

Determinación del uso diferencial de promotores transcripcionales del receptor de estrógenos alfa (ER α) en el ovario bovino.

Rodríguez, F.M.^{1,2}; Huber, E.^{1,2}; Marelli, B.E.^{1,2}; Recce, S.^{1,3}; Notaro, U.^{1,2}; Salvetti, N.R.^{1,2}; Ortega, H.H.^{1,2}; Rey, F.^{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/ ³Cátedra de Genética, Universidad Nacional del Litoral (UNL).
fmrodriguez@santafe-conicet.gov.ar

PICT-2013-2279: Programación fetal durante la preñez en vacas lecheras: influencia de factores ambientales sobre la fertilidad de la progenie y su relación con la expresión y regulación de receptores de hormonas esteroides en el ovario.

La eficiencia reproductiva en el ganado lechero ha disminuido notablemente en las últimas décadas en concomitancia al aumento de la producción láctea. Diferentes factores actúan en detrimento de un desempeño reproductivo adecuado, entre ellos el estrés ambiental ⁽¹⁾. El estrés por calor es uno de los estresores de mayor impacto sobre la eficiencia reproductiva del ganado lechero. Esta situación es muy frecuente en bovinos de la cuenca lechera santafesina donde existen índices de temperatura-humedad (ITH) por fuera de los niveles de confort del ganado durante un periodo considerable entre los meses de diciembre a marzo ⁽²⁾. Por otro lado, debido a que la gametogénesis ocurre durante la gestación, los factores de estrés como altos ITH pueden afectar la fertilidad de la descendencia y la calidad o marcas epigenéticas en sus gametos, creando así un efecto transgeneracional. Se han asociados cambios epigenéticos transgeneracionales a diferentes funciones y regulaciones, como por ejemplo a la regulación de la funcionalidad de los receptores de estrógenos en el endometrio bovino ⁽³⁾. En modelos experimentales en ovinos, se ha establecido que la expresión de receptores de hormonas esteroides en hembras adultas puede ser reprogramada por la exposición de la madre a testosterona ⁽⁴⁾. Estos receptores y correguladores serían afectados por cambios epigenéticos cuyas consecuencias podrían ser significativas. La epigenética se define como el estudio de las modificaciones heredables en la función del gen que ocurre sin alteraciones en la secuencia del ADN. Los mecanismos de regulación epigenética consisten principalmente en la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, reconstrucción de la cromatina y la expresión de ARN no codificantes. Altos niveles de metilación en regiones promotoras debilitan la unión a factores de transcripción asociados y causan disminución de la expresión génica.

Considerando estos antecedentes, nos planteamos como hipótesis de trabajo que las condiciones ambientales y de manejo desfavorables que sufren las vacas lecheras durante la gestación podrían desencadenar cambios a nivel molecular de los receptores de hormonas esteroides afectando la eficiencia reproductiva de las hijas.

Particularmente en este trabajo nos proponemos determinar la expresión de los promotores (A, B y C) del ER α , optimizando las técnicas necesarias para poder evaluar su uso diferencial y evaluar un patrón de metilación de regiones promotoras ricas en CpG en el ovario bovino. Para ello, trabajamos con muestras de tejidos controles, seleccionando oviducto, útero y glándula mamaria, donde se evalúa la presencia de los promotores mencionados. Una vez detectados los promotores en los tejidos controles, se analiza el comportamiento en el ovario.

Se obtuvieron muestras de tejido ovárico, oviducto, útero y glándula mamaria de bovinos provenientes de un frigorífico de la zona. Las muestras fueron colectadas de vacas sin signos de preñez y sin alteraciones visibles en su sistema reproductor. Para el procesamiento, fueron transportadas inmediatamente al laboratorio en conservadoras con hielo. Posteriormente, se tomaron secciones de los diferentes tejidos controles y muestras de folículos ováricos que fueron congeladas a -80°C hasta el momento de su utilización.

Mediante el programa bioinformático PrimerSelect (Lasergene software; DNASTar, Madison, Wis., USA), se diseñaron cebadores sentido cuyas secuencias son homólogas a los distintos exones 5' no codificantes correspondientes a los promotores transcripcionales (A, B, C) del ER α y un cebador antisentido complementario a la secuencia codificante del exón 1 a partir de secuencias ya publicadas (Figura 1).

Se realizó la extracción de ARN mediante el reactivo comercial Trizol (Invitrogen) siguiendo la metodología descrita por el fabricante. Luego de la transcripción reversa con la enzima MMLV-RT (Promega), se utilizó una técnica de PCR utilizando los cebadores diseñados para los promotores descriptos. Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando el servicio Macrogen (Corea), para determinar la especificidad de cada reacción.

Por otro lado, se analizó la región promotora para detectar regiones ricas en citosinas y guaninas mediante el software Methprimer y predecir posibles islas CpG en los promotores analizados.

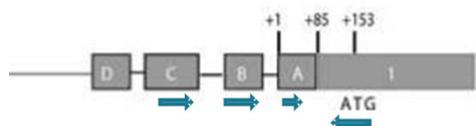


Figura 1: Primers diseñados para los promotores del ER α .

Los resultados de las PCRs para el promotor B en tejidos controles (oviducto, útero y glándula mamaria) evidenciaron una banda a 350pb. Los datos de secuenciación para las muestras controles mostraron un 100% de homología con la secuencia publicada del promotor B para ER α . En el caso de las diferentes muestras de ovario analizadas, se encontraron bandas con el tamaño esperado coincidentes con los datos de los tejidos controles y los analizados por homología mediante el uso del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Si bien los resultados de las PCRs para los promotores A y C evidenciaron bandas de 100pb y 400pb, respectivamente para los tejidos controles, restan realizar pruebas confirmatorias para su identificación.

Por otro lado se analizó la región promotora del ER α mediante el software Methprimer, donde se encontraron 3 islas CpG, prediciendo una de las islas en el promotor B.

Si bien queda por analizar con más profundidad los promotores A y C, estos resultados preliminares podrían ser los primeros indicios de que el promotor B podría participar en la regulación de la expresión génica del ER α en el ovario bovino. Resta analizar además, el patrón de metilación de estos promotores y comparar con los datos génicos y proteicos en vacas y vaquillonas gestadas en diferentes condiciones de ITH.

Bibliografía:

- 1- Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. 1999. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci.* 82:2611-2616.
- 2- Gallardo M, Valtorta S. 2011. Estrés por calor en ganadolechero: impactos y mitigación. *Producción y bienestar animal. Hemisferio Sur.* 124 p.
- 3- Fürst RW, Meyer HH, Schweizer G, Ulbrich SE. 2012. Is DNA methylation an epigenetic contribution to transcriptional regulation of the bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy? *Mol Cell Endocrinol.* 348:67-77.
- 4- Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. 2009. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction* 137:865-877.