

Optimización de cultivos de células de la granulosa a partir de folículos ováricos bovinos.

Amweg AN, Rodríguez FM, Marelli BE, Gareis NC, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F.
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. ICiVet-Litoral (UNL-CONICET).
ayelenamweg@yahoo.com.ar

Proyecto: "Influencia del estrés en la reproducción: participación del receptor de melanocortina 2 (MC2R) en la respuesta ovárica a la ACTH". PICT- 2014- 2540.

La proliferación de las células de la granulosa desempeña un rol determinante en la foliculogénesis. Las gonadotropinas y los estrógenos son los principales moduladores del crecimiento celular durante el periodo preovulatorio¹. El cultivo de células de granulosa bovina ha sido ampliamente utilizado desarrollándose diferentes sistemas *in vitro* para la evaluación de la regulación fisiológica del crecimiento folicular y la ovulación, entre otros procesos². Las células de la granulosa bovina son capaces de proliferar *in vitro* en presencia de diferentes factores de crecimiento y en presencia o ausencia de suero fetal bovino. En este sentido, una combinación adecuada de factores de crecimiento y hormonas serían suficientes para promover a las células a ingresar a la fase de síntesis (S) de ciclo celular¹.

Debido a la necesidad de evaluar la respuesta de dichas células frente a diferentes estímulos hormonales o analizar diversos componentes intracelulares que no pueden ser estudiados *in vivo* dado la complejidad de los sistemas, en este trabajo nos propusimos optimizar el cultivo primario de las células de la granulosa a partir de folículos ováricos bovinos.

Para ello, se realizaron ensayos con muestras de ovarios obtenidas en playa de faena provenientes de animales sin signos aparentes de trastornos reproductivos que fueron transportadas al laboratorio en solución fisiológica a 35°C. Una vez allí, los ovarios fueron lavados con solución fisiológica previamente acondicionada en baño termostático a 35°C. Se seleccionaron folículos con diámetro mayor a 8mm provenientes de ovarios sin alteraciones macroscópicas visibles y se realizaron diferentes pooles de 6 folículos como máximo. Se realizó la punción de dichos folículos con agujas 21G y se extrajo el líquido folicular que fue almacenado a -80°C para su posterior análisis hormonal. Se realizaron lavados suaves con buffer fosfato salino (PBS) estéril suplementado con antibiótico-antimicótico (penicilina- streptomycin- anfotericina- fungizona, Gibco), para desprender las células de la granulosa. El producto del lavado fue centrifugado por 5 minutos a 500g. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue lavado con PBS estéril y centrifugado en las mismas condiciones. A continuación, se procedió a la eliminación de los eritrocitos mediante el uso de un buffer de lisis (EDTA-Na₂ 0,1mM, NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 1mM). Finalmente, las células se resuspendieron en 1ml de medio de cultivo DMEM:F12 (MV) suplementado con albúmina sérica bovina (0,1%, BSA, Felasa), FSH, 1ng/ml, insulina, 0,01ng/ml y antibiótico- antimicótico, 0,1%. Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer utilizando el método de exclusión del Trypan blue. Para cada ensayo se sembraron 100.000 células viables/pocillo para ensayar las siguientes condiciones: 1- Control basal (células sin estímulos); 2- Células estimuladas con testosterona, 100ng/ml.

Luego de incubar durante 48hs a 37°C en atmosfera con 5% CO₂, se realizó el estímulo correspondiente y se mantuvieron en las mismas condiciones por 72hs.

Una vez que las células llegaron a confluencia, las células sin estímulo, se resuspendieron en el reactivo comercial Trizol (Invitrogen) y se realizó la extracción de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego se trató con ADNasa y se realizó la transcripción reversa para obtener ADNc. Finalmente se analizaron los niveles de la enzima citocromo P450 aromataza (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.

Por otro lado, las células estimuladas con testosterona fueron resuspendidas en un buffer RIPA para su posterior extracción de proteínas y análisis del receptor de FSH (RFSH) mediante western blot.

Para el análisis proteico se realizó una corrida electroforética en un gel desnaturante de poliacrilamida al 12%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y luego se realizó el western blot con un anticuerpo policlonal específico anti-RFSH desarrollado en el Centro de Medicina Comparada (CMC- ICiVet Litoral, UNL-CONICET).

Los sobrenadantes de los cultivos se almacenaron a -80°C para futuras determinaciones hormonales.

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 todos los pools evaluados sin observarse la expresión génica de CYP17a1, que confirmaría la pureza de la población de células en cultivo.

Por otro lado, mediante el ensayo de western blot se evidenció una banda específica de 30KDa de peso molecular correspondiente al RFSH, y cuya expresión se incrementó en presencia del agente estimulante respecto al control.

Estos resultados preliminares indicarían que el método de obtención de células de la granulosa a partir de folículos ováricos bovinos podría ser utilizado para futuros ensayos que contribuirían a comprender los mecanismos relacionados a la esteroidogénesis, la ovulación y los procesos relacionados a la funcionalidad ovárica.

Bibliografía

- 1. Colman-Lerner, A.; Salamone, D.; Chiappe, M.E.; Baraño, L.** (1995). Comparative Studies Between Freshly Isolated and Spontaneously Immortalized Bovine Granulosa Cells: Protein Secretion, Steroid Metabolism, and Responsiveness to Growth Factors. *J Cell Physiol* 164:395-403.
- 2. 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.