

Optimización de un modelo de células de la granulosa en cultivos estimulados con bajas concentraciones de progesterona.

Cattaneo ML¹, Chiaraviglio JA¹, Amweg AA^{1,2}, Salvetti NR^{1,2}, Rey F^{1,2}, Rodríguez FM^{1,2}

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

La salud animal de los sistemas agropecuarios es crítica para lograr una buena rentabilidad. Se ha observado un incremento de los desórdenes reproductivos consecuentes a la elevada producción láctea de los últimos años. Una importante causa de subfertilidad en el bovino es la enfermedad quística ovárica (COD). Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de un folículo persistente, con diámetro superior al ovulatorio, que falla en ovular. La patogenia de esta enfermedad es compleja e involucra un trastorno plurifuncional del proceso de la ovulación. Entre los factores que intervienen en el desarrollo la COD, se ha demostrado que las concentraciones subluteales de progesterona (P4) alteran la pulsatilidad de LH, inhibiendo el pico preovulatorio de la misma. De esta manera se inhibe la ovulación, provocando el crecimiento y persistencia de folículos dominantes, reduciendo la fertilidad. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de persistencia folicular en bovinos lecheros que consiste en la administración de bajas dosis de P4 utilizando un dispositivo intravaginal². En este modelo in vivo se determinó que el tratamiento con progesterona inhibe el pico preovulatorio de LH en las vacas tratadas y altera los niveles de 17 β -estradiol (E2), P4, 17-hidroxiprogesterona y testosterona en suero y líquido folicular, similar a lo observado en vacas con COD.

En este trabajo, nos propusimos optimizar un modelo en una línea de células de la granulosa bovina (BGC-1) estimuladas con bajas concentraciones de P4, similar a las encontradas en folículos persistentes. El objetivo de este desarrollo es contar con un sistema in vitro para luego estudiar la modulación de diferentes factores y comprender los efectos de alteraciones que no pueden desarrollarse in vivo. Para ello, se analizará la estimulación con P4 a niveles subluteales analizando la expresión del receptor de la hormona luteinizante (RLH) mediante western blot y se analizarán las concentraciones de E2 en los sobrenadantes de cultivos mediante electroquimioluminiscencia (ECLIA) para comprobar la respuesta del estímulo.

Las células BGC-1, cedidas por el Dr. Lino Baraño del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET), se cultivaron en un medio DMEM:F12 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios) y 1% de antibiótico (Atb, Gibco) según técnicas ya descriptas¹. Al alcanzar el 80% de confluencia en un frasco T75, se realizó en recuento celular en cámara de Neubauer con el colorante de exclusión azul de Tripán. En placas de 24 pocillos, se sembraron 35.000 células/pocillo con un medio DMEM:F12 10% SFB 1% Atb y suplementado con diferentes concentraciones de P4: 0,1; 1, 10 ng/ml por 24, 48 y 72 h. Se incorporaron controles sin P4 en los tiempos estudiados.

Luego de las correspondientes incubaciones, los sobrenadantes de cultivo se almacenaron a -80°C hasta su medición hormonal. Por otro lado, las células se lisaron con buffer RIPA con inhibidores de proteasas al 10% y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis por western blot.

Se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% y transferencia a membranas de nitrocelulosa para analizar la expresión de RLH y de β -actina como control endógeno. En los SDS-PAGE, se sembraron 40 μ g de muestra por calle, cuya concentración fue determinada previamente mediante un método de Lowry modificado (BIO-RAD).

La expresión del RLH se detectó con un anticuerpo monoclonal cedido por Bukovsky (Universidad de Tennessee) en una dilución 1:150 siguiendo el protocolo ya descripto³. Se realizó la normalización del western blot con β -actina (dilución 1:1500, Santa Cruz). La cuantificación del RLH se realizó mediante análisis digital de imágenes con el programa informático IMAGE PRO PLUS 3.0, evaluando

la densidad óptima integrada (IOD). Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados estadísticamente con el programa SPSS 10.1 (SPSS Inc. USA) mediante un ANOVA y post-test de Duncan para los valores analizados.

Los datos preliminares obtenidos se observan en las figuras I y II. En las células sometidas a niveles de P4 correspondientes a 10ng/ml por 48h de cultivos se determinó un incremento de la expresión del LHR (Figura I). De esta manera se corroboró la respuesta frente al estímulo de la P4 en las células estudiadas.

Los resultados hormonales mostraron una disminución de la concentración de E2 en el sobrenadante de cultivos obtenido a las 48 h correspondientes al estímulo con P4 de 10ng/ml (Figura II). Estos datos son coincidentes con lo obtenido en el modelo in vivo, donde se observó una disminución del E2 en líquido folicular de animales con persistencia folicular.

Con estos datos preliminares podemos concluir que el cultivo de la línea celular BGC-1 sometidas a un estímulo por 48h con P4 a niveles subluteales (10ng/ml) podría ser útil como modelo in vitro de persistencia para estudiar factores que no se podrían analizar in vivo en animales de experimentación, tales como el silenciamiento de diferentes genes entre otros análisis.

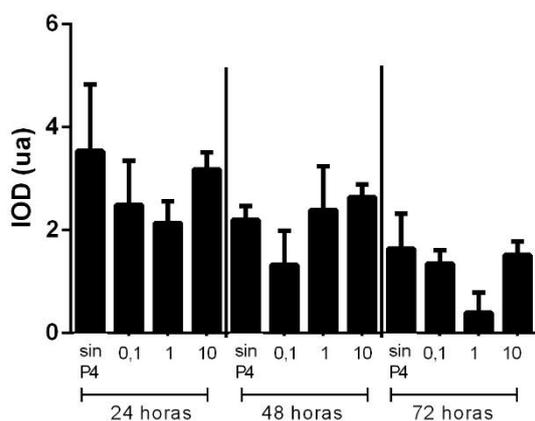


Figura I. Expresión de RLH en células BGC-1 estimuladas con diferentes concentraciones de progesterona (P4; 0,1; 1; 10 ng/ml) y control sin P4 en los tiempos estudiados 24, 48 y 72h. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (ua) correspondientes a la densidad óptima integrada (IOD) Las barras indican los promedios \pm SEM.

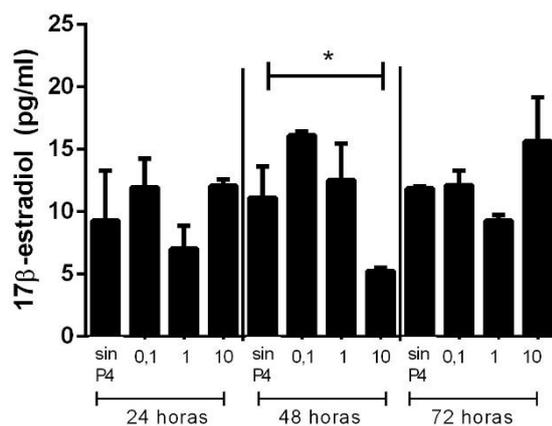


Figura II. Concentración de 17β-Estradiol (pg/ml) en el sobrenadante (medio de cultivo) correspondiente a los estímulos de progesterona (P4) en diferentes concentraciones (0,1; 1; 10 ng/ml) y control sin P4 en los tiempos estudiados 24, 48 y 72h. Las barras indican los promedios \pm SEM. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

1. Colman-Lerner AA, Salamone DF, Chiappe ME, Barañao JL. (1995). Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors. *Journal Cell Physiology*. 164, 395-403.
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. Rodríguez FM, Gareis NC, Hein GJ, Salvetti NR, Amweg AN, Huber E, Stassi AF, Ortega HH and Rey F. (2017). Role of Components of the Insulin-like Growth Factor System in the Early Stages of Ovarian Follicular Persistence in Cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 157, 201-214