

Evaluación de la localización folicular del receptor de la hormona del crecimiento en ovarios bovinos

Leandro Durante¹, Cristian Leiva²

¹Cientibecario.²Médico Veterinario (graduado reciente). Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina

*leo_oel2004@hotmail.com.ar

Área Temática: Ciencias de la Salud
Sub-área: Veterinaria
Grupo: X

INTRODUCCIÓN

La eficiencia productiva en bovinos de carne y leche se basa en la obtención de buenos índices reproductivos con altas tasas de fertilidad y bajos intervalos parto-parto. Sin embargo, para lograr altas tasas de concepción, las vacas deben reanudar su ciclicidad ovárica, tener una involución uterina normal, ser detectadas en estro, e inseminadas lo más rápido posible luego del parto. La performance reproductiva de cada vaca afecta la eficiencia de producción de leche o carne en el rodeo, por su influencia en el intervalo parto-primero servicio, parto-parto, duración de la lactancia y porcentaje de reposición.

Para el establecimiento de la dominancia folicular y la consecuente ovulación, es necesaria una adecuada cooperación entre factores hormonales y metabólicos. Esto se exagera en el posparto inmediato, donde las demandas metabólicas de la lactancia compiten con las de la reproducción. En este contexto, aunque los ejes somatotrófico y gonadotrófico han sido relacionados entre sí durante el crecimiento y la maduración sexual, el rol de la hormona de crecimiento (GH) en la reproducción generalmente ha sido considerado como poco relevante (Ogilvy-Stuart y Shalet, 1992). Sin embargo, pueden encontrarse en la literatura trabajos que demuestran que la GH afecta directamente la esteroideogénesis, gametogénesis y diferenciación gonadal, así como la secreción de gonadotrofinas y la capacidad de respuesta a las mismas (Perez-Ibave et al., 2014). Asimismo, ha sido descrito que el ovario es un sitio de acción directa de la GH (Katz et al., 1993), y la presencia de su receptor ha sido reportada hace tiempo en diferentes componentes foliculares (Lucy et al., 1993, Izadyar et al., 1999). Además, mientras que estas acciones pueden reflejar roles endocrinos de la GH hipofisaria, también pueden estar relacionadas a funciones paracrinas y autocrinas, ya que se ha demostrado la expresión del ARNm de GH en tejidos reproductivos de diferentes especies (Hull y Harvey, 2000; Silva et al., 2009), incluyendo el ovario bovino (Izadyar et al., 1999).

Por lo tanto, considerando las funciones de la GH y su estrecha asociación con la fisiología ovárica, planteamos como hipótesis general que una alteración en sus mecanismos de acción intraováricos, podría afectar el restablecimiento de la actividad ovárica favoreciendo además el desarrollo de ciertos trastornos reproductivos como la enfermedad quística ovárica (EQO).

OBJETIVOS

Evaluar mediante la técnica de inmunohistoquímica indirecta (IHQ) la localización del receptor de la hormona del crecimiento (GHR) en folículos ováricos bovinos en diferentes estadios de desarrollo.

METODOLOGÍA

Animales utilizados

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron ovarios obtenidos a partir de vacas Holando Argentino (n=3) con ciclos estrales regulares de acuerdo a la detección previa del estro, palpación rectal y ultrasonografía. Los ciclos estrales de dichos animales fueron sincronizados utilizando el protocolo G6G-Ovsynch. El inicio del estro fue confirmado por examen rectal y ultrasonografía y designado como día cero del ciclo. Adicionalmente se obtuvieron ovarios de vacas Holando Argentino en playa de faena de frigoríficos (n=3), seleccionando aquellos de animales no preñados, sin cuerpo lúteo activo, y sin evidencias de patologías en el sistema reproductivo.

Protocolo de sincronización

El protocolo G6G-Ovsynch en los animales a campo, consiste en una administración de prostaglandina F2 α (PGF2 α) y la aplicación, 2 días después, de una dosis de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que distará por 6 días de la administración de GnRH del protocolo Ovsynch (día 0). Dicho protocolo continúa con una aplicación de PGF2 α al día 7, y finalmente otra dosis de GnRH al día 9 (Bello et al., 2006). Se observó el comportamiento de los animales 24 h después de la última administración de GnRH para detectar el inicio del celo. Asimismo, la ovulación fue confirmada mediante ultrasonografía y designada como día 1 del ciclo estral. Durante la sincronización se realizó el seguimiento de los animales por ultrasonografía utilizando un equipo con un transductor transrectal de doble frecuencia de onda (5.0-7.5Mhz) (Chisson 8300 Digital, China) de acuerdo a la técnica descrita por Siriois y Fortune (1988). Las imágenes fueron almacenadas y utilizadas para efectuar las mediciones de las estructura foliculares ováricas.

Obtención de las muestras ováricas

Los ovarios fueron obtenidos en playa de faena o removidos por ovariectomía transvaginal bajo anestesia epidural de acuerdo a técnicas descritas previamente por nuestro grupo de trabajo (Marelli et al., 2014). En el caso de animales a campo, previo a la castración, los folículos dominantes fueron aspirados. El líquido folicular (LF) obtenido fue refrigerado inmediatamente hasta su arribo al laboratorio donde fue conservado a -80°C hasta su procesamiento para la obtención de células foliculares y la realización de las determinaciones hormonales. Antes del procesamiento, los ovarios fueron fotografiados para registrar su tamaño y realizar una descripción detallada de las estructuras foliculares encontradas. Por otra parte, los ovarios fueron fijados en formol bufferado al 10% y procesados mediante técnicas histológicas de rutina hasta su inclusión en parafina. Finalmente, se realizaron cortes histológicos coloreados con hematoxilina-eosina para una caracterización morfológica inicial. También se almacenaron muestras de tejidos a -80°C para ser analizadas por western blot.

Detección del receptor de la hormona del crecimiento en muestras de ovarios bovinos

Western blot

Esta técnica se utilizó a los fines de evaluar la especificidad del anticuerpo anti-GHR (anti- human growth hormone receptor antibody ab202964, Abcam) en muestras de pared folicular completa. Para ello se procesaron entre 60-80 mg de tejido en buffer RIPA (RadiolInmunoPrecipitation Assay) con inhibidores de proteasas utilizando un homogenizador manual UltraTurrax® T25 Basic. El homogenato fue centrifugado y el sobrenadante, conteniendo los extractos proteicos totales, fue recuperado. La concentración de proteínas totales fue determinada mediante el método colorimétrico de Lowry (Lowry et al., 1951). Dichos extractos fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), sembrando 40 µg de proteínas totales por calle. A continuación, las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE) para realizar la inmunodetección con el anticuerpo anti-GHR (1:5000) mencionado anteriormente. La banda inmunoreactiva correspondiente al GHR fue evidenciada utilizando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (GE Healthcare) y la reacción fue visualizada mediante quimioluminiscencia (ECL Plus, GE Healthcare).

Inmuhistoquímica indirecta

Secciones histológicas de ovarios bovinos fueron analizadas por IHQ con el propósito evaluar la expresión del GHR. Para ello se utilizó el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa que se describe a continuación. En primer lugar, los cortes histológicos fueron desparafinados y se realizó una recuperación antigénica leve mediante el tratamiento de los mismos en microondas en buffer citrato de sodio 0,01 M (pH=6,0). La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con H₂O₂ al 3% (vol/vol) en metanol, y las uniones no específicas fueron bloqueadas con suero normal de cabra al 10% (vol/vol). Los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario anti-GHR mencionado en el ítem anterior en una dilución 1:100 durante 18 h a 4°C. Luego de lavar, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario 1:100 (Goat anti-rabbit IgG-B biotin conjugated, Santa Cruz) durante 30 min a temperatura ambiente. Los antígenos fueron visualizados con estreptavidina-biotina (CytoScanHRP Detection System, Cell Marque) y 3,3-diaminobencidina (2-Component DAB Pack, BioGenex) como cromógeno. Finalmente, los cortes fueron lavados en agua destilada, contracolorados con hematoxilina, deshidratados, y montados. Las imágenes microscópicas fueron digitalizadas con cámara Nikon DS - Fi2 montada en un microscopio convencional (Nikon Eclipse Ni), utilizando objetivos de 4X y 40X.

RESULTADOS

Mediante el análisis por western blot de muestras de tejido de pared completa de folículos de ovarios bovinos se observó una única banda inmunoreactiva de 110-120 kDa correspondiente al receptor de membrana GHR. Estos resultados permitieron confirmar la especificidad del anticuerpo primario anti-GHR previo a su utilización en ensayos de IHQ.

Por otra parte, mediante la técnica de IHQ se evidenció una marcación homogénea y abundante en células de la granulosa de las estructuras foliculares más pequeñas como ser folículos primordiales, de transición, y primarios. Mientras tanto, los folículos en estadios de desarrollo más avanzados como son preantrales y antrales, así como

los atrésicos presentan una clara marcación en células de la teca, no observada en las estructuras pequeñas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran una localización diferencial del GHR en las distintas estructuras foliculares analizadas. En este sentido, se evidenció una intensa marcación del receptor en células de la granulosa de folículos en los primeros estadios de desarrollo y en células de teca en estadios más avanzados. Considerando que GH cumple un rol importante durante la dinámica folicular estimulando la proliferación de las células foliculares en diferentes etapas, podemos inferir que las modificaciones en sus niveles de expresión pueden ser eslabones fundamentales en la patogenia de enfermedades ováricas y en desequilibrios endócrinos.

BIBLIOGRAFÍA

Bello NM et al. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 89(9):3413-24.

Hull KL, Harvey S. 2000. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Reviews of Reproduction*, 5: 175-182.

Izadyar F et al. 1999. Messenger RNA Expression and Protein Localization of Growth Hormone in Bovine Ovarian Tissue an in Cumulus Oocyte Complexes (COCs) During In Vitro Maturation. *Mol Reprod Develp*, 53: 398-406.

Katz E et al. 1993. The potential relevance of growth hormone to female reproductive physiology and pathophysiology. *Fertil Steril*, 59:8-34.

Lowry OH et al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.

Lucy ML et al. 1993. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol Reprod*, 48: 1219-1227.

Marelli BE et al. 2014. mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Reprod Biol* 14: 276-281.

Ogilvy-Stuart AL and Shalet SM. 1992. Commentary – growth hormone and puberty *J Endocrinol*, 135: 405-406.

Pérez-Ibave DC et al. 2014. Extrapituitary growth hormone synthesis in humans. *Growth Hormone & IGF Research*, 24: 47-53.

Silva JR. 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis, *Theriogenology*, 71: 1193-1208.

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