

Expresión de VEGFA-164 y su receptor VEGF-R2 como un componente intraovárico involucrado en la Enfermedad Quística Ovárica en bovinos.

Gasser, F.¹; Stassi, A.¹; Velázquez M.M.L.^{1,2}; Belotti, E.M.^{1,2}; Gareis, N.^{1,2}; Salvetti, N.^{1,2}; Ortega, H.H.^{1,2}; Baravalle M.E.¹

1. Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral-UNL-CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

2. Facultad de Ciencias Veterinarias del Litoral, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

fatimagasser@hotmail.com

La enfermedad quística ovárica bovina (COD: Cystic Ovarian Disease) constituye una de las causas más frecuentes de infertilidad en el ganado bovino lechero. Se caracteriza por la presencia de estructuras foliculares de un diámetro mayor al ovulatorio, que permanecen en el tiempo ocasionando trastornos en la funcionalidad ovárica¹. La función ovárica depende del establecimiento y la remodelación continua del sistema vascular, que le suministre al folículo el oxígeno y los nutrientes. El factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) es uno de los factores angiogénicos más importantes, siendo el VEGFA-164 una de las isoformas más estudiadas. Dentro de los receptores específicos, el VEGF-R2 parece mediar casi todas las respuestas celulares conocidas de VEGFA². VEGFA y VEGF-R2 fueron detectados en forma cualitativa en células de folículos antrales normales y quísticos de bovinos^{3,4}. En el presente trabajo nos propusimos evaluar la expresión génica y proteica de VEGFA-164 y VEGFR-2 en folículos preovulatorios provenientes de animales sanos (como estructura de referencia) y folículos quísticos de animales con COD espontánea.

La expresión génica (ARN mensajero) de la isoforma VEGFA-164 y del receptor VEGF-R2 se evaluó mediante PCR en tiempo real, en células foliculares ováricas obtenidas mediante la técnica de aspirado folicular. Por otro lado, se evaluó la detección de los mismos factores secretados en el líquido folicular mediante Western Blot (WB) y finalmente se evaluó la expresión proteica mediante Inmunohistoquímica indirecta (IHQ) en la pared de folículos quísticos y preovulatorios obtenidos y procesados luego de la ovariectomía. El análisis de los resultados de PCR en tiempo real se realizó mediante el software StepOne Software v2.3. Los resultados de IHQ y WB se analizaron mediante la digitalización de imágenes y el análisis del área inmunomarcada utilizando el software Image ProPlus 3.0 e Image Studio Software, respectivamente. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el uso del software SPSS 15.0.

Se detectó la expresión génica del VEGFA-164 y VEGF-R2 en células de granulosa obtenidas a partir del líquido folicular provenientes de los folículos preovulatorios del grupo control y folículos quísticos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ARNm entre los grupos evaluados ($p > 0.05$).

En la detección mediante WB en líquido folicular, los folículos quísticos mostraron mayores niveles de VEGFA-164 en comparación con los folículos preovulatorios del grupo control ($p < 0.05$). El VEGF-R2 soluble (aproximadamente 76KDa) fue detectado en líquido folicular en los dos grupos evaluados, sin diferencias significativas ($p > 0.05$) (Fig. 1). Las reacciones fueron negativas para los controles negativos y la banda inmunopositiva fue confirmada en muestras de tejido folicular ovárico bovino.

VEGFA-164 y VEGF-R2 fueron inmunolocalizados mediante IHQ en los dos grupos evaluados. La reacción fue negativa en los controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario específico. Se detectó la expresión de las dos proteínas en el citoplasma de las células de granulosa y teca en folículos quísticos y folículos preovulatorios. Respecto al VEGF-164, no se observaron diferencias significativas entre los folículos evaluados en células de granulosa ($p > 0.05$). En células de la teca, el VEGF-164 mostró una mayor expresión en folículos quísticos respecto a los folículos preovulatorios

del grupo control ($p < 0.05$). Para VEGF-R2, tanto en teca como en granulosa no se observaron diferencias significativas entre folículos preovulatorios y quísticos ($p > 0.05$) (Fig. 2).

Fig. 1. A) Imagen representativa de la detección proteica de VEGFA-164 y VEGF-R2 secretada en liquido folicular mediante WB. B) Niveles de VEGFA-164 y VEGF-R2 secretados en liquido folicular. Los valores representan la media \pm DE. Las diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$). IOD: Densidad Óptica Integrada. Preov: folículo preovulatorio. Q: folículo quístico.

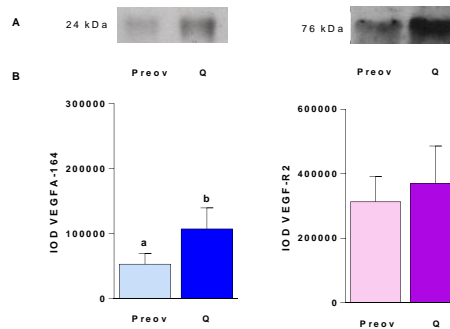
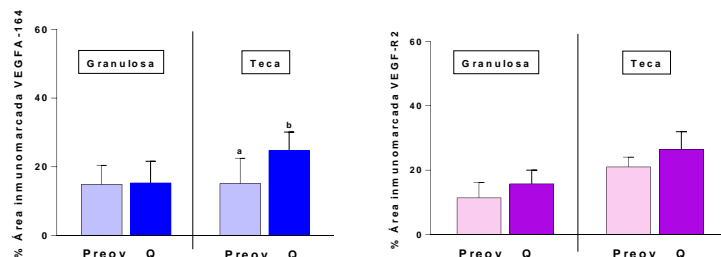


Fig. 2. Porcentaje del área inmunomarcada por VEGFA-164 y VEGF-R2 en células de granulosa y teca. Preov: folículo preovulatorio. Q: folículo quístico. Los valores representan la media \pm DE. Las diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$).



Los resultados obtenidos indican que VEGFA-164 y el receptor VEGFR-2 son expresados en los distintos tipos celulares (células de granulosa y teca) de los folículos ováricos del bovino normal y en condiciones patológicas (COD), siendo mayor la expresión de VEGFA-164 en células de la teca y en líquido folicular de los folículos quísticos respecto de los folículos preovulatorios, tomados como estructuras de referencia. Teniendo en cuenta que la angiogénesis representa un aspecto clave en la función ovárica normal y patológica, los resultados de este estudio sugieren que el crecimiento excesivo de los folículos quísticos depende del sistema vascular desarrollado en el ovario y además sugiere que los componentes del sistema VEGF podrían ser parte importante de la patogenia de la enfermedad quística ovárica bovina y su desregulación angiogénica.

- 1) Ortega, H.H.; Díaz, P.U.; Salvetti, N.R.; Hein, G.J.; Marelli, B.E.; Rodríguez, F.M.; Stassi, A.F.; Rey, F. (2016). Follicular Cysts: A Single Sign and Different Diseases. A View from Comparative Medicine. *Current Pharmaceutical Design*, 22, 5634-5645.
- 2) Berisha, B.; Schams, D.; Rodler, D.; Pfaffl, M.W. (2016). Angiogenesis in The Ovary - The Most Important Regulatory Event for Follicle and Corpus Luteum Development and Function in Cow - An Overview. *Journal of Veterinary Medicine*, 45, 124-30.
- 3) Isobe, N.; Kitabayashi, M.; Yoshimura, Y. (2005). Microvascular distribution and vascular endothelial growth factor expression in bovine cystic follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, 29, 634-645
- 4) Isobe, N.; Kitabayashi, M.; Yoshimura, Y. (2008). Expression of vascular endothelial growth factor receptors in bovine cystic follicles. *Reproduction in domestic animals*, 43, 267-271.