



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias

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

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

***Influencia de factores ambientales sobre la programación
fetal de vacas lecheras. Efectos sobre la fertilidad de la
progenie y su relación con la modulación del receptor de
glucocorticoides***

Autora: Lic. Emilia Huber
Directora: Dra. Florencia Rey
Codirectora: Dra. Natalia R. Salvetti

“El aprendizaje es experiencia, todo lo demás es información”

Albert Einstein

Dedico este trabajo

A mi mamá, Silvina, y mis hermanos, Ana y Pedro, mi refugio, mis motores

A mi papá, Esteban, que desde algún lado sé que está orgulloso de mi

Agradecimientos

A mi mamá, por su incondicionalidad

A mi papá, de quien heredé las ganas de seguir aprendiendo siempre

A Vicente, por su amor, paciencia, respeto y compañía, y por impulsarme a sacar lo mejor de mí

A Flor, por invitarme al mundo de la ciencia, y por guiarme en todo el recorrido con paciencia, dedicación y, sobre todo, con cariño

A Nati, por la confianza y por su buena predisposición, atenta a cada cosa que necesité

A Hugo, por la exigencia y sabiduría

A Chelo Signorini, por atender mis consultas con paciencia y claridad

A Aye, mi amiga del alma, por ser mi primera maestra en este trayecto, y, sobre todo, por su incondicionalidad, respeto y cariño

A Fer, que supo convertirse en una gran amiga, por el aguante y por tener siempre la palabra justa

A mis amigos “crotos”, por el día a día, los mates, las risas y las palabras de aliento

A mis compañeros veterinarios, por su colaboración fundamental en la realización de esta tesis, y por enseñarme con paciencia todo lo que aprendí de ciencias veterinarias

A todos mis compañeros del laboratorio y del CMC, por la ayuda cuando la necesité, y por los lindos momentos compartidos

A mis amigas, por el aguante, por la motivación, por estar siempre

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por darme la posibilidad de cursar mis estudios de posgrado y, sobre todo, por las personas que puso en mi camino

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la beca que me permitió realizar el Doctorado

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por los subsidios necesarios para el desarrollo de este trabajo de Tesis

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PROGRAMACIÓN FETAL Y EPIGENÉTICA	2
1.1.1 Concepto de programación fetal.....	2
1.1.2 Concepto de Epigenética.....	3
1.1.3 Tipos de modificaciones epigenéticas.....	4
1.1.4 Herencia y efectos transgeneracionales	6
1.2 INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN LA REPRODUCCIÓN BOVINA.....	9
1.2.1 Estrés calórico y mecanismos de adaptación al mismo	9
1.2.2 Índice de Temperatura y Humedad.....	10
1.2.3 Impacto del estrés por calor en la eficiencia reproductiva bovina	11
1.3 MECANISMOS FISIOLÓGICOS ASOCIADOS AL ESTRÉS Y SU IMPACTO EN EL CICLO ESTRAL BOVINO.....	13
1.3.1 Endocrinología del ciclo reproductivo.....	13
1.3.2 Mecanismos fisiológicos de respuesta a estrés	14
1.3.3 Importancia biológica de los glucocorticoides	16
1.3.4 Acción de los glucocorticoides a nivel ovárico	16
1.4 EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES COMO MEDIADOR DE SU RESPUESTA.....	17
1.4.1 Descripción molecular del receptor de glucocorticoides.....	17
1.4.2 Regulación de la expresión del receptor de glucocorticoides.....	20
1.4.2.1 Regulación por uso diferencial de promotores transcripcionales	20
1.4.2.2 Regulación epigenética de la expresión	21
1.4.3 Mecanismos de acción del receptor de glucocorticoides	23

1.4.3.1	Vías de acción genómicas (clásicas)	23
1.4.3.2	Vías de acción no genómicas: interacción con la cascada de señalización de insulina..	25
1.5	HIPÓTESIS	27
2.	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo general	29
2.2	Objetivos específicos	29
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1	PROCEDIMIENTOS GENERALES EFECTUADOS CON ANIMALES	31
3.1.1	Animales	31
3.1.2	Criterio de selección y exposición a estrés calórico	31
3.1.3	Procedimientos con animales	32
3.1.3.1	Sincronización de celos	32
3.1.3.2	Seguimiento de los animales y recuento de folículos antrales	33
3.1.3.3	Obtención de muestras	34
3.1.3.3.1	Muestras de sangre:	35
3.1.3.3.2	Muestras de aspirado folicular:	35
3.1.3.3.3	Muestras de ovarios completos:	37
3.2	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	38
3.2.1	Procesamiento inicial y almacenamiento	38
3.2.1.1	Muestras de sangre	38
3.2.1.2	Muestras de ovarios completos	38
3.2.1.3	Muestras de aspirado folicular	39
3.2.2	Destino de cada muestra	40
3.2.3	Procesamiento específico según el destino	40
3.2.3.1	Procesamiento de muestras para PCR en tiempo real	40
3.2.3.1.1	Aislamiento de ARN total:	40
3.2.3.1.2	Transcripción reversa:	41
3.2.3.2	Procesamiento de muestras para evaluación de modificaciones epigenéticas	42
3.2.3.3	Procesamiento de muestras para IHQ	42
3.3	CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS	43

3.3.1	Determinación de 17β-estradiol, progesterona, testosterona y cortisol	43
3.3.2	Determinación de insulina	43
3.3.3	Determinación de hormona antimülleriana (AMH)	44
3.4	EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES	45
3.4.1	Diseño de cebadores específicos.....	45
3.4.2	Amplificación por PCR en tiempo real.....	45
3.4.3	Cálculo de la expresión génica relativa	47
3.4.4	Secuenciación	47
3.5	EVALUACIÓN DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS	47
3.5.1	Evaluación del estado de metilación global del ADNg	47
3.5.2	Evaluación del estado de metilación de la región promotora del gen del receptor de glucocorticoides	48
3.5.2.1	Análisis de la secuencia génica del receptor de glucocorticoides.....	48
3.5.2.2	Análisis del grado de metilación de CpGs: EpiTYPER	49
3.5.2.2.1	Fundamento del método:	49
3.5.2.2.2	Explicación de la técnica:.....	49
3.5.2.2.3	Diseño de cebadores específicos:	51
3.5.2.2.4	Análisis de datos:.....	53
3.6	EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES, PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E INTERMEDIARIOS DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA	54
3.6.1	Evaluación de la especificidad de los anticuerpos primarios	54
3.6.1.1	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	54
3.6.1.2	Western blot.....	55
3.6.2	Detección y cuantificación de la expresión proteica: Inmunohistoquímica indirecta	57
3.6.2.1	IHQ indirecta.....	57
3.6.2.2	Análisis digital de imágenes	59
3.7	ENSAYOS IN VITRO	60
3.7.1	Desarrollo de un modelo para el estímulo del cultivo celular con Dexametasona.....	60
3.7.2	Desarrollo de un modelo para el estímulo del cultivo celular con insulina	62

3.7.3	Desarrollo de un modelo para el estímulo combinado del cultivo celular con Dexametasona e insulina	63
3.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
4.	RESULTADOS	66
4.1	DETERMINACIONES HORMONALES Y RECUENTO DE FOLÍCULOS ANTRALES	67
4.1.1	Concentraciones hormonales intrafoliculares	67
4.1.2	Concentraciones hormonales sistémicas y recuento de folículos antrales	69
4.2	EXPRESIÓN GÉNICA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES Y MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS.....	71
4.2.1	Expresión génica del receptor de glucocorticoides y estado de metilación global del ADN.....	71
4.2.2	Estado de metilación de la región promotora del receptor de glucocorticoides.....	72
4.3	EXPRESIÓN PROTEICA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES, PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E INTERMEDIARIOS DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA	77
4.3.1	Expresión proteica del receptor de glucocorticoides y sus moduladores citoplasmáticos	77
4.3.2	Expresión proteica de intermediarios de la cascada de señalización de insulina	79
4.4	ENSAYOS IN VITRO	82
4.4.1	Desarrollo de un modelo para el estímulo del cultivo celular con Dexametasona.....	83
4.4.2	Desarrollo de un modelo para el estímulo del cultivo celular con insulina	84
4.4.3	Desarrollo de un modelo para el estímulo combinado del cultivo celular con Dexametasona e insulina	84
5.	DISCUSIÓN	86
5.1	Impacto del estrés calórico en la programación fetal de parámetros endocrinos y locales relacionados con la respuesta a estrés y la fertilidad	87
5.2	Impacto del estrés calórico prenatal en la expresión génica del receptor de glucocorticoides y la regulación epigenética de la misma.....	95
5.3	Impacto del estrés calórico prenatal en la expresión proteica del receptor de glucocorticoides y sus moduladores citoplasmáticos	100
5.4	Interacción de los mecanismos de respuesta no genómicos del receptor de glucocorticoides con la cascada de señalización de insulina	103
6.	CONCLUSIONES	105
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADNg	ADN genómico
AMH	Hormona anti-Mülleriana
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B2M	B2-microglobulina
BGC-1	Línea de células de la granulosa bovina
CG	Células de la granulosa
CpG	Dinucleótido C-G
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
Ct	Ciclo umbral
Da	Dalton
DAB	3-3'-diaminobencidina
DBD	Dominio de unión a ADN
DEPC	Dietil pirocarbonato
Dex	Dexametasona
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E	Estrógenos
E2	17 β -estradiol
ECLIA	Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FSH	Hormona folículo estimulante
GC	Glucocorticoide
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
HHA	Hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHO	Hipotálamo-hipófisis-ovario

HSP	Proteína de choque térmico
IgG-HRP	Inmunoglobulina G acoplada a la peroxidasa de rábano picante
IHQ	Inmunohistoquímica
Ins	Insulina
IR	Receptor de insulina
IRS	Proteína sustrato del receptor de insulina
ITH	Índice de Temperatura y Humedad
LBD	Ligand binding domain
LF	Líquido folicular
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MMLV	Virus de la leucemia murina
MS-MALDI-TOF	Espectrometría de masas con detector MALDI-TOF
NTD	Dominio N-terminal
OD	Densidad óptica
P1	Período 1 (0-150 días de gestación)
P2	Período 2 (151 días de gestación-nacimiento)
P4	Progesterona
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PK1	Quinasa dependiente de fosfoinositol-1
PGF2α	Prostaglandina F-2 α
PI(4,5)P₂	Fosfatidilinositol-4,5-trifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
p-IR	Receptor de insulina fosforilado
p-IRS	Proteína sustrato del receptor de insulina fosforilada
PKB o AKT	Proteína quinasa B
RFA	Recuento de folículos antrales
RGC	Receptor de glucocorticoides
RIPA	Radioinmunoprecipitación

SAM	S-adenosil Metionina
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
T1	Trimestre 1 de la gestación
T2	Trimestre 2 de la gestación
T3	Trimestre 3 de la gestación
TBS-T	Tris buffer salino conteniendo -Tween 20
5'-UTR	Región 5' no traducida (no codificante)
WB	Western blot

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pares de cebadores utilizados en PCR en tiempo real. N° de acceso de la secuencia de ARNm correspondiente a cada gen, secuencias sentido y antisentido (5'-3') de los oligonucleótidos, tamaño de los amplificadores y temperaturas de anillado.	46
Tabla 2. Anticuerpos, características y condiciones utilizados en la técnica de Western blot.	56
Tabla 3. Anticuerpos cuya especificidad fue demostrada en trabajos previos y citas correspondientes.	56
Tabla 4. Detalle de anticuerpos, dilución y recuperación antigénica realizada en cada caso para la técnica de inmunohistoquímica.	59
Tabla 5. Variables independientes relacionadas al estrés calórico y cálculo de las mismas.	65
Tabla 6. Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y las concentraciones hormonales intrafoliculares.	68
Tabla 7. Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y las concentraciones hormonales sistémicas y el RFA.	69
Tabla 8. Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y la expresión génica del RGC, y el estado de metilación global del ADN.	72
Tabla 9 (parte I). Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y el estado de metilación de distintas posiciones CpG dentro de la región promotora del RGC.	75
Tabla 9 (parte II). Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y el estado de metilación de distintas posiciones CpG dentro de la región promotora del RGC.	76
Tabla 10. Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y la expresión proteica del RGC y sus moduladores citoplasmáticos en células de la granulosa y de la teca.	78
Tabla 11 (parte I). Asociación entre la expresión proteica del RGC y de los intermediarios de la cascada de señalización de insulina.	82
Tabla 11 (parte II). Asociación entre la expresión proteica del RGC y de los intermediarios de la cascada de señalización de insulina.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de las distintas marcas epigenéticas presentes en el ADN.....	5
Figura 2. Esquema que representa la influencia directa de la metilación de islas CpG presentes en regiones regulatorias de los genes, en la expresión génica.....	6
Figura 3. Secuencia temporal de eventos reproductivos en la vida de diferentes mamíferos.	8
Figura 4. Cambios hormonales durante las distintas etapas del ciclo estral en bovinos.....	13
Figura 5. Esquema representativo de las interacciones entre los ejes hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) e hipotálamo-hipófisis-ovarios (HHO).....	15
Figura 6. Estructura proteica del receptor de glucocorticoides.....	18
Figura 7. Representación de la estructura molecular del gen del RGC (NR3C1).	19
Figura 8. Vías genómicas de señalización intracelular del RGC.	24
Figura 9. Esquema representativo de la activación del a vía PI3K/AKT como parte de la vía de señalización de insulina.	26
Figura 10. Protocolo de sincronización de ciclos estrales utilizado en todas las vacas, adaptado del denominado G6G seguido por Ovsynch (Bello <i>et al.</i> , 2006; Díaz <i>et al.</i> , 2015).....	33
Figura 11. Seguimiento de los animales y recuento de folículos antrales realizada por profesionales veterinarios pertenecientes al grupo de trabajo.	34
Figura 12. Técnica de extracción de sangre por punción de vasos coccígeos, realizada por profesionales veterinarios pertenecientes al grupo de trabajo.	35
Figura 13. Aspiración folicular guiada por ultrasonografía utilizando una sonda transvaginal, realizada por profesionales veterinarios pertenecientes al grupo de trabajo.....	36
Figura 14. Técnica de ovariectomía bilateral por flanco izquierdo, realizada por profesionales veterinarios pertenecientes al grupo de trabajo.....	37
Figura 15. Procesamiento de muestras de ovarios completos.	39
Figura 16. Principio químico de la conversión del ADN por bisulfito.....	50
Figura 17. Esquema de la técnica EpiTYPER.....	51
Figura 18. Esquema representativo de amplicones diseñados para evaluar el estado de metilación de la región 5'-UTR del gen del RGC.	52
Figura 19. Esquema que ejemplifica la interpretación de los espectros obtenidos por MS-MALDI-TOF..	53
Figura 20. Esquema de representación del cultivo de células de la línea BGC-1 con distintos estímulos con Dexametasona (Over®).....	61

Figura 21. Esquema de representación del cultivo de células de la línea BGC-1 con distintos estímulos con insulina recombinante (Humulina N, Lilly).	62
Figura 22. Esquema de representación del cultivo de células de la línea BGC-1 con estímulos combinados con Dexametasona (Over [®]) e insulina recombinante (Humulina N, Lilly).	63
Figura 23. Representación de un fragmento de la región promotora proximal 5'-UTR del gen del RGC... 73	
Figura 24. Imágenes representativas de la inmunomarcación de RGC (arriba, izquierda), HSP90 (arriba, derecha) y HSP70 (abajo, izquierda) en folículo preovulatorio y control sin anticuerpo primario (abajo, derecha); aumento total: 400X. G: células de la granulosa, T: células de la teca.	77
Figura 25. Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR total (IR, izquierda) e IR fosforilado (pIR, derecha) en folículo preovulatorio; aumento total: 400X. G: células de la granulosa, T: células de la teca.	80
Figura 26. Imágenes representativas de la inmunomarcación de RGC, IRS1 total (IRS1), IRS1 fosforilado (pIRS1) y PI3K en folículo preovulatorio; aumento total: 400X.	81
Figura 27. Imágenes representativas de la inmunodetección por WB del RGC (90 kDa) en muestras de cultivo celular estimuladas con distintas concentraciones Dexametasona (se detallan arriba), a distintos tiempos (se detallan abajo), y los controles sin estímulo.	83
Figura 28. Imágenes representativas de la inmunodetección por WB de PI3K- α p85 (85 kDa) en muestras de cultivo celular estimuladas con distintas concentraciones de insulina (se detallan arriba), a distintos tiempos (se detallan abajo), y los controles sin estímulo.	84
Figura 29. Imagen representativa de la inmunodetección por WB de RGC (90 kDa), PI3K- α p85 (85 kDa) y β -actina (43 kDa) en muestras de cultivo celular estimuladas con distintas combinaciones de Dexametasona (Dex) e insulina (Ins), a distintos tiempos (se detalla abajo), y los controles sin estímulo (Basal).	85

RESUMEN

El estrés por calor en vacas gestantes es capaz de inducir modificaciones epigenéticas en el embrión en desarrollo, que luego se manifestarán en variaciones fenotípicas/funcionales en el animal adulto y en su descendencia. Ante situaciones de estrés en mamíferos, se estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides, los cuales pueden tener un efecto inhibitorio sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y el ciclo estral en hembras. El objetivo de esta tesis fue evaluar la expresión del receptor de glucocorticoides (RGC) considerando probables modificaciones epigenéticas y estudiar la modulación de sus respuestas no genómicas, en ovarios de bovinos gestados en diferentes condiciones ambientales y de manejo. Nuestros resultados muestran que la concentración plasmática de cortisol fue mayor en animales cuyas madres tuvieron estrés calórico en los primeros meses de gestación, y menor en las hijas de vacas que tuvieron estrés calórico en los últimos meses de gestación. No hallamos asociación entre la exposición a ITH elevados durante el desarrollo intrauterino y la expresión génica ni proteica del RGC en el folículo preovulatorio. No obstante, sí observamos un patrón de metilación alterado en sitios CpG dentro de la región promotora de su gen, cercanos a sitios de reconocimiento de factores de transcripción. Además, hallamos una asociación de la expresión proteica del RGC con los intermediarios de señalización intracelular IRS1 total y fosforilada y con PI3K en folículo preovulatorio de los animales estudiados. Estos resultados aportan información novedosa acerca del impacto del estrés calórico prenatal en la modulación de la expresión del RGC y sus respuestas no genómicas a nivel ovárico.

ABSTRACT

Heat stress in pregnant cows is able to induce epigenetic modifications in the developing embryo, which, in turn, would lead to phenotypic and functional variations in the adult animal and its offspring. In response to stress, mammals stimulate the synthesis and secretion of glucocorticoids, which may have detrimental effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and the female estrous cycle. The objective of this thesis was to evaluate glucocorticoid receptor (GCR) expression, considering probable epigenetic modifications, and to study its non-genomic response modulation, in ovaries from cows gestated under different environmental and managing conditions. Our results show that plasma cortisol concentration was higher in cows from dams that had heat stress during first months of gestation, and it was lower in cows from dams that had heat stress during late stages of gestation. We found no association between high ITH exposure during intrauterine development and GCR gene or protein expression in preovulatory follicles. However, we did find alterations in GCR gene promoter region methylation patterns, specifically at CpG sites around transcription factors binding sites. Additionally, we found association between GCR protein expression and expression of intracellular signaling intermediates, specifically IRS1 (total and phosphorylated forms) and PI3K, in preovulatory follicles of cows in this study. These results provide novel information about prenatal heat stress impact on GCR expression modulation and its non-genomic response at the ovarian level.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PROGRAMACIÓN FETAL Y EPIGENÉTICA

1.1.1 Concepto de programación fetal

El desarrollo prenatal es un proceso altamente regulado y organizado, caracterizado por la plasticidad en la diferenciación celular y organogénesis. Si bien esta plasticidad es indispensable para el desarrollo normal, hace que el embrión sea altamente sensible a señales ambientales que pueden alterar la estructura y función de los tejidos de forma permanente (Khulan y Drake, 2012). Se denomina **programación fetal** al conjunto de estímulos recibidos durante la vida intrauterina capaces de interferir en el desarrollo fetal y tener consecuencias permanentes en la vida adulta (Barker *et al.*, 1993a; Lucas *et al.*, 1999; Drake y Walker, 2004; Abruzzese *et al.*, 2018). En otras palabras, la exposición a determinados factores en este período de susceptibilidad puede modular los procesos del desarrollo involucrados en la formación del fenotipo adulto.

Una serie de estudios epidemiológicos retrospectivos realizados en humanos entre los 80' y 90', señalaron la asociación entre el tamaño al nacer (y otros parámetros fenotípicos similares), y la predisposición a padecer enfermedades cardiovasculares en adultos. Inicialmente, Barker *et al.* (1990) demostraron una asociación de la tasa de crecimiento fetal (relación entre tamaño de la placenta y tamaño del individuo al nacer) con la presión arterial en el adulto y la prevalencia de hipertensión. Luego éstos y otros autores demostraron la asociación del tamaño y peso al nacer con la tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular (Barker *et al.*, 1993a), y con la tolerancia a glucosa y prevalencia de diabetes tipo 2 (Hales *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 1992). Estas inferencias realizadas a partir de estudios observacionales dieron origen a la hipótesis de que existe una **programación fetal** de ciertas enfermedades.

Por otro lado, en numerosos estudios experimentales se sugiere que la manipulación del ambiente intrauterino del feto puede alterar distintos procesos y funciones en adultos (Barker, 1998; Drake y Walker, 2004). Langley-Evans *et al.* (1994) observaron que dietas de bajo contenido proteico en ratas preñadas provocaron hipertensión en las crías. Se ha reportado que la exposición a pesticidas durante el período de embriogénesis de ratas, afecta la composición celular de los testículos y el número y supervivencia de células germinales, comprometiendo su

capacidad espermatogénica en el adulto (Skinner *et al.*, 2010). En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo en colaboración con autores de la Universidad de Michigan (EEUU), se observó que la exposición de ovejas gestantes a elevadas concentraciones de andrógenos provoca un desbalance en la expresión de receptores de hormonas esteroides (Ortega *et al.*, 2009), de proteínas relacionadas al equilibrio proliferación/apoptosis (Salvetti *et al.*, 2012) y de enzimas claves de la maquinaria esteroideogénica (Padmanabhan *et al.*, 2014) en el ovario de las crías. Además, en un estudio reciente realizado en bovinos, se observó que la dieta ingerida por la madre durante la gestación influye sobre el crecimiento folicular fetal de las crías hembras, lo cual podría afectar el tamaño de la reserva folicular de la prole (Weller *et al.*, 2016).

Dado que los distintos tejidos maduran en distintas etapas de la vida fetal, los potenciales efectos del ambiente a largo plazo dependerán de la etapa en la que ocurran (Barker *et al.*, 1993b). Si la exposición ocurre durante etapas críticas del desarrollo, como ser la diferenciación de los tejidos, puede alterar la actividad genómica inherente a dicho proceso (Skinner *et al.*, 2010). Consecuentemente, podrá verse afectado el perfil de expresión génica y la fisiología asociada. Además, teniendo en cuenta que la línea germinal participa en la transmisión de información entre generaciones, el embrión es especialmente sensible a las influencias del ambiente durante la diferenciación sexual de las gónadas en la línea germinal, pudiendo modular características heredables (Skinner *et al.*, 2010).

1.1.2 Concepto de Epigenética

Debido a que el genoma es química y evolutivamente estable, la habilidad del ambiente de influir en el fenotipo en general no involucra mutaciones (Skinner *et al.*, 2010). Actualmente, está bien establecido que los **mecanismos epigenéticos** son los que permiten relacionar el genotipo con el ambiente para generar un determinado fenotipo (Jirtle y Skinner, 2007; Skinner *et al.*, 2010; Waddington, 2012; Allis y Jenuwein, 2016; Ispada *et al.*, 2018). El término **epigenética** fue originalmente definido por C. Waddington (2012, reimpreso de la versión original de 1942) como “*interacciones entre los genes y el ambiente, que dan origen al fenotipo*”. En la actualidad, se

refiere al conjunto de mecanismos que modulan los patrones de expresión génica sin alterar la secuencia de nucleótidos del ADN, y son heredables (Murrell *et al.*, 2005; Jirtle y Skinner, 2007; Allis y Jenuwein, 2016).

En condiciones normales, las distintas células de un organismo, con el mismo contenido genético, tendrán un determinado fenotipo en un determinado momento, que dependerá de su patrón de expresión génica, es decir, de cuales genes se expresan y cuales se mantienen reprimidos. Esto es regulado por las distintas marcas epigenéticas y les otorga a las células una función específica, diferenciada del resto. Aunque dichas marcas son potencialmente reversibles, se mantienen durante las divisiones mitóticas (Surani, 2001; Hunter, 2012).

1.1.3 Tipos de modificaciones epigenéticas

Las marcas epigenéticas incluyen metilaciones en el ADN; modificaciones covalentes en las histonas como metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones; y ARN no codificantes (Figura 1) (Jirtle y Skinner, 2007; Hunter, 2012; Saffery y Novakovic, 2014). Son incorporadas por una variedad de enzimas que interactúan de manera compleja para modular la estructura de la cromatina y, consecuentemente, la disponibilidad del ADN a interacciones con la maquinaria transcripcional (Razin, 1998; Murrell *et al.*, 2005; Jirtle y Skinner, 2007; Hunter, 2012).

En mamíferos, la metilación del ADN es la principal modificación epigenética. Ocurre en dinucleótidos CpG -par de nucleótidos formado por citosina seguida inmediatamente por guanina- y suele asociarse al silenciamiento génico (Razin, 1998; Weaver *et al.*, 2004). En este proceso, los grupos metilo provienen de S-adenosilmetionina (SAM) y son incorporados covalentemente por ADN metil-transferasas en el carbono ubicado en la posición 5' de la citosina de pares CpG (Meaney *et al.*, 2007; Ispada *et al.*, 2018), en ambas hebras del ADN (Turner *et al.*, 2008).

En la molécula de ADN, los pares CpG no son frecuentes, sino que están mayormente distribuidos en *clusters* denominados **islas CpG** a lo largo del genoma. Estas contienen más de 50 % de GC, alta frecuencia de CpG respecto al resto del genoma, y se encuentran principalmente en la región 5'-no codificante de los genes (5'-UTR), corriente arriba del codón de inicio de la traducción (Gardiner-Garden y Frommer, 1987; Turner *et al.*, 2008). Además, frecuentemente, las islas CpG contienen regiones promotoras de los genes (Turner *et al.*, 2008), involucradas en la regulación de la transcripción génica.

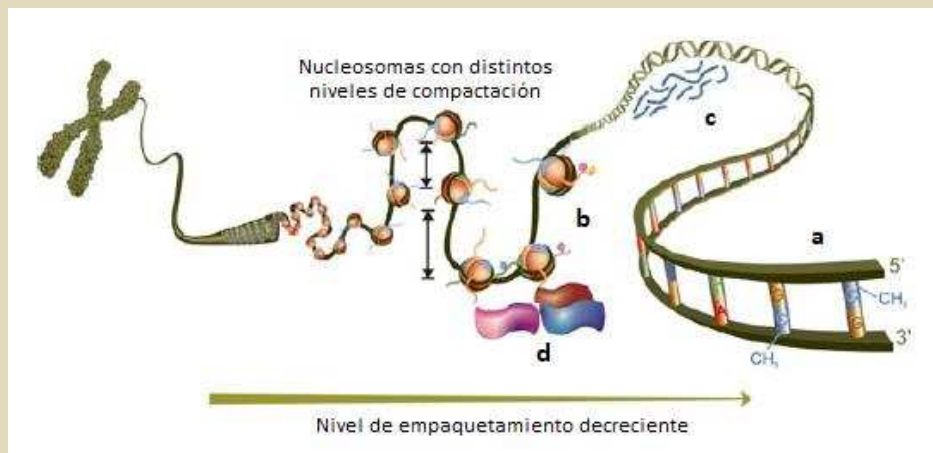


Figura 1. Esquema representativo de las distintas marcas epigenéticas presentes en el ADN.

a) Metilación de residuos de citosina dentro de dinucleótidos CpG, en ambas hebras del ADN; b) Modificaciones covalentes en las histonas presentes en los nucleosomas, tales como metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y ubiquitinaciones, que influyen en el nivel de compactación de los mismos; c) ARNs no codificantes; d) Asociación de complejos remodeladores de la cromatina con el ADN o con otras marcas epigenéticas. Adaptada de Saffery y Novakovic (2014).

La hipermetilación de pares CpG en regiones reguladoras de los genes provoca una disminución en la expresión génica (Figura 2). Esto puede ocurrir por mecanismos directos o indirectos. En mecanismos directos, la metilación de un sitio CpG presente en un sitio de reconocimiento de un factor de transcripción, impide el reconocimiento del sitio y por lo tanto inhibe la unión de dicho factor de transcripción. En mecanismos indirectos, la metilación conlleva a la formación de un complejo multiproteico de represión que induce cambios en la acetilación de histonas,

interfiriendo con la estructura general de la cromatina y, consecuentemente, con la accesibilidad de los factores de transcripción (Levine *et al.*, 1992; Razin, 1998; Meaney *et al.*, 2007). Por el contrario, la hipometilación de regiones regulatorias de los genes usualmente se asocia con una estructura de la cromatina transcripcionalmente activa (Weaver *et al.*, 2004).

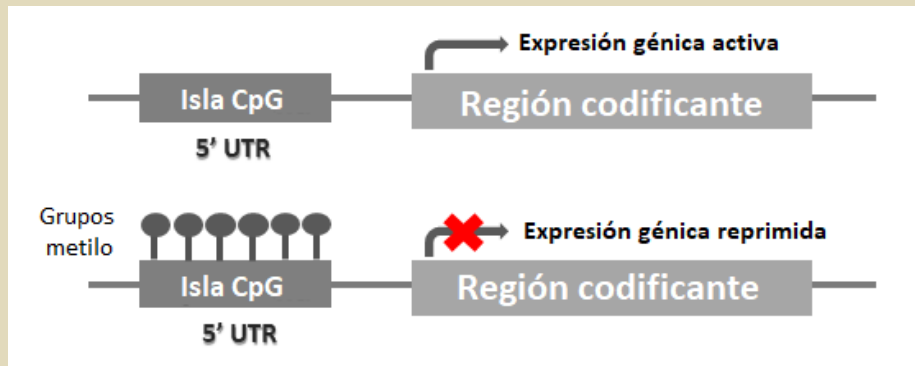


Figura 2. Esquema que representa la influencia directa de la metilación de islas CpG presentes en regiones regulatorias de los genes, en la expresión génica.

La hipometilación (arriba) de CpGs presentes en la región 5'-UTR de un gen permite la transcripción y consecuente expresión génica del mismo. Por el contrario, la hipermetilación (abajo) de CpGs en dicha región reguladora perjudica la accesibilidad de la maquinaria transcripcional, reprimiendo de esta manera la expresión génica.

1.1.4 Herencia y efectos transgeneracionales

Como se mencionó previamente, uno de los períodos más sensibles a la influencia del ambiente durante el desarrollo embrionario en mamíferos es la diferenciación sexual de las gónadas en la línea germinal. A medida que el embrión atraviesa las sucesivas divisiones celulares, el mismo es sometido a la *reprogramación epigenética*, que involucra la demetilación y re-metilación del ADN (Dobbs *et al.*, 2013), y es un proceso esencial para la transformación de los gametos (alto grado de metilación) secuencialmente en células totipotentes y luego pluripotentes (Ispada *et al.*, 2018). La programación epigenética se inicia durante la migración de las células germinales primordiales en el embrión, cuando son sometidas a la demetilación. Una vez iniciada la

diferenciación sexual de las gónadas, estas células se desarrollan en un linaje femenino o masculino, y el ADN se re-metila de manera específica acorde al sexo (Surani, 2001; Skinner *et al.*, 2010).

El establecimiento de la reserva de folículos primordiales en mamíferos ocurre durante la vida fetal o neonatal, a tiempos que dependen de cada especie. En todos los casos, la formación de la reserva de células germinales comienza con la migración de las células germinales primordiales hacia la cresta genital. En hembras, las ovogonias proliferan, atravesando sucesivas divisiones mitóticas para luego convertirse en ovocitos primarios que inician la profase de su primera división meiótica. La meiosis se detiene al final de la profase I y los ovocitos primarios son rodeados por una capa de células somáticas (pre-granulosa) aplanadas, formándose así los folículos primordiales (Fortune *et al.*, 2013; Monniaux *et al.*, 2014). De esta manera, se establece el pool de folículos primordiales que luego podrán activarse y crecer para continuar el desarrollo folicular. En humanos y rumiantes, todas estas etapas ocurren durante la vida fetal, y se solapan entre sí. Es decir, algunos folículos primordiales pueden comenzar a crecer y desarrollarse aun cuando no se ha terminado de establecer la reserva completa. En bovinos, la diferenciación de los folículos primordiales comienza entre los 90 y 140 días de gestación (Figura 3) (Yang y Fortune, 2008; Evans *et al.*, 2012). Además, se ha establecido que, en el ovario bovino en desarrollo, el número de ovogonias alcanza un máximo y desciende rápidamente por apoptosis en el último tramo de la vida fetal, hasta alcanzar un número de folículos al nacimiento que es altamente variable entre individuos (Evans *et al.*, 2012; Cushman y Perry, 2019).

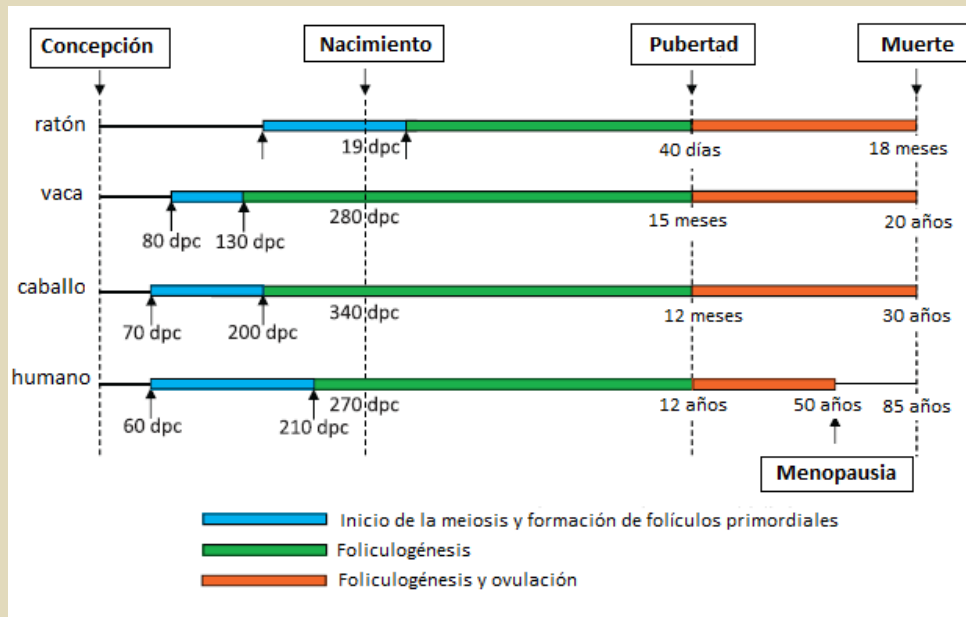


Figura 3. Secuencia temporal de eventos reproductivos en la vida de diferentes mamíferos. Se muestran las distintas etapas del desarrollo reproductivo para cada uno: inicio de meiosis y formación de la reserva de folículos primordiales (celeste), foliculogénesis previa a la pubertad (verde) y foliculogénesis seguida de ovulación posterior a la pubertad (naranja). Adaptada de Monniaux *et al.* (2014).

Cualquier modificación durante el desarrollo fetal puede ser permanente y afectar los patrones de expresión génica del adulto. Por esta razón, los factores ambientales que afectan a las hembras gestantes pueden impactar en la línea germinal de las crías en desarrollo, y de esta manera modular características fenotípicas que serán transmitidas transgeneracionalmente (Skinner *et al.*, 2010).

1.2 INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN LA REPRODUCCIÓN BOVINA

La eficiencia reproductiva es el principal factor que afecta la eficiencia económica y productiva de establecimientos de producción lechera. Esto se debe a que mejores índices reproductivos disminuyen los costos de inseminación y tratamientos veterinarios y se reducen los intervalos parto-parto y parto-concepción (Westwood *et al.*, 2002; Diskin *et al.*, 2003; Ismael *et al.*, 2016). En las últimas décadas, se ha observado un fenómeno global de aumento de la producción láctea que ocurre paralelamente a una disminución en la eficiencia reproductiva (Lucy, 2001; Cattaneo *et al.*, 2014; Berry *et al.*, 2016; Rearte *et al.*, 2018). Si bien se ha reportado una asociación antagónica directa entre estos parámetros, en la bibliografía se ha discutido la influencia de otros factores en la disminución de la eficiencia reproductiva. Numerosos estudios postulan que la nutrición, prácticas de manejo, enfermedades posparto o las elevadas temperaturas ambientales ejercen mayor efecto sobre parámetros reproductivos que la alta producción láctea (Fuquay, 1981; Hansen y Aréchiga, 1999; Roth *et al.*, 2001a; Gallardo *et al.*, 2005; Vanselow *et al.*, 2016). Dado que las vacas lecheras ya poseen elevadas cargas de calor interno inherentes a la alta producción, las consecuencias de acumular mayor calor se exacerban cuando la temperatura y humedad ambiental aumentan (Polsky y von Keyserlingk, 2017).

1.2.1 Estrés calórico y mecanismos de adaptación al mismo

Se puede definir al **estrés** como una situación de amenaza a la homeostasis, el complejo y dinámico equilibrio armónico del medio interno que mantiene a los organismos vivos (Chrousos y Gold, 1992). En particular, el **estrés calórico** se define como la suma de fuerzas externas a un animal homeotermo que provoca un aumento de la temperatura corporal por sobre el estado de reposo, generando una respuesta fisiológica (Hansen y Aréchiga, 1999; Polsky y von Keyserlingk, 2017).

La *adaptación al estrés* implica diversos procesos focalizados en contrarrestar los efectos de los estresores, con el objetivo de reestablecer la homeostasis (Chrousos y Gold, 1992). En particular,

frente a situaciones de estrés calórico, la respuesta adaptativa en mamíferos tiende a mantener la temperatura corporal normal. En el caso de la vaca lechera, para tratar de hacer frente a los efectos negativos del ambiente y mantener su equilibrio térmico, la mayoría de los ajustes realizados implican disipación del calor al ambiente y reducción de la producción de calor interno. Esto incluye procesos físicos tales como reducción en la ingesta de materia seca, aumento en el consumo de agua, además de la activación de procesos fisiológicos como ser jadeo, sudoración, aumento en la frecuencia cardíaca y respiratoria, reducción de pérdida de agua en orina y materia fecal, cambios en la tasa metabólica, y disminución de la producción (McDowell *et al.*, 1976; Armstrong, 1994; Kadzere *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2005; Polsky y von Keyserlingk, 2017). Este balance entre la ganancia y pérdida de calor es lo que se define como “termorregulación” (Fuquay, 1981) y es esencial para controlar los procesos fisiológicos y reacciones bioquímicas implicados en el metabolismo. La habilidad para regular la temperatura es una adaptación evolutiva que permite a los homeotermos funcionar a pesar de las variaciones en la temperatura ambiente (Kadzere *et al.*, 2002).

1.2.2 Índice de Temperatura y Humedad

Se entiende por “zona termoneutral” al rango de temperaturas ambientales entre los cuales se observa una mínima producción de calor corporal a temperaturas corporales normales (Kadzere *et al.*, 2002). Superando este rango, aún a bajos niveles de humedad, la temperatura ambiental efectiva está por encima de los niveles de confort de las vacas lecheras, de manera que éstas disminuyen su capacidad de termorregular adecuadamente (Armstrong, 1994; Kadzere *et al.*, 2002).

La *temperatura ambiental efectiva* es determinada por cuatro factores: la temperatura del aire, la humedad relativa, el movimiento del aire y la radiación solar (Armstrong, 1994). Es por ello que, actualmente, para describir las condiciones ambientales que conducen a estrés térmico, se utiliza el **Índice de Temperatura y Humedad (ITH)**, que contempla la temperatura ambiente y la humedad relativa (Fuquay, 1981; Armstrong, 1994; Kadzere *et al.*, 2002; Polsky y von Keyserlingk,

2017). Este concepto fue introducido por Thom (1959) como “Índice de discomfort” para describir la sensación de calor ambiental en humanos, y luego se ha demostrado su eficacia como índice para evaluar el impacto del estrés térmico en vacas lecheras (De Rensis *et al.*, 2015). Actualmente, se toman los valores de ITH como determinantes para la toma de decisiones respecto al manejo del ganado, siendo provisto por las estaciones meteorológicas cercanas a los establecimientos lecheros.

En la bibliografía se categorizan los valores de ITH de manera de estimar los niveles de estrés calórico: se considera que valores de ITH hasta 71 están en la zona de confort o zona termoneutral; ITH entre 72 y 79 implican estrés térmico leve; entre 80 y 90, estrés térmico moderado; y mayores a 90, estrés térmico severo (Armstrong, 1994; Gallardo *et al.*, 2005; Polsky y von Keyserlingk, 2017).

1.2.3 Impacto del estrés por calor en la eficiencia reproductiva bovina

Como fue mencionado previamente, el estrés calórico es un factor altamente perjudicial en la eficiencia reproductiva del rodeo lechero. Durante los meses estivales se ha observado una disminución de la tasa de concepción de entre un 20 y un 30 %, con evidentes patrones estacionales de detección de celo debido a una reducción en la duración e intensidad del estro (Hansen y Aréchiga, 1999; De Rensis y Scaramuzzi, 2003; Polsky y von Keyserlingk, 2017).

En particular, esta reducción en el comportamiento de celo puede relacionarse con la disminución en el consumo de materia seca que ocurre en situaciones de estrés por calor (Westwood *et al.*, 2002). Otros autores lo relacionan con el estado de letargo físico que forma parte de los mecanismos adaptativos de la vaca ante las situaciones de estrés por calor. Se sugiere que es la propia reducción de actividad física la que limita los aumentos adicionales en la producción de calor interno del animal inherentes al estro, contribuyendo indirectamente a reducir los índices reproductivos por afectar la tasa de detección de celo (Hansen y Aréchiga, 1999; Polsky y von Keyserlingk, 2017).

El estrés calórico afecta específicamente parámetros reproductivos tales como la diferenciación folicular y altera la composición del líquido folicular, en particular la concentración de ácidos grasos, conllevando menor calidad del ovocito y comprometiendo la funcionalidad de las células de la granulosa (Vanselow *et al.*, 2016). Roth *et al.* (2001a) encontraron que la exposición de vacas a estrés calórico en etapas tempranas del desarrollo folicular tuvo un efecto posterior en la esteroidogénesis en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales y preovulatorios, lo cual puede influir en la viabilidad del ovocito. La comunicación intercelular entre células de la granulosa y del cumulus, o entre estas últimas y el ovocito, también puede estar alterada, lo cual podría perjudicar la competencia ovocitaria (Roth *et al.*, 2001b). Además, el estrés por calor puede reducir el tamaño del folículo dominante y alterar los niveles hormonales del líquido folicular y la sangre (Hansen y Aréchiga, 1999). En particular, se observó una menor concentración de 17β -estradiol en ambos fluidos, concomitante con un ciclo estral más largo, atribuyendo la mayor duración del mismo a la falta de apoyo estrogénico para desencadenar el mecanismo luteolítico a través de la producción de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) uterina (Wilson *et al.*, 1998).

Por otro lado, los mecanismos de adaptación que los homeotermos experimentan cuando se encuentran bajo estrés por calor pueden comprometer otras funciones fisiológicas importantes (Hansen y Aréchiga, 1999). Un ejemplo lo representa la redistribución de la circulación sanguínea hacia la periferia como forma de disipación del calor hacia el ambiente. En animales gestantes, esto conlleva a una disminución del flujo sanguíneo hacia la placenta, por lo cual puede retrasarse el crecimiento fetal. Además, se ha reportado en distintos estudios la asociación entre la mortalidad embrionaria temprana y el estrés por calor, dependiendo de la severidad del mismo (Hansen y Aréchiga, 1999; De Rensis y Scaramuzzi, 2003). Esto puede asociarse a alteraciones en la secreción hormonal endometrial, que provocan luteólisis prematura y pérdida del embrión (De Rensis y Scaramuzzi, 2003).

Diversos estudios demuestran que prácticas de manejo tales como la presencia de sectores con sombra, o el uso de aspersores y ventiladores, pueden atenuar los efectos del estrés por calor en vacas lecheras (Valtorta *et al.*, 1996; Gallardo *et al.*, 2005). No obstante, si bien de esta manera se puede mejorar el confort de los animales y la producción, estas prácticas suelen aplicarse en

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

1.3 MECANISMOS FISIOLÓGICOS ASOCIADOS AL ESTRÉS Y SU IMPACTO EN EL CICLO ESTRAL BOVINO

1.3.1 Endocrinología del ciclo reproductivo

El ciclo estral bovino consiste en dos fases principales: fase luteal y fase folicular (Figura 4). La fase luteal es el período que sigue a la ovulación y es donde se presenta un cuerpo lúteo estructural y funcionalmente completo, mientras que la fase folicular es el período que sigue a la lisis del cuerpo lúteo (luteólisis) hasta la ovulación. La fase folicular se caracteriza por un cambio de dominancia de progesterona a dominancia de estrógenos, como resultado de la regresión del cuerpo lúteo y desarrollo de un folículo preovulatorio, y en ella ocurre la maduración final del mismo y la ovulación (Peter *et al.*, 2009).

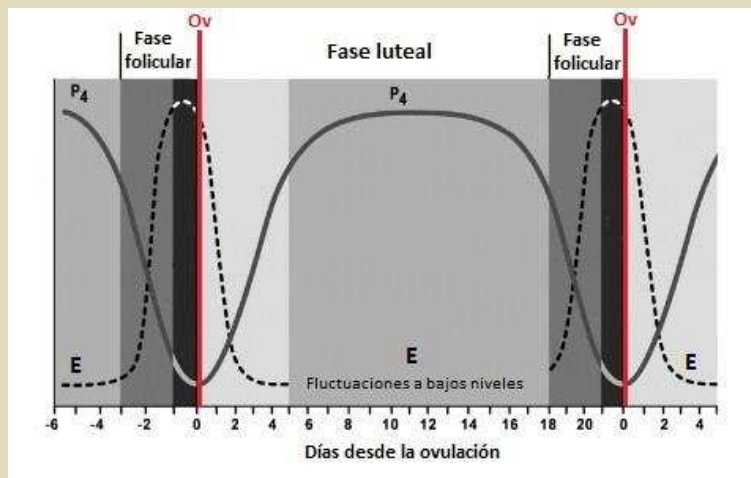


Figura 4. Cambios hormonales durante las distintas etapas del ciclo estral en bovinos. E: estrógenos; P4: progesterona; Ov: ovulación. Adaptada de Peter *et al.* (2009).

Estos procesos dependen de una secuencia cuidadosamente sincronizada de eventos endocrinos, regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) (Liptrap, 1993; Kalantaridou *et al.*, 2004). En condiciones normales, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual estimula la producción hipofisaria de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). Éstas luego ejercen su acción en los ovarios, estimulando la secreción de estrógenos y progesterona (Figura 5) (Chrousos *et al.*, 1998). Todo el eje es regulado por un sistema de retroalimentación negativa/positiva, según la etapa del ciclo.

Durante el crecimiento folicular, las células de la granulosa de la pared folicular secretan estrógenos por acción de la FSH, a partir de precursores producidos por las células de la teca regulados por la LH. Los niveles crecientes de estrógenos circulantes ejercen una retroalimentación positiva sobre la secreción de GnRH en el hipotálamo y sobre la sensibilidad hipofisaria a la misma. Esto resulta en un aumento de la LH circulante, que culmina con la ovulación (Liptrap, 1993).

Los procesos de regulación por retroalimentación a nivel del hipotálamo-hipófisis, los cambios bruscos de concentraciones hormonales y los cambios morfológicos en el ovario que caracterizan al ciclo reproductivo de la hembra, lo hacen especialmente vulnerable al estrés (Liptrap, 1993).

1.3.2 Mecanismos fisiológicos de respuesta a estrés

Como se mencionó anteriormente, ante situaciones de estrés, se producen cambios en el sistema nervioso central y periférico de los mamíferos que ayudan al individuo a adaptarse y preservar la especie, incluyendo la inhibición de comportamientos biológicamente costosos tales como la reproducción, alimentación y crecimiento (Chrousos *et al.*, 1998). De hecho, ante situaciones de estrés crónico suficientemente severo, el sistema reproductor de la hembra puede inhibirse completamente (Liptrap, 1993; Chrousos *et al.*, 1998).

A nivel fisiológico, el estrés provoca la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). El hipotálamo sintetiza y secreta hormona liberadora de corticotrofina (CRH) hacia la adenohipófisis, donde estimula la secreción de hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y,

consecuentemente, la síntesis y secreción de cortisol en la corteza adrenal. En bovinos, al igual que en humanos, el cortisol es el principal glucocorticoide (GC) y regula la actividad basal del eje HHA y la respuesta a estrés por retroalimentación negativa (Cain y Cidlowski, 2015; Amweg *et al.*, 2017). Además, en nuestro grupo de trabajo demostramos que el ovario bovino es capaz de sintetizar y secretar GCs en respuesta a ACTH (Amweg *et al.*, 2011, 2017). Esto indica que podría haber una respuesta endocrina local a estrés en el ovario, lo cual podría tener un impacto negativo en los mecanismos regulatorios de la función ovárica. Al activarse el eje HHA por estrés, ejerce un efecto inhibitorio sobre el eje HHO y la reproducción. Tanto la CRH como los GCs inhiben la secreción de GnRH en el hipotálamo por retroalimentación negativa. Además, los GCs tienen un efecto inhibitorio directo sobre la secreción de LH en la hipófisis y de estradiol en el ovario, y un efecto indirecto inhibiendo la respuesta a estradiol en sus tejidos blanco (Chrousos *et al.*, 1998). Se esquematizan estos procesos en la Figura 5.

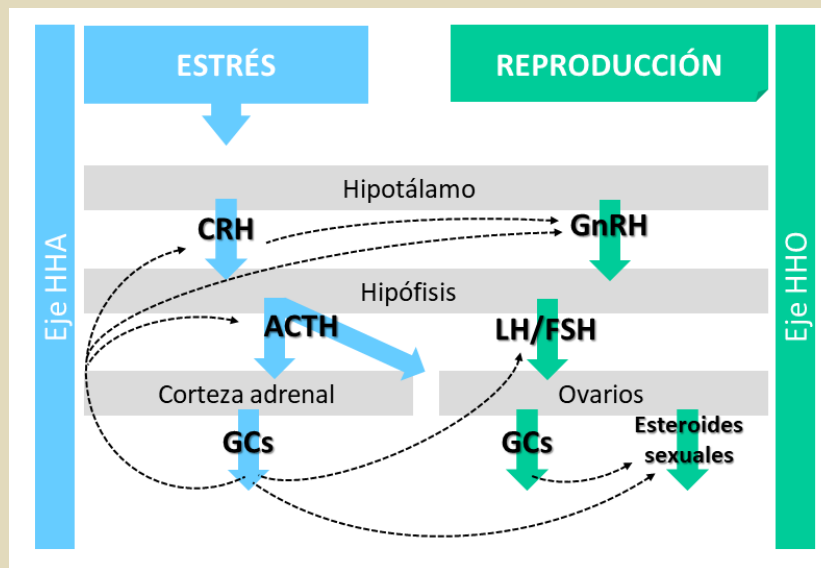


Figura 5. Esquema representativo de las interacciones entre los ejes hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) e hipotálamo-hipófisis-ovarios (HHO).

Las líneas discontinuas indican efecto inhibitorio. CRH: hormona liberadora de corticotrofinas; ACTH: hormona adrenocorticotrófica; GCs: glucocorticoides; GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona foliculoestimulante.

1.3.3 Importancia biológica de los glucocorticoides

Los GCs son hormonas esteroides sintetizadas y secretadas principalmente por la corteza adrenal bajo regulación del eje HHA, que desempeñan un papel fundamental en la fisiología normal y la respuesta al estrés. Asimismo, actúan como reguladores en una gran variedad de procesos biológicos tales como desarrollo y diferenciación, respuesta inmune, reproducción, metabolismo lipídico y sensibilidad a insulina (Newton, 2000; Tetsuka, 2007; Rose y Herzig, 2013; Cain y Cidlowski, 2015). Es por ello que alteraciones en sus respuestas son capaces de ocasionar distintos trastornos de salud tanto en humanos como en animales. En bovinos, se destacan las alteraciones a nivel reproductivo, como la persistencia folicular y el desarrollo de quistes foliculares (Amweg *et al.*, 2013, 2016). En humanos, se encuentra el síndrome metabólico, que incluye una serie de anormalidades tales como resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, obesidad, dislipidemia e hipertensión arterial, que en su conjunto aumentan el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares (Rose y Herzig, 2013; Martins *et al.*, 2017).

Por otro lado, es ampliamente reconocido que los GCs son potentes reguladores de la respuesta inmune e inflamatoria, que actúan modulando directa o indirectamente la producción de moléculas como citoquinas, quemoquinas y moléculas de adhesión (Newton, 2000; Amweg *et al.*, 2016). En este sentido, los GCs son capaces de inducir la expresión de moléculas antiinflamatorias y de inhibir la expresión de moléculas proinflamatorias, a través de distintos mecanismos (Stahn y Buttgereit, 2008).

1.3.4 Acción de los glucocorticoides a nivel ovárico

Considerando que los ovarios se encuentran dentro de los órganos blanco de los GCs, se ha descrito su acción a nivel ovárico en varias especies (Tetsuka, 2007; Scarlet *et al.*, 2017), donde ejercen tanto efectos estimulatorios como inhibitorios en las funciones ováricas (Tetsuka *et al.*, 2010). Por un lado, se ha demostrado que el cortisol aumenta la síntesis de progesterona en células de la granulosa murinas (Hsueh y Erickson, 1978) y bovinas (Kawate *et al.*, 1993) en cultivos suplementados con FSH. Asimismo, estos autores demostraron que los GCs suprimen la

actividad aromatasas P450 inducida por FSH y, consecuentemente, la secreción de estrógenos al medio de cultivo. Kawate *et al.* (1993) demostraron que el cortisol causa una disminución en el número de receptores de LH en células de la granulosa.

Por otro lado, en estudios recientes de embriología en bovinos (da Costa *et al.*, 2016) y equinos (Scarlet *et al.*, 2017), se demostró que la adición de cortisol mejora la maduración de ovocitos *in vitro*, con la consecuente adquisición de competencia ovocitaria, y el desarrollo embrionario *in vitro* posterior.

La ovulación ha sido descrita como un proceso inflamatorio, debido a los cambios hemodinámicos y bioquímicos agudos que ocurren en el sitio de ruptura folicular (Hillier y Tetsuka, 1998). Es por ello que se ha sugerido que el aumento de GCs a nivel ovárico que ocurre concomitantemente al pico preovulatorio del LH, es un mecanismo fisiológico para limitar el daño inflamatorio causado en el sitio de ovulación (Hillier y Tetsuka, 1998; Acosta *et al.*, 2005; Scarlet *et al.*, 2017). En estudios previos de nuestro grupo de trabajo, se determinó una mayor concentración intrafolicular de cortisol en quistes foliculares bovinos en relación a folículos preovulatorios controles (Amweg *et al.*, 2013), así como una mayor expresión de su receptor específico en la pared folicular de quistes respecto de folículos terciarios controles (Amweg *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren una posible respuesta inflamatoria aumentada en ovarios de animales con enfermedad quística ovárica, lo cual podría inhibir el proceso ovulatorio, con la consecuente persistencia folicular y desarrollo de quistes foliculares.

1.4 EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES COMO MEDIADOR DE SU RESPUESTA

1.4.1 Descripción molecular del receptor de glucocorticoides

A nivel celular, los GCs son capaces de atravesar la membrana plasmática, y ejercen sus acciones biológicas a través de su unión en el citosol al receptor de glucocorticoides (RGC). El mismo pertenece a la superfamilia de receptores hormonales nucleares dependientes de ligando, los

cuales comparten una estructura modular de 3 dominios principales: un dominio N-terminal (*N-terminal Domain*: NTD), un dominio central de unión a ADN (*DNA Binding Domain*: DBD), y un dominio C-terminal de unión al ligando (*Ligand Binding Domain*: LBD); estos últimos separados por una región flexible o “bisagra” (H). Dentro de ellos existen regiones de activación de la función que interaccionan con la maquinaria transcripcional y con correguladores, regiones de localización nuclear y de dimerización. Además, la proteína es modificada postraduccionalmente por fosforilaciones, ubiquitinaciones, acetilaciones y sumoilaciones que regularan su funcionalidad (Figura 6) (Newton, 2000; Cain y Cidlowski, 2015).



Figura 6. Estructura proteica del receptor de glucocorticoides.

Se esquematizan los dominios principales: Dominio N-Terminal (NTD), de unión a ADN (DBD), y de unión al ligando (LBD). Además, se representan la región bisagra (H), las regiones asociadas con la interacción con correguladores (AF1, independiente de hormonas, y AF2, dependiente de la unión a hormonas), con la dimerización y la localización nuclear, y los sitios de modificación postraduccional por fosforilación (P), sumoilación (S), ubiquitinación (U) y acetilación (A). Adaptada de Cain y Cidlowski (2015).

El RGC es codificado por el gen NR3C1 (del inglés: *Nuclear Receptor Subfamily 3 group C member 1*), cuya estructura es particularmente compleja (Figura 7). En la región 5' existen múltiples exones 1 no codificantes, que mantienen cierta homología entre especies, cada uno de los cuales tiene asociado un sitio de inicio de la transcripción y un promotor. Estos se transcriben alternativamente de manera tejido-específica, empalmándose al exón 2 y generando una variedad de transcritos primarios. Los exones 2 a 9 comprenden la región codificante del gen. El exón 2 tiene un codón de terminación inmediatamente corriente arriba del primer codón de inicio, de manera que la heterogeneidad de la región 5' no codificante (5'-UTR) no es traducida,

por lo tanto no afecta la secuencia ni la estructura proteica del RGC (Figura 7a) (Turner *et al.*, 2006, 2010; Alt *et al.*, 2010).

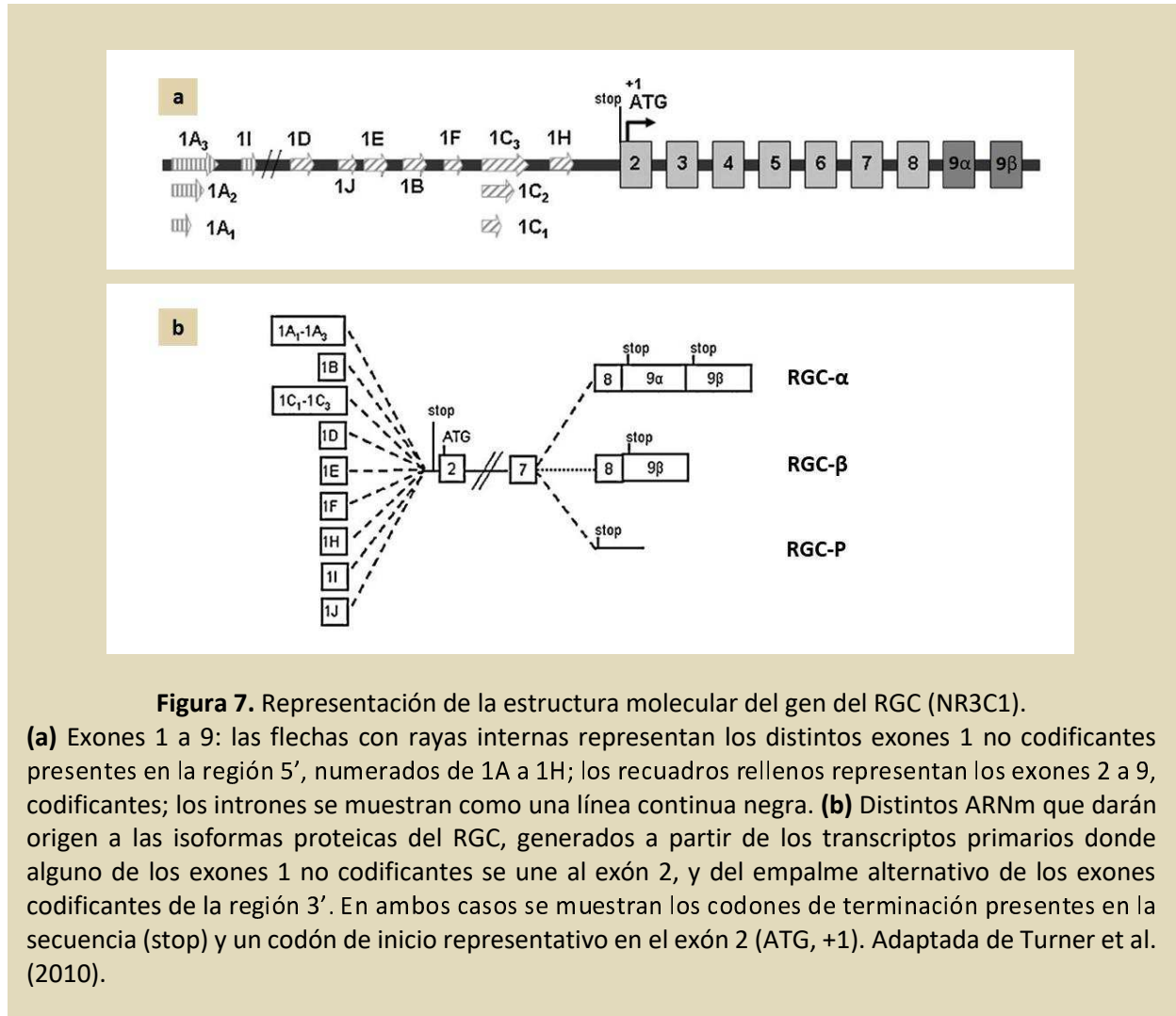


Figura 7. Representación de la estructura molecular del gen del RGC (NR3C1).

(a) Exones 1 a 9: las flechas con rayas internas representan los distintos exones 1 no codificantes presentes en la región 5', numerados de 1A a 1H; los recuadros rellenos representan los exones 2 a 9, codificantes; los intrones se muestran como una línea continua negra. **(b)** Distintos ARNm que darán origen a las isoformas proteicas del RGC, generados a partir de los transcritos primarios donde alguno de los exones 1 no codificantes se une al exón 2, y del empalme alternativo de los exones codificantes de la región 3'. En ambos casos se muestran los codones de terminación presentes en la secuencia (stop) y un codón de inicio representativo en el exón 2 (ATG, +1). Adaptada de Turner *et al.* (2010).

Existen múltiples isoformas proteicas del RGC como producto del empalme alternativo en el ARN mensajero (ARNm) de los exones codificantes, y, además, de los diferentes sitios de inicio de la traducción presentes en la secuencia del exón 2. El perfil de isoformas expresadas en las células de un determinado tejido reflejará, en parte, su sensibilidad y especificidad a los GCs. El **RGC-α** es la isoforma bioactiva completa que interviene en la mayoría de los efectos descritos de los GCs, y se produce a partir de un ARNm en el cual el exón 8 se une al inicio del exón 9. La isoforma

RGC- β se produce a partir de un ARNm en el cual el exón 8 se une a una secuencia más corta del exón 9, y RGC-P carece tanto del exón 8 como del 9; por esta razón ambos contienen dominios de unión a ligando truncados y no son capaces de unir GCs. Sus funciones no se encuentran bien definidas, aunque se ha propuesto que RGC- β actúa como regulador negativo del RGC- α , mientras que RGC-P es la isoforma predominante en células tumorales resistentes a GCs (Figura 7b) (Alt *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2010; Cain y Cidlowski, 2015).

1.4.2 Regulación de la expresión del receptor de glucocorticoides

Numerosos factores afectan la sensibilidad tisular a GCs por regulación de la actividad del RGC, tales como las distintas isoformas proteicas existentes, la interacción con coactivadores y correpresores, y, principalmente, los niveles de expresión proteica, determinados por los niveles de expresión génica (Turner *et al.*, 2010). El RGC se expresa prácticamente en todas las células del organismo, pero sus niveles de ARNm y proteína varían considerablemente entre los distintos tejidos (Turner y Muller, 2005). En células eucariotas, la expresión génica es regulada a nivel transcripcional y postranscripcional por procesos tales como la condensación de la cromatina, metilación del ADN, iniciación de la transcripción, empalme alternativo del ARN, modulación de la estabilidad del ARNm, entre otros.

1.4.2.1 Regulación por uso diferencial de promotores transcripcionales

Sumado a los mecanismos citados de regulación de la expresión, ciertos genes, entre ellos el del RGC, poseen múltiples promotores asociados con sitios de inicio de la transcripción alternativos dentro de exones no codificantes en la región 5'. El uso alternativo de alguno de los múltiples exones 1 de un modo tejido-específico ha sido reconocido como otro importante mecanismo de control de la expresión génica a nivel transcripcional, que aporta una regulación fina de los niveles locales de RGC (Turner *et al.*, 2010; Cao-Lei *et al.*, 2011). Se han identificado factores de transcripción que se unen específicamente a alguno de estos exones 1, incluido el propio RGC,

constituyendo un mecanismo de autorregulación por retroalimentación que puede ser positiva o negativa dependiendo del tipo celular (Turner *et al.*, 2006; Presul *et al.*, 2007). Además, teniendo en cuenta que la mayoría de los exones 1 no codificantes del RGC se encuentran dentro de una isla CpG corriente arriba del sitio de inicio de la traducción (Turner *et al.*, 2006; Alt *et al.*, 2010), la unión de estos factores de transcripción puede estar regulada por la metilación del ADN en sus sitios de unión dentro de los promotores (Bird, 2002).

En el humano, la *región promotora proximal*, que contiene a la mayoría de los exones 1 no codificantes, se encuentra dentro de una isla CpG de aproximadamente 3,1 kpb, que inicia una 5 kpb corriente arriba del exón 2. Además, existe una *región promotora distal*, ubicada aproximadamente 30 kpb corriente arriba del exón 2, que contiene dos de los exones 1 no codificantes. Se ha demostrado por alineamientos de secuencias que la isla CpG proximal se encuentra conservada entre distintas especies, habiendo una homología del 68% entre ratas y humanos, 88% entre ratas y ratones, hasta un 99% entre humanos y chimpancés (Turner *et al.*, 2006). Si bien las secuencias de los distintos exones 1 están identificadas tanto en humanos como en ratas (Turner y Muller, 2005), no sucede lo mismo para bovinos. No obstante, existe una homología de 77 % entre las regiones promotoras proximales del RGC humano y bovino, la cual llega a ser de hasta el 84 % para uno de los exones 1. En la región codificante la homología es del 90 % entre estas especies (Turner *et al.*, 2006).

1.4.2.2 Regulación epigenética de la expresión

Como se mencionó previamente en la sección 1.1.3, la metilación de dinucleótidos CpG presentes en regiones regulatorias de los genes se asocia con el silenciamiento de dichos genes, por impedimento directo del acceso de la maquinaria transcripcional o por inactivación de la cromatina. Además, la regulación epigenética de la expresión génica está íntimamente relacionada con la influencia del medio ambiente en la programación fetal o temprana del fenotipo adulto. En particular, con respecto al RGC, cambios en sus niveles de expresión son capaces de tener impactos significativos en la respuesta a estrés y la regulación del eje HHA por

retroalimentación (Turner *et al.*, 2010; Witzmann *et al.*, 2012), así como en trastornos de salud relacionados a la reproducción, metabolismo o al sistema inmune, en los cuales participa el RGC. En estudios experimentales en ratas (Weaver *et al.*, 2004), se observó que el comportamiento materno (cuidado versus no cuidado de las crías) tiene un impacto negativo en la metilación de uno de los promotores del gen del RGC en el hipocampo de dichas crías, y que esto causa una alteración en los niveles de expresión del receptor, provocando efectos profundos y prolongados en la respuesta a estrés de la descendencia. De manera similar, Lilycrop *et al.* (2007) encontraron que la restricción nutricional de ratas preñadas se relacionó con la hipometilación de uno de los promotores y con la sobreexpresión del RGC en el hígado de las crías, lo cual podría causar enfermedades metabólicas en el adulto. Asimismo, en un estudio realizado en ovinos, Stevens *et al.* (2010) hallaron que la restricción nutricional de madres preñadas alrededor del momento de la concepción se asoció con hiperacetilación de histonas e hipometilación del promotor del RGC en hipotálamo de las crías, y con un incremento en la expresión del RGC en ese tejido en comparación con los controles. Además, estos autores postularon que las alteraciones encontradas en la expresión del RGC podrían relacionarse con la programación fetal de la predisposición a la obesidad en las crías. Por otro lado, en estudios realizados en humanos, se observó que la exposición a depresión o ansiedad materna durante el tercer trimestre de vida fetal se relacionó con una mayor metilación del promotor del gen del RGC en un sitio de unión para un factor de transcripción, determinado en células mononucleares de sangre de cordón umbilical tomada al momento del nacimiento. Además, la hipermetilación en este sitio se relacionó con una elevada respuesta a estrés en los bebés a los 3 meses de edad, determinada por los niveles de cortisol luego de la exposición a un estresor (Oberlander *et al.*, 2008). Otros autores encontraron que pacientes con enfermedades autoinmunes como el lupus, poseen una menor expresión del RGC- α en células mononucleares de sangre periférica que se correlaciona significativamente con la hipermetilación de la región promotora del gen, en comparación con pacientes sanos (Chen *et al.*, 2015). En otros estudios, se determinó que pacientes con trastornos mentales asociados a la respuesta a estrés, como la depresión persistente, presentan una metilación elevada de uno de los promotores del gen del RGC en sangre periférica, en

comparación con pacientes sanos, aunque no se halló asociación entre esta hipermetilación y la expresión génica del RGC o los niveles plasmáticos de cortisol (Nantharat *et al.*, 2015).

En bovinos, cuya estructura del gen del RGC posee alta homología con la del humano (Turner *et al.*, 2006), es posible que un patrón de metilación diferencial en el mismo, originada por una programación fetal alterada, provoque cambios en la expresión del RGC que resulten en una respuesta alterada a GCs.

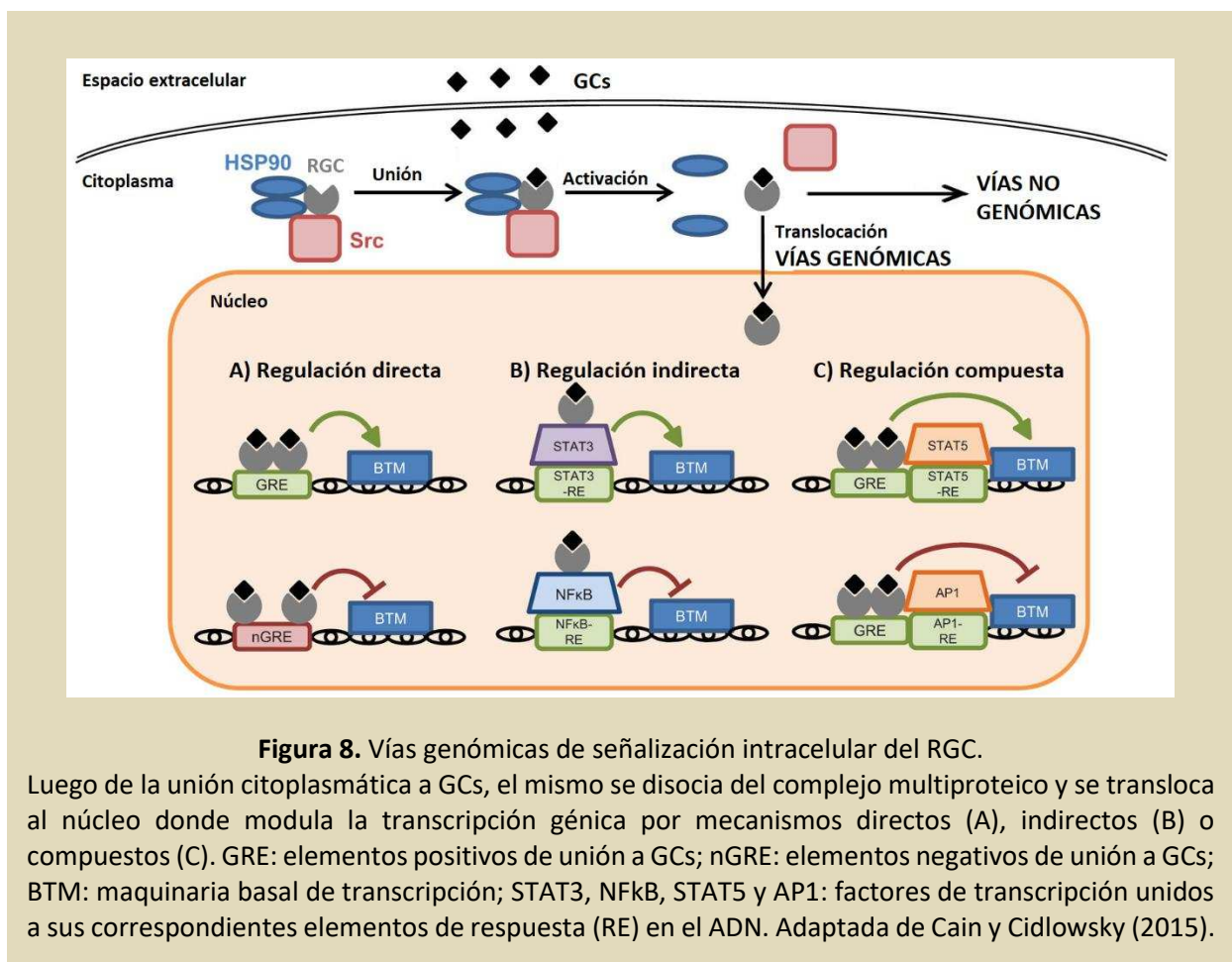
1.4.3 Mecanismos de acción del receptor de glucocorticoides

En ausencia de ligando, el RGC permanece inactivo en el citoplasma formando un complejo multiproteico, que incluye principalmente proteínas de choque térmico que actúan como chaperonas moleculares (HSP90 y HSP70), co-chaperonas organizadoras (como p23 y p60) y tirosin-quinazas (como c-SRC) (Newton, 2000; Grad y Picard, 2007; Cain y Cidlowski, 2015). En este complejo, que posee alta afinidad de unión al ligando, HSP90 es indispensable para la unión del RGC a la hormona, mientras HSP70 y el resto de las proteínas cumplen distintas funciones en la conformación y estabilización del complejo proteico (Dittmar y Pratt, 1997; Grad y Picard, 2007). La unión de GCs al LBD provoca un cambio conformacional en el receptor, causando la disociación del complejo multiproteico y su consecuente activación para cumplir sus funciones moleculares.

1.4.3.1 Vías de acción genómicas (clásicas)

Por un lado, la activación del RGC desenmascara sus secuencias de localización nuclear, de manera que el mismo es capaz de translocarse al núcleo y actuar por **vías de acción genómicas**, regulando la expresión de una amplia variedad de genes blanco, lo cual ocurre por distintos mecanismos. El RGC puede interaccionar directamente con el ADN, en secuencias consenso específicas denominadas “elementos de respuesta a GCs”, en forma de homodímero o como dos

monómeros separados, e inducir o reprimir la transcripción génica, respectivamente (Figura 8A). Asimismo, puede unirse a otros factores de transcripción, los cuales interactúan con sus correspondientes secuencias consenso en el ADN, y modular de esta manera la transcripción génica indirectamente (Figura 8B). Por último, el RGC puede unirse a elementos de respuesta a GCs y a la vez unirse a otros factores de transcripción, regulando la transcripción génica en un mecanismo compuesto (Figura 8C) (Newton, 2000; Limbourg y Liao, 2003; Cain y Cidlowski, 2015).

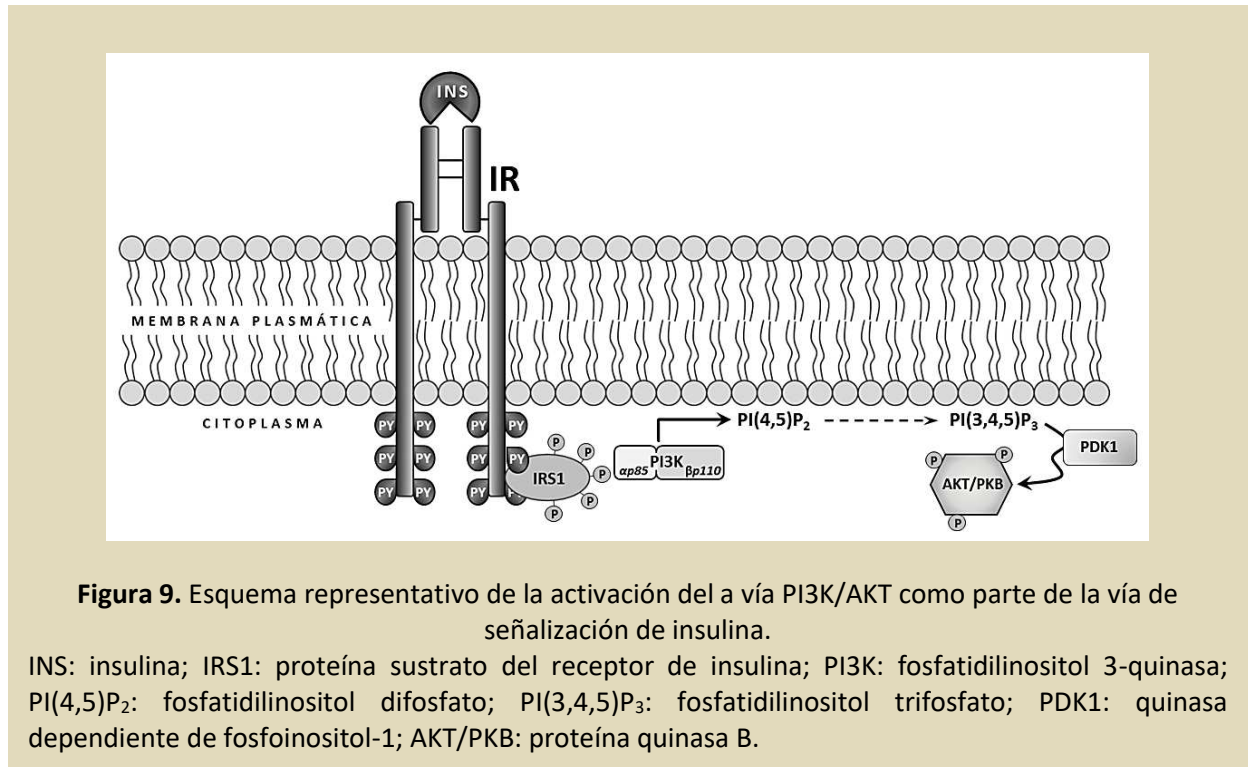


1.4.3.2 Vías de acción no genómicas: interacción con la cascada de señalización de insulina

Sumado a sus efectos genómicos de regulación de la transcripción, se ha descrito que el RGC actúa por **vías de acción no genómicas** (Stahn y Buttgereit, 2008; Cain y Cidlowski, 2015). El RGC citosólico activado por GCs es capaz de interactuar con proteínas involucradas en otras vías de señalización intracelular, como por ejemplo la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (PKB, también llamada AKT) (Limboung y Liao, 2003). La vía PI3K/AKT está asociada a la regulación de numerosos procesos celulares, tales como la regulación del ciclo celular, la supervivencia celular, la respuesta inmune innata, entre otros (Manning y Cantley, 2007). Se ha demostrado, por ejemplo, que el RGC monomérico es capaz de interactuar con la subunidad reguladora α 85 de PI3K y activarla, lo cual fue detectado como un aumento en la cantidad de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), sin intervención de mecanismos genómicos. Asimismo, se demostró que esto también provoca activación de AKT y, consecuentemente, la activación de enzimas involucradas en la protección tisular y vasodilatación. No obstante, los mecanismos específicos involucrados no han sido dilucidados (Hafezi-Moghadam *et al.*, 2002; Limbourg *et al.*, 2002).

Una importante vía de señalización en la que participan PI3K y AKT es la **vía de señalización de insulina** (Figura 9). El receptor de insulina (IR) es un receptor transmembrana heterotetramérico formado por dos subunidades α (extracelulares) y dos subunidades β (transmembrana/intracelulares). La unión de insulina a la porción extracelular del IR provoca un cambio conformacional que permite que se autofosforile en sus dominios citosólicos, dando inicio una cascada de fosforilaciones intracelulares que regulan las acciones de la insulina en tejidos periféricos. Esto ocurre por dos vías principales: la vía PI3K/AKT, que es responsable de la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina, y vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), que regula la expresión de ciertos genes y coopera con la vía PI3K para controlar el crecimiento y la diferenciación celular. En la activación de la vía PI3K/AKT, el IR autofosforilado recluta y fosforila a proteínas sustrato del IR (IRS), que luego interactúan con la subunidad reguladora α 85 de PI3K, de manera que se activa la subunidad catalítica β p110 que cataliza la producción de PIP₃ a partir de PIP₂ en la membrana plasmática. El PIP₃ actúa como segundo mensajero y permite el reclutamiento y activación de la quinasa dependiente de

fosfoinositol-1 (PDK1), la cual es capaz de fosforilar y activar a AKT (figura 9) (Taniguchi *et al.*, 2006; Yunn *et al.*, 2018).



La relación entre factores metabólicos y la fertilidad en hembras ha sido ampliamente estudiada y descrita en bovinos, ovinos, roedores y humanos (Diskin *et al.*, 2003; Dupont y Scaramuzzi, 2016). La insulina es una hormona clave que puede modular la función reproductiva tanto a nivel del eje HHA como a nivel ovárico (Bossart *et al.*, 2010). En bovinos, los bajos niveles de insulina observados en el posparto pueden perjudicar la reanudación de la ciclicidad aumentando los intervalos parto-concepción (Diskin *et al.*, 2003). A nivel local, en el ovario, se ha demostrado que interviene directa e indirectamente en el desarrollo folicular, esteroidogénesis y proliferación de las células de la granulosa y de la teca (Bossart *et al.*, 2010; Hein *et al.*, 2015). En nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que trastornos reproductivos como la enfermedad quística ovárica en bovinos se asocian con variaciones en la expresión de intermediarios de la cascada de señalización de insulina y de la esteroidogénesis, indicando un posible estado de insulino-

resistencia local que compromete la funcionalidad ovárica y la fertilidad (Hein *et al.*, 2015; Gareis *et al.*, 2018). Estos resultados motivaron la profundización de los estudios de manera de evaluar posibles efectos tempranos manifestados en situaciones de persistencia folicular que llevarían a problemas reproductivos. Es por ello que evaluamos en un modelo de persistencia folicular desarrollado en nuestro laboratorio (Díaz *et al.*, 2015), la expresión de los principales intermediarios de señalización intervinientes en la respuesta a insulina en células de la pared de folículos con diferentes días de persistencia (Gareis, 2019). Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias en la activación de los intermediarios indicando que la respuesta a insulina podría verse alterada desde estadios de persistencia tempranos.

1.5 HIPÓTESIS

Considerando los resultados de numerosos estudios desarrollados en nuestro laboratorio y por otros autores que muestran la relevancia de los mecanismos de señalización y su alteración frente a diferentes situaciones de estrés, nos propusimos evaluar las implicancias del estrés calórico ejercido en madres gestantes sobre la reproducción bovina de la progenie. Las numerosas condiciones de estrés calórico a las cuales se encuentran sometidas las vacas en los rodeos lecheros y las posibles consecuencias heredables, pueden ejercer efectos deletéreos sobre la fertilidad debido a desbalances en los ejes HHA e HHO, íntimamente relacionados en la regulación de la funcionalidad ovárica y metabólica. Es por ello que, en el presente trabajo de tesis, nos planteamos como **hipótesis general** que *“Las condiciones ambientales y de manejo desfavorables a las que se encuentran sometidas las vacas lecheras durante la gestación producen modificaciones epigenéticas en la región promotora del gen del receptor de glucocorticoides en el ovario de las crías. En consecuencia, se altera la expresión del receptor, y con ello la respuesta a estos esteroides, comprometiendo la funcionalidad ovárica de la progenie y afectando así la fertilidad de las hembras.”*

2. OBJETIVOS

Para evidenciar la hipótesis expuesta, se propusieron los siguientes objetivos de trabajo:

2.1 Objetivo general

Evaluar la regulación epigenética de la expresión del receptor de glucocorticoides y estudiar la modulación de sus respuestas no genómicas, en ovarios de bovinos gestados en diferentes condiciones ambientales y de manejo.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudiar la expresión del receptor de glucocorticoides en tejidos ováricos de vacas gestadas bajo diferentes condiciones ambientales y de manejo.
2. Evaluar posibles mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la expresión del receptor de glucocorticoides en muestras de ovarios de vacas asignadas a los diferentes grupos estudiados e identificar relaciones entre las modificaciones epigenéticas y la expresión del receptor de glucocorticoides.
3. Evaluar las respuestas no genómicas desencadenadas por los glucocorticoides considerando la expresión de proteínas intermediarias en la respuesta a insulina capaces de ser modulados por acción de los glucocorticoides.
4. Establecer la influencia ejercida por el receptor de glucocorticoides en la señalización de insulina en estudios *in vitro* determinando relaciones con los estudios llevados a cabo con las muestras *in vivo*.
5. Correlacionar las posibles alteraciones en la fertilidad de las hembras con modificaciones epigenéticas originadas por una programación fetal alterada debido a estrés ambiental durante la gestación y con potenciales respuestas no genómicas mediadas por el receptor de glucocorticoides.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES EFECTUADOS CON ANIMALES

Todos los procedimientos efectuados con animales fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) de Santa Fe, bajo las resoluciones número 157/13y 220/15; 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*. 3° ed. Federation of Animal Science Societies, 2010).

3.1.1 Animales

Se trabajó con establecimientos lecheros de la zona de influencia de la FCV-UNL, dentro de la cuenca lechera santafesina, ubicados en la zona centro-norte de las provincias de Santa Fe y Córdoba. Se contó con el aval de los productores y médicos veterinarios de los establecimientos de procedencia de los animales. Se utilizaron vacas adultas multíparas de la raza Holando argentino en lactancia o con indicación de rechazo por motivos no reproductivos. En todos los casos se realizó una anamnesis completa de los animales y el rodeo, corroborando que sean clínicamente sanos y sin alteraciones reproductivas. La alimentación estuvo basada en pastura de alfalfa, silaje de maíz, alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales fueron realizados por profesionales veterinarios pertenecientes al grupo de trabajo.

3.1.2 Criterio de selección y exposición a estrés calórico

Para evaluar las diferentes condiciones ambientales durante la gestación, se seleccionaron aquellas vacas con las que se contaba con registro de su fecha de nacimiento, a partir del cual se estimó la fecha de servicio efectivo, considerando una gestación total de 282 días. Se consideró el ITH en distintos momentos del desarrollo de cada animal, de manera de contemplar su exposición a estrés calórico en las distintas etapas de vida intrauterina. Para ello, teniendo en

cuenta el período de establecimiento de la reserva folicular ovárica en bovinos descrito previamente (aproximadamente hasta los 140 días de gestación), se dividió la gestación en dos períodos: **período 1** (P1, 0-150 días) y **período 2** (P2, 151 días-nacimiento). Además, se realizaron análisis dividiendo la gestación en 3 trimestres: (T1, 0-90 días; T2, 91-180 días; T3, 181 días-nacimiento).

Los registros diarios de ITH fueron proporcionados por INTA, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Para cada animal, se calcularon los **promedios de ITH** y el **porcentaje de días con ITH \geq 72** en la gestación completa, en cada período y en cada trimestre. Se tomó como línea de corte el valor de ITH=72, debido a que es el punto a partir del cual se considera que los animales sufren estrés calórico, tal como fue descrito previamente. Además, se calculó para cada caso un “**Índice de exposición**”, con el objetivo de discriminar la exposición continua a estrés calórico de la exposición en intervalos cortos, teniendo en cuenta que, en la cuenca lechera santafesina, sobre todo durante los meses de verano, es frecuente la ocurrencia de “olas de calor”, definidas como *al menos 3 días con temperaturas por fuera de los niveles de confort* (Valtorta *et al.*, 2008). Para el cálculo de este índice se consideraron sólo los días con ITH \geq 72 que se presentaron en “ciclos” de 3 o más días consecutivos, y se relativizaron al número de ciclos (el cálculo se detalla más adelante). De esta manera, un mayor índice de exposición representa que hubo mayor cantidad de días con ITH \geq 72, o que éstos se presentaron en un menor número de ciclos, es decir, que estos ciclos u olas de calor fueron más largos.

3.1.3 Procedimientos con animales

3.1.3.1 Sincronización de celos

Se sincronizaron los ciclos estrales de todos los animales de manera que estuvieran en proestro al momento de obtener las muestras. Para ello, se aplicó el protocolo adaptado del denominado G6G seguido por Ovsynch (Figura 10) (Bello *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2015). Se determinó como día 0 del protocolo al día del inicio de la sincronización (figura 10). Ese día se aplicaron dos dosis de PGF2 α (150 μ g D + cloprostenol; Enzaprost DC, Biogénesis-Bagó, Garín, Buenos Aires, Argentina)

separadas por 12 horas para inducir la luteólisis (am-pm) (Hatler *et al.*, 2008), seguido de una dosis de GnRH (20 µg acetato de buserelina; Gonaxal, Biogénesis-Bagó, Argentina) dos días después para estimular la ovulación de los folículos dominantes presentes. Seis días posteriores a la primera dosis de GnRH (día 8), las vacas recibieron una segunda dosis de GnRH. Siete días más tarde (día 15), recibieron las dos últimas dosis de PGF2 α , separadas por 12 horas, para inducir la luteólisis. El día 18 del protocolo, día previo al esperado de ovulación, se realizó la ovariectomía o aspiración del líquido folicular, según corresponda.

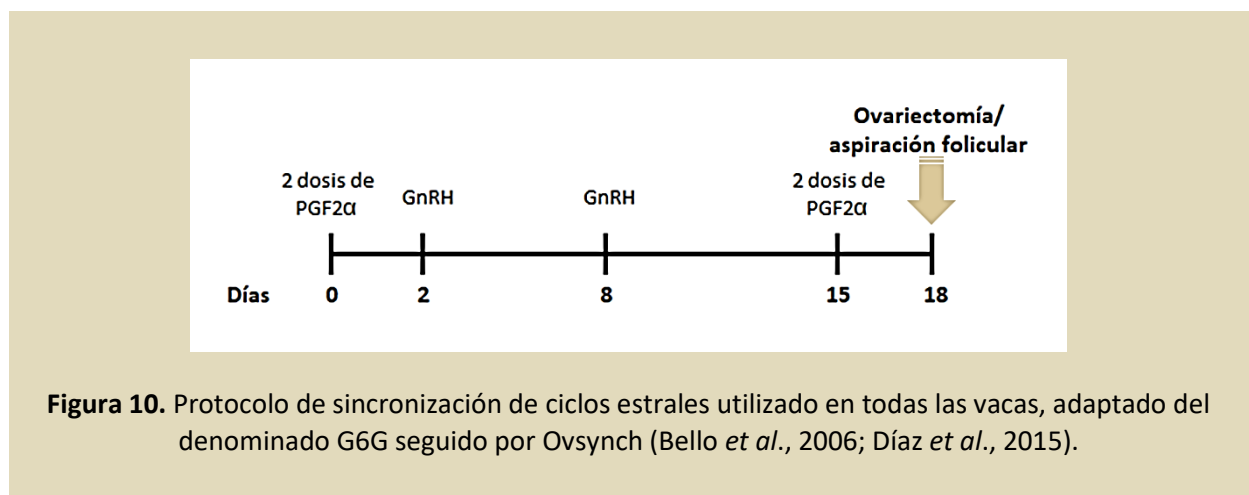


Figura 10. Protocolo de sincronización de ciclos estrales utilizado en todas las vacas, adaptado del denominado G6G seguido por Ovsynch (Bello *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2015).

3.1.3.2 Seguimiento de los animales y recuento de folículos antrales

Durante todo el protocolo, los animales fueron controlados por palpación rectal y ultrasonografía de manera de tener un seguimiento de los cambios ocurridos durante el ciclo estral. Para ello se utilizó un equipo de ultrasonografía digital Mindray Z6 Vet provisto con un transductor lineal transrectal.

En la etapa de reclutamiento folicular, se realizó el recuento de folículos antrales (RFA), parámetro que se utiliza como indicador de fertilidad en las hembras (Ireland *et al.*, 2001). Para ello, se realizó la ultrasonografía transrectal, y se contabilizaron todos los folículos antrales

iguales o mayores a 3 milímetros presentes en ambos ovarios, siguiendo la técnica descrita por Jimenez-Krassel *et al.* (2017).

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

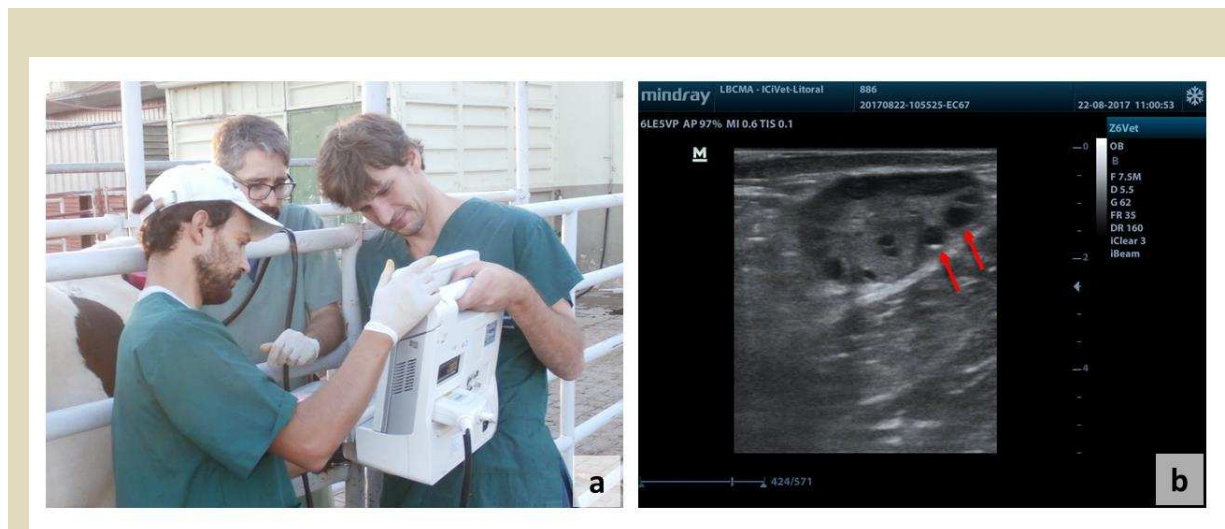


Figura 11. Seguimiento de los animales y recuento de folículos antrales realizada por profesionales veterinarios pertenecientes al grupo de trabajo.

a) Técnica de ultrasonografía transrectal. **b)** Imagen ultrasonográfica representativa de un ovario en la etapa de evaluación de la dinámica folicular. Las flechas rojas indican ejemplos de folículos contabilizados.

3.1.3.3 Obtención de muestras

A partir de la sincronización de las vacas, el día previo al esperado de ovulación se tomaron dos tipos de muestras principales: **ovarios completos** (de 26 vacas *con indicación de rechazo* por motivos no reproductivos) y **líquido folicular** (LF, de 41 vacas *en lactancia* sin indicación de rechazo). La obtención de ovarios completos se efectuó mediante ovariectomía bilateral por flanco izquierdo, mientras que la extracción del líquido folicular se realizó por aspiración folicular guiada por ecografía, utilizando la técnica descrita por Seneda *et al.* (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, niveles de producción, manejo e índices reproductivos, para un posterior análisis en trabajos paralelos dentro de nuestro grupo de investigación.

3.1.3.3.1 Muestras de sangre:

En todos los casos se tomaron muestras de sangre con anticoagulante al momento de la ovariectomía o de la aspiración de LF (Figura 12). Se utilizó la técnica de extracción a través de punción de vasos coccígeos, para lo cual 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.

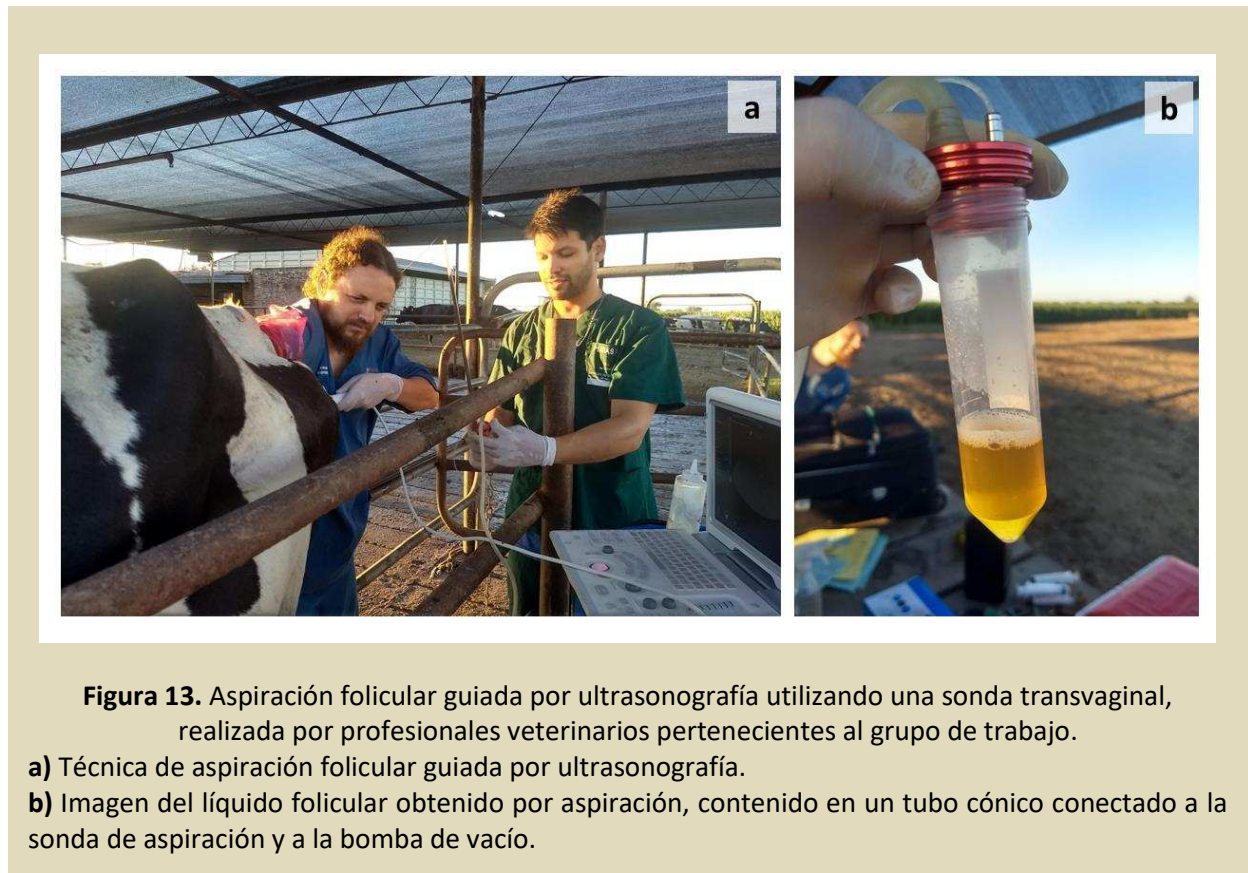


Figura 12. Técnica de extracción de sangre por punción de vasos coccígeos, realizada por profesionales veterinarios pertenecientes al grupo de trabajo.

3.1.3.3.2 Muestras de aspirado folicular:

Para la aspiración del LF se adaptó la técnica descrita por Seneda *et al.* (2003) que ha sido ampliamente utilizada en la obtención de muestras para estudios moleculares (Figura 13). Para

tal 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 20 G 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 vagina, y el ovario previamente localizado por tacto rectal, fue acercado 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 se trasladó al laboratorio para su procesamiento.



3.1.3.3.3 Muestras de ovarios completos:

La obtención de los ovarios completos fue realizada mediante ovariectomía bilateral por laparotomía (abordaje por flanco izquierdo) (Figura 14). El procedimiento se desarrolló con el animal en pie, sedándolo vía intramuscular con 6-8 mg de clorhidrato de xilazina (Xilazina 2 %, Over®) y luego se realizó anestesia local infiltrativa según la técnica de Magda modificada (Garnero y Perusia, 2002), utilizando 160 ml de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2 %, Over®), además de realizarse una anestesia epidural baja con 5 ml de lidocaína.

El procedimiento quirúrgico se realizó siguiendo los pasos descritos previamente por Gareis (2019).



3.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA) del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

3.2.1 Procesamiento inicial y almacenamiento

3.2.1.1 Muestras de sangre

Las muestras de sangre con anticoagulante se mantuvieron en refrigeración (2-8 °C) por al menos 30 min y luego se centrifugaron a 2000 g por 10 min para separación del plasma. Previamente, se separó una alícuota de sangre completa con anticoagulante que se congeló inmediatamente en N₂ líquido y posteriormente se almacenó a -80 °C hasta su utilización, de la misma manera que se almacenaron las muestras de plasma.

3.2.1.2 Muestras de ovarios completos

Se realizó una evaluación macroscópica del par ovárico, identificando el folículo preovulatorio, teniendo en cuenta la información obtenida por ultrasonografía. Se aspiró el LF del folículo preovulatorio utilizando jeringa y aguja, lentamente y de manera de no separar las células de la granulosa. Luego se tomó una porción de pared folicular completa del mismo folículo. Ambas muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Posteriormente los ovarios fueron fijados en formol tamponado (10 %) durante 8-12 h a temperatura ambiente y se procesaron siguiendo protocolos de rutina hasta su inclusión en parafina, como se describe más adelante. Se muestran imágenes representativas del procedimiento en la Figura 15.



3.2.1.3 Muestras de aspirado folicular

Estas muestras contienen LF con células de la granulosa (CG). Se centrifugaron a 2000 g durante 10 min a 4 °C (centrífuga Sorvall ST16R, Thermo Scientific, USA), permitiendo la separación del pellet de CG y el sobrenadante de LF. Ambas fracciones se almacenaron a -80 °C para su posterior utilización.

3.2.2 Destino de cada muestra

En el siguiente esquema se observa el destino de cada muestra obtenida:

LF	<ul style="list-style-type: none"> • Mediciones hormonales
Pared folicular	<ul style="list-style-type: none"> • PCR en tiempo real (evaluación de la expresión génica) • Evaluación de modificaciones epigenéticas específicas
Ovarios completos	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunohistoquímica (IHQ) indirecta (evaluación de la expresión proteica)
Sangre completa	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de modificaciones epigenéticas globales
Plasma	<ul style="list-style-type: none"> • Mediciones hormonales

3.2.3 Procesamiento específico según el destino

3.2.3.1 Procesamiento de muestras para PCR en tiempo real

3.2.3.1.1 Aislamiento de ARN total:

Se realizó a partir de las muestras de pared folicular en un procedimiento de doble extracción, de la siguiente manera: se tomó una porción de tejido de aproximadamente 50 mg, se colocó en un tubo con 750 µl del reactivo TRIzol® LS (Invitrogen) y luego se procedió a la homogeneización del tejido con un homogeneizador manual (Ultra Turrax® IKA T10 Basic) hasta lograr la dispersión total del mismo. La suspensión celular obtenida fue incubada durante 5 min a temperatura ambiente y luego se agregaron 150 µl de cloroformo, agitando vigorosamente en vórtex (ZX Classic, VELP Científica®) para favorecer el contacto entre las fases. Se dejó reposar la mezcla por 5 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 14000 g durante 15 min a 4 °C (centrífuga Sorvall Legend Micro 21R, Thermo Scientific, USA), permitiendo la separación de fases. De la fase acuosa (superior) se tomó un volumen no superior al 70 % y se transfirió a otro tubo con 750 µl de TRIzol LS para realizar una segunda extracción, repitiendo los pasos anteriores excepto la homogeneización que se realizó con vórtex en lugar de homogeneizador manual. Nuevamente, se

tomó aproximadamente el 70 % de la fase acuosa y en este caso se trasvasó a un tubo estéril. Se adicionaron 500 μ l de isopropanol y 2 μ l de un coprecipitante (GlycoBlue, Invitrogen), se homogeneizó suavemente por inversión y se incubó toda la noche a -20 °C para favorecer la precipitación del ARN. Posteriormente, se centrifugó a 14000 g durante 45 min a 4 °C. El precipitado de ARN total fue lavado dos veces con etanol 75 % y, una vez evaporado el resto de alcohol, fue resuspendido en agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato, inactivador de ARNasas), precalentada a 60 °C. La concentración y calidad del ARN se determinó espectrofotométricamente (Clario Star, BMG LABTECH), y luego se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

3.2.3.1.2 Transcripción reversa:

Inicialmente se trataron las muestras de ARN con ADNasa (DNase I RNase-Free, PB-L) siguiendo las instrucciones del fabricante, de manera de eliminar las posibles contaminaciones de ADN genómico presentes. Para la síntesis del ADN copia (ADNc) se utilizó una cantidad constante de ARN (1 μ g) en una mezcla de reacción conteniendo: retrotranscriptasa MMLV (del inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*, Invitrogen), buffer 5X (Invitrogen), ditiotreitól (DTT, Invitrogen), inhibidor de ribonucleasas (RNaseOUT, Invitrogen), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y cebadores con secuencia al azar. Las condiciones y tiempos utilizados para la transcripción reversa fueron las indicadas por el fabricante: 5 min a 65 °C para romper las estructuras secundarias del ARN; 2 min a 37 °C; 10 min a 25 °C para el anillado de los cebadores al azar; 50 min a 37 °C para la síntesis del ADNc y 15 min a 70 °C para la inactivación de la MMLV. Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 20 μ l utilizando un termociclador estándar (TC-3000G, Techne Inc., NJ, USA). La concentración y calidad del ADNc se determinó espectrofotométricamente (Clario Star, BMG LABTECH), y luego fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

3.2.3.2 Procesamiento de muestras para evaluación de modificaciones epigenéticas

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

- a) Para muestras de pared folicular, se colocó una porción de tejido de aproximadamente 15-20 mg en un tubo estéril y se le agregaron 180 μ l del buffer de digestión y 20 μ l de proteinasa K. Se incubó a 55 °C por 3 h hasta digestión completa del tejido. Se centrifugó 3 min a máxima velocidad (centrífuga MiniSpin®, Eppendorf) y se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril. Se agregaron 20 μ l de ARNasa A, 200 μ l de buffer de lisis y unión, y 200 μ l de etanol absoluto, y se homogeneizó con vórtex, obteniendo de esta manera el lisado.
- b) Para muestras de sangre completa con anticoagulante, se colocaron 200 μ l de la misma en un tubo estéril y se le agregaron 20 μ l de proteinasa K, 20 μ l de ARNasa A y 200 μ l de buffer de lisis y unión. Se incubó a 55 °C por 10 min para promover la digestión proteica. Se agregaron 200 μ l de etanol absoluto y se homogeneizó con vórtex, obteniendo el lisado.

Se colocó el lisado en una columna de microcentrífuga, se centrifugó durante 1 min a 10000 g y se lavó dos veces con *buffers* de lavado provistos por el kit, centrifugando cada vez a máxima velocidad por 3 min. Finalmente, se eluyó el ADNg con 30 μ l de *buffer* de elución provisto. La concentración y calidad del ADNg fueron determinadas espectrofotométricamente (Clario Star, BMG LABTECH), y luego se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

3.2.3.3 Procesamiento de muestras para IHQ

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 el protocolo descrito por Salvetti *et al.* (2010) para efectuar la inclusión en parafina. Para ello, las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, aclaradas por pasajes xilol y finalmente incluidas en parafina. Se efectuaron cortes

seriados de 4-5 μm de espesor con un micrótopo rotativo (Leica RM2245), 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 h. Para hacer una caracterización inicial y evidenciar la morfología de las distintas estructuras ováricas, se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina.

3.3 CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS

3.3.1 Determinación de 17 β -estradiol, progesterona, testosterona y cortisol

Los niveles de 17 β -estradiol (E2), progesterona (P4), testosterona y cortisol, a nivel sistémico e intrafolicular, se midieron en un laboratorio externo. Las determinaciones se realizaron mediante kits de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA, del inglés: *Electrochemiluminescence Immunoassay*) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en un sistema COBAS e601 (Roche Diagnostics), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que se validaron previamente en bovinos (Díaz *et al.*, 2015). La sensibilidad del ensayo fue de 5,00 pg/ml para el E2, 0,05 ng/ml para la P4, 0,025 ng/ml para la testosterona y 0,02 ug/dl para el cortisol. Los coeficientes de variación intra e interensayo para E2 fueron 3 % y 4,7 % respectivamente, para P4, 5,3 % y 9 % respectivamente, para testosterona, 5,4 % y 6,4 % respectivamente y para cortisol, 1,6 % y 2,3 % respectivamente.

3.3.2 Determinación de insulina

Las concentraciones sistémicas de insulina fueron analizadas por radioinmunoanálisis (RIA), en un laboratorio externo perteneciente al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME, CONICET, Buenos Aires). Se utilizó un anticuerpo anti-insulina bovina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) y un estándar de insulina humana provisto por Laboratorios Beta (Buenos Aires, Argentina);

la concentración detectable mínima fue de 0,05 ng/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 8 % y 11 %, respectivamente.

Las concentraciones de insulina intrafoliculares fueron determinadas en nuestro laboratorio utilizando un kit comercial de ELISA sandwich (del inglés: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), siguiendo las instrucciones del fabricante (DIAsource Immuno Assays S.A., Bélgica, referencia KAP1251). Se realizó la curva estándar con los calibradores según las instrucciones y se determinó la absorbancia (OD, del inglés: *Optical Density*) de cada calibrador y de las muestras en un lector de microplacas (Clario Star, BMG LABTECH), a una longitud de onda de 450 nm con corrección a 650 nm. La concentración de cada muestra luego se calculó por extrapolación de la curva estándar, utilizando para la misma un ajuste dado por la función logística de 4 parámetros. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 10,3 % y 10,4 %, respectivamente.

3.3.3 Determinación de hormona antimülleriana (AMH)

Se determinó la concentración de AMH en LF utilizando un kit comercial de ELISA sandwich (Beckman Coulter, Inc., USA, referencia A73818). Se siguieron las instrucciones del fabricante, realizando una curva estándar de 7 puntos, para lo cual se utilizaron los calibradores correspondientes (Beckman Coulter, Inc., USA, referencia A73819). Se determinó la absorbancia (OD) de cada calibrador y de las muestras en un lector de microplacas (Clario Star, BMG LABTECH), a una longitud de onda de 450 nm con corrección a 600 nm. La concentración de cada muestra luego se calculó por extrapolación de la curva estándar. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 2,2 % y 8,9 %, respectivamente.

3.4 EVALUACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

La evaluación de la expresión génica relativa se realizó mediante PCR en tiempo real sobre el ADNc obtenido a partir de pared de folículos preovulatorios. Se evaluó la expresión de β -actina y β 2-microglobulina (B2M) como genes constitutivos de referencia.

3.4.1 Diseño de cebadores específicos

A partir de las secuencias de ARNm correspondientes al RGC, β -actina y B2M, obtenidas de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>), se diseñaron los cebadores específicos para su amplificación. Para el diseño se utilizó la herramienta *PrimerQuest Tool* de la plataforma www.idtdna.com. Para la posterior verificación de su especificidad se utilizó la herramienta *Olygo Analyzer Tool* de la misma plataforma y la aplicación Primer Select del programa LASER GENE (DNASTAR, WI, USA). Todos los oligonucleótidos utilizados fueron provistos por Invitrogen. En la tabla 1 se muestran las secuencias de los cebadores sentido y antisentido utilizados.

3.4.2 Amplificación por PCR en tiempo real

Se utilizó un protocolo de PCR en tiempo real optimizado para analizar la expresión de ARNm del RGC y los genes de referencia utilizando SYBR Green I (Invitrogen) como fluoróforo, según la guía de MIQE (Bustin *et al.*, 2009). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20 μ l que contenía: 4 μ l de ADNc, 2 μ l de buffer 10X (correspondiente a la enzima), $MgCl_2$ 1,5 mM, cebadores sentido/antisentido 0,5 Mm (cada uno), dNTPs 0,2 mM, 1 μ l SYBR Green I (Invitrogen), 1,6 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen) y volumen necesario de agua tratada con DEPC estéril.

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technology, CA, USA). Se utilizaron las siguientes condiciones para el ciclado: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min seguida por 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C

durante 15 seg, anillado (temperatura dependiendo de cada par de cebadores, se detalla en la tabla 1) durante 15 seg, y extensión a 72°C durante 20 seg.

La eficiencia de las reacciones de 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 v2.3 (Applied Biosystems). La pureza de cada 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 amplificados.

Los niveles de expresión de ARNm de los genes se registraron según los valores de sus Ct (ciclo umbral, del inglés: *cycle threshold*), 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 el software StepOne v2.3. Todas las muestras se evaluaron por duplicado, calculándose un promedio del Ct en cada caso. Se incluyeron controles negativos (agua tratada con DEPC en lugar de muestra) en todos los ensayos.

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

Nombre	N° de acceso GenBank	Secuencia de cebadores (5'-3')	Tamaño del producto	Temperatura de anillado
RGC	NM_001206634.1	Sentido: TTCCTGCAACATTACCACAACCTCA Antisentido: TTTCACGGCTGCAATCACCT	167 pb	60 °C
β-actina	BT030480.1	Sentido: ACCCACAACACTGTGCCCATCTA Antisentido: CGGAACCGCTCATTGCC	290 pb	60 °C
B2M	NM_173893.3	Sentido: GCGTCCTCCAAAGATTCAAG Antisentido: GGTCTGACTGCTCCGATTTA	152 pb	57 °C

3.4.3 Cálculo de la expresión génica relativa

Los niveles relativos de ARNm se cuantificaron mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Como gen constitutivo de referencia se seleccionó B2M, debido a que se observó que el mismo presenta valores de Ct similares entre las diferentes muestras, además de tener niveles de expresión semejantes a los del gen de interés, lo cual no ocurrió con la expresión de β -actina. Los niveles relativos de transcripto de cada muestra se expresaron respecto a la expresión en aquellos animales con baja exposición a estrés térmico durante toda la vida intrauterina ($\leq 20\%$ días con $ITH \geq 72$). Tal como fue detallado previamente, en nuestra zona geográfica ocurren largas temporadas con ITH elevados, por lo que no disponemos de muestras obtenidas de animales que no hayan cursado ningún período de estrés por calor durante su vida intrauterina.

3.4.4 Secuenciación

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 evaluadas mediante la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para verificar los porcentajes de similitud con las secuencias publicadas en GenBank.

3.5 EVALUACIÓN DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS

3.5.1 Evaluación del estado de metilación global del ADNg

Se evaluó el estado de metilación global de los animales en muestras de ADNg aisladas de sangre completa, como parámetro de sus niveles transcripcionales generales. Para ello, se utilizó un kit comercial (Abcam®, Methylated DNA Quantification Kit - Colorimetric; referencia ab117128) en el cual el ADN se une a pocillos específicamente tratados para tener alta afinidad hacia el mismo.

La fracción de ADN metilado fue detectada usando anticuerpos de captura y de detección (provistos por el fabricante), y luego cuantificada colorimétricamente a través de la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro para microplacas (Clario Star, BMG LABTECH). La cantidad absoluta de ADN metilado fue proporcional a la densidad óptica medida, y se determinó realizando una curva estándar de 5 puntos con los reactivos provistos en el kit.

3.5.2 Evaluación del estado de metilación de la región promotora del gen del receptor de glucocorticoides

Dentro de las posibles modificaciones epigenéticas involucradas específicamente en la regulación de la expresión del RGC, se evaluó el estado de metilación de su región 5'-UTR, donde se encuentran los promotores encargados de la regulación de la transcripción.

3.5.2.1 Análisis de la secuencia génica del receptor de glucocorticoides

Se utilizó la plataforma Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) para obtener la secuencia de ADN del gen del RGC bovino (NR3C1, código ENSBTAG00000019472). Dentro de la misma, se identificó la región 5'-UTR, ubicada corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Posteriormente se utilizó la herramienta *Promoter Scan* (<https://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan>) para identificar los posibles sitios de unión de los factores de transcripción en esta región, es decir, predecir la ubicación de los distintos promotores del gen. Se utilizó esta herramienta ya que a la actualidad no se encuentran publicadas las secuencias específicas de dichos promotores para bovinos.

3.5.2.2 Análisis del grado de metilación de CpGs: EpiTYPER

Se realizó sobre el ADN_g aislado de pared de folículos preovulatorios, mediante la técnica EpiTYPER (Agena Biosciences, USA). Este servicio fue brindado por el Laboratorio de Epigenética y Cromatina (INCLIVA), en la Universidad de Valencia, España.

3.5.2.2.1 Fundamento del método:

El método EpiTYPER detecta cuantitativamente la metilación de ADN a través del clivaje sitio-específico de ADN_g tratado con bisulfito, y posterior análisis por espectrometría de masas (MS, del inglés: *mass spectrometry*) con un detector MALDI-TOF (del inglés: *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) (Ehrich *et al.*, 2005; Kunze, 2018).

3.5.2.2.2 Explicación de la técnica:

El ADN_g fue tratado con bisulfito de sodio utilizando un kit comercial (EZ-96 DNA Methylation kit, Zymo Research). En este paso, las **citocinas (C) no metiladas** fueron convertidas a uracilos (U), mientras que las **C metiladas** permanecieron sin alteraciones, protegidas por el grupo metilo (Figura 16). Cada muestra de ADN_g se analizó por triplicado, en placas multipocillos.

Luego, el ADN_g tratado con bisulfito fue amplificado por PCR, utilizando cebadores diseñados específicamente (se detalla en el siguiente punto), de modo que los U se reemplazaron con timinas (T). De esta manera, dependiendo de la presencia o ausencia del grupo metilo en cada sitio CpG, se produjeron cambios CxT en la secuencia.

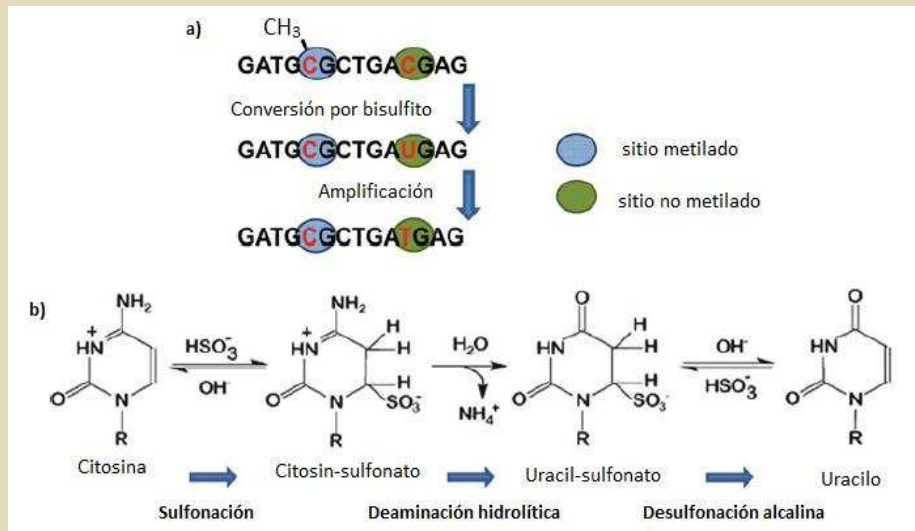


Figura 16. Principio químico de la conversión del ADN por bisulfito.

a) Esquema representativo de los cambios ocurridos en la molécula de ADN al ser tratado con bisulfito: las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, los cuales luego son reemplazados por timinas en la secuencia amplificada por PCR; las citosinas metiladas, en cambio, son conservadas a lo largo del proceso. **b)** Cambios químicos secuenciales de la molécula de citosina durante el tratamiento con bisulfito, para transformarse, finalmente, en uracilo. Adaptada de Kunze (2018).

A continuación, se realizó una transcripción *in vitro* sobre la cadena reversa del producto de PCR, seguida del clivaje sitio-específico en cada U de la molécula de ARN resultante, utilizando ARNasa A. De esta manera, se generaron fragmentos de diferentes tamaños y masas, que fueron analizados por MS-MALDI-TOF. En este procedimiento, los fragmentos resultantes de cada sitio CpG, provenientes de moléculas de ADN metilado o no metilado, tienen el mismo tamaño, pero diferente composición de nucleótidos. Es decir, a partir de un sitio metilado, que conserva su C, se obtiene una molécula de ARN con una guanina (G) en ese sitio. A partir de un sitio no metilado, en el que la C se convirtió en U, se genera una molécula de ARN con una adenosina (A) en dicha posición. Este cambio GxA se observa en los gráficos generados por MS-MALDI-TOF, como picos con diferencia de masa de 16 Da. Se esquematiza todo el proceso en la Figura 17.

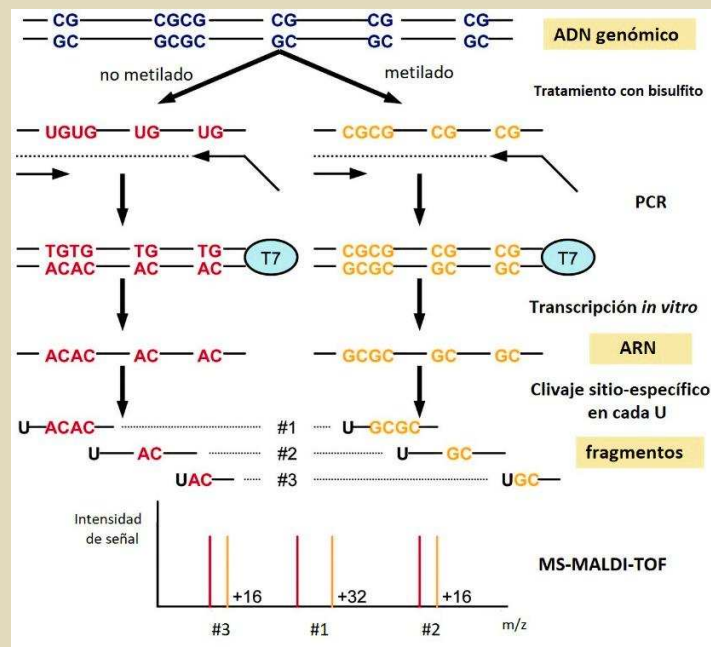


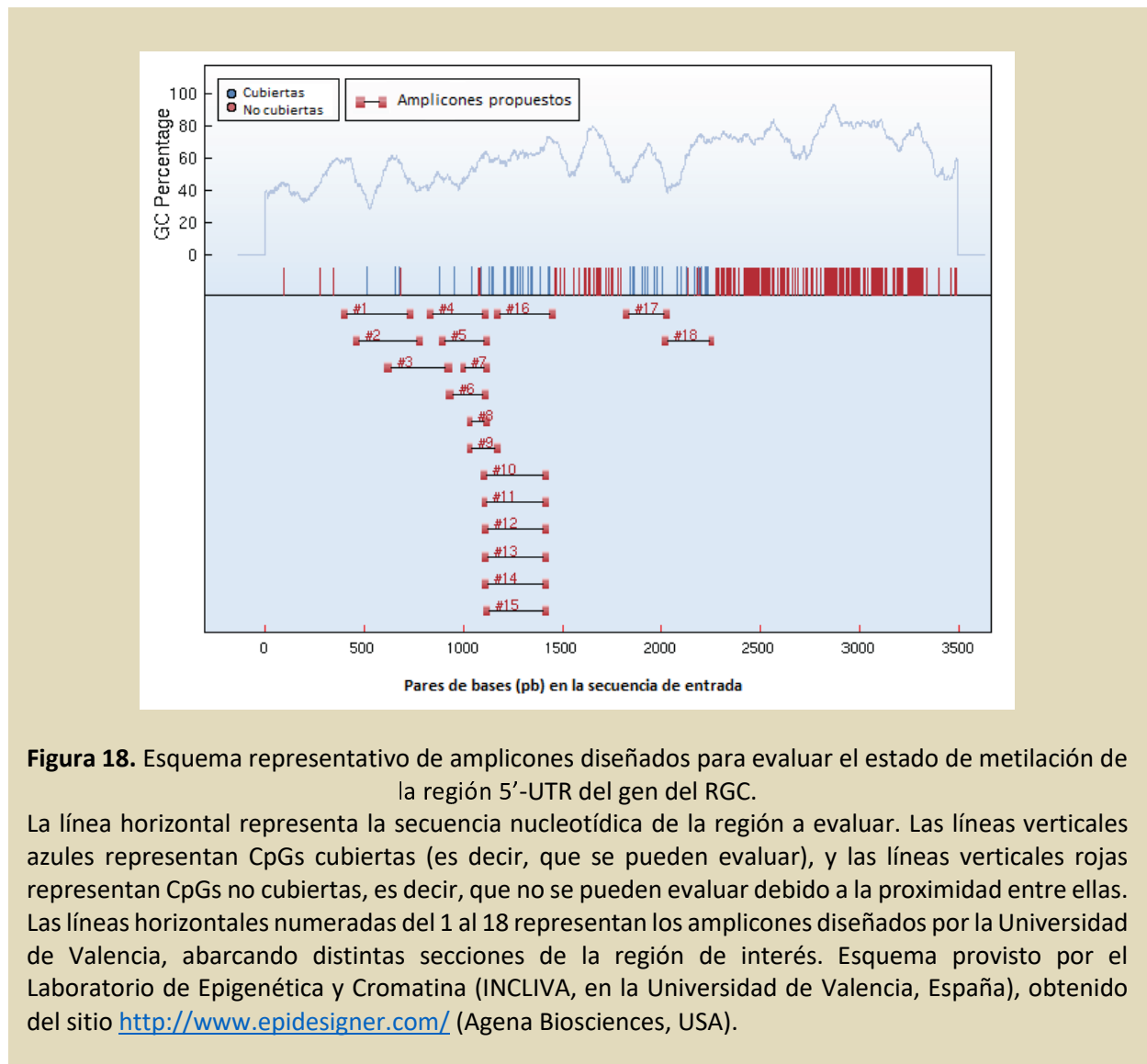
Figura 17. Esquema de la técnica EpITYPER.

El ADNg tratado con bisulfito es amplificado por PCR utilizando cebadores específicos para la región de interés, los cuales introducen una secuencia para un promotor T7. El producto de PCR es luego transcrito *in vitro* y el ARN resultante es clivado de manera sitio-específica en cada U. Los fragmentos resultantes, de diferentes tamaños, son analizados por MS-MALDI-TOF, obteniendo un patrón de señal característico de cada masa. La señal roja corresponde al ADNg no metilado, y la señal naranja corresponde al ADNg metilado. El fragmento #1 contiene 2 sitios de metilación (es decir, dos CpG contiguas); si ambas se encuentran metiladas o no metiladas, los fragmentos obtenidos mostrarán una señal de masa con una diferencia de 32 Da. Para los fragmentos #2 y #3, la diferencia de masas observada es de 16 Da ya que ambos tienen solo un sitio de metilación. Adaptada de Ehrich *et al.* (2005).

3.5.2.2.3 Diseño de cebadores específicos:

Tal como se describió previamente, para la amplificación por PCR, se diseñan cebadores específicos para la región de interés dentro de la secuencia a evaluar, y que contienen una secuencia para un promotor T7. Esto permite la posterior transcripción *in vitro* del producto de PCR. Para este trabajo de tesis, a partir de la secuencia 5'-UTR del gen del RGC, en la Universidad de Valencia se diseñaron y propusieron una serie de cebadores específicos a través de la plataforma Epidesigner (<http://www.epidesigner.com/>, Agena Biosciences, USA). Los amplicones correspondientes, que abarcan distintas secciones de la región de interés, se representan en la

Figura 18, numerados del 1 al 18. Como se observa en la figura, algunas CpG están muy cercanas una a la otra (regiones en rojo), de manera que no pueden ser discriminadas para evaluarse mediante esta técnica. Teniendo en cuenta la ubicación de los promotores predichos con *Promoter scan*, como se describió anteriormente, se seleccionaron para ser evaluados 3 amplicones: 16, 17 y 18. Dentro de los mismos se abarcaron un total de 30 sitios de metilación (CpG).



3.5.2.2.4 Análisis de datos:

Los espectros obtenidos a partir de la MS-MALDI-TOF, se analizaron para la presencia/ausencia de señales y se determinó cuales CpG en la secuencia de ADN_g están metiladas. Finalmente, a partir de la razón entre las áreas de los picos, se nos informó el **grado de metilación (porcentaje, %) de cada posición CpG**, tal como se esquematiza en la Figura 19.

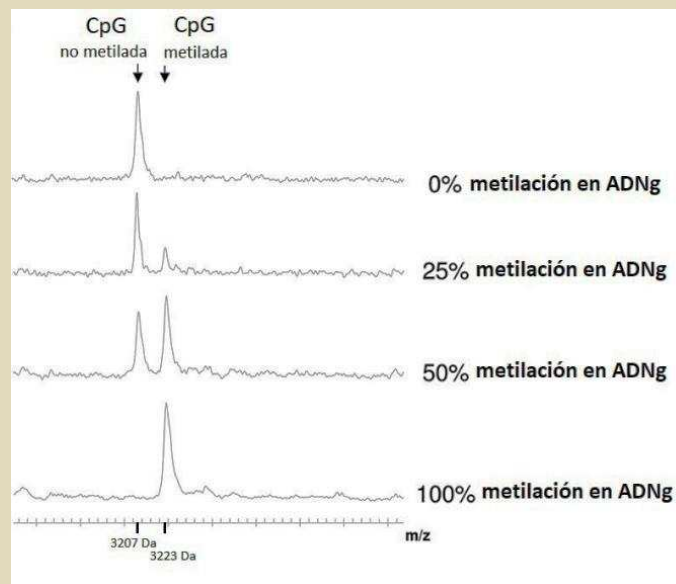


Figura 19. Esquema que ejemplifica la interpretación de los espectros obtenidos por MS-MALDI-TOF.

Se representan 4 espectros distintos, originados a partir de 4 posibles estados de metilación de un sitio CpG (no son datos correspondientes a las CpG evaluadas en este trabajo). Los picos, con una diferencia de 16 Da, tienen distintas relaciones de sus áreas dependiendo del grado de metilación en el templado de ADN_g. Adaptada de Ehrich *et al.* (2005).

3.6 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES, PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E INTERMEDIARIOS DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

3.6.1 Evaluación de la especificidad de los anticuerpos primarios

La especificidad de los anticuerpos que se utilizaron para la detección de proteínas, fue determinada mediante la técnica *western blot* (WB). En el marco de trabajo de la presente tesis se evaluó la especificidad de los anticuerpos enumerados en la tabla 2. Para los restantes, la especificidad fue demostrada en trabajos previos de nuestro grupo, tal como se detalla en la tabla 3. Además, con la herramienta BLAST, se analizó la homología entre las proteínas contra las cuales fueron generados los anticuerpos reactivos, y la correspondiente proteína bovina (en los casos en que fueron generados para especies diferentes a *Bos taurus*). Se obtuvieron homologías entre 96 y 100 %.

3.6.1.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Se realizó la electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida del 10 %. Se obtuvieron las muestras proteicas a partir de pared folicular, homogeneizando con buffer de lisis de radioinmunoprecipitación (RIPA) conteniendo 10 % de inhibidor de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche). Se prepararon las muestras diluyendo convenientemente con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE, y posteriormente se incubaron en baño termostático en ebullición por 5 min. Se sembraron 40 µg de proteínas por calle, teniendo en cuenta la concentración del homogeneizado, determinada previamente por el método de Lowry utilizando para las lecturas y cálculo de concentraciones el espectrofotómetro y software provisto por el mismo (Clario Star, BMG LABTECH). Se realizó la electroforesis en una cuba vertical (Mini-PROTEAN, Bio-Rad) y utilizando el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3.

Luego, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa, en frío, a 100 V durante 1:30 h, utilizando buffer de transferencia Towbin modificado (Tris-Glicina y 20% de metanol). Las membranas obtenidas se colorearon con el colorante Rojo Ponceau para comprobar la efectividad de la transferencia, luego se lavaron con agua destilada para eliminar el colorante y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de la inmunodetección.

3.6.1.2 Western blot

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

- 1) Hidratación de la membrana con Tris buffer salino conteniendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T), 15 min a temperatura ambiente.
- 2) Bloqueo los sitios de unión inespecíficos con leche al 5% diluida en TBS-T, 1 h a temperatura ambiente y en agitación.
- 3) Lavado a temperatura ambiente en agitación (agitador orbital BOECO OS-10, Alemania) con TBS-T: 2 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min.
- 4) Incubación con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4 °C. Para la dilución del anticuerpo primario se utilizó TBS-T leche 0,5%.
- 5) Lavado a temperatura ambiente en agitación con TBS-T: 2 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min.
- 6) Incubación con el anticuerpo secundario según cada caso (Tabla 2), durante una 1:30 h a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utilizó TBS-T leche 0,5%.
- 7) Lavado a temperatura ambiente en agitación con TBS-T: 2 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min.
- 8) Incubación con reactivo quimioluminiscente (ECL Plus, GE Healthcare).
- 9) Exposición de la membrana en placas radiográficas (GE Helthcare) en cuarto oscuro, y revelado de la misma con los reactivos de revelado y fijado (Kodak).

Tabla 2. Anticuerpos, características y condiciones utilizados en la técnica de Western blot.

Anticuerpo primario	Dilución anticuerpo 1 ^{ro}	Peso molecular (kDa)	Anticuerpo secundario	Dilución anticuerpo 2 ^{ro}
RGCα (P-20) Policlonal (sc-1002, Santa Cruz Biotechnology)	1/100	90	Mouse anti-rabbit IgG-HRP (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology)	1/10000
IRβ (C-19) Policlonal (sc-711, Santa Cruz Biotechnology)	1/100	90/95	Mouse anti-rabbit IgG-HRP (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology)	1/10000
p-IRβ (10C3) Monoclonal (sc-81500, Santa Cruz Biotechnology)	1/100	95	m-IgG κ BP-HRP (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology)	1/10000

Tabla 3. Anticuerpos cuya especificidad fue demostrada en trabajos previos y citas correspondientes.

Anticuerpo primario	Trabajo en el que fue demostrada su especificidad
HSP90 Monoclonal (ab13492, Abcam)	Velazquez <i>et al.</i> , 2010
HSP70 Monoclonal (AM289, Biogenex)	Velazquez <i>et al.</i> , 2010
IRS1 Policlonal (sc-559, Santa Cruz)	Gareis, 2019
p-IRS1 Monoclonal (ab46800, Abcam)	Gareis, 2019
PI3K - p85α (Z8) Policlonal (sc-423, Santa Cruz)	Gareis, 2019

3.6.2 Detección y cuantificación de la expresión proteica: Inmunohistoquímica indirecta

Se utilizaron cortes histológicos de ovario, tal como fue detallado previamente, para localizar y cuantificar la expresión proteica de RGC, HSP70, HSP90, IR, p-IR, IRS, p-IRS y pI3K, por IHQ indirecta con los anticuerpos específicos comerciales detallados en la tabla 4.

3.6.2.1 IHQ indirecta

Se empleó el siguiente protocolo (Salvetti *et al.*, 2010):

- 1) Acondicionamiento de los cortes durante 10 min en estufa a 60 °C.
- 2) Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 y 10 min, respectivamente.
- 3) Hidratación seriada en alcoholes de graduación decreciente: etanol absoluto (dos pasajes de 2 min), etanol 96° (un pasaje de 2 min) y finalmente etanol 70° (un pasaje de 2 min).
- 4) Lavado en PBS pH 7,2 durante 5 min.
- 5) Tratamiento de recuperación antigénica en horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800 W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un recipiente coplin conteniendo la solución de recuperación, y sumergido parcialmente en un baño con agua destilada, y fueron sometidos a una de las siguientes secuencias de recuperación:
 - Recuperación convencional: 3 min al 100 % de potencia, dos veces 6 min al 40 % de potencia y 20 min dentro del microondas apagado. Entre los diferentes pasos se recargó el recipiente coplin con agua destilada en ebullición.
 - Recuperación intensa: dos veces 5 min al 100 % de potencia, dos veces 6 min al 40 % de potencia y 20 min dentro del microondas apagado. Entre los diferentes pasos se recargó el recipiente coplin con agua destilada en ebullición.
- 6) Lavado en PBS durante 5 min.

- 7) Inactivación de la peroxidasa endógena: se incubaron los cortes durante 10 min en una solución al 3 % de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno por 10 minutos más.
- 8) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- 9) Bloqueo de la biotina endógena: se utilizó un kit comercial, siguiendo las instrucciones provistas (Abcam, referencia ab64212). Los lavados correspondientes se realizaron con PBS.
- 10) Incubación en cámara húmeda con anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en las diluciones adecuadas para las proteínas a detectar (detallado en la tabla 4). Para los controles de especificidad (controles negativos) se sustituyó el anticuerpo primario por PBS.
- 11) Dos lavados durante 5 min en PBS.
- 12) Incubación en cámara húmeda con anticuerpo secundario universal (Cytoscan HRP Detection System, Cell Marque), durante 30 min a temperatura ambiente.
- 13) Dos lavados durante 5 minutos en PBS.
- 14) Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa (Cytoscan HRP Detection System, Cell Marque) durante 30 min a temperatura ambiente.
- 15) Cinco lavados durante 5 min en PBS.
- 16) Revelado de la reacción con 3-3'-diaminobencidina (DAB Substrate kit, Cell Marque, referencia 957D-20). Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y estandarizarlo.
- 17) Dos lavados de 5 min en agua destilada.
- 18) Coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur®), deshidratación y montaje con bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur®) y cubreobjetos apropiados.

Tabla 4. Detalle de anticuerpos, dilución y recuperación antigénica realizada en cada caso para la técnica de inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Dilución	Recuperación antigénica
GRα (P-20) Policlonal (sc-1002, Santa Cruz Biotechnology)	1/200	Convencional
HSP90 Monoclonal (ab13492, Abcam)	1/400	Convencional
HSP70 Monoclonal (AM289, Biogenex)	1/200	Convencional
IRβ (C-19) Policlonal (sc-711, Santa Cruz Biotechnology)	1/150	Convencional
p-IRβ (10C3) Monoclonal (sc-81500, Santa Cruz Biotechnology)	1/25	Intensa
IRS1 (C-20) Policlonal (sc-559, Santa Cruz Biotechnology)	1/1000	Convencional
p-IRS1 Monoclonal (ab46800, Abcam)	1/25	Intensa
PI3K - p85α (Z8) Policlonal (sc-423, Santa Cruz Biotechnology)	1/200	Convencional

3.6.2.2 Análisis digital de imágenes

Se digitalizaron imágenes del folículo preovulatorio utilizando una cámara digital (Nikon DS-Fi2 Tokyo, Japan), acoplada a un microscopio óptico (Nikon Eclipse Ni), empleando un objetivo de 40X de aumento. La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 píxeles.

Las imágenes fueron analizadas usando el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA) según estudios que realizamos previamente (Ortega *et al.*, 2010). El porcentaje de área inmunopositiva para cada anticuerpo se calculó como el porcentaje del área total evaluada, a través de un análisis de segmentación de colores, el cual extrae objetos mediante la localización de todos los objetos de un color específico (en este caso, tinción marrón correspondiente al precipitado de DAB). Estos valores se verificaron y

normalizaron con controles evaluados en varios ensayos, usando la misma región (verificada por comparación de imágenes) para la calibración. Para todos los anticuerpos, se evaluó solamente la inmunomarcación citoplasmática. El porcentaje de área inmunopositiva o área inmunomarcada, se calculó separadamente para cada compartimiento (granulosa y teca interna), evaluando al menos 10 secciones representativas de cada folículo.

3.7 ENSAYOS IN VITRO

Para los estudios *in vitro* se utilizó una línea de células de la granulosa bovina (BGC-1) cedida generosamente por el Dr. Lino Barañaño del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME, CONICET). Las células se mantuvieron en medio DMEM-F12 (del inglés: *Dubeccos' Modified Eagle Medium*, Gibco, Thermo Fisher Scientific), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Internegocios).

Se desarrollaron modelos para estimular los cultivos celulares con un GC sintético (Dexametasona, OVER®) y con insulina recombinante (Humulina N, Lilly). Para ello, se optimizaron las condiciones de cultivo, evaluando diferentes concentraciones y tiempos de estímulo en cada caso, basados en la bibliografía publicada (Burén *et al.*, 2002; Ranta *et al.*, 2006; Balachandran *et al.*, 2008). Posteriormente, se desarrolló un modelo para realizar un estímulo combinado con Dexametasona e insulina.

3.7.1 Desarrollo de un modelo para el estímulo del cultivo celular con Dexametasona

Se utilizaron placas de 24 pocillos donde se cultivaron 50000 células/pocillo, se incubaron en estufa a 37 °C por 8 h y luego se realizaron los estímulos detallados a continuación, sembrando cada condición por duplicado (Figura 20). Se realizaron dos réplicas de este ensayo.

Concentraciones de Dexametasona: 0 M (Basal) - 1 pM - 1 nM - 100 nM

Tiempos: 12, 24 y 48 h

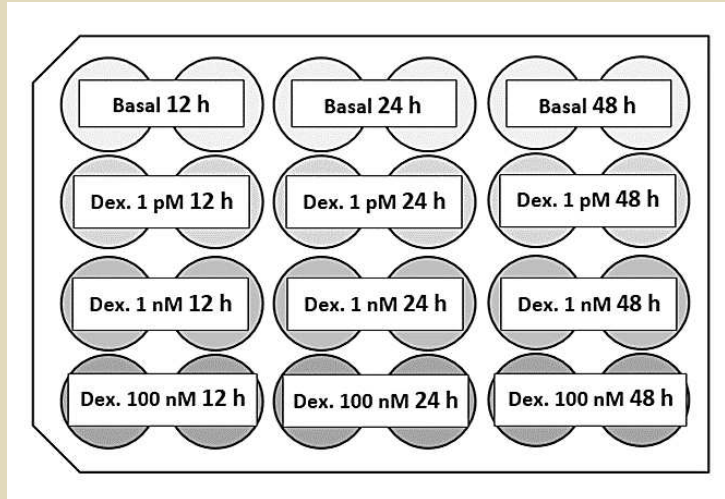


Figura 20. Esquema de representación del cultivo de células de la línea BGC-1 con distintos estímulos con Dexametasona (Over®).

Transcurrido el tiempo en cada caso, se cosecharon las células y se resuspendieron en buffer de lisis RIPA conteniendo 10 % de inhibidor de proteasas (Roche), de manera de obtener las proteínas totales. Posteriormente, estas fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa, tal como fue previamente descrito para las muestras de tejido ovárico.

Para seleccionar las condiciones adecuadas del estímulo con Dexametasona, sobre las membranas se realizó la inmunodetección del RGC por la técnica de WB (descrita en la sección anterior), para lo cual previamente se optimizaron las condiciones utilizando muestras de células de la línea BGC-1 sin estímulos. La dilución empleada del anticuerpo primario para el WB fue 1/100. Como anticuerpo secundario se utilizó mouse anti-rabbit IgG-HRP (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1/10000.

3.7.2 Desarrollo de un modelo para el estímulo del cultivo celular con insulina

Se utilizó una placa de 24 pocillos donde se cultivaron 50000 células/pocillo, se incubaron en estufa a 37 °C por 8 h y luego se realizaron los estímulos detallados a continuación, sembrando cada condición por triplicado (Figura 21). Se realizó una réplica de este ensayo.

Concentraciones de insulina: 0 µg/ml (Basal) - 0,1 µg/ml - 1 µg/ml - 100 µg/ml

Tiempos: 24 y 48 h

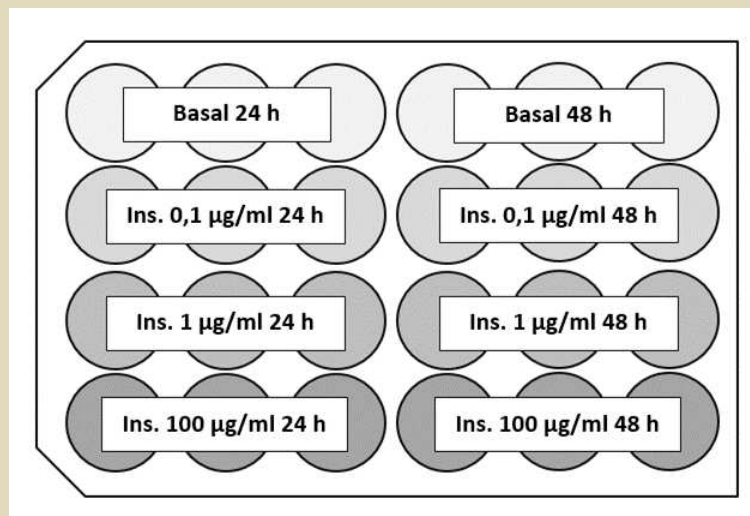


Figura 21. Esquema de representación del cultivo de células de la línea BGC-1 con distintos estímulos con insulina recombinante (Humulina N, Lilly).

Al igual que en el ensayo anterior, las células de cada condición fueron resuspendidas en buffer de lisis, separadas en electroforesis SDS-PAGE y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Para determinar las condiciones adecuadas del estímulo con insulina, se realizó la inmunodetección de PI3K por WB, cuyas condiciones fueron previamente optimizadas utilizando células de la línea BGC-1 sin estímulos. La dilución del anticuerpo primario utilizada en el WB fue 1/75. Como anticuerpo secundario se utilizó mouse anti-rabbit IgG-HRP (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1/10000.

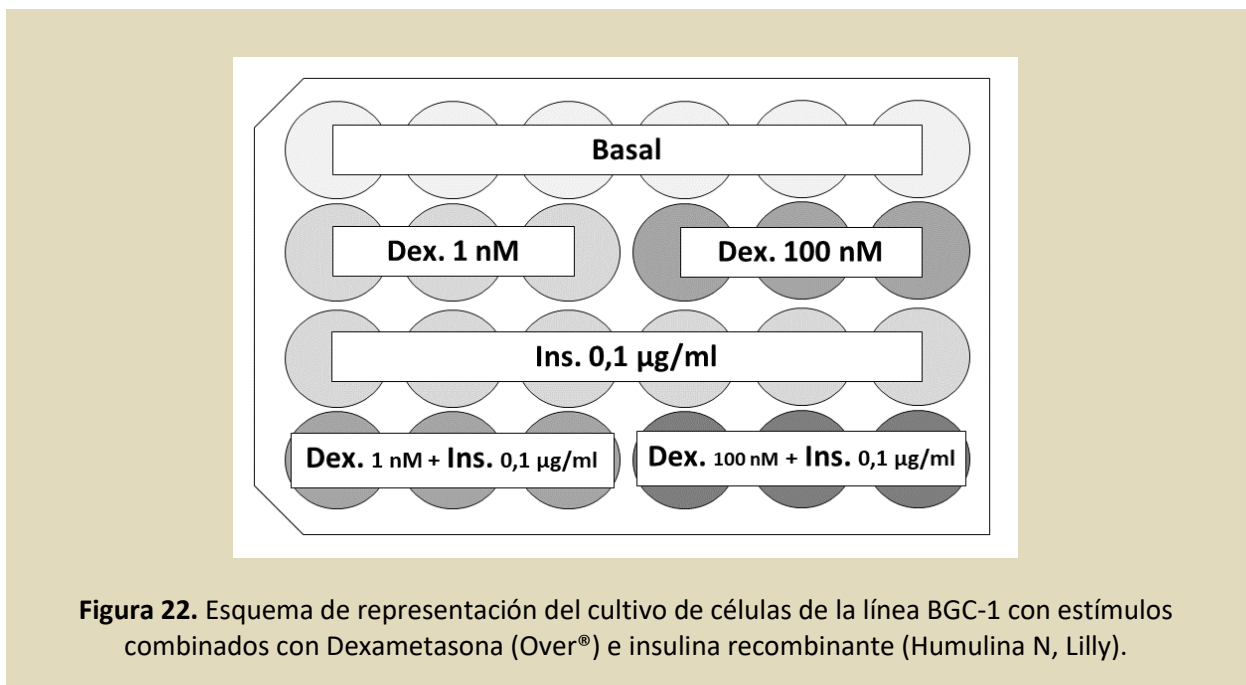
3.7.3 Desarrollo de un modelo para el estímulo combinado del cultivo celular con Dexametasona e insulina

Se utilizaron dos placas de 24 pocillos donde se cultivaron 50000 células/pocillo, se incubaron en estufa a 37 °C por 8 h y luego se realizaron los estímulos detallados a continuación, de la misma manera en cada placa, sembrando cada condición por triplicado (Figura 22). Se realizó una réplica de este ensayo.

Concentraciones de Dexametasona: 1 nM - 100 nM

Concentración de insulina: 0,1 µg/ml

Tiempos: 24 y 48 h (una de las placas se estimuló por 24 h y la otra por 48 h)



De la misma manera que en los ensayos anteriores, las células de cada condición fueron resuspendidas en buffer de lisis, separadas en electroforesis SDS-PAGE y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se realizó la inmunodetección de PI3K y RGC por WB, utilizando las condiciones optimizadas previamente para cada uno, tal como se describió en

los ensayos anteriores. Además, se realizó la inmunodetección de β -actina (mouse monoclonal JLA20; DSHB, Iowa City, IA, USA) como control de siembra. Las condiciones, previamente optimizadas, fueron: concentración de anticuerpo primario 1/1500, anticuerpo secundario m-IgG κ BP-HRP (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology), en una dilución 1/10000.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluó el efecto de la exposición a estrés térmico en distintas etapas del desarrollo fetal, tal como se detalló previamente, sobre las distintas variables de respuesta, con el programa SPSS 25.0 para Windows. Se aplicaron modelos lineales generalizados mixtos (MLGM), utilizando la función de enlace correspondiente según la distribución de frecuencias de la variable de respuesta (Normal, Gamma o Poisson). En todos los casos, se incorporó la variable “Tambo”, correspondiente al establecimiento de procedencia de cada animal, como factor aleatorio en el modelo. Además, se añadió la variable “Edad al momento del muestreo” como covariable. Se consideró que existe una asociación significativa entre las variables en los casos que la significancia de la asociación (p) fue menor o igual a 0,05, y una tendencia si p fue mayor a 0,05 y menor o igual a 0,10.

3.8.1 Variables independientes analizadas

Se calcularon las distintas variables independientes (variables de entrada), representando la exposición a estrés térmico en las distintas etapas del desarrollo fetal, del modo detallado en la tabla 5.

Tabla 5. Variables independientes relacionadas al estrés calórico y cálculo de las mismas.
Ciclos: intervalos de 3 o más días consecutivos con ITH \geq 72.

Variable independiente	Fórmula de cálculo
Promedio de ITH durante toda la gestación	$\frac{\text{sumatoria de valores de ITH}}{282 \text{ días}}$
Promedio de ITH en P1, P2, T1, T2 y T3	$\frac{\text{sumatoria de valores de ITH del período/trimestre}}{\text{total de días de ese período/trimestre}}$
Porcentaje de días con ITH \geq 72 durante toda la gestación	$\frac{\text{sumatoria de días con ITH} \geq 72}{282 \text{ días}} \times 100 \%$
Porcentaje de días con ITH \geq 72 en P1, P2, T1, T2 y T3	$\frac{\text{sumatoria de días con ITH} \geq 72 \text{ del período/trimestre}}{\text{total de días de ese período/trimestre}} \times 100 \%$
Índice de exposición en P1, P2, T1, T2 y T3	$\frac{\text{sumatoria de días con ITH} \geq 72 \text{ dentro de ciclos del período/trimestre}}{\text{total de ciclos de ese período/trimestre}}$

3.8.2 Variables de respuesta analizadas

- Concentraciones sistémicas e intrafoliculares de las hormonas detalladas previamente
- Recuento de folículos antrales
- Niveles relativos de ARNm del RGC en pared de folículos preovulatorios
- Estado de metilación global del genoma
- Grado de metilación de distintos sitios CpG dentro de la región 5'-UTR del gen del RGC
- Expresión proteica de RGC α , IR β , p-IR β , IRS1, p-IRS1 y PI3K en citoplasma de células de la granulosa y de la teca de folículos preovulatorios

4. RESULTADOS

4.1 DETERMINACIONES HORMONALES Y RECuento DE FOLÍCULOS ANTRALES

4.1.1 Concentraciones hormonales intrafoliculares

En la tabla 6 se muestra la asociación entre el estrés por calor durante la vida intrauterina (variables de entrada) y las concentraciones de hormonas en LF del folículo preovulatorio (variables de salida). Según las distribuciones de frecuencia, para E2 y cortisol se utilizó una función de enlace Normal, y para el resto de las variables se utilizó función de enlace Gamma.

Se puede observar una asociación significativa ($p \leq 0,05$) entre el porcentaje de días con $ITH \geq 72$ en toda la gestación, y la concentración de E2 en LF del folículo preovulatorio. Además, existe una tendencia de asociación ($p = 0,06$) de esta variable con el promedio de valores de ITH a lo largo de la gestación. En ambos casos, la asociación es negativa ($\beta < 0$), es decir, que los animales expuestos a mayor porcentaje de días con ITH superior a 72, o a mayores valores de ITH durante toda la gestación, presentaron menores concentraciones de E2 intrafoliculares en la vida adulta. No se observaron asociaciones en ninguna de las etapas en particular.

La concentración de P4 intrafolicular tuvo una asociación significativa positiva ($p \leq 0,05$; $\beta > 0$) con el índice de exposición a estrés por calor en el 2° trimestre de la gestación, aunque no se observó asociación con el porcentaje de días con $ITH \geq 72$ ni con el promedio de valores de ITH en esa etapa. Esto quiere decir que, a mayor exposición a estrés por calor en el segundo trimestre de vida intrauterina, los animales tuvieron mayor concentración de P4 intrafolicular en la vida adulta.

En el caso de la testosterona, se puede observar que la misma tuvo una asociación significativa ($p \leq 0,05$) con el índice de exposición a estrés por calor en el 3° trimestre de la gestación y en el segundo período de la misma (151 días hasta el nacimiento), negativa en ambos casos ($\beta < 0$), aunque no se observó asociación con el porcentaje de días con $ITH \geq 72$ ni con el promedio de valores de ITH en esas etapas. Esto quiere decir que, a mayor exposición a estrés calórico en la última etapa de vida intrauterina, los animales tuvieron menor concentración de testosterona intrafolicular en la vida adulta.

En cuanto a la concentración de cortisol intrafolicular, se aprecia que hubo una tendencia de asociación ($p=0,08$) con el porcentaje de días con ITH superior a 72 en el primer tercio de la gestación, aunque no se observó asociación con el promedio de valores e ITH ni con el índice de exposición en esa etapa. En este caso la asociación fue positiva ($\beta>0$), es decir que, a mayor proporción de días con $ITH\geq 72$ en la primera etapa de vida intrauterina, los animales tuvieron mayor concentración de cortisol intrafolicular en la vida adulta.

Las concentraciones de insulina y de AMH intrafoliculares no presentaron asociación con ninguna de las variables de entrada analizadas.

Tabla 6. Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y las concentraciones hormonales intrafoliculares.

Se detalla el número de datos analizados en cada caso (N), además de la significancia de asociación (p) y el valor del coeficiente de asociación (β) para los casos de asociaciones significativas ($p\leq 0,05$, color verde) y tendencias ($0,05<p\leq 0,10$, color amarillo).

Variable de salida	17 β -estradiol en LF (pg/ml)		Progesterona en LF (ng/ml)		Cortisol en LF (ug/dl)		Testosterona en LF (ng/ml)		Insulina en LF (ng/ml)	AMH en LF (ng/ml)
N	61		61		59		61		43	48
Variable de entrada	p	β	p	β	p	β	p	β	p	p
ITH promedio gestación	0,06	-110,04	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
% días ITH ≥ 72 gestación	0,05	-27,47	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
ITH promedio T1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
% días ITH ≥ 72 T1	>0,10		>0,10		0,08	0,013	>0,10		>0,10	>0,10
Índice exposición T1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
ITH promedio T2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
% días ITH ≥ 72 T2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
Índice exposición T2	>0,10		0,03	0,097	>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
ITH promedio T3	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
% días ITH ≥ 72 T3	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
Índice exposición T3	>0,10		>0,10		>0,10		0,04	-0,048	>0,10	>0,10
ITH promedio P1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
% días ITH ≥ 72 P1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
Índice exposición P1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
ITH promedio P2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
% días ITH ≥ 72 P2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	>0,10
Índice exposición P2	>0,10		>0,10		>0,10		0,05	-0,056	>0,10	>0,10

4.1.2 Concentraciones hormonales sistémicas y recuento de folículos antrales

En la tabla 7 se muestra la asociación entre el estrés por calor durante la vida intrauterina y las concentraciones de hormonas en plasma. Además, se muestra la asociación con el RFA. Según las distribuciones de frecuencia, para P4 se utilizó una función de enlace Gamma, para RFA se utilizó Poisson, y para el resto de las variables se utilizó función de enlace Normal.

Tabla 7. Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y las concentraciones hormonales sistémicas y el RFA.

Se detalla el número de datos analizados en cada caso (N), además de la significancia de asociación (p) y el valor del coeficiente de asociación (β) para los casos de asociaciones significativas ($p \leq 0,05$, color verde) y tendencias ($0,05 < p \leq 0,10$, color amarillo).

Variable de salida	17 β -estradiol en plasma (pg/ml)		Progesterona en plasma (ng/ml)		Cortisol en plasma (ug/dl)		Insulina en plasma (ng/ml)		RFA (n° de folículos)	
N	61		61		59		60		80	
Variable de entrada	p	β	p	p	β	p	p	p	β	
ITH promedio gestación	>0,10		>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 gestación	>0,10		>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	
ITH promedio T1	>0,10		>0,10	>0,10	0,02	0,065	>0,10	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 T1	0,05	0,05	>0,10	>0,10	0,01	0,016	>0,10	>0,10	>0,10	
Índice exposición T1	>0,10		>0,10	>0,10	0,02	0,139	>0,10	>0,10	>0,10	
ITH promedio T2	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 T2	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	
Índice exposición T2	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	
ITH promedio T3	>0,10		>0,10	>0,10	0,04	-0,058	>0,10	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 T3	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	
Índice exposición T3	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	
ITH promedio P1	>0,10		>0,10	>0,10	0,06	0,062	>0,10	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 P1	>0,10		>0,10	>0,10	0,07	0,016	>0,10	>0,10	>0,10	
Índice exposición P1	>0,10		>0,10	>0,10	0,09	0,134	>0,10	0,10	-0,303	
ITH promedio P2	0,08	-0,215	>0,10	>0,10	0,05	-0,062	>0,10	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 P2	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	
Índice exposición P2	>0,10		>0,10	>0,10	0,06	-0,113	>0,10	>0,10	>0,10	

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

concentración de E2, aunque no se observó asociación con el promedio de valores de ITH ni con el índice de exposición en esa etapa. Por otro lado, hay una tendencia de asociación negativa ($p=0,08$, $\beta<0$) con el promedio de ITH en el segundo período de vida intrauterina (151 días hasta el nacimiento), sin mostrar asociación con las otras variables de entrada correspondientes a esa etapa. Esto quiere decir que, los animales que estuvieron expuestos a mayor porcentaje de días con ITH superior a 72 en el primer tercio de vida intrauterina, tuvieron mayor concentración de E2 plasmática. Además, los animales expuestos a mayores valores de ITH en la última etapa de vida intrauterina, presentaron menores concentraciones plasmáticas de esta hormona en la vida adulta.

La concentración de cortisol plasmática tuvo una asociación significativa positiva ($p\leq 0,05$, $\beta>0$) con todas las variables relacionadas al estrés calórico en el primer trimestre de la gestación, y una tendencia de asociación positiva ($p=0,06$; $0,07$ y $0,09$; $\beta>0$) con las correspondientes al primer período de la gestación (0-150 días). Es decir, animales que tuvieron mayor estrés por calor durante las primeras etapas de vida intrauterina, tuvieron mayores concentraciones sistémicas de cortisol en la vida adulta. Por otro lado, se observó una asociación significativa negativa ($p\leq 0,05$, $\beta<0$) entre la concentración plasmática de cortisol y el promedio de ITH en el último trimestre de la gestación y en el segundo período de la misma (151 días hasta el nacimiento). Asimismo, hubo una tendencia de asociación con el índice de exposición en esta etapa. Esto quiere decir que animales expuestos a mayores niveles de ITH durante la última etapa de vida fetal tuvieron menores concentraciones circulantes de cortisol en la vida adulta.

Las concentraciones plasmáticas de P4 e insulina no mostraron asociación con las variables representativas del estrés calórico durante la vida intrauterina.

En la determinación de testosterona en plasma se observó que la mayor parte de las muestras tuvieron niveles por debajo de la sensibilidad de la técnica ($<0,025$ ng/ml), de manera que esta variable no pudo ser analizada estadísticamente.

Con respecto al RFA, se observa una tendencia de asociación negativa ($p=0,10$, $\beta<0$) con el índice de exposición a estrés calórico en los primeros 150 días de gestación. Es decir, animales con mayor exposición a estrés por calor durante esta etapa, tienden a tener menor RFA.

4.2 EXPRESIÓN GÉNICA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES Y MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS

4.2.1 Expresión génica del receptor de glucocorticoides y estado de metilación global del ADN

En la tabla 8 se muestra la asociación entre el estrés por calor durante la vida fetal y la expresión génica del RGC, expresada como niveles relativos de ARNm; también se muestra la asociación con el estado de metilación global, expresado como porcentaje de ADN metilado. Según las distribuciones de frecuencia, se utilizó una función de enlace Normal para los niveles de ARNm y una función Gamma para el porcentaje de metilación global.

Se puede observar que no se hallaron asociaciones significativas entre las variables de entrada analizadas y los niveles de ARNm del RGC.

Con respecto al estado de metilación global del ADN, se observa una tendencia de asociación positiva ($p=0,084$; $\beta>0$) con el promedio de valores de ITH en el segundo trimestre de la gestación. Esto quiere decir que, animales expuestos a mayores niveles de ITH durante esa etapa de vida fetal, tuvieron mayores niveles de metilación global en su ADN.

Tabla 8. Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y la expresión génica del RGC, y el estado de metilación global del ADN. Se detalla el número de datos analizados en cada caso (N), además de la significancia de asociación (p) y el valor del coeficiente de asociación (β) para los casos de asociaciones significativas ($p \leq 0,05$, color verde) y tendencias ($0,05 < p \leq 0,10$, color amarillo).

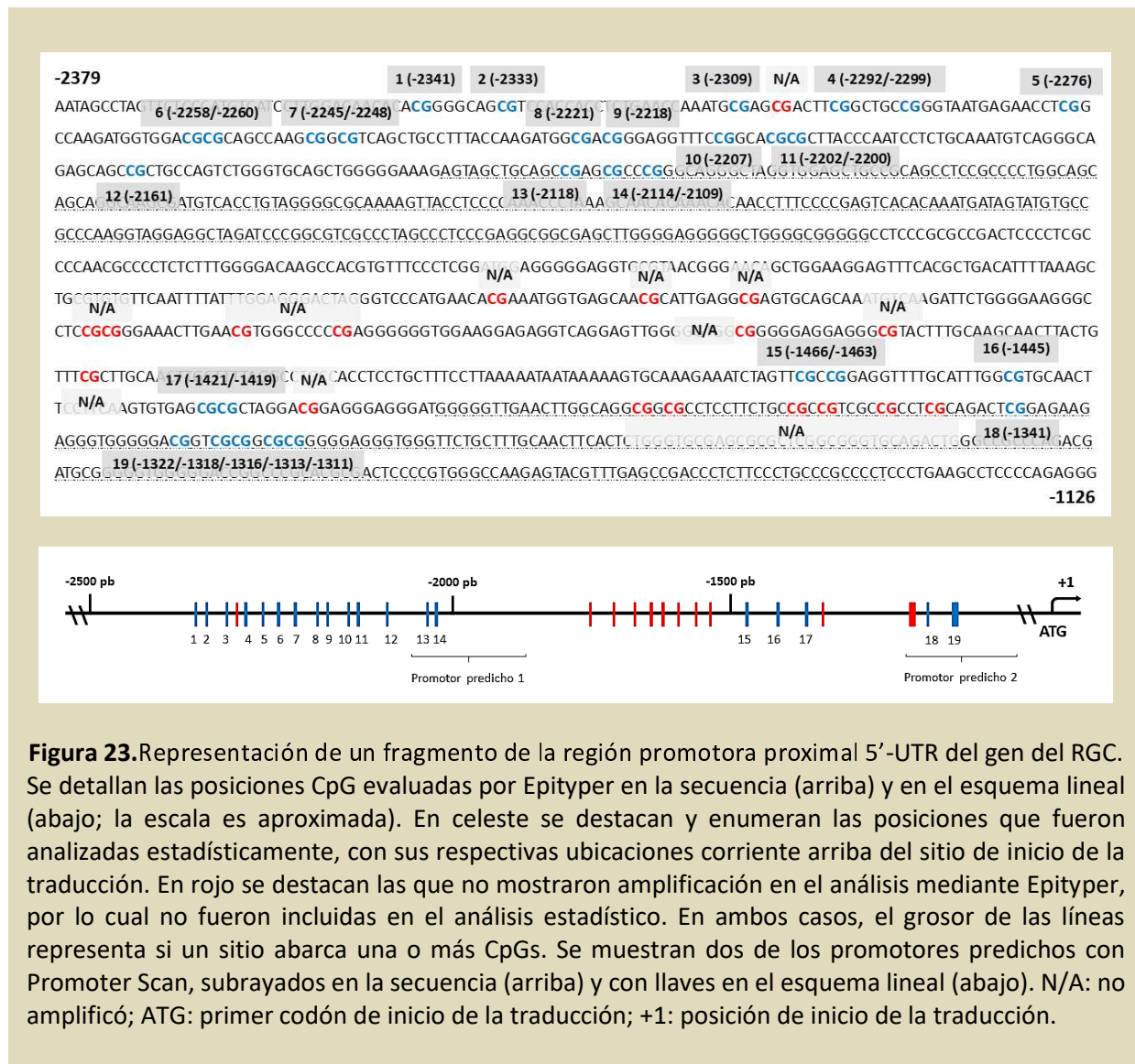
Variable de salida	Niveles relativos de ARNm RGC ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Estado de metilación global (% de ADN metilado)	
N	23	35	
Variable de entrada	p	p	β
ITH promedio gestación	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 gestación	>0,10	>0,10	
ITH promedio T1	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 T1	>0,10	>0,10	
Índice exposición T1	>0,10	>0,10	
ITH promedio T2	>0,10	0,08	0,036
% días ITH ≥ 72 T2	>0,10	>0,10	
Índice exposición T2	>0,10	>0,10	
ITH promedio T3	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 T3	>0,10	>0,10	
Índice exposición T3	>0,10	>0,10	
ITH promedio P1	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 P1	>0,10	>0,10	
Índice exposición P1	>0,10	>0,10	
ITH promedio P2	>0,10	>0,10	
% días ITH ≥ 72 P2	>0,10	>0,10	
Índice exposición P2	>0,10	>0,10	

4.2.2 Estado de metilación de la región promotora del receptor de glucocorticoides

Dentro de la región 5'-UTR proximal del gen del RGC (aproximadamente 3 kpb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción), se evaluó el estado de metilación de 30 posiciones CpG, tal como fue detallado previamente, en 18 muestras de ADN de pared de folículo preovulatorio. En su mayoría comprenden CpGs individuales, aunque en algunos casos una posición incluye dos o más CpGs; en tales casos, el valor del porcentaje de metilación corresponde a un promedio entre

las mismas. Se representa un fragmento de la región y todas las posiciones evaluadas en la Figura 23.

En el análisis estadístico se incluyeron 19 de las 30 posiciones evaluadas mediante Epityper. Dentro de las posiciones no analizadas estadísticamente, 6 de ellas no mostraron amplificación en un 25 a 70 % de las muestras, y, en los otros 5 casos, esto fue así para el 100 % de las muestras.



En la tabla 9 (partes I y II) se muestra la asociación entre el estrés por calor durante la vida intrauterina (variables de entrada) y el estado de metilación de las distintas posiciones CpG evaluadas (variables de salida). Según las distribuciones de frecuencia, para las CpG 11, 14 y 15 se utilizó una función de enlace Gamma, y para el resto se utilizó función de enlace Normal.

Se pueden observar múltiples asociaciones entre las distintas CpG evaluadas y el estrés calórico en las distintas etapas de vida intrauterina. Para facilitar la interpretación, se detalla cada una en la sección 5.2.

Tabla 9 (parte I). Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y el estado de metilación de distintas posiciones CpG dentro de la región promotora del RGC.

Se detalla el número de datos analizados en cada caso (N), además de la significancia de asociación (p) y el valor del coeficiente de asociación (β) para los casos de asociaciones significativas ($p \leq 0,05$, color verde) y tendencias ($0,05 < p \leq 0,10$, color amarillo).

Variable de salida	Met CpG1	Met CpG2	Met CpG3	Met CpG4	Met CpG5	Met CpG6	Met CpG7	Met CpG8	Met CpG9	
N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	
Variable de entrada	p	p	β	p	p	p	p	β	p	β
ITH promedio gestación	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10
% días ITH \geq 72 gestación	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	0,04 -0,002
ITH promedio T1	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	0,10 0,001	0,04 0,005	>0,10
% días ITH \geq 72 T1	>0,10	0,04 -0,0001		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10
Índice exposición T1	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	0,04 0,004	>0,10	0,09 0,008	>0,10
ITH promedio T2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10
% días ITH \geq 72 T2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10
Índice exposición T2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10
ITH promedio T3	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	0,07 -0,004	>0,10
% días ITH \geq 72 T3	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	0,09 -0,0001	0,06 -0,001	>0,10
Índice exposición T3	>0,10	0,02 0,004		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10
ITH promedio P1	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	0,10 0,001	0,10 0,005	>0,10
% días ITH \geq 72 P1	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10
Índice exposición P1	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	0,10 0,01	>0,10
ITH promedio P2	>0,10	0,05 0,002		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	0,06 -0,005	>0,10
% días ITH \geq 72 P2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	0,10 -0,0001	0,04 -0,001	>0,10
Índice exposición P2	>0,10	<0,01 0,006		>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	0,04 -0,011	>0,10

Tabla 9 (parte II). Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y el estado de metilación de distintas posiciones CpG dentro de la región promotora del RGC. Se detalla el número de datos analizados en cada caso (N), además de la significancia de asociación (p) y el valor del coeficiente de asociación (β) para los casos de asociaciones significativas ($p \leq 0,05$, color verde) y tendencias ($0,05 < p \leq 0,10$, color amarillo).

Variable de salida	Met CpG10	Met CpG11	Met CpG12	Met CpG13	Met CpG14	Met CpG15	Met CpG16	Met CpG17	Met CpG18	Met CpG19				
N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18				
Variable de entrada	p	p	β	p	p	p	β	p	p	p	β	p	p	β
ITH promedio gestación	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
% días ITH \geq 72 gestación	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
ITH promedio T1	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
% días ITH \geq 72 T1	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
Índice exposición T1	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
ITH promedio T2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
% días ITH \geq 72 T2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	0,09	-0,0001	>0,10	>0,10	
Índice exposición T2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
ITH promedio T3	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
% días ITH \geq 72 T3	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
Índice exposición T3	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
ITH promedio P1	>0,10	0,04	-0,036	>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
% días ITH \geq 72 P1	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
Índice exposición P1	>0,10	0,04	-0,069	>0,10	>0,10	0,09	-0,063	>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
ITH promedio P2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
% días ITH \geq 72 P2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	
Índice exposición P2	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	>0,10	>0,10		>0,10	0,06	-0,003

4.3 EXPRESIÓN PROTEICA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES, PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E INTERMEDIARIOS DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

4.3.1 Expresión proteica del receptor de glucocorticoides y sus moduladores citoplasmáticos

Se detectó la presencia del RGC y ambos moduladores citoplasmáticos (HSP90 y HSP70) en el citoplasma de ambas capas celulares del folículo preovulatorio (Figura 24). Se puede observar, además, la detección nuclear de estos marcadores, no estudiada en la presente tesis.

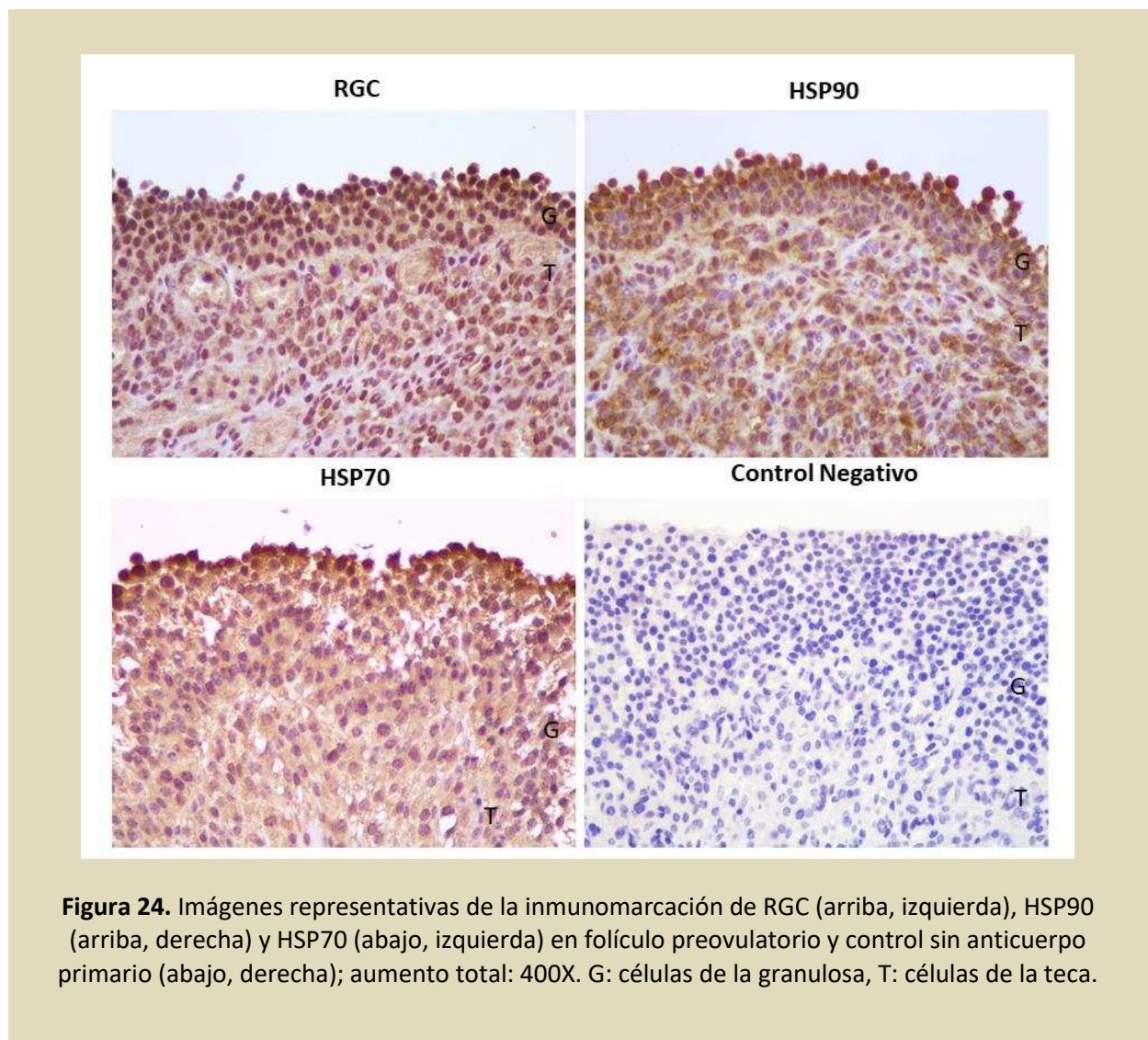


Figura 24. Imágenes representativas de la inmunomarcación de RGC (arriba, izquierda), HSP90 (arriba, derecha) y HSP70 (abajo, izquierda) en folículo preovulatorio y control sin anticuerpo primario (abajo, derecha); aumento total: 400X. G: células de la granulosa, T: células de la teca.

En la tabla 10 se muestra la asociación entre el estrés por calor durante la vida intrauterina (variables de entrada) y la expresión proteica del RGC, HSP90 y HSP70, en el citoplasma de células de la granulosa y de la teca (variables de salida). También se muestra la asociación entre la expresión de ambas HSP (variables de entrada) y la expresión del RGC (variables de salida), en cada capa celular según corresponda. Según las distribuciones de frecuencia, se utilizó una función de enlace Normal para todas las variables.

Tabla 10. Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y la expresión proteica del RGC y sus moduladores citoplasmáticos en células de la granulosa y de la teca. Se detalla el número de datos analizados en cada caso (N), además de la significancia de asociación (p) y el valor del coeficiente de asociación (β) para los casos de asociaciones significativas ($p \leq 0,05$, color verde) y tendencias ($0,05 < p \leq 0,10$, color amarillo).

Variable de salida	RGC granulosa		RGC teca		HSP90 granulosa		HSP90 teca		HSP70 granulosa		HSP70 teca	
N	26		26		26		26		26		26	
Variable de entrada	p	β	p	p	p	p	p	β	p	β		
ITH promedio gestación	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
% días ITH ≥ 72 gestación	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
ITH promedio T1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
% días ITH ≥ 72 T1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
Índice exposición T1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
ITH promedio T2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
% días ITH ≥ 72 T2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	0,09	>0,10	-0,075	>0,10	
Índice exposición T2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
ITH promedio T3	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
% días ITH ≥ 72 T3	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
Índice exposición T3	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
ITH promedio P1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
% días ITH ≥ 72 P1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
Índice exposición P1	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
ITH promedio P2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
% días ITH ≥ 72 P2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10	
Índice exposición P2	>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		>0,10		0,07	-0,692
HSP90 granulosa	<0,01	0,454										
HSP90 teca			>0,10									
HSP70 granulosa	>0,10											
HSP90 teca			>0,10									

Se observa que no hubo asociaciones significativas entre las variables relacionadas con el estrés calórico y la expresión de RGC en granulosa ni teca. La expresión de HSP90 tampoco mostró asociaciones significativas con las variables relacionadas al estrés calórico en ninguna de las capas celulares. Sin embargo, en células de la granulosa, se observó una asociación significativa positiva ($p \leq 0,05$; $\beta > 0$) entre la expresión de HSP90 y la expresión de RGC.

La expresión de HSP70 en células de la granulosa tuvo una tendencia de asociación negativa ($p = 0,09$; $\beta < 0$) con el porcentaje de días con ITH > 72 en el segundo trimestre de la gestación, aunque no se observó asociación con el resto de las variables correspondientes a esa etapa. En células de la teca, hubo una tendencia de asociación negativa ($p = 0,07$; $\beta < 0$) con el índice de exposición en el segundo periodo de la gestación (151 días al nacimiento), sin asociaciones con el resto de las variables correspondientes a esa etapa. La expresión de HSP70 no mostró asociaciones significativas con la expresión del RGC en células de la granulosa ni en células de la teca.

4.3.2 Expresión proteica de intermediarios de la cascada de señalización de insulina

La expresión de los intermediarios de la cascada de señalización de insulina fue analizada con el fin de evaluar la posible interacción con los mecanismos de respuesta no genómicos del RGC.

Se detectó la presencia del receptor de insulina total (IR β total, subunidad citoplasmática del IR) tanto en las células de la granulosa como de la teca interna del folículo preovulatorio. El IR β fosforilado (p-IR β , activo) sólo se detectó en células de la granulosa (Figura 25).

La proteína de unión al IR total (IRS1 total) y fosforilada (p-IRS1, activa) fue detectada en ambas capas celulares del folículo preovulatorio. La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) también fue detectada en ambas capas celulares del folículo preovulatorio. (Figura 26).

En la tabla 11 (partes I y II) se muestra la asociación entre la expresión proteica del RGC (variables de entrada) y la expresión proteica de los distintos intermediarios de la cascada de insulina

evaluados (variables de salida), en células de la granulosa y de la teca. Según las distribuciones de frecuencia, se utilizó una función de enlace Gamma para p-IRS1, y función Normal para el resto de las variables. Se observa que hay una asociación significativa ($p \leq 0,05$) entre la expresión del RGC en células de la granulosa y la expresión de IRS1 total, p-IRS1 y PI3K en las mismas células. Esta asociación es positiva ($\beta > 0$), es decir que animales con mayor expresión del RGC en células de la granulosa tuvieron mayor expresión de IRS1 total, p-IRS1 y PI3K.

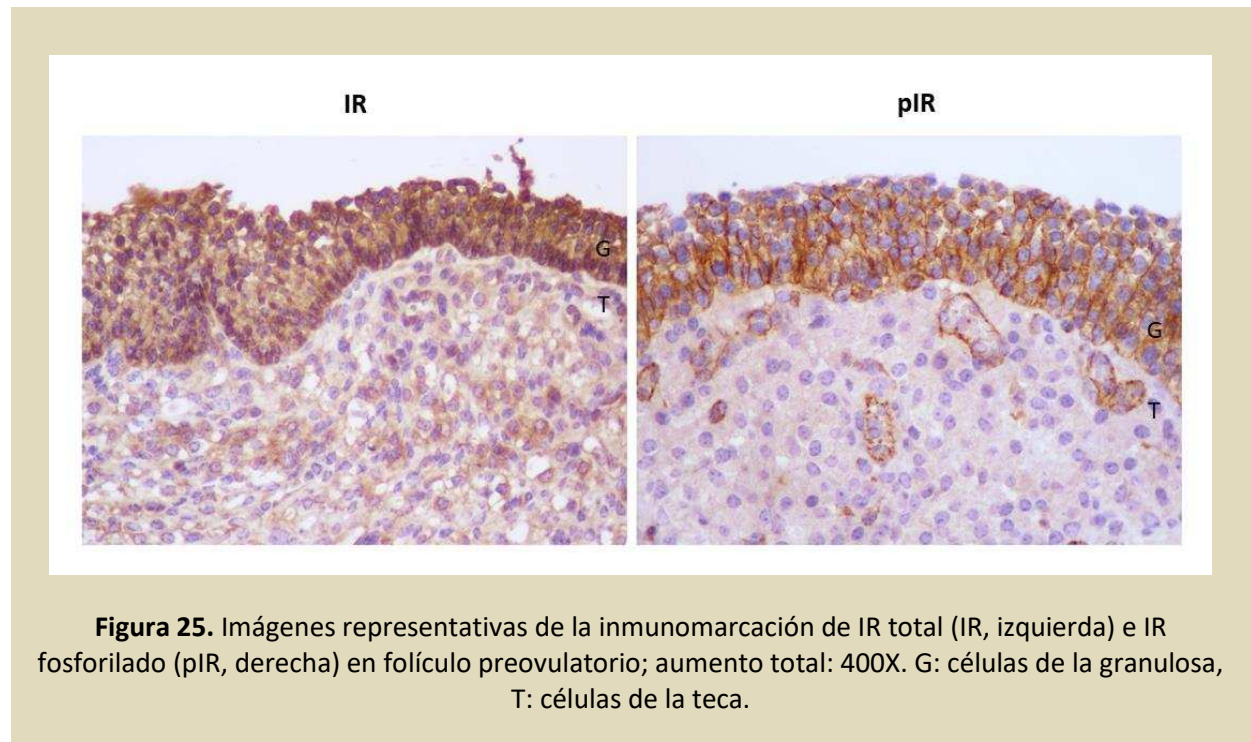


Figura 25. Imágenes representativas de la inmunomarcación de IR total (IR, izquierda) e IR fosforilado (pIR, derecha) en folículo preovulatorio; aumento total: 400X. G: células de la granulosa, T: células de la teca.

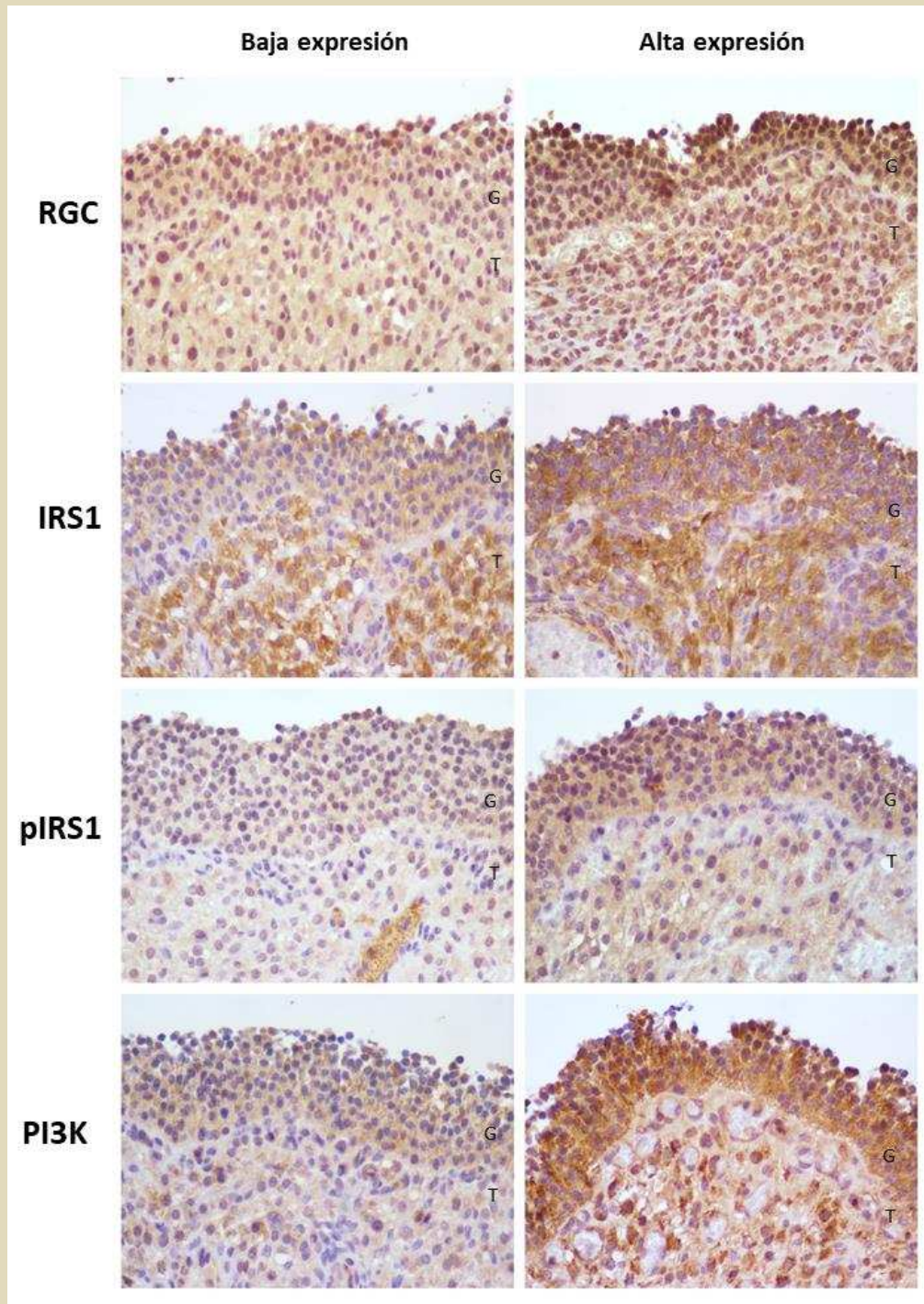


Figura 26. Imágenes representativas de la inmunomarcación de RGC, IRS1 total (IRS1), IRS1 fosforilado (pIRS1) y PI3K en folículo preovulatorio; aumento total: 400X. Se muestran folículos con baja expresión (izquierda) o alta expresión (derecha), para cada caso. G: células de la granulosa, T: células de la teca.

Tabla 11 (parte I). Asociación entre la expresión proteica del RGC y de los intermediarios de la cascada de señalización de insulina.

Se detalla el número de datos analizados en cada caso (N), además de la significancia de asociación (p) y el valor del coeficiente de asociación (β) para los casos de asociaciones significativas ($p \leq 0,05$, color verde) y tendencias ($0,05 < p \leq 0,10$, color amarillo).

Variable de salida	IR total granulosa	IR total teca	p-IR granulosa	IRS1 total granulosa	IRS1 total teca	
N	26	26	26	26	26	
Variable de entrada	p	p	p	p	β	p
RGC granulosa	> 0,10		> 0,10	0,007	1,063	
RGC teca		> 0,10				> 0,10

Tabla 11 (parte II). Asociación entre la expresión proteica del RGC y de los intermediarios de la cascada de señalización de insulina. Se detalla el número de datos analizados en cada caso (N), además de la significancia de asociación (p) y el valor del coeficiente de asociación (β) para los casos de asociaciones significativas ($p \leq 0,05$, color verde) y tendencias ($0,05 < p \leq 0,10$, color amarillo).

Variable de salida	p-IRS1 granulosa		p-IRS1 teca		PI3K granulosa		PI3K teca	
N	26		26		24		24	
Variable de entrada	p	β	p	β	p	β	p	β
RGC granulosa	0,002	0,910			0,038	0,534		
RGC teca			> 0,10				> 0,10	

4.4 ENSAYOS IN VITRO

Estos ensayos se realizaron con el objetivo de establecer la influencia ejercida por el estrés y su respuesta a través del RGC sobre la cascada de señalización de insulina, como parte de sus mecanismos de acción no genómicos. En este sentido, se planteó la realización de estímulos con Dexametasona (GC sintético) en presencia/ausencia de insulina, sobre la línea celular BGC-1, evaluando posteriormente la expresión de los intermediarios de la cascada. En esta tesis se

desarrollaron los modelos para los estímulos correspondientes, optimizando las condiciones para cada caso.

4.4.1 Desarrollo de un modelo para el estímulo del cultivo celular con Dexametasona

En la Figura 27 se muestran imágenes de la inmunodetección por WB del RGC en las muestras del cultivo estimulado con Dexametasona, y el control sin estímulo. Se puede observar en todas las calles una banda a 90 kDa (peso esperado del RGC α). Con respecto a las condiciones, se observa que a las 24 h de estímulo la presencia de Dexametasona induce una expresión del RGC que es mayor que la que se observa en ausencia de la hormona (condición "Basal"), lo cual se mantiene a las 48 h de estímulo. Además, se observa que tanto 1 nM como 100 nM de Dexametasona son las concentraciones que inducen una expresión notable del RGC.

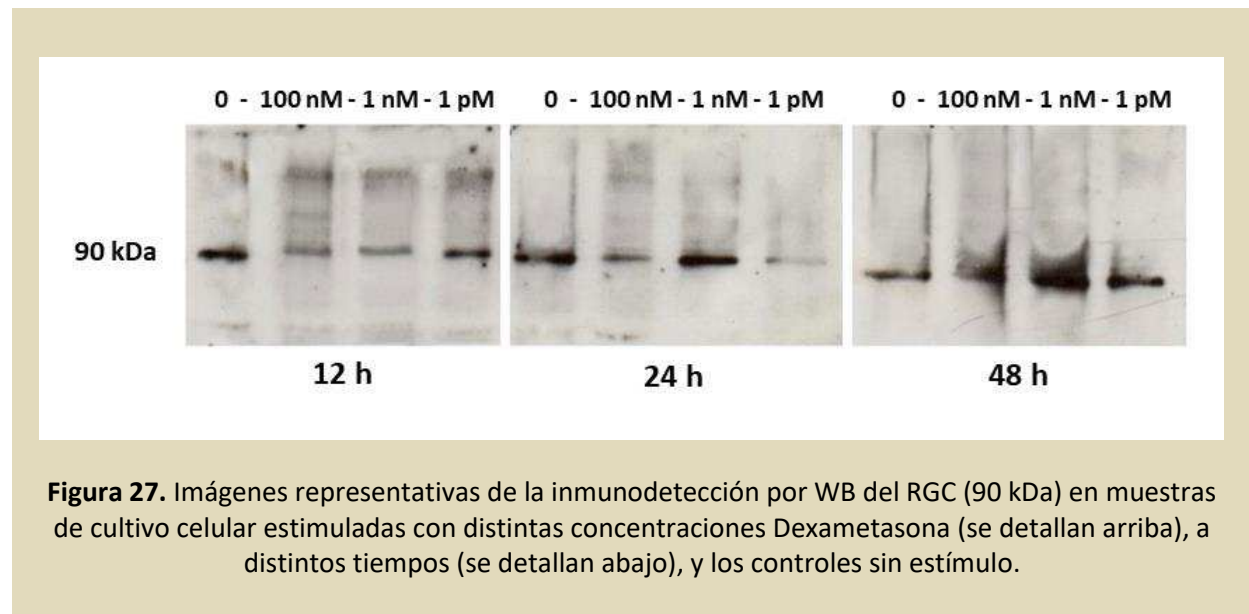


Figura 27. Imágenes representativas de la inmunodetección por WB del RGC (90 kDa) en muestras de cultivo celular estimuladas con distintas concentraciones Dexametasona (se detallan arriba), a distintos tiempos (se detallan abajo), y los controles sin estímulo.

4.4.2 Desarrollo de un modelo para el estímulo del cultivo celular con insulina

En la Figura 28 se muestran imágenes de la inmunodetección por WB de PI3K en las muestras del cultivo estimulado con insulina, y el control sin estímulo. Se puede observar en todas las calles una banda a 85 kDa, correspondiente a la subunidad α p85 de PI3K. Con respecto a las condiciones, se aprecia una baja detección de las bandas a las 24 h. A las 48 h de estímulo se pueden observar bandas en todas las calles, sin diferencias aparentes entre las distintas concentraciones de insulina. Por esta razón, se selecciona la menor concentración (0,1 μ g/ml) para el estímulo combinado de Dexametasona e insulina.

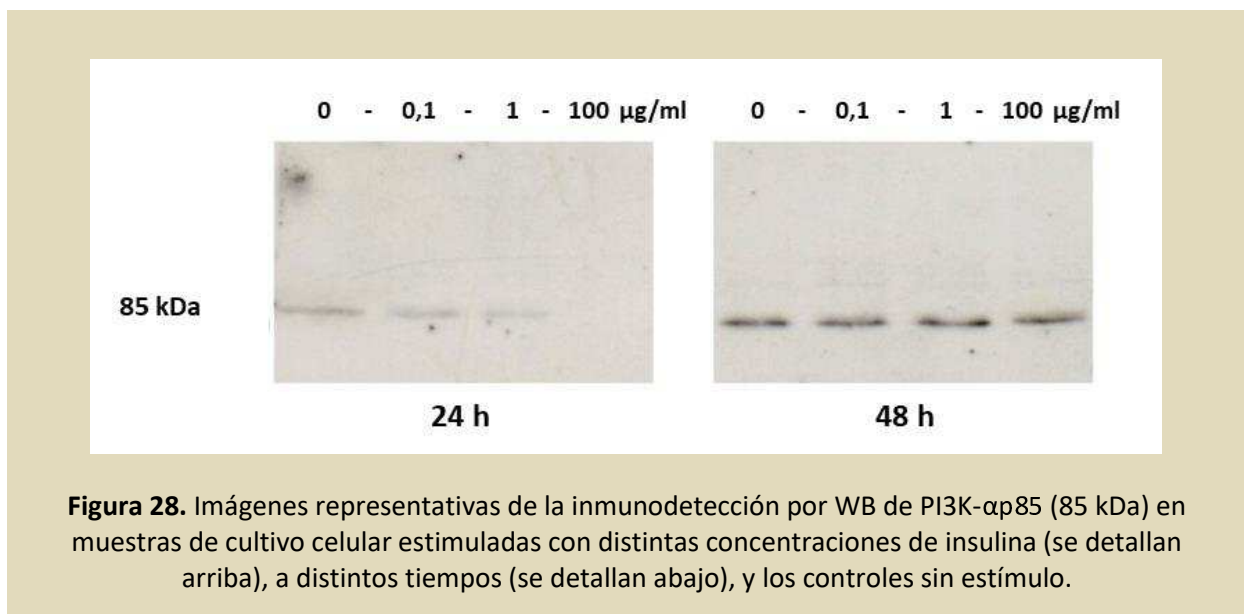
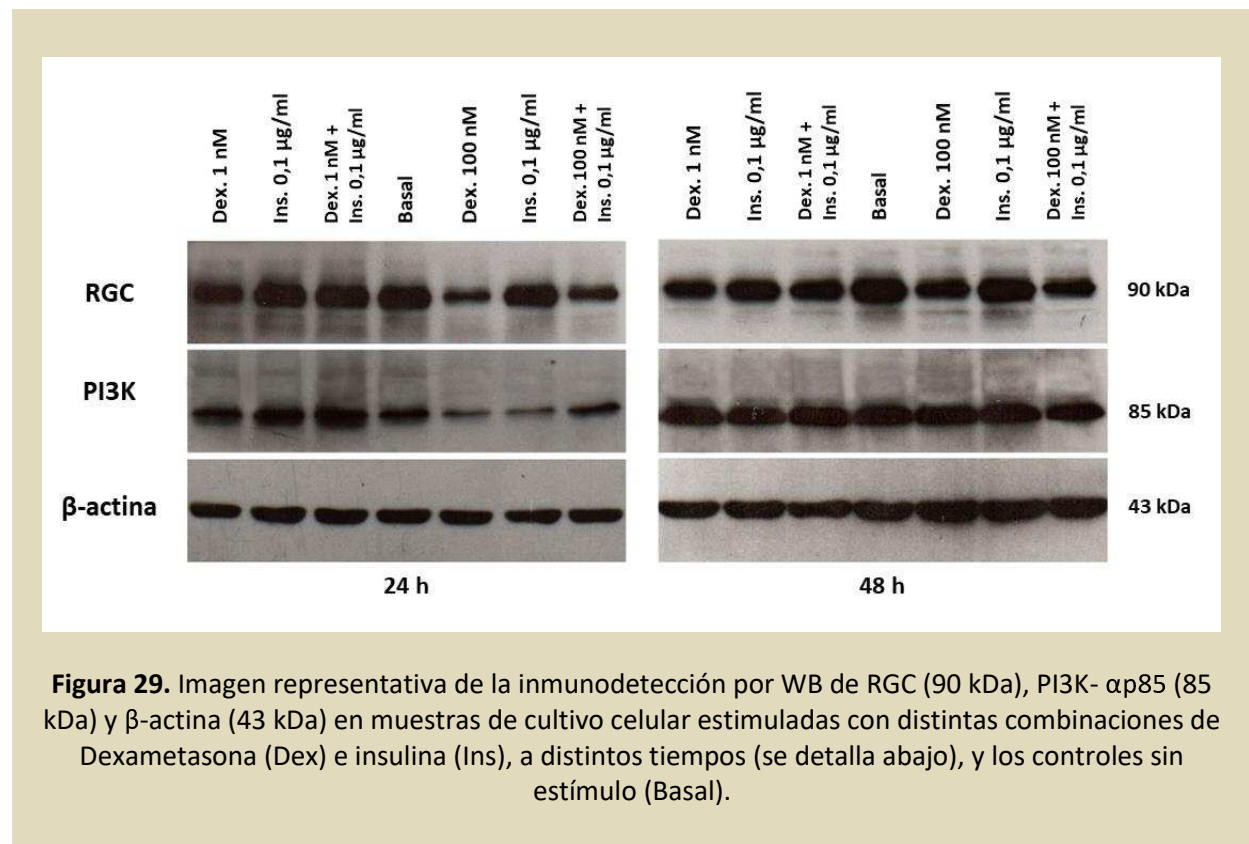


Figura 28. Imágenes representativas de la inmunodetección por WB de PI3K- α p85 (85 kDa) en muestras de cultivo celular estimuladas con distintas concentraciones de insulina (se detallan arriba), a distintos tiempos (se detallan abajo), y los controles sin estímulo.

4.4.3 Desarrollo de un modelo para el estímulo combinado del cultivo celular con Dexametasona e insulina

En la Figura 29 se muestran imágenes representativas de la inmunodetección de RGC, PI3K y β -actina en las muestras de cultivo estimuladas con Dexametasona e Insulina, solos y combinados, y los controles sin estímulo. Se puede observar las bandas correspondientes a los pesos moleculares de estas proteínas (90, 85 y 43 kDa, respectivamente).

Si bien el resultado obtenido no es concluyente, debido a que al momento se ha realizado una sola réplica de este ensayo, se puede observar que la combinación del estímulo con Dexametasona e insulina de 24 hs induce la expresión diferencial del RGC y de PI3K, en comparación con la situación basal (sin estímulo). Además, se observa que estos resultados se aprecian cuando la concentración de Dexametasona es 100 nM, sin observar diferencias aparentes cuando es de 1 nM. Por otro lado, los resultados del ensayo con 48 hs de estímulo muestran diferencias menos claras entre las distintas condiciones de estímulo.



5. DISCUSIÓN

Dentro de los factores ambientales que pueden afectar la eficiencia productiva y reproductiva de bovinos, se ha descrito al estrés por calor como una de las principales causas de pérdidas económicas. Actualmente, para describir las condiciones ambientales que afectan la temperatura ambiental efectiva, se utiliza el Índice de Temperatura y Humedad (ITH), que contempla la temperatura ambiente y humedad relativa, y se ha demostrado su eficacia como índice para evaluar el impacto del estrés térmico en vacas lecheras (De Rensis *et al.*, 2015).

En la zona correspondiente a la cuenca lechera santafesina, son muy frecuentes las situaciones de calor agudo que exceden los niveles de confort de los animales, especialmente en los meses estivales, aunque también suelen presentarse en meses de primavera y otoño. Es por ello que, en la evaluación de la exposición a estrés calórico prenatal de los animales estudiados, pudimos determinar que todos estuvieron expuestos a algún periodo con elevados índices de ITH.

Si bien el impacto de estrés térmico sobre la reproducción bovina está ampliamente estudiado, así como lo están los efectos del estrés prenatal en distintos parámetros de la vida adulta en humanos y otras especies, los resultados presentados en esta tesis contribuirán al conocimiento general y en particular sobre la existencia de una asociación entre parámetros de fertilidad modificados por la exposición a altos niveles de ITH durante el desarrollo.

5.1 Impacto del estrés calórico en la programación fetal de parámetros endocrinos y locales relacionados con la respuesta a estrés y la fertilidad

La programación fetal hace referencia a procesos que ocurren durante la vida intrauterina, en respuesta a estímulos o señales del ambiente, y pueden tener consecuencias a largo plazo en la vida adulta, modulando tanto la salud como la enfermedad. Debido a la frecuente exposición a elevadas temperaturas ambientales que sufren las vacas lecheras a lo largo de la preñez, el estrés por calor es uno de los factores ambientales que pueden inducir la programación fetal del ganado. Los resultados presentados muestran que la exposición a elevados ITH en los primeros 150 días de vida intrauterina, muestran una tendencia a impactar negativamente en el RFA del

animal adulto. Las vacas, al igual que otros mamíferos, nacen con un número elevado y altamente variable de folículos que van disminuyendo a lo largo de la vida reproductiva (Evans *et al.*, 2012). Esta variación en la reserva ovárica se refleja en el número de folículos antrales presentes en el ovario al nacimiento. Debido a que el número de folículos se encuentra determinado durante la gestación (Monniaux *et al.*, 2014), la exposición de la madre a un ambiente adverso, como lo es cuando se encuentran en ambientes con niveles de ITH elevados, puede tener un impacto durante el desarrollo ovárico fetal en la proliferación de ovogonias y, en consecuencia, en el establecimiento de la reserva folicular en el animal adulto. Se ha demostrado por ultrasonografía que el número de folículos con que el animal cuenta es característico de cada individuo y estable a lo largo de la vida fértil (Ireland *et al.*, 2009). En este aspecto, el RFA es un buen predictor de fertilidad en vacas lecheras (Ireland *et al.*, 2011; Mossa *et al.*, 2012), habiéndose relacionado con distintos parámetros relativos a la funcionalidad ovárica y la eficiencia reproductiva. Particularmente, el RFA está altamente correlacionado con las concentraciones circulantes de AMH en bovinos y otras especies (Ireland *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2012). La AMH es una hormona producida exclusivamente por las células de la granulosa de folículos sanos en crecimiento, y este patrón de expresión característico hace de la AMH un marcador endocrino del tamaño de la reserva ovárica en vacas (La Marca y Volpe, 2006; Evans *et al.*, 2012; Akbarinejad *et al.*, 2017). Ha sido establecido que, al igual que el RFA, la concentración de AMH es constante y altamente repetible día a día para un individuo, y muy variable entre poblaciones (Ireland *et al.*, 2011). En este trabajo hemos determinado las concentraciones de AMH en el LF de folículos preovulatorios, sin haber encontrado asociaciones significativas con el estrés calórico durante el desarrollo prenatal. Cabe destacar que la determinación no pudo realizarse en muestras de plasma debido a que las concentraciones presentes fueron menores al límite de detección de la técnica utilizada. Teniendo en cuenta el periodo de establecimiento de la reserva ovárica en vacas, es posible que la exposición a elevados ITH durante los primeros meses del desarrollo prenatal tenga un impacto negativo en el RFA y la fertilidad de vacas lecheras. En un estudio reciente, Akbarinejad *et al.* (2017) reportaron efectos adversos del estrés por calor en vacas gestantes sobre la fertilidad, longevidad productiva y tamaño de la reserva ovárica (determinado por las concentraciones de AMH circulantes) en las crías. En contraste con nuestros

resultados, estos autores encontraron que el segundo y tercer trimestre de la gestación parecen ser los periodos más críticos, teniendo en cuenta la exposición a un promedio mensual de $ITH \geq 72$ por al menos 2,5 meses en cada periodo. Por otro lado, en el marco de un trabajo de tesis paralelo a la presente, en nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que el estrés calórico durante los primeros meses de vida intrauterina se asocia negativamente a parámetros reproductivos como el intervalo parto-concepción y el intervalo parto-primer servicio (Recce *et al.*, enviado a evaluación). Cabe destacar que estos resultados, los cuales respaldan a los reportados en la presente tesis, fueron obtenidos a partir del análisis de una base de datos correspondiente a casi 11000 vacas, provenientes de 43 tambos de la zona, mientras que el estudio llevado a cabo por Akbarinejad *et al.* (2017) evaluó vacas provenientes de un solo establecimiento. Además, si bien en este trabajo no se encontró asociación con la concentración intrafolicular de AMH, podría existir una alteración en los niveles circulantes de esta hormona, lo cual reforzaría la inferencia realizada.

El ambiente endocrino durante el ciclo estral y el correcto desarrollo del folículo preovulatorio son componentes claves para una fertilidad óptima debido a que pueden impactar en la funcionalidad del ovocito, en el número y función de las células de la granulosa y la teca, en el desarrollo adecuado del oviducto y el ambiente uterino, entre otras funciones reproductivas (Wiltbank *et al.*, 2011). Particularmente, en el proestro, las concentraciones hormonales son críticas para que se produzca la ovulación y formación del cuerpo lúteo y, por lo tanto, impacta de manera directa en la eficiencia reproductiva. En este trabajo de tesis, no se encontró asociación del estrés calórico durante el desarrollo intrauterino con las concentraciones circulantes de P4. Sin embargo, al evaluar el contenido hormonal intrafolicular, se determinó que los animales que tuvieron mayores índices de estrés calórico en el segundo trimestre de vida fetal tuvieron mayores concentraciones de P4 en LF en proestro. Esto podría resultar de la diferenciación prematura de las células de la granulosa a luteales, interfiriendo con el proceso de ovulación (Peter *et al.*, 2009). Alternativamente, podría haber una alteración en la expresión y/o actividad de enzimas de la cascada esteroideogénica (Webb y Campbell, 2007), causando un desbalance en la secreción de hormonas al medio folicular. Por otro lado, se debe tener en cuenta que la P4 presente en la circulación no proviene solamente del ovario, sino también de

otras fuentes tales como la corteza adrenal, lo cual podría explicar la diferencia entre los resultados hallados a nivel sistémico y ovárico, sin descartar potenciales acciones compensatorias circulantes.

Nuestros resultados también muestran que las concentraciones circulantes de E2 están influenciadas por el estrés calórico durante el desarrollo intrauterino, dependiendo de la etapa en la que ocurre: en el primer trimestre, más días de exposición a $ITH \geq 72$ se asociaron significativamente con mayores concentraciones plasmáticas de E2 en el proestro, mientras que mayores niveles de ITH en los últimos meses de vida fetal (151 días hasta el nacimiento) tienden a causar menores concentraciones circulantes de E2 en el proestro. Por otro lado, a nivel ovárico se observó que la exposición a más días con $ITH \geq 72$ a lo largo de toda la vida intrauterina se asociaron significativamente con menores concentraciones de E2 en LF de folículos preovulatorios, y que mayores niveles de ITH en dicho período tienden a causar el mismo efecto. Estudios previos en bovinos han demostrado que el estrés térmico durante periodos avanzados de la gestación tiene un impacto negativo en distintos parámetros productivos, reproductivos, metabólicos e inmunológicos de las crías (Tao *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2016a, b). Por su parte, Mossa *et al.* (2009) reportaron que la restricción nutricional de vacas preñadas durante el primer trimestre de la gestación tiene un impacto negativo en el número de folículos presentes en las ondas foliculares de las crías, mientras que Weller *et al.* (2016) reportaron efectos similares relacionados con la sobrenutrición de las madres preñadas, mostrando, además, alteraciones en la expresión de enzimas involucradas en la esteroidogénesis, foliculogénesis y apoptosis en ovarios de la progenie. Estos estudios muestran la importancia de factores que actúan como estresores, presentes durante las distintas etapas del desarrollo prenatal en bovinos en parámetros fenotípicos y funcionales de las crías. Además, los mecanismos involucrados en la programación fetal de distintos parámetros reportada por estos autores, podrían estar involucrados en las alteraciones a nivel endocrino de la progenie encontradas en el presente estudio.

En relación a nuestros hallazgos, es importante resaltar que la alteración en los niveles hormonales, especialmente E2 y P4, puede ser un factor clave en el mantenimiento de los eventos necesarios para una fecundación y posterior gestación exitosa (Wiltbank *et al.*, 2011).

Souza *et al.* (2007) encontraron que animales con mayores concentraciones de E2 en el proestro tuvieron mayor expresión de celo y mayores tasas de preñez luego de la inseminación. En un estudio posterior, estos autores determinaron una relación positiva entre el espesor endometrial en el proestro y la fertilidad de vacas lecheras (Souza *et al.*, 2011). Los animales con un endometrio más delgado fueron los que tuvieron folículos preovulatorios más pequeños y menores concentraciones circulantes de E2, lo cual provoca la reducción en la fertilidad.

El estrés calórico en el último trimestre de la gestación tuvo un impacto negativo en la concentración intrafolicular de testosterona en el proestro. Si bien en este estudio no se evaluó el impacto del estrés calórico en la capacidad esteroidogénica del folículo preovulatorio, es posible que las células de la teca tengan una capacidad reducida de convertir los progestágenos en andrógenos (Schams y Berisha, 2002). Además, esto puede implicar una disminución en la disponibilidad de sustrato para la producción de estrógenos en células de la granulosa (Schams y Berisha, 2002). Si bien no observamos impacto negativo del estrés calórico en este periodo en la concentración de E2 a nivel intrafolicular, sí se observó una disminución general del E2 en animales con mayor exposición a estrés calórico en toda la vida intrauterina.

Por otro lado, en el presente estudio no hallamos asociación entre la exposición a ITH elevados durante la gestación y las concentraciones de insulina sistémicas o intrafoliculares. En concordancia con estos resultados, Tao *et al.* (2014) reportaron que las crías de vacas preñadas que tuvieron condiciones controladas de estrés calórico o “enfriamiento” (acondicionamiento con sistemas de ventilación y aspersores) durante el periodo de secado, mostraron concentraciones similares de insulina circulantes, previo a la realización de pruebas de tolerancia a glucosa y desafío de insulina. Además, observaron que las vacas cuyas madres tuvieron estrés calórico en el periodo preparto mostraron una respuesta a insulina aumentada luego de dichas pruebas respecto de las nacidas de madres del grupo “enfriado”. Es importante destacar que la insulina y el IGF1 (factor de crecimiento similar a la insulina-1), poseen un rol clave en la reproducción, tanto a nivel ovárico como del sistema nervioso central. A nivel de este último, ambas hormonas afectan la secreción de GnRH y, consecuentemente, de LH y FSH (Lucy, 2003; Bossaert *et al.*, 2010). A nivel ovárico, aumentan la sensibilidad de las células ováricas a las gonadotropinas (Lucy, 2003), y estimulan la esteroidogénesis y proliferación celular en los

folículos preovulatorios (Hein *et al.*, 2015), siendo determinantes para el crecimiento y maduración folicular (Kawashima *et al.*, 2007).

En términos generales, nuestros resultados sugieren que la exposición a estrés por calor durante el desarrollo fetal, especialmente durante los últimos meses, podría provocar un ambiente endocrino inadecuado, lo cual podría repercutir en la fertilidad de la progenie. En este sentido, se debe tener en cuenta que la exposición a ITH por encima de los niveles de confort de los animales, desencadena mecanismos adaptativos que incluyen, entre otras cosas, una disminución del consumo de materia seca, y las vacas lecheras son especialmente sensibles a estos cambios debido a que la alta producción requiere una mayor ingesta de nutrientes (Kadzere *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2005; Lucy, 2007). Además, hacia el final de la gestación, comienza a ocurrir una redistribución de nutrientes para satisfacer los requerimientos para el mantenimiento de la preñez y de la producción de leche en el posparto temprano, lo cual afecta el perfil endocrino de los animales (Butler, 2000; Lucy, 2003). Esto provoca un balance energético negativo, con consecuencias en la posterior reanudación de la ciclicidad dado que los perfiles de insulina, IGF1, GH, impactan sobre la secreción de gonadotrofinas que regulan la funcionalidad ovárica durante el posparto (Lucy, 2007). En un estudio controlado, Mossa *et al.* (2013) reportaron que la restricción nutricional de vacas preñadas durante el primer trimestre de la gestación causó un aumento en la concentración de testosterona en las mismas durante el período experimental, y, posteriormente, una disminución de la reserva ovárica en las crías, determinada por una reducción en el RFA y la concentración de AMH, y un aumento en la concentración de FSH. Estos resultados muestran que el estado nutricional de la madre durante la gestación es clave para el correcto desarrollo de la progenie, siendo el primer trimestre el periodo más sensible en cuanto desarrollo reproductivo (Rhind *et al.*, 2001; Monniaux *et al.*, 2014). Asimismo, es posible que la restricción nutricional de la madre en las últimas etapas de la gestación, sumada al desbalance hormonal que provoca, contribuya a los efectos adversos del estrés calórico de vacas preñadas en la programación fetal del perfil endocrino y la fertilidad de las crías.

Uno de los resultados más remarcables que se presentan en esta tesis, es la asociación del estrés calórico durante el desarrollo prenatal con la concentración de cortisol plasmático en vacas

adultas. En el primer trimestre, tanto los niveles de ITH, los días con $ITH \geq 72$ y el índice de exposición a ITH elevados mostraron una marcada asociación positiva significativa con la concentración de cortisol circulante. Además, en los primeros 150 días de vida intrauterina, estas variables mostraron una tendencia de asociación positiva con la concentración de cortisol plasmático. Es decir, los animales cuyas madres estuvieron bajo estrés calórico en los primeros meses de gestación, tuvieron elevada concentración de cortisol circulante en el proestro en la vida adulta. A nivel folicular, sólo se observó una tendencia de asociación positiva con los días con $ITH \geq 72$ en el primer trimestre. En este sentido cabe destacar que los GCs circulantes provienen mayormente de la corteza adrenal, por lo cual es posible que los niveles intrafoliculares difieran de lo observado a nivel sistémico, aunque sí se observa que en ambos casos la asociación es positiva. Por otro lado, se observó una asociación negativa significativa con los valores de ITH en el último tercio de la vida fetal, y en el segundo periodo (151 días-nacimiento), y una tendencia de asociación negativa con el índice de exposición en esta etapa. Esto indica que el estrés calórico en los últimos meses del desarrollo fetal provocó menores concentraciones de cortisol en sangre, sin determinarse un efecto a nivel folicular. Si bien se observa que el impacto del estrés calórico en la concentración de cortisol es diferente según la etapa del desarrollo fetal en la que ocurre, estos resultados indican una posible respuesta a estrés alterada en los animales en la vida reproductiva adulta. Estos resultados concuerdan parcialmente con un estudio realizado en primates, donde la exposición de hembras preñadas a situaciones causantes de estrés -movimiento a una zona oscura, donde fueron sometidas a protocolos acústicos de sobresalto durante 10 minutos, 5 días a la semana por 6 semanas- resultó en elevados niveles de cortisol basal en las crías (Pryce *et al.*, 2011). A diferencia de lo encontrado en nuestro estudio, en este caso, se obtuvo el mismo resultado tanto cuando el estrés ocurrió en etapas tempranas como tardías de la gestación. En un estudio llevado a cabo en humanos (O'Donnell *et al.*, 2013), se observó que el estrés de madres embarazadas durante los últimos meses de gestación -presencia de ansiedad o depresión- se asoció con menores niveles de cortisol diurnos en los hijos en la adolescencia. En este caso, los resultados respaldan los obtenidos en nuestro estudio, a pesar de las diferencias respecto de los estresores, especie y momento de determinación del cortisol. Por otro lado, en estudios realizados en bovinos, se

observó que en las crías cuyas madres fueron sometidas a estrés por transporte durante los primeros 140 días de la preñez, el peso de la hipófisis aumentó significativamente (Lay *et al.*, 1997a) y el *clearance* de cortisol fue más lento que en los controles (Lay *et al.*, 1997b). En contraste, en cabras, se observó que el transporte repetido durante el último tercio de la gestación no tuvo efectos sobre las concentraciones de cortisol basales en la descendencia, pero influyó significativamente en el sistema simpático-adreno-medular (Roussel *et al.*, 2005). En un estudio reciente, Monteiro *et al.* (2014), observaron que terneras cuyas madres tuvieron estrés térmico durante el periodo de secado, tuvieron menores niveles circulantes de cortisol en las primeras semanas de vida comparadas con terneras provenientes de madres “enfriadas” en ese periodo. En síntesis, se demuestra que la exposición a estrés durante el desarrollo fetal, es capaz de alterar la respuesta a estrés y la funcionalidad del eje HHA de las crías en distintas etapas de su vida.

Nuestros resultados muestran evidencias del potencial efecto del estrés por calor en la programación fetal de la respuesta a estrés en la vaca lechera. Considerando el período de establecimiento de la reserva folicular ovárica, directamente relacionada con la fertilidad de las vacas lecheras, la alteración en la funcionalidad del eje HHA y la respuesta a estrés podría resultar en un impacto en la funcionalidad del eje HHO y la eficiencia reproductiva de las crías en la vida adulta (Huber *et al.*, enviado a evaluación).

5.2 Impacto del estrés calórico prenatal en la expresión génica del receptor de glucocorticoides y la regulación epigenética de la misma

En esta tesis se planteó como hipótesis que la exposición de vacas lecheras a estrés por calor durante la gestación puede resultar en cambios en los patrones de expresión del RGC en los ovarios de las hijas, alterando de esta manera la respuesta local a GCs, y, en consecuencia, comprometer la funcionalidad ovárica y la fertilidad de la progenie. Para ello, en principio, se evaluó la expresión génica del RGC en muestras de pared del folículo preovulatorio de animales que fueron gestados en distintas épocas del año. Por otro lado, nos propusimos estudiar las modificaciones epigenéticas que podrían modular la expresión génica del RGC y que, además, pueden estar programadas durante el desarrollo fetal.

En la evaluación de la expresión génica del RGC, no se encontraron asociaciones con las variables referidas a la exposición a $ITH \geq 72$ durante la vida intrauterina.

Con respecto a la evaluación de modificaciones epigenéticas capaces de regular la expresión génica, se evaluó, por un lado, el estado de metilación global del ADN genómico. Ha sido reportado que la hipometilación global induce la inestabilidad del genoma y contribuye, entre otras cosas, a la transformación celular que ocurre en la formación de tumores (Hsiung *et al.*, 2007; Kulis y Esteller, 2010; Allis y Jenuwein, 2016). Asimismo, se ha descrito que una disminución del estado de metilación global del genoma se asocia al proceso de envejecimiento, con una gran variabilidad entre individuos (Jones *et al.*, 2015), y a enfermedades como la esquizofrenia (Shimabukuro *et al.*, 2007) y la diabetes mellitus tipo 1 (Arroyo-Jousse *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que la exposición de ratas hembras a uranio durante la gestación provocó una disminución en la metilación global en los ovarios de las propias ratas expuestas, en las crías y en la subsiguiente generación, mostrando un efecto de programación fetal con alcance transgeneracional (Elmhiri *et al.*, 2018). En nuestro estudio, no encontramos asociaciones significativas del estrés calórico durante el desarrollo fetal con estado de metilación global del genoma, determinado a partir de muestras de sangre periférica, aunque sí observamos una tendencia de asociación positiva con los valores de ITH en el segundo trimestre de vida

intrauterina. Es decir, tiende a existir una hipermetilación de todo el genoma en animales que estuvieron expuestos a elevados niveles de ITH durante esa etapa. Si bien encontramos solo una tendencia, esto muestra un posible impacto del estrés por calor percibido durante el desarrollo fetal en el estado de metilación del genoma, y, consecuentemente, esto podría conllevar a un efecto perjudicial en los niveles transcripcionales generales de estos animales.

Por otro lado, es de especial interés la regulación específica de la expresión del gen del RGC, por lo cual evaluamos el estado de metilación de la región promotora del mismo, analizando el porcentaje de metilación de 19 sitios de metilación, numerados consecutivamente según su ubicación corriente arriba del sitio de inicio de la traducción (+1).

Entre los sitios CpG evaluados, algunos de ellos (CpG1 a 12) se encuentran dentro de 200 pb corriente arriba de uno de los promotores predichos por *Promoter Scan* (promotor predicho 1) y dos de ellos están incluidos en este promotor (CpG13 y 14), tal como se muestra en la figura 23. Además, las CpG15 a 17 se encuentran dentro de 70 pb corriente arriba de otro de los promotores predichos (promotor predicho 2), y las CpG18 y 19 se encuentran dentro del mismo. En este sentido, se debe tener en cuenta que este programa estima los *posibles* sitios de unión de factores de transcripción. Además, si bien se encuentra disponible la secuencia de la región 5'-UTR del gen del RGC bovino, hasta el momento no se han identificado los distintos exones 1 no codificantes dentro de la misma para esta especie. Es por ello que, al momento del análisis, se tiene en cuenta que las CpGs *cercanas* a los promotores predichos podrían formar parte de los promotores verdaderos y regulan, en efecto, la expresión génica del RGC.

Se observó que las **CpG7 y 8**, cercanos entre sí, tuvieron un patrón de metilación similar, y mostraron asociaciones semejantes con las variables representativas del estrés calórico prenatal. Por un lado, se observó una asociación positiva del estrés calórico en los primeros meses de vida intrauterina (T1: 0 a 90 días, y P1: 0 a 150 días) con la metilación de estas CpG, que fue significativa en un caso y tendencia en otros casos (se detalla en **Tabla 9**). Esto quiere decir que animales que estuvieron expuestos a ITH elevados en los primeros meses de desarrollo prenatal, tienden a mostrar una hipermetilación en estas posiciones CpG. Por otro lado, se observó un resultado inverso en el caso de animales cuyas madres tuvieron estrés por calor en los últimos meses de gestación (T3: 181 días al nacimiento, y P2: 151 días al nacimiento), ya que hubo una

asociación negativa de algunas de las variables representativas de estrés calórico en estas etapas con la metilación de estas CpG (se detalla en **Tabla 9**). Es decir, animales que estuvieron bajo estrés por calor en los últimos meses de desarrollo fetal tienden a mostrar una hipometilación de estos sitios. En este aspecto, es interesante destacar que, si bien estos sitios se encuentran por fuera del promotor predicho, se observó que entre ellos existe una secuencia que fue reportada como sitio de unión para un factor de transcripción (Ying Yang 1, o YY1), previamente descrito en la región promotora del RGC humano y murino (Breslin y Vedeckis, 1998; Turner *et al.*, 2010). Este factor de transcripción se expresa constitutivamente en una amplia variedad de tejidos en mamíferos, y puede actuar como activador, como represor o como iniciador de la transcripción, dependiendo del contexto (Breslin y Vedeckis, 1998; Turner *et al.*, 2010). En el caso del RGC, estos autores reportaron que YY1 actuaría como *activador* de la transcripción, de manera que la hipometilación de su sitio de unión podría resultar en una mayor expresión del RGC, mientras que la hipermetilación podría derivar en una menor expresión del mismo. De esta manera, nuestros resultados indicarían que los animales nacidos de madres que tuvieron estrés por calor durante las primeras etapas de la gestación, tendrían una menor expresión del RGC en el ovario, mientras que animales nacidos de madres que tuvieron estrés calórico en las últimas etapas de la gestación tendrían una mayor expresión del RGC en el ovario.

De manera similar, entre los sitios **CpG5 y 6**, ubicadas 10-20 pb corriente arriba de CpG7, se encuentra otro sitio de unión para YY1. En el caso de CpG5, no hubo asociaciones del estado de metilación con el estrés calórico en ninguna de las etapas del desarrollo intrauterino, mientras que la metilación del sitio CpG6 mostró una asociación significativa positiva con el índice de exposición en el T1. En otras palabras, animales expuestos a mayores niveles de ITH en esta etapa mostraron hipermetilación en la CpG6. Este resultado concuerda con lo encontrado para las CpG7 y 8, es decir, estos animales tendrían una menor expresión del RGC en el ovario.

Con respecto a las **CpG1 a 4**, sólo se observaron asociaciones en la CpG2, con un resultado opuesto al observado para las CpG descritas previamente (se detalla en la **Tabla 9**). En este caso, hubo una asociación significativa *negativa* entre el porcentaje de días con ITH \geq 72 en el T1 y la metilación de CpG2; es decir, animales expuestos a un mayor porcentaje de días con ITH \geq 72 en esta etapa del desarrollo prenatal, tuvieron una hipometilación en este sitio. Inversamente, se

observó una asociación significativa *positiva* del índice de exposición a estrés calórico en el T3 con la metilación de CpG2. Asimismo, hubo una asociación significativa *positiva* de los niveles de ITH en los últimos 150 días de gestación y del índice de exposición en esa etapa con la metilación de CpG2. En otras palabras, animales con mayor exposición a ITH elevado en los últimos meses de desarrollo fetal tuvieron una hipermetilación en este sitio. Si bien no hemos podido identificar sitios de unión para algún factor de transcripción alrededor de estas posiciones CpG en la secuencia de bovinos, sí se detectó un tercer sitio de unión para YY1, idéntico a los dos anteriores, aproximadamente 100 pb corriente arriba de la CpG1. En este sentido, en la región promotora del RGC humano también existen 3 sitios YY1 cercanos entre sí, corriente arriba del exón no codificante 1-D, al igual que ocurre para la secuencia murina, corriente arriba del exón 1-4, homólogo al 1D (Breslin y Vedeckis, 1998; Turner *et al.*, 2008, 2010). Observando esta similitud con la secuencia evaluada en bovinos, es posible suponer que haya más sitios de unión no identificados en la secuencia de interés en bovinos, los cuales podrían activar o reprimir la transcripción. Además, los factores de transcripción suelen interactuar entre sí en la regulación transcripcional (Breslin y Vedeckis, 1998; Turner *et al.*, 2008). Adicionalmente, el estado de metilación de estos sitios podría interferir en la unión de los factores de transcripción, sumando otro nivel de complejidad a la regulación de la expresión génica del RGC.

Inmediatamente corriente abajo de la CpG8, se encuentran las **CpG9, 10 y 11 (Figura 23)**. Se observó una asociación significativa negativa entre la metilación de CpG9 y el porcentaje de días con $ITH \geq 72$ a lo largo de toda la vida intrauterina, es decir, a mayor cantidad de días de exposición a ITH altos durante todo el desarrollo prenatal, los animales tuvieron una hipometilación en este sitio. No se observaron asociaciones en ninguna de las etapas en particular. Para la CpG10, no hubo asociaciones en ningún caso. Respecto a la CpG11, se observó asociación significativa *negativa* de los niveles de ITH y del índice de exposición en los primeros 150 días con la metilación en este sitio. Esto quiere decir que animales con mayor exposición a ITH elevados en esta etapa, tuvieron una hipometilación en esta posición CpG. Luego, aproximadamente 40 pb corriente abajo de estas, se encuentra **CpG12**, y otras 40 pb más adelante, ya dentro del promotor predicho 1, están las **CpG13 y 14 (Figura 23)**. Para las CpG 12 y 13, no se observaron asociaciones entre la metilación y el estrés por calor prenatal. Para la CpG14, sí se observó una tendencia de asociación

negativa con el índice de exposición en los primeros 150 días, semejante a lo ocurrido con la CpG11; es decir, animales que estuvieron expuestos a mayores ITH en los primeros meses del desarrollo intrauterino, tuvieron una hipometilación en este sitio. Estas CpG se encuentran dentro (CpG 14) o 70 pb corriente arriba (CpG11) del promotor predicho 1. Esto quiere decir que, en efecto, existen sitios de unión para factores de transcripción alrededor de las mismas, aunque no hemos podido identificarlos específicamente. No obstante, está claro que las CpG evaluadas se encuentran dentro de una región reguladora de la transcripción, junto con otras no evaluadas, de manera que el estado de metilación de las mismas es capaz de influir en la modulación de la expresión génica del RGC.

Como se mencionó previamente, cercano al promotor predicho 2 se encuentran las **CpG15, 16 y 17 (Figura 23)**. No se observaron asociaciones entre el estrés calórico durante el desarrollo intrauterino y la metilación de CpG15 y 16, en ninguna de las etapas. En el caso de CpG17, sí se observó una tendencia de asociación *negativa* entre la metilación de la misma y el porcentaje de días con $ITH \geq 72$ en el segundo trimestre de vida intrauterina. Es decir, animales que estuvieron expuestos a más días con ITH alto en esa etapa del desarrollo tendieron a tener una hipometilación en esa posición CpG. Por otro lado, dentro del promotor predicho 2 se encuentran las **CpG18 y 19**. La metilación de la CpG18 no mostró asociaciones con el estrés térmico prenatal en ninguna de las etapas evaluadas. Para la CpG19, en cambio, se observó una tendencia de asociación *negativa* entre el índice de exposición en el P2 (151 días-nacimiento) y la metilación de la misma. Esto quiere decir que animales expuestos a mayores niveles de ITH durante esa etapa del desarrollo fetal, tuvieron una tendencia a tener hipometilación en ese sitio CpG. Nuevamente, estas CpG se encuentran alrededor o dentro de un promotor predicho, de manera que, cercano a las mismas, existen sitios de unión para factores de transcripción. Por lo tanto, el estado de metilación de dichas CpG podría de influir en la modulación de la expresión génica del RGC.

En síntesis, en este trabajo de tesis pudimos demostrar, al menos en parte, que el patrón de metilación de la región promotora del gen del RGC se encuentra alterado en animales expuestos a elevados ITH en las distintas etapas de su desarrollo intrauterino. Tal como fue ampliamente reportado en otras especies, este gen posee una compleja región promotora corriente arriba del

primer exón codificante (exón 2), encargada de regular los niveles de expresión del RGC y los patrones de expresión del mismo de una manera tejido-específica (Turner y Muller, 2005; Turner *et al.*, 2006, 2008; Sun *et al.*, 2014; Watkeys *et al.*, 2018). Además, esta región es sensible a distintas modificaciones epigenéticas capaces de interferir en la regulación de la transcripción, las cuales son susceptibles a la influencia del ambiente (Lillycrop *et al.*, 2007; Witzmann *et al.*, 2012; Cao-Lei *et al.*, 2013). Como se mencionó previamente, si bien la metilación del ADN es la modificación epigenética más ampliamente estudiada, existen otras modificaciones que regulan la expresión génica, tales como modificaciones en las histonas o ARN no codificantes (Jirtle y Skinner, 2007; Saffery y Novakovic, 2014). Por esta razón, no es posible elaborar conclusiones definitivas respecto de la regulación de la expresión génica del RGC teniendo en cuenta sólo el estado de metilación de su región promotora. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio aportan valiosa información acerca del impacto del estrés calórico durante el desarrollo fetal en el estado de metilación de este gen en el ovario bovino, la cual es capaz de modular la expresión del RGC y alterar, de esta manera, la respuesta a GCs.

5.3 Impacto del estrés calórico prenatal en la expresión proteica del receptor de glucocorticoides y sus moduladores citoplasmáticos

La respuesta celular a GCs es el resultado de la interacción entre 3 parámetros: la concentración de hormona libre, la potencia relativa de la misma, y la capacidad de la célula de recibir y transducir la señal. Este último punto se refiere a la disponibilidad de RGC en la célula y su activación luego de la unión a GCs, liberándose del complejo multiproteico con HSPs y otras proteínas (Bamberger *et al.*, 1996).

En la evaluación de la expresión proteica del RGC en la pared del folículo preovulatorio de los animales estudiados, se observó que el mismo se expresa en ambos estratos celulares de la pared folicular, tanto en el citosol como en el núcleo. Estos resultados respaldan los publicados previamente por nuestro grupo de trabajo y por otros autores, donde se reporta la presencia del RGC en células de la granulosa y teca interna de folículos ováricos bovinos en distintos estadios

de desarrollo (Tetsuka *et al.*, 2010; Amweg *et al.*, 2016). No se observó asociación de la expresión proteica del RGC citoplasmático con las variables referidas al estrés calórico prenatal, en células de la granulosa ni de la teca interna, en concordancia con los resultados obtenidos en la evaluación de la expresión génica. No obstante, teniendo en cuenta los resultados observados respecto de las modificaciones epigenéticas que modulan la expresión del RGC, es posible que existan otros mecanismos epigenéticos involucrados en esta regulación, los cuales no fueron evaluados en esta tesis.

Por otro lado, se detectó la presencia de HSP90 en células de la granulosa y teca interna, tanto en citoplasma como en núcleo, aunque en este trabajo sólo se analizó la expresión citoplasmática. Previamente nuestro grupo de trabajo describió la expresión de HSPs en folículos ováricos bovinos en distintos estadios de desarrollo (Velazquez *et al.*, 2010), aunque, en ese caso, no se evaluó la expresión en folículos preovulatorios. No obstante, sí se detectó la presencia de HSP90 en células de la granulosa y teca interna de folículos antrales en crecimiento. En el presente trabajo, no se observó asociación del estrés calórico en ninguna de las etapas del desarrollo fetal con la expresión proteica de HSP90, en células de la granulosa ni de la teca interna. Sin embargo, se observó una asociación significativa positiva entre la expresión de HSP90 y del RGC en células de la granulosa, lo cual implica que a mayor expresión de HSP90, mayor expresión del RGC. En este sentido, se ha descrito previamente la función de HSP90 en la formación del complejo citoplasmático que mantiene al RGC inactivo en ausencia de GCs. En este complejo multiproteico, HSP90 es esencial para la maduración final del RGC ya que colabora para que alcance un estado sensible a la activación por GCs (Grad y Picard, 2007).

Por último, la expresión proteica de HSP70 también fue detectada en células de la granulosa y teca interna de folículos preovulatorios, aunque sólo fue analizada la expresión citoplasmática. Al igual que HSP90, HSP70 fue detectada previamente por Velázquez *et al.* (2010) en células de la granulosa y de la teca de folículos ováricos bovinos en distintos estadios de desarrollo, incluyendo folículos antrales en crecimiento. En nuestro trabajo, se observó que animales expuestos a mayor porcentaje de días con $ITH \geq 72$ en el segundo trimestre de vida intrauterina tienden a expresar menores niveles de HSP70 en células de la granulosa. Además, se observó que animales expuestos a mayores índices de estrés calórico desde los 151 días de gestación hasta el

nacimiento presentaron una tendencia a tener una menor expresión de HSP70 en la teca interna. El análisis de este resultado, estaría en concordancia con lo postulado previamente que indicaría que los animales expuestos a estrés por calor durante las primeras etapas del desarrollo fetal, tendrían una menor expresión del RGC en el ovario, mientras que los expuestos en las últimas etapas del desarrollo fetal tendrían una mayor expresión del RGC en el ovario, confluendo en detrimento de la respuesta a GCs. Sin embargo, no se observó asociación de la expresión de HSP70 con la expresión del RGC, en células de la granulosa ni de la teca interna. En este aspecto, si bien HSP70 no es esencial para la unión del RGC a la hormona, esta chaperona es requerida para el correcto plegamiento y formación del complejo multiproteico (Dittmar y Pratt, 1997; Grad y Picard, 2007), cuyo efecto neto consecuente en la respuesta modulada por GCs podría evaluarse indirectamente, resultando en una potencial respuesta alterada frente a situaciones de estrés.

En resumen, nuestros resultados indican que la expresión de RGC no estaría afectada por la exposición a estrés calórico durante el desarrollo prenatal. Además, dentro de los moduladores citoplasmáticos del RGC evaluados en esta tesis, se podría inferir que la expresión de HSP90 en células de la granulosa y de la teca interna tampoco es afectada por el estrés calórico prenatal, mientras que la expresión de HSP70 sí lo es. Asimismo, pudimos corroborar que RGC y HSP90 aumentan su expresión de manera conjunta, corroborando la importancia de esta chaperona en la modulación citoplasmática del receptor. De esta manera, podemos suponer que, si bien la concentración de cortisol se encuentra alterada en animales cuyas madres tuvieron estrés calórico en distintas etapas de la gestación, la respuesta a GCs evaluada no se vería modificada. Sin embargo, tal como se expuso, existen otras modulaciones adicionales a las estudiadas y otras respuestas en las que participan los GCs que podrían encontrarse modificadas considerando los numerosos blancos de los mismos, no sólo por las vías no genómicas aquí analizadas, sino, además, a través de sus respuestas clásicas como factores transcripcionales.

5.4 Interacción de los mecanismos de respuesta no genómicos del receptor de glucocorticoides con la cascada de señalización de insulina

Además de las funciones ampliamente conocidas del RGC en el núcleo como modulador de la transcripción, se ha descrito que el RGC citosólico, luego de ser activado por GCs, es capaz de interactuar con proteínas involucradas en otras vías de señalización intracelular, como por ejemplo la vía de la PI3K/AKT (Limbourg y Liao, 2003). Dentro de los procesos celulares en los que participa, la vía PI3K/AKT forma parte de la vía de señalización de insulina.

En este trabajo de tesis, evaluamos la expresión proteica de distintos intermediarios de la cascada de señalización de insulina, totales y activos, en folículos preovulatorios de vacas lecheras. Además, analizamos la asociación de la expresión del RGC con los intermediarios evaluados. La expresión proteica de IR fue detectada en la membrana celular, tanto en células de la granulosa como de la teca interna. La expresión de IRS1 y PI3K fue detectada en el citoplasma de ambos tipos celulares. La expresión detectada del IR y los intermediarios IRS1 y PI3K, concuerda con el hecho de que IR es un receptor transmembrana mientras que IRS1 y PI3K son intermediarios citoplasmáticos (Yunn *et al.*, 2018). Trabajos previos realizados en nuestro grupo han determinado la presencia de estos intermediarios en folículos ováricos bovinos (Hein *et al.*, 2015). La expresión del p-IR sólo fue apreciable en células de la granulosa, sin detectarse expresión en células de la teca interna. Si bien en este trabajo no se realizó la comparación de la expresión entre los distintos estratos celulares, en las imágenes representativas se puede apreciar que la inmunomarcación de IR es visiblemente mayor en células de la granulosa que en la teca interna. En el trabajo publicado por Hein *et al.* (2015), también se reporta una expresión mayor de IR en células de la granulosa en comparación con la teca interna. En este sentido, ha sido previamente demostrada la importancia de la insulina en el desarrollo folicular y la esteroidogénesis, así como en el proceso ovulatorio (Shimizu *et al.*, 2008; Bossaert *et al.*, 2010; Hein *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta estos resultados conjuntamente con los hallados en esta tesis, es posible inferir que las células de la granulosa son el principal blanco de la acción de la insulina en la función ovárica. Por otro lado, la expresión de p-IRS fue detectada tanto en células de la granulosa como en la teca interna. Cabe destacar, que la activación de este intermediario

es compartida por otras vías de señalización, como ser de factor de crecimiento IGF1, entre otros (Rodríguez *et al.*, 2017), por lo que posibles diferencias en la activación determinada podrían deberse a respuestas mediadas por ellos.

Al evaluar la asociación de la expresión del RGC con estos intermediarios, se observó que no hubo asociación con la expresión del IR, en células de la granulosa ni en la teca interna. Tampoco se observó asociación con la expresión del p-IR en células de la granulosa. Por otro lado, en células de la granulosa, se observó asociación significativa positiva de la expresión de RGC con la expresión de IRS1, p-IRS1 y PI3K- α p85. Es decir, a mayor expresión del RGC, aumentó la expresión de estos intermediarios. Limbourg *et al.* (2002) han demostrado previamente que el RGC activo monomérico es capaz de interactuar con PI3K- α p85 y activarla, activando de esta manera la cascada de señalización subsiguiente, en células neuronales de ratón. Sin embargo, hasta el momento, no ha sido estudiada la interacción de estas vías en el ovario bovino. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Limbourg *et al.* (2002) respecto de la interacción del RGC con PI3K- α p85, y, además, aportan información acerca de una posible interacción con IRS1, el intermediario previo en la cascada de señalización, que se observó tanto en la forma total como en la fosforilada. En este sentido, los resultados reportados en esta tesis proveen evidencia novedosa de la posible interacción de los mecanismos de acción no genómicos del RGC con la cascada de señalización de insulina en el ovario bovino.

6. CONCLUSIONES

La eficiencia reproductiva del rodeo lechero es el principal factor que afecta rentabilidad de los establecimientos de producción láctea. Por esta razón, en la actualidad, existe un creciente interés en el estudio de factores que puedan resultar perjudiciales para la misma. En regiones cálidas como la cuenca lechera santafesina, el estrés por calor es uno de los factores de mayor impacto en parámetros reproductivos. Además, debido a la susceptibilidad del embrión a señales ambientales, el estrés calórico en vacas gestantes es capaz de modular características fenotípicas que perdurarán en la vida adulta de las crías.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la exposición a estrés durante el desarrollo fetal, que conlleva a la síntesis y liberación de GCs e implica la consecuente exposición prenatal a un exceso de GCs, es capaz de alterar la respuesta a estrés y la funcionalidad del eje HHA de las crías en distintas etapas de su vida con impacto sobre la reproducción. Esto se evidencia en las alteraciones encontradas a nivel endocrino en animales que fueron gestados bajo estrés por calor en distintas etapas del desarrollo. Además, considerando el período de establecimiento de la reserva folicular ovárica, directamente relacionada con la fertilidad de las vacas lecheras, una alteración en la funcionalidad del eje HHA y la respuesta a estrés podría afectar la funcionalidad del eje HHO, altamente interrelacionados entre sí, y la eficiencia reproductiva de las crías en la vida adulta.

Los GCs liberados a circulación como parte del mecanismo fisiológico de respuesta a estrés, cumplen sus funciones en los tejidos blanco luego de unirse al RGC. Tal como fue ampliamente reportado en otras especies, el gen que codifica para el RGC posee una compleja región promotora corriente arriba del primer exón codificante, encargada de regular los niveles de expresión del receptor y los patrones de expresión del mismo de una manera tejido-específica. Además, esta región es sensible a distintas modificaciones epigenéticas capaces de interferir en la regulación de la transcripción, las cuales son susceptibles a la influencia del ambiente. En este trabajo de tesis pudimos demostrar, al menos en parte, que el patrón de metilación de la región promotora del gen del RGC se encuentra alterado en animales que estuvieron expuestos a estrés por calor en las distintas etapas de su desarrollo prenatal, particularmente alrededor de sitios de unión a factores de transcripción. En este punto se debe tener en cuenta que existen, además de la metilación

del ADN, otras modificaciones epigenéticas que regulan la expresión génica, las cuales no fueron estudiadas en esta tesis. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio aportan valiosa información acerca del impacto del estrés calórico durante el desarrollo intrauterino en el estado de metilación de este gen en el ovario bovino, elemental en la modulación de la expresión del RGC y, en consecuencia, en la respuesta a GCs a nivel ovárico.

En la evaluación de la expresión proteica del RGC y sus moduladores citoplasmáticos en el ovario, no pudimos hallar asociaciones significativas con la exposición a estrés calórico prenatal. No obstante, la respuesta celular a GCs depende, además de los niveles de expresión del RGC, de la concentración y actividad de la hormona. Teniendo en cuenta las alteraciones halladas en la concentración de cortisol a nivel sistémico, y la elevada irrigación sanguínea que existe en la pared del folículo preovulatorio, es posible que exista una respuesta a estrés exacerbada en el ovario de vacas gestadas bajo estrés calórico en los primeros meses del desarrollo. Si bien el impacto de factores ambientales en características fenotípicas transgeneracionales ha sido ampliamente estudiado previamente, nuestros resultados muestran las primeras evidencias del potencial efecto del estrés por calor en la programación fetal de la respuesta a estrés en la vaca lechera.

Por otro lado, se ha estudiado en otras especies que, dentro de los mecanismos de respuesta no genómicos de los GCs a través del RGC, este es capaz de interactuar con intermediarios de la cascada de señalización de insulina. Sin embargo, hasta el momento, no había sido estudiada esta interacción en vacas. Los resultados presentados en esta tesis muestran evidencia novedosa acerca de una posible interacción entre el RGC e intermediarios claves de la cascada de señalización de insulina, como IRS1 y PI3K, en células de la granulosa del ovario bovino. De esta manera, se abren las puertas a futuros estudios más profundos en este aspecto que puedan colaborar con el entendimiento de los intrincados mecanismos de señalización intracelular, capaces de influir en la funcionalidad ovárica y la fertilidad.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abruzzese GA, Crisosto N, De Grava Kempinas W y Sotomayor-Zárate R** (2018) Developmental programming of the female neuroendocrine system by steroids. *Journal of Neuroendocrinology* **30** 1–12.
- Acosta TJ, Tetsuka M, Matsui M, Shimizu T, Berisha B, Schams D y Miyamoto A** (2005) In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle of the cow. *Journal of Reproduction and Development* **51** 483–489.
- Akbarinejad V, Gharagozlou F y Vojgani M** (2017) Temporal effect of maternal heat stress during gestation on the fertility and anti-Müllerian hormone concentration of offspring in bovine. *Theriogenology* **99** 69–78.
- Allis CD y Jenuwein T** (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* **17** 487–500.
- Alt SR, Turner JD, Klok MD, Meijer OC, Lakke EAJF, DeRijk RH y Muller CP** (2010) Differential expression of glucocorticoid receptor transcripts in major depressive disorder is not epigenetically programmed. *Psychoneuroendocrinology* **35** 544–556.
- Amweg AN, Paredes A, Salvetti NR, Lara HE y 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, Salvetti N, Stangaferro M, Paredes A, Lara H, Rodríguez F y Ortega H** (2013) Ovarian localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD): Effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domestic Animal Endocrinology* **45** 126–140.
- Amweg AN, Rodríguez FM, Huber E, Marelli BE, Salvetti NR, Rey F y Ortega HH** (2016) Role of glucocorticoids in cystic ovarian disease: Expression of glucocorticoid receptor in the bovine ovary. *Cells Tissues Organs* **201** 138–147.
- Amweg AN, Rodríguez F, Huber E, Marelli B, Gareis N, Belotti E, Rey F, Salvetti N y Ortega H** (2017) Detection and activity of 11 beta hydroxylase (CYP11B1) in the bovine ovary. *Reproduction* **153** 433–441.
- Armstrong D** (1994) Heat Stress Interaction with Shade and Cooling. *Journal of Dairy Science* **77** 2044–2050.
- Arroyo-Jousse V, García-Díaz DF y Pérez-Bravo F** (2015) La metilación global del ADN y los niveles de homocisteína en plasma se encuentran disminuidos en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. *Revista Medica de Chile* **143** 562–568.
- Balachandran A, Guan H, Sellan M, Van Uum S y Yang K** (2008) Insulin and dexamethasone dynamically regulate adipocyte 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology* **149** 4069–4079.
- Bamberger CM, Schulte HM y Chrousos GP** (1996) Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Reviews* **17** 245–261.
- Barker DJ** (1998) In utero programming of chronic disease. *Clinical Science* **95** 115–128.
- Barker DJ, Bull A, Osmond C y Simmonds S** (1990) Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ*

301 259–262.

Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ y Wield GA (1993a) The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ* **306** 422–426.

Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA y Robinson JS (1993b) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *The Lancet* **341** 938–941.

Bello NM, Steibel JP y Pursley JR (2006) Optimizing Ovulation to First GnRH Improved Outcomes to Each Hormonal Injection of Ovsynch in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **89** 3413–3424.

Berry DP, Friggens NC, Lucy M y Roche JR (2016) Milk Production and Fertility in Cattle. *Annual Review of Animal Biosciences* **4** 269–290.

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* **16** 6–21.

Bossaert P, De Cock H, Leroy JLMR, De Campeneere S, Bols PEJ, Filliers M y Opsomer G (2010) Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo. *Theriogenology* **73** 1210–1219.

Breslin MB y Vedeckis W V. (1998) The human glucocorticoid receptor promoter upstream sequences contain binding sites for the ubiquitous transcription factor, Yin Yang 1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **67** 369–381.

Burén J, Liu HX, Jensen J y Eriksson JW (2002) Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *European Journal of Endocrinology* **146** 419–429.

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

Butler W. (2000) Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* **60–61** 449–457.

Cain DW y Cidlowski JA (2015) Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* **29** 545–556.

Cao-Lei L, Leija SC, Kumsta R, Wüst S, Meyer J, Turner JD y Muller CP (2011) Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: Identification and analysis of alternative promoter regions. *Human Genetics* **129** 533–543.

Cao-Lei L, Suwansirikul S, Jutavijittum P, Mériaux SB, Turner JD y Muller CP (2013) Glucocorticoid receptor gene expression and promoter CpG modifications throughout the human brain. *Journal of Psychiatric Research* **47**

1597–1607.

Cattaneo L, Signorini M, Bertoli J, Bartolomé J, Gareis N, Díaz P, Bó G y Ortega H (2014) Epidemiological Description of Cystic Ovarian Disease in Argentine Dairy Herds: Risk Factors and Effects on the Reproductive Performance of Lactating Cows. *Reproduction in Domestic Animals* **49** 1028–1033.

Chen H, Fan J, Shou Q, Zhang L, Ma H y Fan Y (2015) Hypermethylation of glucocorticoid receptor gene promoter results in glucocorticoid receptor gene low expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International* **35** 1335–1342.

Chrousos G y Gold P (1992) The Concepts of Stress and Stress System Disorders. *Jama* **267** 1244–1252.

Chrousos GP, Torpy DJ y Gold PW (1998) Interactions between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Female Reproductive System: Clinical Implications. *Annals of Internal Medicine* **129** 229.

da Costa NN, Brito KNL, Santana P di PB, Cordeiro M da S, Silva TVG, Santos AX, Ramos P do C, Santos S do SD, King WA, Miranda M dos S et al. (2016) Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Theriogenology* **85** 323–329.

Cushman RA y Perry GA (2019) Developmental Programming of Fertility in Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **35** 321–330.

Díaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L y 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.

Diskin M, Mackey D, Roche J y Sreenan J (2003) Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science* **78** 345–370.

Dittmar KD y Pratt WB (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90-p60-hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *Journal of Biological Chemistry* **272** 13047–13054.

Dobbs KB, Rodriguez M, Sudano MJ, Ortega MS y Hansen PJ (2013) Dynamics of DNA Methylation during Early Development of the Preimplantation Bovine Embryo. *PLoS ONE* **8** e66230.

Drake A y Walker B (2004) The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *Journal of Endocrinology* **180** 1–16.

Dupont J y Scaramuzzi RJ (2016) Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. *Biochemical Journal* **473** 1483–1501.

Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, Cantor CR, Field JK y van den Boom D (2005) Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass

- spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102** 15785–15790.
- Elmhiri G, Gloaguen C, Grison S, Kereselidze D, Elie C, Tack K, Benderitter M, Lestaevel P, Legendre A y Souidi M** (2018) DNA methylation and potential multigenerational epigenetic effects linked to uranium chronic low-dose exposure in gonads of males and females rats. *Toxicology Letters* **282** 64–70.
- Evans ACO, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW y Ireland JJ** (2012) Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reproduction in Domestic Animals* **47** 31–37.
- Fortune JE, Yang MY, Allen JJ y Herrick SL** (2013) Triennial Reproduction Symposium: The ovarian follicular reserve in cattle: What regulates its formation and size? *Journal of Animal Science* **91** 3041–3050.
- Fuquay JW** (1981) Heat Stress as it Affects Animal Production. *Journal of Animal Science* **52** 164–174.
- Gallardo MR, Valtorta SE, Leva PE, Gaggiotti MC, Conti GA y Gregoret RF** (2005) Diet and cooling interactions on physiological responses of grazing dairy cows, milk production and composition. *International Journal of Biometeorology* **50** 90–95.
- Gardiner-Garden M y Frommer M** (1987) CpG Islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* **196** 261–282.
- Gareis NC, Huber E, Hein GJ, Rodríguez FM, Salvetti NR, Angeli E, Ortega HH y Rey F** (2018) Impaired insulin signaling pathways affect ovarian steroidogenesis in cows with COD. *Animal Reproduction Science* **192** 298–312.
- Gareis NC** (2019) Influencia del estado metabólico en bovinos con enfermedad quística ovárica: Análisis de mecanismos de señalización involucrados en la respuesta a insulina. *Tesis presentada para optar por el grado académico de Doctora en Ciencias Veterinarias, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral*.
- 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. Editorial Imprenta San Cayetano, Santa Fe. **31**: 59-76.
- Grad I y Picard D** (2007) The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology* **275** 2–12.
- Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier J-C, Rebsamen MC, Hsieh C-M, Chui D-S, Thomas KL, Prorock AJ et al.** (2002) Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nature Medicine* **8** 473–479.
- Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C y Winter PD** (1991) Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* **303** 1019–1022.
- Hansen P y Aréchiga C** (1999) Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *Journal of animal*

science **77 Suppl 2** 36–50.

Hatler TB, Hayes SH, Ray DL, Reames PS y Silvia WJ (2008) Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *The Veterinary Journal* **177** 360–368.

Hein GJ, Panzani CG, Rodríguez FM, Salvetti NR, Díaz PU, Gareis NC, Benítez GA, Ortega HH y Rey F (2015) Impaired insulin signaling pathway in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Animal Reproduction Science* **156** 64–74.

Hillier SG y Tetsuka M (1998) An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? *Journal of Reproductive Immunology* **39** 21–27.

Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD y Kelsey KT (2007) Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **16** 108–114.

Hsueh A y Erickson G (1978) Glucocorticoid inhibition of fsh-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* **32** 639–648.

Hunter RG (2012) Epigenetic effects of stress and corticosteroids in the brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **6** 1–8.

Ireland JJ, Folger J, Bettgowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Knight PG, Smith GW, Lonergan P y Evans ACO (2009) Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality. *Biology of Reproduction* **80** 954–964.

Ireland J, Smith GWB, Scheetz DA y Folger JKA (2011) Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve. *Reproduction, Fertility and Development* **23** 1–14.

Ismael A, Strandberg E, Berglund B, Fogh A y Løvendahl P (2016) Seasonality of fertility measured by physical activity traits in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **99** 2837–2848.

Ispada J, De Lima CB, Sirard MA, Fontes PK, Nogueira MFG, Annes K y Milazzotto MP (2018) Genome-wide screening of DNA methylation in bovine blastocysts with different kinetics of development. *Epigenetics and Chromatin* **11** 1–13.

Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Pursley JR y Ireland JJ (2017) A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. *Journal of Dairy Science* **100** 5019–5027.

Jirtle RL y Skinner MK (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics* **8** 253–

262.

Jones MJ, Goodman SJ y Kobor MS (2015) DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* **14** 924–932.

Kadzere C, Murphy M, Silanikove N y Maltz E (2002) Heat stress in lactating dairy cows: A review. *Livestock Production Science* **77** 59–91.

Kalantaridou S, Makrigiannakis A, Zoumakis E y Chrousos G (2004) Stress and the female reproductive system. *Journal of Reproductive Immunology* **62** 61–68.

Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Amaya Montoya C, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake YI et al. (2007) Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction* **133** 155–163.

Kawate N, Inaba T y Mori J (1993) Effects of cortisol on the amounts of estradiol-17 β and progesterone secreted and the number of luteinizing hormone receptors in cultured bovine granulosa cells. *Animal Reproduction Science* **32** 15–25.

Khulan B y Drake AJ (2012) Glucocorticoids as mediators of developmental programming effects. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* **26** 689–700.

Kulis M y Esteller M (2010) DNA Methylation and Cancer. En *Advances in Genetics*, pp 27–56.

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

Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227** 680–685.

Langley-Evans SC, Phillips GJ y Jackson AA (1994) In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. *Clinical Nutrition* **13** 319–324.

Lay DC, Randel RD, Friend TH, Carroll JA, Welsh TH, Jenkins OC, Neuendorff DA, Bushong DM y Kapp GM (1997a) Effects of prenatal stress on the fetal calf. *Domestic Animal Endocrinology* **14** 73–80.

Lay DC, Randel RD, Friend TH, Jenkins OC, Neuendorff DA, Bushong DM, Lanier EK y Bjorge MK (1997b) Effects of prenatal stress on suckling calves. *Journal of Animal Science* **75** 3143–3151.

Levine A, Cantoni GL y Razin A (1992) Methylation in the preinitiation domain suppresses gene transcription by an indirect mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89** 10119–10123.

Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA y Burdge GC (2007) Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted

- diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and . *British Journal of Nutrition* **97** 1064–1073.
- Limbourg FP y Liao JK** (2003) Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. *Journal of Molecular Medicine* **81** 168–174.
- Limbourg FP, Huang Z, Plumier J-C, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schütz G, Moskowitz MA y Liao JK** (2002) Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *Journal of Clinical Investigation* **110** 1729–1738.
- Liptrap RM** (1993) Stress and Reproduction in Domestic Animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* **697** 275–284.
- Livak KJ y Schmittgen TD** (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25** 402–408.
- Lucas A, Fewtrell MS y Cole TJ** (1999) Fetal origins of adult disease-the hypothesis revisited. *BMJ* **319** 245–249.
- Lucy M** (2001) Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science* **84** 1277–1293.
- Lucy MC** (2003) Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement* **61** 415–427.
- Lucy MC** (2007) Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **64** 237–254.
- Manning BD y Cantley LC** (2007) AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129** 1261–1274.
- La Marca A y Volpe A** (2006) Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clinical Endocrinology* **64** 603–610.
- Martins CS, Elias D, Colli LM, Couri CE, Souza MCLA, Moreira AC, Foss MC, Elias LLK y de Castro M** (2017) HPA axis dysregulation, NR3C1 polymorphisms and glucocorticoid receptor isoforms imbalance in metabolic syndrome. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **33** e2842.
- McDowell R, Hooven N y Camoens J** (1976) Effect of Climate on Performance of Holsteins in First Lactation. *Journal of Dairy Science* **59** 965–971.
- Meaney MJ, Szyf M y Seckl JR** (2007) Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends in Molecular Medicine* **13** 269–277.
- Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C y Monget P** (2014) The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? *Biology of Reproduction* **90** 1–11.

- Monteiro APA, Tao S, Thompson IM y Dahl GE** (2014) Effect of heat stress during late gestation on immune function and growth performance of calves: Isolation of altered colostral and calf factors. *Journal of Dairy Science* **97** 6426–6439.
- Monteiro APA, Tao S, Thompson IM y Dahl GE** (2016a) In utero heat stress decreases calf survival and performance through the first lactation. *Journal of Dairy Science* **99** 8443–8450.
- Monteiro APA, Guo JR, Weng XS, Ahmed BM, Hayen MJ, Dahl GE, Bernard JK y Tao S** (2016b) Effect of maternal heat stress during the dry period on growth and metabolism of calves. *Journal of Dairy Science* **99** 3896–3907.
- Mossa F, Kenny D, Jimenez-Krassel F, Smith GW, Berry D, Butler S, Fair T, Lonergan P, Ireland JJ y Evans ACO** (2009) Undernutrition of Heifers During the First Trimester of Pregnancy Diminishes Size of the Ovarian Reserve in Female Offspring. *Biology of Reproduction* **81** 135–135.
- Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ y Evans ACO** (2012) Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **95** 2355–2361.
- Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland J LH, Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ y Evans ACO** (2013) Maternal Undernutrition in Cows Impairs Ovarian and Cardiovascular Systems in Their Offspring1. *Biology of Reproduction* **88** 1–9.
- Murrell A, Rakyan VK y Beck S** (2005) From genome to epigenome. *Human Molecular Genetics* **14** 3–10.
- Nantharat M, Wanitchanon T, Amesbutr M, Tammachote R y Praphanphoj V** (2015) Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) promoter is hypermethylated in Thai females with major depressive disorder. *Genetics and Molecular Research* **14** 19071–19079.
- Newton R** (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* **55** 603–613.
- O'Donnell KJ, Glover V, Jenkins J, Browne D, Ben-Shlomo Y, Golding J y O'Connor TG** (2013) Prenatal maternal mood is associated with altered diurnal cortisol in adolescence. *Psychoneuroendocrinology* **38** 1630–1638.
- Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S y Devlin AM** (2008) Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics* **3** 97–106.
- Ortega HH, Salvetti NR y Padmanabhan V** (2009) Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction* **137** 865–877.
- Ortega HH, Rey F, Velazquez MML y Padmanabhan V** (2010) Developmental Programming: Effect of Prenatal Steroid Excess on Intraovarian Components of Insulin Signaling Pathway and Related Proteins in Sheep1. *Biology of Reproduction* **82** 1065–1075.

- Padmanabhan V, Salvetti NR, Matiller V y Ortega HH** (2014) Developmental programming: Prenatal steroid excess disrupts key members of intraovarian steroidogenic pathway in sheep. *Endocrinology* **155** 3649–3660.
- Peter AT, Levine H, Drost M y Bergfelt DR** (2009) Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology* **71** 1343–1357.
- Polsky L y von Keyserlingk M** (2017) Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science* **100** 8645–8657.
- Presul E, Schmidt S, Kofler R y Helmborg A** (2007) Identification, tissue expression, and glucocorticoid responsiveness of alternative first exons of the human glucocorticoid receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* **38** 79–90.
- Pryce CR, Aubert Y, Maier C, Pearce PC y Fuchs E** (2011) The developmental impact of prenatal stress, prenatal dexamethasone and postnatal social stress on physiology, behaviour and neuroanatomy of primate offspring: studies in rhesus macaque and common marmoset. *Psychopharmacology* **214** 33–53.
- Ranta F, Avram D, Berchtold S, Düfer M, Drews G, Lang F y Ullrich S** (2006) Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. *Diabetes* **55** 1380–1390.
- Razin A** (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing---a three-way connection. *The EMBO Journal* **17** 4905–4908.
- Rearte R, LeBlanc SJ, Corva SG, de la Sota RL, Lacau-Mengido IM y Giuliodori MJ** (2018) Effect of milk production on reproductive performance in dairy herds. *Journal of Dairy Science* **101** 7575–7584.
- De Rensis F y Scaramuzzi R** (2003) Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - A review. *Theriogenology* **60** 1139–1151.
- De Rensis F, Garcia-Ispuerto I y López-Gatius F** (2015) Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology* **84** 659–666.
- Rhind SM, Rae MT y Nigel Brooks A** (2001) Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* **122** 205–214.
- Robinson S, Walton RJ, Clark PM, Barker DJP, Hales CN y Osmonde C** (1992) The relation of fetal growth to plasma glucose in young men. *Diabetologia* **35** 444–446.
- Rodríguez FM, Gareis NC, Hein GJ, Salvetti NR, Amweg AN, Huber E, Stassi AF, Ortega HH y Rey F** (2017) Role of Components of the Insulin-like Growth Factor System in the Early Stages of Ovarian Follicular Persistence in Cattle. *Journal of Comparative Pathology* **157** 201–214.
- Rose AJ y Herzig S** (2013) Metabolic control through glucocorticoid hormones: An update. *Molecular and Cellular Endocrinology* **380** 65–78.

- Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R y Wolfenson D** (2001a) Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* **121** 745–751.
- Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R y Wolfenson D** (2001b) Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* **122** 737–744.
- Roussel S, Boissy A, Montigny D, Hemsworth PH y Duvaux-Ponter C** (2005) Gender-specific effects of prenatal stress on emotional reactivity and stress physiology of goat kids. *Hormones and Behavior* **47** 256–266.
- Saffery R y Novakovic B** (2014) Epigenetics as the mediator of fetal programming of adult onset disease: what is the evidence? *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **93** 1090–1098.
- Salveti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno EJ y Ortega HH** (2010) Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Animal Reproduction Science* **122** 98–110.
- Salveti NR, Ortega HH, Veiga-Lopez A y Padmanabhan V** (2012) Developmental Programming: Impact of Prenatal Testosterone Excess on Ovarian Cell Proliferation and Apoptotic Factors in Sheep1. *Biology of Reproduction* **87** 1–10.
- Scarlet D, Ille N, Ertl R, Alves BG, Gastal GDA, Paiva SO, Gastal MO, Gastal EL y Aurich C** (2017) Glucocorticoid metabolism in equine follicles and oocytes. *Domestic Animal Endocrinology* **59** 11–22.
- Schams D y Berisha B** (2002) Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* **23** 53–65.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA y Nascimento AB** (2003) Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* **59** 1435–1440.
- Shimabukuro M, Sasaki T, Imamura A, Tsujita T, Fuke C, Umekage T, Tochigi M, Hiramatsu K, Miyazaki T, Oda T et al.** (2007) Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: A potential link between epigenetics and schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* **41** 1042–1046.
- Shimizu T, Murayama C, Sudo N, Kawashima C, Tetsuka M y Miyamoto A** (2008) Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Animal Reproduction Science* **106** 143–152.
- Skinner MK, Manikkam M y Guerrero-Bosagna C** (2010) Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **21** 214–222.
- Souza AH, Gümen A, Silva EPB, Cunha AP, Guenther JN, Peto CM, Caraviello DZ y Wiltbank MC** (2007) Supplementation with Estradiol-17 β Before the Last Gonadotropin-Releasing Hormone Injection of the Ovsynch Protocol in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **90** 4623–4634.

- Souza AH, Silva EPB, Cunha AP, Gümen A, Ayres H, Brusveen DJ, Guenther JN y Wiltbank MC** (2011) Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology* **75** 722–733.
- Stahn C y Buttgereit F** (2008) Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature Clinical Practice Rheumatology* **4** 525–533.
- Stevens A, Begum G, Cook A, Connor K, Rumball C, Oliver M, Challis J, Bloomfield F y White A** (2010) Epigenetic Changes in the Hypothalamic Proopiomelanocortin and Glucocorticoid Receptor Genes in the Ovine Fetus after Periconceptional Undernutrition. *Endocrinology* **151** 3652–3664.
- Sun Q, Jia Y, Li R, Li X, Yang X y Zhao R** (2014) Breed-specific expression of GR exon 1 mRNA variants and profile of GR promoter CpG methylation in the hippocampus of newborn piglets. *Animal* **8** 1851–1856.
- Surani MA** (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* **414** 122–128.
- Taniguchi CM, Emanuelli B y Kahn CR** (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7** 85–96.
- Tao S, Monteiro APA, Thompson IM, Hayen MJ y Dahl GE** (2012) Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. *Journal of Dairy Science* **95** 7128–7136.
- Tao S, Monteiro APA, Hayen MJ y Dahl GE** (2014) Short communication: Maternal heat stress during the dry period alters postnatal whole-body insulin response of calves. *Journal of Dairy Science* **97** 897–901.
- Tetsuka M** (2007) Actions of glucocorticoid and their regulatory mechanisms in the ovary: Review article. *Animal Science Journal* **78** 112–120.
- Tetsuka M, Nishimoto H, Miyamoto A, Okuda K y 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. *Journal of Reproduction and Development* **56** 616–622.
- Thom EC** (1959) The Discomfort Index. *Weatherwise* **12** 57–61.
- Turner JD y Muller CP** (2005) Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: Identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *Journal of Molecular Endocrinology* **35** 283–292.
- Turner JD, Schote AB, Macedo JA, Pelascini LPL y Muller CP** (2006) Tissue specific glucocorticoid receptor expression, a role for alternative first exon usage? *Biochemical Pharmacology* **72** 1529–1537.
- Turner JD, Pelascini LPL, MacEdo JA y Muller CP** (2008) Highly individual methylation patterns of alternative glucocorticoid receptor promoters suggest individualized epigenetic regulatory mechanisms. *Nucleic Acids Research* **36** 7207–7218.

- Turner JD, Alt SR, Cao L, Vernocchi S, Trifonova S, Battello N y Muller CP** (2010) Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochemical Pharmacology* **80** 1860–1868.
- Valtorta SE, Gallardo MR, Castro HC y Castelli. M. E.** (1996) Artificial Shade and Supplementation Effects on Grazing Dairy Cows in Argentina. *Transactions of the ASAE* **39** 233–236.
- Valtorta SE, Leva PE, García MS y Rodríguez RO** (2008) Régimen Agroclimático de Olas de Calor en la Provincia de Santa Fe, Argentina. *FAVE Sección Ciencias Agrarias* **7** 131–136.
- Vanselow J, Vernunft A, Koczan D, Spitschak M y Kuhla B** (2016) Exposure of lactating dairy cows to acute pre-ovulatory heat stress affects granulosa cell-specific gene expression profiles in dominant follicles. *PLoS ONE* **11** 1–19.
- Velazquez MML, Alfaro NS, Dupuy CRF, Salvetti NR, Rey F y Ortega HH** (2010) Heat shock protein patterns in the bovine ovary and relation with cystic ovarian disease. *Animal Reproduction Science* **118** 201–209.
- Waddington CH** (2012) The Epigenotype - reprinted with permission from “The Epigenotype (1942), Endeavour 18-20”. *International Journal of Epidemiology* **41** 10–13.
- Watkeys OJ, Kremerskothen K, Quidé Y, Fullerton JM y Green MJ** (2018) Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) DNA methylation in association with trauma, psychopathology, transcript expression, or genotypic variation: A systematic review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **95** 85–122.
- Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D’Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M y Meaney MJ** (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience* **7** 847–854.
- Webb R y Campbell BK** (2007) Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Reproduction in Domestic Ruminants* **6** 141–163.
- Weller MMDCA, Fortes MRS, Marcondes MI, Rotta PP, Gionbeli TRS, Valadares Filho SC, Campos MM, Silva FF, Silva W, Moore S et al.** (2016) Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. *Journal of Dairy Science* **99** 3056–3071.
- Westwood C, Lean I y Garvin J** (2002) Factors Influencing Fertility of Holstein Dairy Cows: A Multivariate Description. *Journal of Dairy Science* **85** 3225–3237.
- Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH y Lucy MC** (1998) Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 1. Lactating Cows. *Journal of Dairy Science* **81** 2124–2131.
- Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM, Vasconcelos JLM, Nascimento AB, Souza AH, Ayres H, Cunha AP, Keskin A, Guenther JN et al.** (2011) Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* **76** 1568–1582.
- Witzmann SR, Turner JD, Meriaux SB, Meijer OC y Muller CP** (2012) Epigenetic regulation of the glucocorticoid

receptor promoter 17 in adult rats. *Epigenetics* **7** 1290–1301.

Yang MY y 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. *Biology of Reproduction* **78** 1153–1161.

Yunn N-O, Kim J, Kim Y, Leibiger I, Berggren P-O y Ryu SH (2018) Mechanistic understanding of insulin receptor modulation: Implications for the development of anti-diabetic drugs. *Pharmacology & Therapeutics* **185** 86–98.