

<p>CONVOCATORIA 2018 Vigencia: 1/12/17 al 1/03/18</p>	<p>PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO</p>
<p>Título: "EFECTOS DEL NEUROESTEROIDE ALLOPREGNENOLONA SOBRE LA MORFOFISIOLOGÍA OVÁRICA. POTENCIAL APLICACIÓN EN LA CLÍNICA VETERINARIA".</p>	
<p>Directora de Proyecto: Dr Myriam R. Laconi</p>	
<p>Dirección de correo electrónico: mlaconi@yahoo.com / mlaconi@mendoza-conicet.gov.ar</p>	
<p>Integrantes del Equipo de Investigación:</p> <p>Laura Tatiana Pelgrina – Investigadora</p> <p>Martina Caliri – Investigadora</p> <p>Antonella Cáceres – Becaria diplomada</p> <p>Antonio Martinez – Asesor externo</p> <p>Fernanda Parborell – Asesora externa</p> <p>María de los Angeles Sanhueza – Becaria estudiante</p>	
<p>Carrera/s UMaza a la/s que está asociado el Proyecto: Carrera de veterinaria</p>	
<p>Proyecto es Interinstitucional junto a IMBECU. Convenio vigente.</p>	

- **DESARROLLO DEL PROYECTO**

RESUMEN

Los neuroesteroides son moléculas con un alto potencial de uso farmacológico aún en estudio. Participan de la regulación endócrina de la modulación del síndrome pre menstrual post menopáusico y en enfermedades neurodegenerativas. En este caso en particular, abordamos el efecto potencial sobre la fertilidad y diversos aspectos de la biología reproductiva de la hembra.

Tanto en veterinaria como en proyectos clínicos en humanos el análisis de estos efectos putativos puede aportar significativamente en el desarrollo de drogas anticonceptivas y eventualmente en drogas protectoras de procesos cancerígenos.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Objetivos generales:

- Evaluar el efecto de la administración de ALLO intrabursa a las 24 h sobre los procesos de muerte celular programada (apoptosis), formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y sobre la morfo-fisiología ovárica de la rata adulta en ciclo.
- Determinar mediante una curva dosis/respuesta la dosis efectiva en este nuevo modelo experimental de administración vía intra-bursa ovárica (5 µl/ovario). Se probarán 5 puntos comenzando por la dosis farmacológica de 6000nM (6 µM), luego se irá descendiendo (600 nM, 120 nM, 60nM y 10 nM) hasta el valor referido por la bibliografía como el mínimo fisiológico circulante (Purdy y col., 1991).

Objetivos específicos:

Determinar el efecto *in vivo* de ALLO en ratas vírgenes de 60 días de edad sobre los siguientes parámetros:

- Análisis morfométrico (Histológico): Determinar en los 5 puntos de la curva las posibles alternaciones en la morfología y morfometría de las estructuras ováricas, mediante el estudio de la histología ovárica (Kheradmand, et al; 2009) y la verificación de la ovulación post tratamiento.

- Estudios Inmunohistoquímicos: Estudiar la modulación por ALLO sobre la expresión de los receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR) en ovarios por inmunohistoquímica. Identificar por inmunohistoquímica factores pro y anti-angiogénicos específicos (α -actina y Von Willebrand) y de factores pro y anti-apoptóticos (Caspasa 3 clivada y BCL2, BAX) y el factor de proliferación PCNA con el fin de identificar su localización tisular o citológica.
- Estudios Endócrinos: determinar por quimioluminiscencia y Radioinmunoanálisis las concentraciones de hormonas esteroideas en suero y en muestras de tejido ovárico. El día del sacrificio, se colectará la sangre troncal de los animales (24 h posteriores a la administración de los neuroesteroides). Las muestras de suero se conservarán a -30°C hasta la determinación de Es y Pg.
- Estudios Enzimológicos: Medir en tejido ovárico la actividad de la enzima 3β -HSD en respuesta a la administración de ALLO con el fin de evaluar la reactividad metabólica biosintética al neuroesteroide. Previamente en el proyecto 2008-2009 se midieron las actividades de 3β -HSD y la 20α -HSD con el modelo i.c.v. en HMB y ovario.
- Estudios de funcionalidad: Determinar el posible mecanismo de acción de ALLO sobre el receptor GABAa mediante la administración concomitante de Bicuculina (agonista GABAa). Este procedimiento se llevará a cabo sólo en el grupo a sacrificar a las 24 h post administración y con la dosis que haya resultado efectiva.
- Determinar si la acción de Allo en el ovario es mediada por la activación de los receptores de membrana de progesterona.
- Medir los niveles de pregnolona, progesterona y ALLO por la técnica de HPLC en líquido folicular y en suero de ratas.

Reactivos: Allopregnanolona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). ALLO será inicialmente diluida en propilenglicol a una concentración de $600\ \mu\text{M}$. Las concentraciones posteriores de ALLO (600nM , 120nM , 60nM y 10nM) se obtendrán por dilución de la solución inicial en solución fisiológica (Laconi y col., 2001, 2002, 2012 y 2015). La concentración $6\ \mu\text{M}$

corresponde a un nivel sub-máximo circulantes de stress (Purdy, 1991). El vehículo utilizado será preparado a partir de solución salina más un volumen de propilenglycol semejante al usado en la dilución inicial de ALLO (Laconi y col, 2001, 2002, 2012, 2016 y 2017).

Animales de experimentación: Ratas hembras adultas vírgenes de la cepa Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) de 60 días de edad, con un peso de 250 – 300g, nacidas y criadas en el bioterio central de IMBECU. Serán mantenidas de a 4 animales por caja, en condiciones controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminación (12 hs luz/12 hs oscuridad), con libre acceso a alimento (alimento balanceado Cargill, Córdoba, Argentina) y agua. Todos los experimentos realizados en este trabajo seguirán las pautas para cuidado y uso de animales de laboratorio provistas por el CICUAL (entidad que aprobó previamente nuestro protocolo experimental N° 141021/2015), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Diseño Experimental: En la mañana del proestro (09:00 hs) se administra intrabursa del neuroesteroide en un volumen de 5ul/ovario (Abramovich y col, 2010) en el ovario izquierdo y vehículo en el derecho mediante una jeringa Hamilton ultradelgada sin provocar daño a las estructuras aledañas. Los animales serán anestesiados según los protocolos de rutina (Ketamina 90 mg/kg + Xilazina 10 mg/kg i.p.) a las 24 hs post administración de la droga se sacrificarán los animales, el día del estro.

Luego del sacrificio, se colectará la sangre troncal para los RIAs, se extraerán ambos ovarios y se verificará la ovulación mediante punción en la ámpula y recuento de los ovocitos. Luego se limpian los ovarios y se fijan en solución de Bouin para el posterior procesamiento histológico e inmunohistoquímico.

Técnica Quirúrgica: Cirugía bilateral exposición de ovarios y administración intra-bursa, modificada de Abramovich y col, 2010.

Una vez anestesiado el animal, se procederá con la tricotomía y lavajes quirúrgicos de las zonas a incidir con iodopovidona y alcohol. Las zonas previamente mencionadas comprenden el flanco derecho e izquierdo del abdomen, más específicamente el lugar comprendido entre las últimas costillas y la tuberosidad coxal. Luego del embrocado se procede a realizar una incisión en piel, luego se procede a abrirse paso por el subcutáneo hasta el músculo oblicuo externo abdominal, que es incidido con tijeras, se separan las fibras del músculo oblicuo

interno y transversal abdominal, hasta el peritoneo, que también es incidido. Se procede a levantar y exteriorizar el ovario, que es colocado sobre una gasa humedecida en solución fisiológica. Se administran ALLO y Veh respectivamente (5uL/ovario) con ayuda de una jeringa tipo Hamilton. Con una pinza se sostiene al ovario para separarlo de algún depósito de grasa periférica, de forma tal, que la bursa se separe un poco de las estructuras del ovario, para garantizar un lugar de inoculación claro. Una vez inyectado el ovario, se procede a su reintroducción a la cavidad abdominal y sutura de cada uno de los planos incididos. La operación descrita se lleva a cabo de cada lado abdominal, y una vez finalizada, se inyectan 0,15 ml de penicilina subcutánea, para la prevención de posibles infecciones.

1- Estudios Histo-morfométricos: Luego de la fijación se deshidratarán los tejidos mediante una serie descendiente de alcoholes y finalmente xilol (Merk, Germany) y se incluirán en parafina. Luego se cortarán secciones de 5µm en micrótopo y se montarán en portaobjetos. Posteriormente, secciones seriadas a diferentes niveles representativos del ovario se destinarán para la tinción con hematoxilina-eosina que luego se examinarán bajo microscopio óptico (Zeiss, Germany o Nikon Eclipse E 200) con una cámara digital anexada para el registro de las imágenes. El resto de las secciones se utilizarán para los estudios inmunohistoquímicos que se detalla en el punto 2. A continuación, en un equipo de análisis morfométrico con microscopio adosado a un equipo con un programa adecuado para tal fin (Motic Image Plus 2.0) se procederá a las mediciones de las estructuras (diámetro medio). También, se registrará el número de cuerpos lúteos y de folículos en cada uno de sus estadios. Previo a la extracción de los ovarios se evaluará si el animal ovuló mediante un análisis bajo lupa. Luego se aplicará una fórmula (Kheradmand, 2009) para la estimación del volumen ovárico en respuesta a la administración del neuroesteroide.

2- Estudios Inmunohistoquímicos: Se cortan secciones 5µm y se incuban con los anticuerpos específicos contra receptor de Es α , receptor de Pg (Fanelli y col., 1995), α -actina, Von Willebrand, Caspasa-3 clivada, BCL2y el factor de proliferación celular PCNA. Posterior al revelado, la expresión de cada uno de estos factores se cuantificará mediante el uso del programa Image-Pro-Plus 4.1 (NIH).

3- Estudios endócrinos: La sangre troncal extraída se llevará a baño termostático a 20°C

durante 10min para favorecer la formación de coágulos, y así eliminar eficazmente la proteína fibrinógeno del suero. Luego se centrifugará 15 minutos a 1500 rpm y se extrajo el suero. Se medirá la concentración de la hormona Estradiol y progesterona por radio-inmuno-ensayo (RIA) de doble anticuerpo en el IMBECU-CONICET, usando materiales gentilmente provistos por A. F. Parlow y por el NHPP (National Hormone and Pituitary Prserogram, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance CA). Las hormonas serán radio-iodinadas usando el método de la Cloramina T y purificadas mediante el pasaje por Sephadex G75. Todas las muestras serán medidas por duplicado en el mismo ensayo. Se medirán también las mismas hormonas en tejido ovárico.

4-Ensayos Enzimológicos: Determinación de la actividad enzimática 3 β - hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) - La actividad de la enzima 3 β -HSD, será realizada según la metodología de Kawano T y col, 1988, con pequeñas modificaciones. Los ovarios obtenidos serán homogeneizados en Buffer Tris-HCl 0.1M pH 8, conteniendo EDTA 1Mm. El homogenato se centrifugará a 30.000 rpm en ultracentrífuga Beckman . El sobrenadante se descarta, el pellet resuspendido con Sacarosa 0,25 M y centrifugado a 3000 rpm. El sobrenadante obtenido será utilizado para la medición de la actividad enzimática 3 β -HSD. (buffer Glicina-NaOH, pH 9.4, Albumina Sérica Bovina y NAD+).El Buffer y las muestras serán pre-incubadas por 5 minutos a 37°C. La reacción se iniciará mediante la adición del sustrato de 3 β -HSD, Pregnenolona, a la mezcla de reacción; se resuspenderá y se tomarar lecturas de absorbancia a 340 nm en espectrofotómetro Zeltec, cada 30 segundos, hasta que se estabilice la absorbancia. De cada una de las muestras, se guardan 50 μ l del homogenato para realizar la determinación de la concentración de proteínas totales, mediante el método de Lowry, utilizando Albúmina Sérica Bovina como Standart. Las actividades se expresan en miliunidades/mg de proteína (mU/mg). Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que produce un μ mol de NADH en un minuto a 37°C.

5-Estudios Funcionales- Análisis de mecanismo de acción postulado: Tras la administración de ALLO + Bicuculina (agonista GABAa), se procederá al análisis de los 3 principales objetivos planteados previamente, estudios morfométrico e inmunohistoquímico y endocrinos con el fin de dilucidar si los efectos antes encontrados son revertidos por el antagonista GABAa que

según evidencias previas estaría presente en el ovario.

6- Receptores de membrana: Es bien conocido que el cáncer de mama y el de ovario son altamente agresivos y crecen en respuesta a los esteroides sexuales a pesar de que carecen de expresión de los estrógenos clásica (E2) y receptores de progesterona (P4). Desde P4 componente de la membrana del receptor 1 (PGRM) se expresa en los tumores de cáncer de mama y es conocido para mediar la supervivencia celular P4-inducida, este estudio fue diseñado para determinar la expresión de PGRM en ovarios de ratas tratadas con ALLO en la regulación de la proliferación y la supervivencia de células ováricas in vitro y el crecimiento de tumores in vivo.

7- Medición de neuroesteroides en suero y tejidos: técnica GC masa/masa. Cabe destacar que hemos invertido materiales y mucho tiempo en poner a punto la técnica de HPLC con Columna para esteroides de los niveles del precursor de Progesterona (Pregnenolona, y Allopregnenolona en líquido folicular y en suero y los resultados no han sido satisfactorios, de modo que para este año hemos decidido cambiar a la espectrometría de masa que tiene mas sensibilidad y especificidad.

RESULTADOS ESPERADOS

En base a los resultados obtenidos previamente con el modelo de administración intra cerebro ventricular (inhibición de la receptividad sexual, de la ovulación etc), claramente ligados a un efecto del neuroesteroide sobre el eje hipotálamo-hipófiso-ovarico, en este proyecto esperamos dilucidar el efecto local del esteroide. Se conoce por bibliografía que los esteroides pueden tener una gama muy variada de efectos dependiendo de su dosis y del sitio de acción y del microambiente hormonal. De modo que esperamos encontrar cuál es el efecto directo de Allo sobre la funcionalidad ovárica apuntando a describir su potencialidad farmacológica en tratamientos de patologías ováricas.