

## Evaluación del Receptor de Insulina en bovinos con persistencia folicular ovárica.

Cattaneo, M.L.<sup>1</sup>; Huber, E.<sup>1,2</sup>; Gareis, N.<sup>1,2</sup>; Rey, F.<sup>1,2</sup>; Rodríguez, F.M.<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/ <sup>3</sup>Cátedra de Genética, Universidad Nacional del Litoral (UNL).

La producción láctea ha aumentado en los últimos años en detrimento de la eficiencia reproductiva en el ganado bovino, causando grandes pérdidas económicas. Una importante causa de sub-fertilidad en vacas de alta producción es la enfermedad quística ovárica (COD). Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de un folículo con diámetro superior al ovulatorio en ausencia de tejido luteal que persiste en el tiempo interrumpiendo el ciclo normal reproductivo<sup>1</sup>. La patogenia de esta enfermedad es compleja e involucra un trastorno plurifuncional del proceso de la ovulación. Entre los factores que intervienen, se ha demostrado que las concentraciones subluteales de progesterona inducen un aumento en la frecuencia de pulsos de LH, inhibiendo el pico preovulatorio de la misma y en consecuencia, la ovulación, provocando el crecimiento y persistencia de folículos dominantes. Por otro lado, existen evidencias que sugieren la existencia de componentes intraováricos en estadios tempranos de la persistencia folicular que podrían causar el desarrollo de quistes ováricos<sup>2</sup>. Aunque no se encuentra completamente definido el mecanismo por el cual se presenta la enfermedad, diversos factores metabólicos como la insulina se han propuesto como mediadores determinantes de las alteraciones descriptas.

La insulina es un componente fundamental para promover la maduración folicular. Para mediar sus respuestas específicas debe unirse a su receptor en la membrana plasmática que desencadena una cascada de señalización intracelular. En folículos ováricos de bovinos, se detectó la expresión del receptor de insulina (IR) en células de la granulosa y células de la teca. Diversos estudios sugieren que alteraciones en la cascada de señalización de la insulina, participarían en disfunciones ováricas. En trabajos previos en nuestro laboratorio hemos detectado cambios en la expresión del IR en vacas con COD<sup>3</sup>. Es por ello que nos propusimos como hipótesis de trabajo que una alteración en los niveles de IR en estadios iniciales de la persistencia folicular afectaría la funcionalidad ovárica y en consecuencia, favorecería el desarrollo de la COD. Por lo tanto, nos proponemos como objetivo determinar la expresión del IR en folículos ováricos bovinos para conocer el momento crítico de la alteración de su expresión utilizando un modelo de persistencia folicular bovina que nos permite evaluar las primeras etapas de la formación de quistes.

Para ello se utilizaron vacas de la raza Holando Argentino examinadas por tacto rectal y ultrasonografía antes del comienzo de la experiencia para comprobar la ausencia de alteraciones en su tracto reproductor; y la normalidad y regularidad de sus ciclos estrales. Los animales fueron sometidos a la sincronización de sus ciclos estrales mediante el protocolo adaptado G6G-Ovsynch<sup>4</sup>. Los animales del grupo control (C, n= 5) sólo recibieron el tratamiento G6G-Ovsynch. Los grupos experimentales con 0 (P0, n=5), 5 (P5, n=5), 10 (P10; n=5) y 15 días de persistencia (P15; n=5) además se trataron con dispositivos intravaginales de liberación lenta de progesterona (P4) hasta los 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular respectivamente. La actividad ovárica fue verificada por ecografía (Transductor lineal transrectal 5 MHz, Honda HS101V, Japón) para evaluar la respuesta a los tratamientos. Los animales fueron sometidos a ovariectomía bilateral en el día esperado para la ovulación (P0) y a los 5 (P5), 10 (P10) y 15 (P15) días de persistencia folicular, y en el proestro de los animales del grupo control (C). Sobre las muestras de ovario se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta para la determinación de la expresión de IR siguiendo el protocolo descrito previamente por Hein y col.<sup>3</sup>. La cuantificación del IR se realizó mediante análisis digital de imágenes (% de área marcada) con el

programa informático IMAGE PRO PLUS. Se evaluaron las células de la granulosa y de la teca de folículos en crecimiento y en los diferentes estadios de persistencia folicular. Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el programa estadístico SPSS 11.0.1 para Windows. Se realizó un análisis de la varianza de los datos obtenidos de la inmunomarcación de los distintos tipos foliculares aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan.

Los resultados mostraron expresión del IR en células de la granulosa y en células de la teca en todas las categorías foliculares analizadas. Se observó una mayor expresión del receptor en células de la granulosa de folículos terciarios respecto a folículos secundarios, tanto en el grupo control como en el grupo de persistencia de 5 días ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, se observó una mayor expresión de IR en folículos terciarios del grupo P5 con respecto al foliculo persistente del mismo grupo ( $p < 0,05$ ). Además, la expresión del IR fue similar en las células de la teca en todas las categorías foliculares analizadas.

Si bien aún resta evaluar otros componentes que intervienen en la respuesta a insulina, con estos datos podemos concluir que el IR se expresa a lo largo de la foliculogénesis y permanece disponible para captar insulina y participar en el desarrollo folicular. Durante la persistencia el IR se mantiene constante, por lo que indicaría que el receptor se expresa para captar la insulina disponible en el foliculo que no sería suficiente para lograr la maduración folicular o permitir la ovulación, lo que llevaría a la persistencia folicular y posterior desarrollo de la COD.

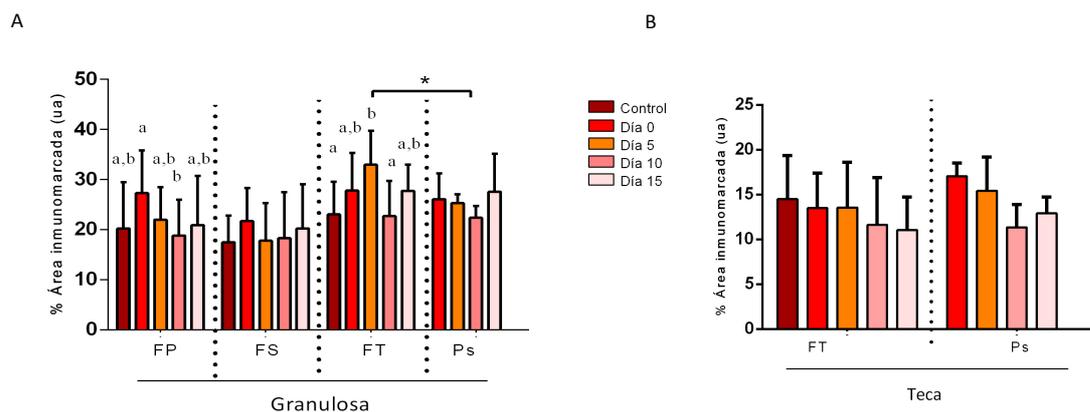


Figura 1: Porcentaje del área innumomarcada del IR en células de la granulosa (A) y de la teca (B) de folículos en desarrollo (FP: Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios) del grupo control y los grupos de 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular. Las barras representan el porcentaje de áreas innumomarcada como la media  $\pm$  SD. Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## Bibliografía

1. Silvia, WJ.; Alter, TB.; Nugent AM.; Laranja da Fonseca LF. (2002). Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest Anim Endocrinol*, 23,167-77.
2. Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. 2009. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction*. 137:865-77
3. Hein, GJ.; Panzani, CG.; Rodríguez, FM.; Salvetti, NR.; Díaz, PU.; Gareis, NC.; Benítez, GA.; Ortega, HH.; Rey, F. (2015). Impaired insulin signaling pathway in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci*. 9. S0378-4320,00057-3.
4. 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*, 15,1149-60