



EFFECTOS DE LA ACTH SOBRE COMPONENTES DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN FOLÍCULOS PREOVULATORIOS BOVINOS

Simoré, Martina¹

¹Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET Litoral, UNL-CONICET)

Directora: Gareis, Natalia Carolina

Codirectora: Rey, Florencia

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: ACTH, Estrés, Metabolismo, Ovario, Bovino

INTRODUCCIÓN

Las vacas lecheras se encuentran expuestas a numerosas situaciones estresantes de índole metabólica, ambiental y de manejo durante toda su vida productiva, capaces de provocar el deterioro del bienestar animal que se evidencia principalmente con bajos índices productivos y reproductivos (Wathes, 2012). Diversos estudios han demostrado los efectos del estrés sobre la reproducción, ya sea a nivel hipotálamo-hipofisiario-gonadal así como directamente sobre el ovario, a consecuencia de la acción de los glucocorticoides liberados en respuesta a estresores. Recientemente en nuestro grupo, evidenciamos que la ACTH puede actuar directamente sobre los ovarios bovinos como una molécula de señalización a través de su receptor específico MC2R (Receptor de melanocortina 2) localizado en los folículos (Etchevers y col., 2021). A nivel ovárico, tanto la oxidación como la síntesis *de novo* de ácidos grasos son importantes para la proliferación y esteroidogénesis en las células de la granulosa, necesarios para el desarrollo de folículos funcionales (Elis y col., 2015). En estudios recientes (resultados aún no publicados) encontramos un aumento en una enzima de la oxidación de ácidos grasos, CPT1 (carnitin palmitoil transferasa 1) en folículos preovulatorios del grupo ACTH. La acetil-CoA generada como producto de la β -oxidación puede derivarse hacia la síntesis *de novo* de colesterol por las células foliculares. En el ovario, una enzima limitante de la síntesis *de novo* es la HMG-CoA reductasa (hidroximetil-glutaril-CoA reductasa) y se relaciona con el aumento de la esteroidogénesis en células de la granulosa. La acetil-CoA generada como producto de la β -oxidación también puede derivarse hacia la síntesis *de novo* de ácidos grasos (lipogénesis), involucrando a la enzima ACC (acetil-CoA carboxilasa), siendo

Título del Proyecto: "Influencia del estrés sobre el entorno folicular ovárico y su relación con el metabolismo lipídico del complejo cumulus-ovocito (CCO) en bovinos lecheros"

Instrumento: PICT

Año de la convocatoria: 2019

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Nombre del director: Natalia C. Gareis.





estimulada por la insulina, o bien hacia la generación de cuerpos cetónicos por medio de la HMG-CoA sintasa (hidroximetil-glutaril-CoA sintasa) a partir de acetil-CoA. Si bien se sabe que los glucocorticoides son moléculas lipolíticas a nivel general, proponemos el estudio más en profundidad de los efectos del estrés sobre el metabolismo de lípidos en ovario bovino.

OBJETIVOS

- ✓ Analizar las concentraciones plasmáticas e intrafoliculares de ácidos grasos no esterificados (AGNEs) y β -hidroxibutirato (BHB), como parámetros metabólicos, en animales sometidos a un modelo de estrés inducido por adrenocorticotropina (ACTH) y en animales controles.
- ✓ Evaluar la expresión proteica de enzimas de síntesis de ácidos grasos (ACC), colesterol (HMG-CoA reductasa) y BHB (HMG-CoA sintasa) en folículos preovulatorios de vacas de ambos grupos (ACTH y control).

METODOLOGÍA

Animales y modelo experimental: Se utilizaron 14 vacas de la raza Holando Argentino provenientes del tambo de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja dependiente de la UNL, examinadas por tacto rectal y ultrasonografía previo al comienzo de la experiencia para comprobar la regularidad de sus ciclos estrales. El modelo experimental ya ha sido optimizado y utilizado en nuestro grupo por lo que se contó con muestras histológicas que permitieron realizar la detección proteica (Belotti y col., 2020). El protocolo se desarrolló para la obtención de muestras de líquido folicular (LF) y de plasma. Los ciclos estrales se sincronizaron mediante el protocolo modificado G6G-Ovsynch (Díaz y col., 2015). Luego, las vacas se dividieron en 2 grupos: grupo control (n = 7), y grupo ACTH (n = 7). A los animales del grupo ACTH, se les administró 100 UI de ACTH intramuscular (Laboratorios ELEA) cada 12 h, el día posterior a la última PGF2 α del protocolo de sincronización (día 15 del ciclo estral) hasta el día 18 del ciclo estral. El grupo control se trató con solución fisiológica estéril durante el mismo período que a los animales tratados con ACTH.

Obtención de ovarios para Inmunohistoquímica (realizado previamente por el grupo): Para la obtención de los folículos preovulatorios, a los animales se les realizó ovariectomía bilateral el día 18 del protocolo. Los ovarios obtenidos fueron procesados histológicamente hasta su inclusión en parafina y se realizaron secciones de 5 μ m con micrótopo, para posteriormente utilizarse en la técnica de Inmunohistoquímica.

Obtención de líquido folicular: Mediante aspiración folicular guiada por ecografía utilizando un ecógrafo Chison 8300Vet equipado con un transductor microconvexo de 5,0 MHz montado en una sonda transvaginal para aspiración folicular (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil), se obtuvo LF de los folículos preovulatorios dominantes de ambos grupos.

Obtención de sangre: Se utilizó la técnica de extracción a través de punción de vasos coccigeos. Las muestras de sangre obtenidas de vacas de ambos grupos se colocaron en tubos con EDTA y se conservaron en frío hasta su procesamiento en el laboratorio, para la obtención de plasma.

Evaluación de la expresión proteica: sobre los cortes de tejido ovárico se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta, para evaluar la expresión proteica de tres enzimas claves del metabolismo lipídico: ACC, la HMG-CoA reductasa y HMG-CoA sintasa. La detección



proteica se analizó tanto en la población de células de la granulosa como en células de la teca de los folículos preovulatorios de cada grupo. Para ello, se utilizaron anticuerpos específicos disponibles comercialmente (Abcam, Santa Cruz). El análisis de las imágenes se realizó mediante el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetic).

Evaluación de las concentraciones de AGNEs y BHB: Las concentraciones de AGNEs en plasma y líquido folicular se determinaron usando un kit comercial (Randox Laboratories Ltd., Reino Unido). Las reacciones se evaluaron mediante espectrofotometría con un equipo SPECTROstar Nano (BGM LABTECH, Ortemberg, Alemania). Las concentraciones de BHB fueron medidas en plasma y líquido folicular empleando tiras reactivas (FreeStyle 210 Optium Xceed, Abbott Diabetes Care Ltd., Oxon, Reino Unido).

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa estadístico SPSS 10.1 (SPSS Inc. USA).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Las concentraciones plasmáticas de AGNEs fueron mayores en animales del grupo control respecto a animales del grupo ACTH ($p < 0,05$). En líquido folicular, las concentraciones de AGNEs fueron similares entre ambos grupos ($p > 0,05$). Las concentraciones plasmáticas e intrafoliculares de BHB fueron similares entre ambos grupos ($p > 0,05$) (Figura 1).

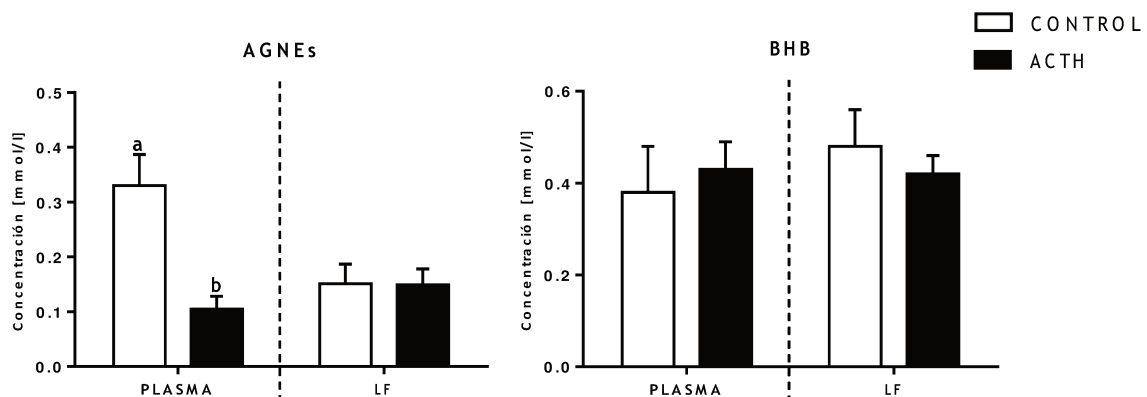


Figura 1: Concentración de AGNEs y BHB en plasma y LF en los animales de los grupos control y ACTH. Los valores representan la media \pm EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el análisis de la expresión proteica de ACC observamos una mayor expresión en el grupo control respecto al grupo ACTH, tanto en células de la granulosa como en células de la teca ($p < 0,05$). En la expresión proteica de HMGC_oA-R no encontramos diferencias significativas entre los grupos en las diferentes poblaciones celulares ($p > 0,05$), sin embargo observamos una tendencia ($p = 0,083$) a una disminución en la expresión proteica en la población de células de la teca del grupo ACTH. No observamos diferencias significativas ($p > 0,05$) en la expresión proteica de HMGC_oA-S en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas (Figura 2).

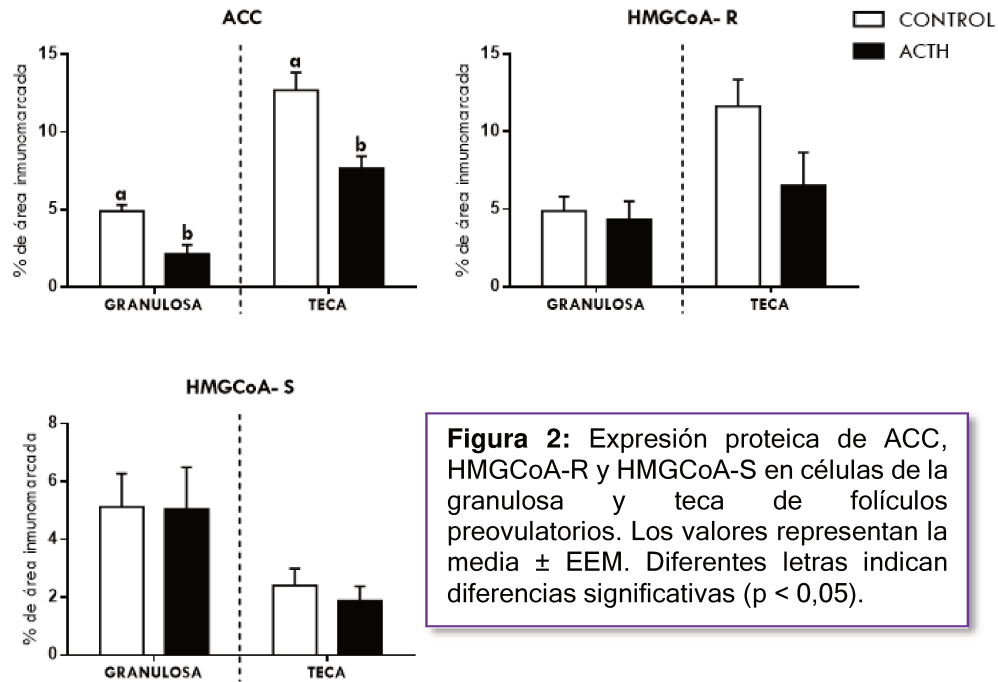


Figura 2: Expresión proteica de ACC, HMGCoA-R y HMGCoA-S en células de la granulosa y teca de folículos preovulatorios. Los valores representan la media \pm EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Si bien no se encontraron alteraciones en la concentración de AGNEs a nivel del líquido folicular, la ACTH sistémica podría estar afectando el mecanismo de síntesis *de novo* de ácidos grasos en células de la granulosa y de la teca. En base a esto, nos planteamos a futuro, evaluar los efectos de la ACTH y el cortisol sobre la maduración de ovocitos bovinos con el fin de comprender las posibles modificaciones que genera el estrés sobre los mismos y su capacidad de ser fertilizados.

REFERENCIAS

- Belotti EM, Amweg AN, Matiller V, Varela ML, Stassi AF, Velázquez MML, Ortega HH, Rey F, Salvetti NR.** 2020. Effects of adrenocorticotrophic hormone on the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the bovine ovary. *Reproduction, Fertility and Development*. 32, 748-762
- Díaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L, Ortega HH.** 2015. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology*, 84: 1149-1160.
- Elis S, Desmarchais A, Maillard V, Uzbekova S, Monget P, Dupont J.** 2015. Cell proliferation and progesterone synthesis depend on lipid metabolism in bovine granulosa cells. *Theriogenology*. 83: 840-853.
- Etchevers L, Belotti EM, Díaz PU, Rodríguez FM, Rey F, Salvetti NR, Ortega HH, Amweg AN.** 2021. MC2R/MRAP2 activation could affect bovine ovarian steroidogenesis potential after ACTH treatment. *Theriogenology*, 174:102-113.
- Wathes DC.** 2012. Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow. *Reprod Domest Anim*. 47: 304-312.