

## **Desarrollo de un modelo de cultivo primario de células de la granulosa bovina con bajas concentraciones de progesterona.**

Cattaneo Moreyra ML<sup>1</sup>, Chiaraviglio JA<sup>1</sup>, Stassi AF<sup>1,2</sup>, Etchevers L<sup>1,2</sup>, Amweg A<sup>1,2</sup>, Salvetti NR<sup>1,2</sup>, Rey F<sup>1,2</sup>, Rodríguez FM<sup>1,2</sup>.

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

[cattaneomml@gmail.com](mailto:cattaneomml@gmail.com)

En los últimos años se desarrollaron con éxito diferentes programas para sincronizar los ciclos estrales del ganado bovino, varios de los cuales, incluyen la administración de progesterona (P4) de liberación prolongada que, si bien es un método eficaz de sincronización resulta en una baja fertilidad<sup>4</sup>. Está demostrado que las concentraciones subluteales de P4 incrementan la frecuencia pulsátil de la LH, inhibiendo sin embargo, el pico preovulatorio. En consecuencia, se extiende el ciclo estral permitiendo que el folículo dominante continúe creciendo y persista en el tiempo<sup>1,2</sup>. Una importante causa de subfertilidad en el bovino es la enfermedad quística ovárica (COD), que se caracteriza por el desarrollo de un folículo persistente, con diámetro superior al ovulatorio, que falla en ovular. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo de persistencia folicular en bovinos lecheros que consiste en la administración de bajas dosis de P4 utilizando un dispositivo intravaginal<sup>2</sup>. En este modelo *in vivo* se determinó que el tratamiento con P4 inhibe el pico preovulatorio de LH en las vacas tratadas y altera los niveles de 17 $\beta$ -estradiol (E2), P4, 17-hidroxiprogesterona y testosterona en suero y líquido folicular, similar a lo descripto en vacas con COD.

El cultivo de células de granulosa bovina ha sido ampliamente estudiado y se han desarrollado diferentes sistemas *in vitro* para la evaluación de la regulación fisiológica del crecimiento folicular y la ovulación, entre otros procesos<sup>3</sup>. Debido a la necesidad de evaluar la respuesta de dichas células frente a diferentes estímulos hormonales o analizar componentes intracelulares que no pueden ser estudiados *in vivo* por la complejidad de los sistemas, en este trabajo nos propusimos desarrollar un modelo de cultivos primarios de células de la granulosa bovina estimuladas con bajas concentraciones de P4 (similar a las encontradas en folículos persistentes del modelo *in vivo*). Las muestras de ovarios fueron obtenidas de vacas Holando Argentino de un frigorífico de la zona y trasladadas al laboratorio en solución fisiológica (9 g/l NaCl) a 37 °C. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron lavadas con solución fisiológica, etanol 70° y por último, un lavado con solución fisiológica para eliminar los restos de etanol. Todas las soluciones utilizadas para los lavados fueron previamente acondicionadas en baño termostático a 37 °C. Se seleccionaron folículos mayores a 8 mm provenientes de ovarios sin alteraciones macroscópicas visibles, con cuerpo lúteo menor a 3 cm (no activo, en regresión). Se aisló el folículo de interés con bisturí y pinzas, en cabina de seguridad de tipo II para mantener el ambiente en condiciones de esterilidad necesarias. Una vez obtenido el folículo, se procedió a extraer el líquido folicular (LF) con células de la granulosa (CG) mediante repetidos lavados con jeringa y aguja (flushing). Este procedimiento se repitió hasta obtener un pool de 6-8 folículos. El LF conteniendo las CG se centrifugó a 500g durante 5 minutos. Parte del LF sobrenadante se almacenó a -80°C para posteriores mediciones hormonales y las células se re-suspendieron en medio de cultivo adecuado (DMEM F-12 (Gibco), BSA 0.1%, bicarbonato de sodio 2mg/ml, insulina 0.01ng/ml, antibiótico-antimicótico 1X, FSH=PMSG 1UI/ml). Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer con el colorante de exclusión azul de Tripán para sembrar 40.000 células por pocillo, en placas de 24 pocillos. Las células se mantuvieron en el medio de cultivo suplementado con 20 ng/ml de P4 durante 24, 48 y 72 h en atmosfera con 5% CO<sub>2</sub>. Para cada tiempo se incluyeron células control mantenidas en medio de cultivo sin P4. Luego se obtuvieron las células por pipeteo y se centrifugaron a 800g durante

7 minutos. El medio de cultivo sobrenadante se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores mediciones hormonales. Para la extracción de ARN se re-suspendieron las células obtenidas en  $200\ \mu\text{l}$  de Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante con modificaciones. Brevemente, se realizó una doble extracción con trizol-cloroformo, luego de lavados y centrifugaciones, se precipitó el ARN con etanol 75% y se centrifugó. El ARN total obtenido se re-suspendió en agua libre de ARNasas, se trató con ADNasa para eliminar el ADN genómico remanente y se realizó la transcripción reversa para obtener ADNc. Finalmente se analizaron los niveles de la enzima citocromo P450 aromatasas (CYP19A1) enzima característica de las células de la granulosa encargada de aromatizar andrógenos, mediante un protocolo optimizado de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Paralelamente, se evaluó la enzima citocromo P450 17 hidroxilasa/ 17, 20 liasa (CYP17A1) característica de las células de la teca para descartar contaminación cruzada con esta población celular.

Las células de la granulosa obtenidas en este ensayo mantuvieron su viabilidad y morfología en las condiciones de cultivo establecidas durante el tiempo del ensayo.

Los resultados evidenciaron expresión génica de la enzima CYP19A1 en las condiciones evaluadas sin observarse la expresión génica de CYP17A1, lo que confirmaría la pureza de la población de células en cultivo.

Estos resultados preliminares indicarían que el método de obtención de células de la granulosa a partir de folículos ováricos bovinos y su mantenimiento con concentraciones bajas de progesterona hasta 72 h, podría ser utilizado para futuros ensayos que contribuirían a comprender los mecanismos relacionados a la persistencia folicular.

## Bibliografía

1. Bridges, P.J., Fortune, J.E., 2003. Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 25:199-214.
2. Díaz PU; Stangaferro ML; Gareis N; Silvia WJ; Matiller V; Salvetti NR; Rey F, Barberis F, Cattaneo L; Ortega HH. 2015. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology*, 84, 1149-1160
3. Gutierrez, C.G., Campbell, B.K., Webb, R. 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod* 56: 608 – 616.
4. Jöchle, W., 1993. Forty years of control of the oestrous cycle in ruminants: progress made, unresolved problems and the potential impact of sperm encapsulation technology. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:587-94