

## DESARROLLO DE UN MODELO *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA BOVINA

Etchevers Lucas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, ICiVet Litoral, UNL-CONICET

Director/a: Amweg, Ayelén N  
Codirector/a: Belotti, Eduardo M

Área: Ciencias Biológicas

### INTRODUCCIÓN

En los programas de manejo de rodeos lecheros, según Huanca (2001), uno de los principales objetivos para optimizar los parámetros reproductivos consiste en reducir el intervalo parto-concepción. Es así que, el restablecimiento de la actividad ovárica normal luego del parto es indispensable para maximizar la eficiencia reproductiva.

De acuerdo a numerosos autores (Silvia y col 2002, Ortega y col 2015), la enfermedad quística ovárica (COD, *cystic ovarian disease*) es una importante disfunción ovárica y una de las mayores causas de subfertilidad en vacas lecheras de alta producción, con una incidencia variable entre un 5% y un 30%. En este sentido, Probo y col. (2011) ha reportado que el desarrollo de la COD ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria lechera debido al aumento de los costos de producción por el aumento en los intervalos parto-concepción y parto-parto y, también, debido a inseminaciones infructuosas y un aumento directo en los gastos veterinarios a causa de los tratamientos.

Richards y col. (2008) ha descrito a la ovulación como un proceso inflamatorio localizado, donde una sucesión de eventos lleva a la degradación proteolítica de un punto específico de la pared folicular para permitir la salida del ovocito. Un desbalance en este proceso puede conducir a alteraciones en el desarrollo folicular lo que afecta la calidad del ovocito y/o impide su ovulación, ocasionando un estado de infertilidad.

Según Charmandari y col (2005), ante situaciones de estrés, el organismo reacciona activando mecanismos fisiológicos y conductuales que, en exceso y/o prolongados pueden afectar las funciones fisiológicas, incluyendo la reproducción. El mecanismo de respuesta al estrés está constituido por dos vías de señalización: una de ellas desencadenada por la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, *corticotropin-releasing hormone*) y, la otra, por la norepinefrina. En particular, respecto de la primera vía, la liberación de CRH desde el núcleo paraventricular del hipotálamo estimula la secreción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH, *adrenocorticotropic hormone*) por parte de la adenohipófisis. De esta manera, la ACTH liberada a circulación sistémica se une al receptor de melanocortinas tipo 2 (MC2R, *melanocortin-2-receptor*) ubicado en la corteza suprarrenal, estimulando la producción y liberación de

Título del proyecto: "Influencia del estrés en la reproducción: participación del receptor de melanocortina 2 (MC2R) en la respuesta ovárica a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH)"

Instrumento:

Año convocatoria: 2014

Organismo financiador: FONCYT - ANCyPT

Director/a: Dra. Amweg, Ayelén



glucocorticoides (GC). En este sentido Kawate y col (2001) han demostrado que el cortisol, un GC activo, ejerce un efecto inhibitorio directo en el ovario sobre la secreción de estradiol y sobre el contenido de receptores de LH. Esto ocasiona una falla en el mecanismo de retroalimentación positiva de estrógenos, suprimiendo el pico preovulatorio de LH, bloqueando la ovulación, con la consiguiente persistencia del folículo dominante y el desarrollo de COD.

A diferencia de los esteroides sexuales y los GC, la ACTH ha recibido menor atención como moduladora de las funciones reproductivas. Aunque no ha sido demostrado que el ovario sea capaz de producir GC *de novo*, Amweg y col (2017) han demostrado la presencia del MC2R en el ovario bovino y además, que la ACTH tiene la capacidad de estimular la secreción de cortisol por la pared de los folículos ováricos. Estos resultados hallados en nuestro grupo de trabajo sugieren que la ACTH podría actuar en forma directa sobre el ovario regulando, en consecuencia, la esteroidogénesis, la ovulación, la función luteal y el desarrollo de la COD. Este panorama nos plantea la necesidad de desarrollar un modelo *in vitro* para poder estudiar en forma precisa el efecto local de la ACTH y del estrés sobre la función ovárica y sus distintos componentes.

### OBJETIVOS

- Optimizar cultivos primarios de células de la teca y la granulosa de folículos ováricos bovinos.
- Optimizar la concentración de ACTH necesaria para generar un modelo de estrés en los cultivos primarios de células de la teca y de la granulosa, mediante la evaluación de la concentración de cortisol en los sobrenadantes del cultivo.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Procesamiento de los ovarios

En frigoríficos de la zona se recolectaron ovarios de vacas Holando Argentino que presentaban estado reproductivo normal. Para el procesamiento se seleccionaron aquellos folículos antrales grandes (>10mm) registrando el estado reproductivo en base al examen del útero (ausencia de preñez o de alteraciones uterinas), ausencia de cuerpo lúteo activo y folículos en crecimiento para su posterior correlación.

Una vez aislado el folículo de interés, se aspiró suavemente el líquido folicular y se almacenó a -80°C para posteriores determinaciones hormonales necesarias para corroborar el estado de los folículos utilizados. Luego, se recolectaron las células de la granulosa realizando lavados del folículo con PBS (0,01M, pH: 7,2) /antibiótico/antimicótico 0,1% (anti-anti 100X, Gibco, Life Technologies, USA) (PBS/ATB) estéril. Se centrifugó la suspensión celular y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio. Finalmente, se determinó el número de células viables por el método de exclusión del colorante vital azul de tripán (Trypan Blue Solution, 0.4%, Gibco).

Las células de la teca fueron obtenidas mediante disección de los folículos antrales grandes y luego de realizar lavados enérgicos del folículo con PBS/ATB estéril. Para el aislamiento de las células de la teca, se realizó una disgregación mecánica y, posteriormente, una digestión enzimáticamente con colagenasa (Gibco). Una vez aisladas las células, se determinó el número de células viables por el método de exclusión del colorante vital azul de tripán.

Para ambos tipos de cultivos, se sembraron 50.000 células por pocillo en placa de cultivo de 24 pocillos. Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera gaseosa (5% CO<sub>2</sub>).

Medios de cultivo

Células de la granulosa: Medio Eagle's modificado por Dulbecco's y Ham's (DMEM-F12) (Gibco) suplementado con albúmina sérica bovina (0,1%) (Chem Cruz, Santa Cruz Biothecnology, Dallas, Texas), antibiótico-antimicótico (0,1%) (Gibco), FSH 0,01 ng/ml (Folltropin-V, Bioniche, Ontario, Canadá) e insulina 10 ng/ml (Humulin N insulina humana isofana, Eli Lilly and Company, USA). Células de la teca: DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino 10% (SFB), selenito de sodio 10 ng/ml (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) y transferrina humana 20ng/ml (Sigma-Aldrich).

#### Ensayos de estímulo con ACTH

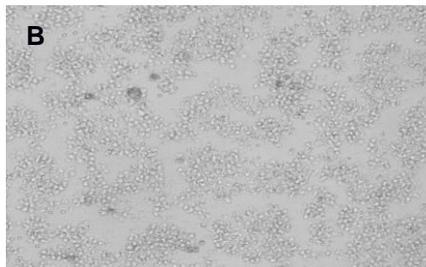
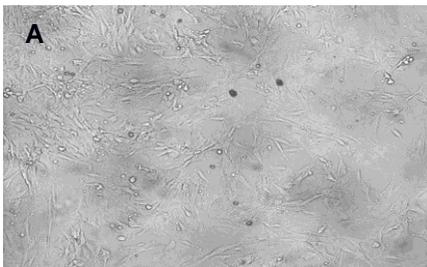
Una vez que las células se encontraban al 80% de confluencia, se les adicionó medio fresco con el estímulo de ACTH correspondiente por 12hs. En el caso de las células de la teca se ensayaron tres concentraciones de ACTH:  $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$  y  $10^{-7}M$  y, para el cultivo de células de la granulosa, se ensayó:  $10^{-5}M$ ,  $10^{-7}M$  y  $10^{-9}M$ . Además, se realizaron controles basales sin estímulos. Cada concentración se evaluó en 4 réplicas.

#### Análisis de los resultados

La concentración de cortisol en los diferentes grupos se evaluó mediante el programa SPSS 11.0.1 (SPSS Inc. USA) utilizando pruebas paramétricas o no paramétricas de acuerdo al análisis preliminar de la normalidad de las variables estudiadas.

### RESULTADOS/CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se logró la optimización de los cultivos primarios de células de la teca y



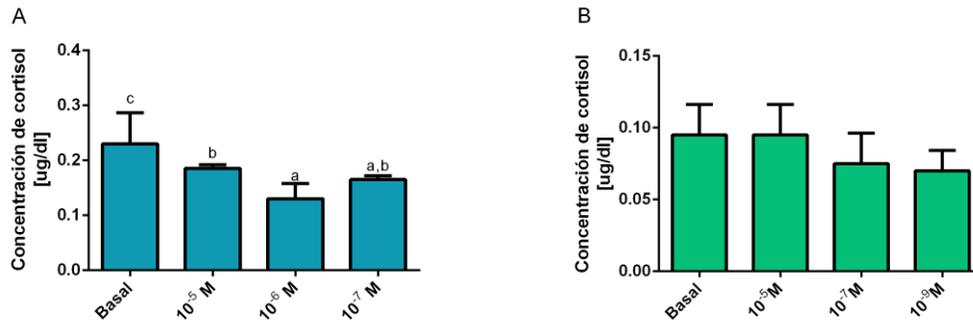
de la granulosa provenientes de folículos antrales bovinos (Figura 1). El cultivo primario de células de la teca y de la granulosa, evidenció un tiempo de supervivencia de 96 y 48hs, respectivamente. Por otro lado, se realizó la evaluación de

**Figura 1.** Fotografías de las células cultivadas. A) células de la teca B) células de la granulosa. Aumento: 10X

las poblaciones celulares mediante la expresión génica de las enzimas citocromo P450 aromatasa (CYP19A1) específica de células de la granulosa y citocromo P450 17 hidroxilasa/17, 20 liasa (CYP17A1) específica de células de la teca. Mediante esta técnica, se pudo validar la pureza de las poblaciones, descartando contaminaciones cruzadas entre las mismas.

Finalmente, se evaluó la concentración de cortisol en los sobrenadante de los cultivos primarios estimulados con las diferentes concentraciones de ACTH, durante 12hs. En el caso de los cultivos de células de la teca, se observa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de cortisol hallada en el sobrenadante de cultivo basal respecto de los estimulados. Por otra parte, en los sobrenadante de cultivo de las células de la granulosa la

concentración de cortisol fue similar ( $p>0,05$ ) para las diferentes concentraciones de ACTH evaluadas (Figura 2). Estos resultados indicarían que las concentraciones de estímulo ensayadas no serían suficientes para lograr cambios en la secreción de cortisol. En base a lo antes mencionado, nos planteamos el desafío de prolongar los tiempos de estímulo o probar otras concentraciones de ACTH.



**Figura 2.** Concentración de cortisol en los sobrenadantes de cultivos. Se encuentran graficadas las medias  $\pm$  DS. A) Células de la teca B) Células de la granulosa.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Amweg A. N., Rodriguez F. M., Huber E., Marelli B. E., Gareis N., Belotti E. M., Ortega, H. H., 2017.** Detection and activity of 11 beta hydroxylase (CYP11B1) in the bovine ovary. *Reproduction*, REP-16.
- Charmandari E., Tsigos C., Chrousos, G., 2005.** Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 259-284.
- Huanca, W., 2001.** Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas lecheras. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 161-163.
- Kawate N., Akiyama M., Suga T., Inaba T., Tamada H., Sawada T., Mori, J., 2001.** Change in concentrations of luteinizing hormone subunit messenger ribonucleic acids in the estrous cycle of beef cattle. *Animal reproduction science*, 68(1-2), 13-21.
- Ortega H. H., Marelli B. E., Rey F., Amweg A. N., Díaz P. U., Stangaferro M. L., Salvetti N. R., 2015.** Molecular aspects of bovine cystic ovarian disease pathogenesis. *Reproduction*, REP-14.
- Probo M., Comin A., Mollo A., Cairoli F., Stradaioli G., Veronesi, M. C., 2011.** Reproductive performance of dairy cows with luteal or follicular ovarian cysts after treatment with buserelin. *Animal reproduction science*, 127(3-4), 135-139.
- Richards J. S., Liu Z., Shimada M., 2008.** Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19(6), 191-196.
- Silvia W. J., Hatler T. B., Nugent A. M., Da Fonseca L. L., 2002.** Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domestic animal endocrinology*, 23(1-2), 167-177.