

Influencia del estrés en la reproducción: participación del receptor de melanocortina tipo 2 en la respuesta ovárica bovina a la hormona adrenocorticotrópica.

Chiaraviglio GG¹, Etchevers L¹, Belotti EM¹, Rodríguez F¹, Cattaneo ML, Amweg AN¹.

- 1- 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 Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina. ayelenamweg@yahoo.com

La ocurrencia de la primera ovulación y la lisis del primer cuerpo lúteo posparto son determinantes importantes para la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras. La enfermedad quística ovárica es una importante disfunción ovárica y una de las mayores causas de subfertilidad en vacas lecheras de alta producción. Esta enfermedad afecta hasta un 15% de las vacas en el período posparto, momento crítico donde existe una transición desde una condición reproductiva no cíclica (preñez) al establecimiento de la ciclicidad regular; y ocasiona grandes pérdidas económicas. Aunque el mecanismo subyacente que conduce a la falla de la ovulación, la persistencia folicular y la formación de los quistes no se encuentra totalmente dilucidado, se ha propuesto que una alteración en la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) inducida por el estrés, podría causar estas alteraciones ováricas². A diferencia de los esteroides sexuales y los glucocorticoides, la ACTH ha recibido poca atención como moduladora de las funciones reproductivas. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha demostrado previamente la presencia de los receptores de melanocortinas (MCRs) en el ovario bovino¹, sugiriendo un rol importante de esta hormona como moduladora de la función gonadal a través de los MCRs². Es por esto que planteamos como objetivo de este trabajo evaluar en un modelo experimental de estrés *in vivo* el efecto de la ACTH sobre el folículo preovulatorio mediante el análisis de la expresión del receptor de melanocortinas 2 (MC2R) y de su proteína accesoria (MRAP).

Se utilizó un modelo experimental *in vivo* de inducción de estrés mediante la administración de ACTH^{3,4} (Figura 1). Para esto, en primer lugar, se utilizó un protocolo de sincronización de celo G6G-Ovsynch. A continuación, los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos: Grupo tratado: los animales recibieron 100 UI de ACTH (ELEA, Buenos Aires) cada 12 horas hasta el día esperado de la ovulación. Grupo control: los animales recibieron inyecciones de solución fisiológica cada 12 hs hasta el día esperado de la ovulación. Finalmente, previo al momento esperado de la ovulación (día 18), se realizaron ovariectomías bilaterales por flanco izquierdo. A continuación, se aspiró el líquido folicular (LF) y se guardó a -80°C para determinaciones hormonales (estradiol, progesterona, cortisol y testosterona). Además, se obtuvo una muestra de pared del folículo preovulatorio de cada animal de los grupos control y tratado con ACTH y se guardó a -80°C para posteriores ensayos como se detalla a continuación. Y el resto de los ovarios se acondicionaron y procesaron hasta su inclusión en parafina.

Cada muestra de pared folicular se dividió en porciones de aproximadamente 10-15 mg cada una. Sobre una porción se realizó extracción de ARN utilizando la técnica de Trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. A continuación, se realizó la transcripción reversa para obtener ADN copia (cDNA) utilizando la enzima Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (MMLV-RT, Life Technologies) y se determinó la concentración de cDNA de cada muestra usando el espectrofotómetro UV/Vis (SPECTROStar Nano). Se llevaron a cabo las PCR en tiempo real utilizando cebadores de secuencias específicas para los genes MC2R y MRAP, y en un equipo QuantStudio QS3 (Applied Biosystem).

Otra porción de cada muestra, se trató con inhibidor de proteasas (Pierce Protease Inhibitor Tablets, Thermo Fisher Scientific) y buffer RIPA, y se disgregó con ayuda de un homogeneizador de tejido (Ultra Turrax® IKA T10 Basic), para obtener las proteínas totales. A continuación, se determinó la

concentración proteica utilizando la técnica analítica de Lowry modificado y un espectrofotómetro UV/Vis (SPECTROStar Nano, BMG LABTECH). Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, sembrando 40 µg de proteínas por calle. Se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa, para luego realizar la técnica western blot con los anticuerpos primarios específicos MC2R (LETH) y MRAP (AbCam).

Se repitieron estos procedimientos para todas las muestras de pared folicular provenientes de los animales controles y tratados con ACTH.

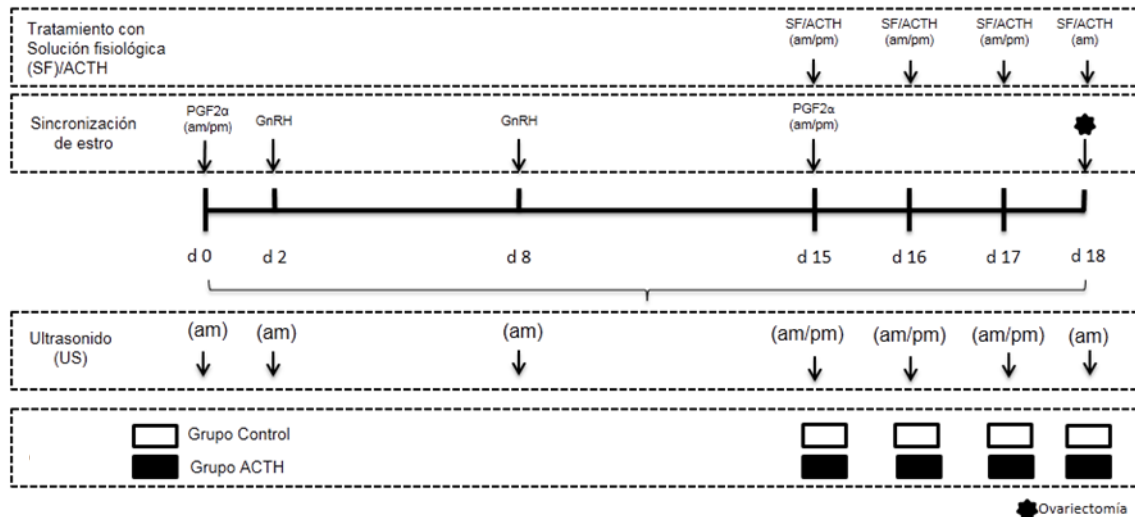


Figura 1. Protocolo de inducción de estrés mediante administración de ACTH. Se indican tratamientos hormonales y seguimiento con ultrasonografía (US) y de la ovariectomía bilateral. SF: Solución fisiológica.

Mediante PCR en tiempo real se evidenció la expresión génica del MC2R y de MRAP en las muestras de pared folicular completa obtenidas de los ovarios de los animales controles y tratados con ACTH. Por western blot, se obtuvo una banda a 33 KDa correspondiente a la proteína MC2R en las muestras evaluadas. Además, se detectó una mayor concentración de cortisol en el LF del grupo tratado con ACTH en relación al grupo control ($p < 0,05$).

Estos resultados muestran que el ovario bovino puede responder localmente a la ACTH liberada como consecuencia del estrés. Además, estos resultados indican que la ACTH, a través de su receptor específico, puede estar involucrada en los mecanismos reguladores relacionados con las funciones ováricas, como la ovulación, la esteroidogénesis y en la fisiopatología de diversas enfermedades reproductivas en el ganado.

Bibliografía

- 1-Amweg, AN.; Paredes, A.; Salvetti, NR.; Lara, HE.; Ortega, HH. (2011). Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary. *Theriogenology*, 75(4), 628-637.
- 2-Amweg, AN.; Salvetti, NR.; Stangaferro, ML.; Paredes, AH.; Lara, HH.; Rodríguez, FM.; Ortega, HH. (2013). Ovarian localization of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11βHSD): effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domestic animal endocrinology*, 45(3), 126-140.
- 3-Belotti, EM. (2018). Análisis de los componentes de la cascada inflamatoria asociados con la ovulación y estudio del estrés como factor etiopatogénico de alteraciones reproductivas bovinas: rol de las metaloproteasas y proteínas relacionadas. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.
- 4-Biran, D.; Braw-Tal, R.; Gendelman, M.; Lavon, Y.; Roth, Z. (2015). ACTH administration during formation of preovulatory follicles impairs steroidogenesis and angiogenesis in association with ovulation failure in lactating cows. *Domestic animal endocrinology*, 53, 52-59.