

## **Expresión folicular de segundos mensajeros de la hormona del crecimiento en vacas con Enfermedad Quística Ovárica.**

Leiva, C.J.<sup>1</sup>; Durante, L.I.<sup>1</sup>; Belotti, E.M.<sup>1</sup>; Díaz, P.U.<sup>1</sup>; Matiller, V.<sup>1</sup>; Salvetti, N.R.<sup>1</sup>; Ortega, H.H.<sup>1</sup>; Marelli, B.E.<sup>1</sup>.

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

cristianjmleiva@yahoo.com.ar

La hormona del crecimiento (GH) es producida por la adenohipófisis, estimula la liberación del factor de crecimiento análogo a insulina (IGF-I) en el hígado y es clave para el control y distribución de los nutrientes <sup>(2)</sup>. GH es el principal regulador postnatal del crecimiento y del metabolismo en los mamíferos, juega un rol crítico en el control de la lactación, en el proceso de desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria y en la fertilidad en el bovino. En diferentes especies se ha demostrado que la GH puede actuar selectivamente sobre los folículos ováricos, inhibiendo el crecimiento del folículo preovulatorio y estimulando el desarrollo de folículos subordinados. La función ovárica en el bovino está controlada por mecanismos de retroalimentación locales y sistémicos que aseguran que en más del 96% de los ciclos estrales sólo ovule un folículo. Diferentes estímulos sistémicos como las gonadotropinas, la GH, el IGF-I y la insulina influyen en el crecimiento folicular <sup>(4)</sup>. No obstante, factores producidos localmente, como IGF-I e inhibina, también tienen un rol modulador fundamental. La alteración o interrupción de la sincronía entre estos actores podría contribuir a la patogenia de enfermedades reproductivas, como la enfermedad quística ovárica (EQO) o la persistencia de folículos anovulatorios, patologías que comprometen la eficiencia reproductiva de los rodeos lecheros. Los efectos somatotróficos y metabólicos de GH están mediados por el receptor de GH localizado en la membrana celular. El mecanismo de señalización de dicho receptor depende, principalmente, de la activación de dos familias de proteínas intracelulares: las JAKs (Janus kinasas) y las STATs (signal transducers and activators transcription), por lo que se lo conoce como la vía JAK-STAT <sup>(1)</sup>. Las JAKs están asociadas al dominio intracelular del receptor de modo que, luego de la unión de GH, estas proteínas son activadas por transactivación y luego van a fosforilar a las STATs. Las STATs fosforiladas translocan al núcleo donde se unen a elementos de respuesta específicos. Considerando lo anteriormente expuesto nos planteamos como objetivo del presente trabajo caracterizar posibles alteraciones en el mecanismo de señalización de la GH asociados a la EQO. Para ello nos propusimos evaluar la expresión proteica de JAK2 y su forma fosforilada (p-JAK2), en las diferentes categorías foliculares de ovarios bovinos sanos sincronizados y en ovarios con EQO. En esta experiencia se utilizaron animales (n = 5 controles, n = 4 quistes) de la raza Holando Argentino. Los ovarios controles fueron obtenidos de animales cuyos ciclos estrales fueron sincronizados mediante el protocolo G6G - Ovsynch. Además, se obtuvieron ovarios de vacas con EQO espontánea. Las muestras ováricas fueron obtenidas mediante ovariectomía bilateral dos días después de finalizada la sincronización (proestro) para las controles y en el momento del diagnóstico para las EQO. Los ovarios fueron fijados en formol bufferado y procesado mediante técnicas histológicas de rutina <sup>(3)</sup>. Los cortes histológicos fueron analizados mediante la técnica de IHQ indirecta utilizando los

anticuerpos comerciales anti-JAK2 (Cell Signaling/D2E12) 1:400 y anti-pJAK2 (Abcam / ab32101) 1:100. Para el revelado se utilizó el sistema CytScan™ Biotinylated Link (Cell Marque). Las imágenes microscópicas de folículos ováricos de distintas categorías fueron digitalizadas y analizadas utilizando el sistema Image-Pro Plus 3.0.1. determinando el porcentaje (%) de área inmunopositiva tanto en células de la granulosa como de la teca. Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante el programa SPSS 10.1 utilizando el test de ANOVA seguido del test de Duncan para comparaciones múltiples. A partir de los resultados obtenidos podemos mencionar que fue posible detectar la proteína JAK2 total y su forma activada p-JAK2 tanto en la teca como en la granulosa de todas las categorías foliculares analizadas: primordial, primarios, preantral pequeño, preantral grande, antral, atrésico y quiste. Además, se evidenció un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en la expresión de JAK2 total en los quistes en relación a los folículos antrales del grupo control, acompañada por una disminución en la forma activada p-JAK2 al comparar los mismos tipos foliculares ( $p < 0,05$ ). Por último, no se evidenciaron diferencias en la marcación de las células de la teca entre grupos experimentales analizados. Considerando la expresión proteica evidenciada para JAK2, la primera proteína involucrada en la cascada de señalización intracelular de GH, podemos concluir que si bien se observa un incremento de la forma total, la cantidad de proteína activada es menor en los quistes que en los ovarios controles sanos. Este resultado podría ser indicativo de que la activación de los siguientes componentes de la cascada de señalización de GH también estaría alterada como parte de los cambios asociados a la EQO.

1-Deng, L.; Jiang, J.; Frank, S. (2012) Growth hormone- induced jak2 signaling and gh receptor down- regulation: role of gh receptor intracellular domain tyrosine residues. *Endocrinology*, 153(5): 2311–2322.

2- Jiang, H. Ge, X. (2014) Mechanism of growth hormone stimulation of skeletal muscle growth in cattle. *Meat science and muscle biology symposium. J Anim Sci*, 92(1): 21- 29.

3-Ortega, H. Salvetti N.; Padmanabhan V. (2009) Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction*, 137:865-877

4-Webb, R.; Gong J.; Bramley, T. (1994) Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology* 41:25-30