

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

Evaluación de diferentes suplementos en un sistema de cultivo de células de la granulosa bovinas.

Rodríguez, F.M.; Salvetti, N.R.; Ortega, H.H., Rey, F.

fernandamrodriguez@hotmail.com

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. ICiVet-Litoral CONICET, Universidad Nacional del Litoral (UNL).

Proyecto: "Evaluación de perfiles hormonales y metabólicos durante la persistencia de folículos ováricos y el desarrollo de la enfermedad quística ovárica en bovinos". CAI+D 2011, UNL.

La proliferación de las células de la granulosa es un componente fundamental en el desarrollo del folículo ovárico. Las células de la granulosa aisladas de diferentes especies muestran diferencias considerables en la habilidad de proliferar *in vitro*. Se ha demostrado que estas células, obtenidas de folículos ováricos bovinos y porcinos, son capaces de proliferar *in vitro* en presencia de diferentes factores de crecimiento y en presencia o ausencia de suero fetal bovino¹.

El cultivo de células de granulosa bovinas ha sido ampliamente estudiado y se han desarrollado diferentes *sistemas in vitro* para la evaluación de la regulación fisiológica del crecimiento folicular y la ovulación, entre otros procesos³. Actualmente, el medio de cultivo utilizado incorpora hormona folículo-estimulante (FSH) e insulina para aumentar la esteroidogénesis y lograr un crecimiento eficaz manteniendo las células sin luteinizarse². Sin embargo, el uso de estos suplementos debe limitarse cuando se requiere evaluar el efecto del estímulo de FSH, de hormona luteinizante (LH) o de insulina sobre la funcionalidad de las células de la granulosa.

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar diferentes suplementos en un medio de cultivo para células de la granulosa bovinas que permitan el crecimiento y mantenimiento prolongado de las mismas. Para ello, se realizaron ensayos con muestras de ovarios obtenidas en playa de faena. Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados con solución fisiológica previamente acondicionada en baño termostático a 35°C. Se seleccionaron 6 folículos con características coincidentes con las de folículos preovulatorios (diámetro mayor a 8mm provenientes de ovarios sin CL o con un CL de diámetro menor a 3mm). Se realizó la punción de dichos folículos con agujas 18G 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 para desprender las células de la granulosa. El producto del lavado fue centrifugado a 500g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue lavado con PBS estéril y centrifugado. Finalmente, las células se resuspendieron en 2ml de medio de cultivo DMEM:F12 y se filtraron utilizando una malla de acero de 150µm. Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer utilizando el método de exclusión del Trypan blue. Para cada ensayo se sembraron 50.000 células viables/pocillo para ensayar las siguientes condiciones del medio de cultivo: 1- DMEM:F12 con 1ng/ml de FSH y 0,01ng/ml de insulina, 2- DMEM:F12 con 4ng/ml de Selenio y 2,5ug/ml de transferrina, 3- DMEM:F12 con Selenio (4ng/ml), transferrina (2,5ug/ml) e insulina (0,01ng/ml) y 4-DMEM:F12 sin suplementos. Se incubaron por 24, 48 y 72 horas a 39°C en atmosfera con 5% CO₂ y se realizaron recuentos celulares a las 24 y 72 horas.

El recuento a las 24 horas evidenció para el medio de cultivo 1: 2,65 10⁵ células vivas/pocillo; para el medio de cultivo 2 1,4 10⁵ células vivas/pocillo; para el 3: 3,15 10⁵ células vivas/pocillo y para el 4: 5,2 10⁵ células vivas/pocillo. Por el contrario, el recuento a las 72 horas para la condición 1 fue: 7,7 10⁵ células vivas/pocillo, para 3- 1,58 10⁶ células vivas/pocillo y para 4- 1,56 10⁶ células vivas/pocillo. El sobrenadante del cultivo se destinó a mediciones hormonales y las células se resuspendieron en el reactivo comercial Trizol (Invitrogen) para la posterior extracción de ARN. Se realizó una retrotranscripción con la tecnología iScript y finalmente se analizaron los niveles de la enzima

AREA TEMATICA: SALUD ANIMAL

aromatasa (CYP19), enzima característica expresada por células de la granulosa encargada de aromatizar andrógenos, mediante PCR en tiempo real. Como gen de referencia para la cuantificación relativa se utilizó gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Los resultados evidenciaron la mayor expresión de la enzima CYP19 y la mayor proliferación celular a las 72hs en el medio de cultivo suplementado por selenio-transferina. En cuanto a los niveles hormonales, se pudo observar una alta relación de estrógenos/ progesterona en dicho medio, lo que evidenciaría el mayor crecimiento de las células a las 72 horas sin luteinización.

Con estos resultados podríamos concluir que el medio de cultivo suplementado con transferina (2,5ug/ml) y selenio (4ng/ml) sería el medio de cultivo de elección en el estudio *in vitro* de células de la granulosa frente a estímulos hormonales en tiempos prolongados.

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. **Ferreira, R., Gasperin, B., Rovani, M., Santos, J., Barreta, M., Bohrer, R., Price, C., Bayard Dias Gonçalves, P.** (2011). Angiotensin II Signaling Promotes Follicle Growth and Dominance in Cattle. *Endocrinology* 152: 4957– 4965.
3. **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.