

<b>CONVOCATORIA 2015</b> Vigencia: 1/04/17 al 31/03/19	<b>PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO</b>
<b>Título: Efectos del Neuroesteroide Allopregnenolona sobre sobre la morfo-fisiología ovárica. Potencial aplicación en la clínica veterinaria</b>	
<b>Resoluciones de aprobación: 566/17 y 367/18</b>	
<b>Línea/s de Investigación:</b> Neurociencias, Reproducción.	
<b>Directora de Proyecto: Myriam Raquel Laconi</b>	
<b>Dirección de correo electrónico:</b> mlaconi@mendoza-conicet.gov.ar ; mlaconi@yahoo.com	
<b>Integrantes del Equipo de Investigación:</b>	
Laura Pelegrina - Investigadora	
Antonella Cáceres - Becaria diplomada	
Antonio Martinez - Asesor externo	
Fernanda Parborell – Asesora externa	
<b>Carrera/s UMaza a la/s que está asociado el Proyecto:</b> Veterinaria y Bioquímica	
<b>Unidad/es Académica/s UMaza:</b> Cátedra de Tutoría científica	
<b>Proyecto Interinstitucional con IMBECU CONICET.</b>	
<b>Laboratorio de Fisiopatología ovárica y neurobiología (IMBECU).</b>	

- **DESARROLLO DEL PROYECTO**

**RESUMEN**

Los esteroides sintetizados y metabolizados en el sistema nervioso central (SNC) se denominan neuroesteroides. Allopregnenolona (ALLO) es el principal metabolito activo de progesterona (Pg) y presenta múltiples propiedades a nivel del SNC tales como la reducción de la ansiedad, potencia la memoria y el aprendizaje y otros efectos neuroprotectores. Los neuroesteroides (ALLO y Pg) son benéficos en enfermedades neurodegenerativas y sobre parámetros de la conducta que subyace a síndromes como el pre menstrual y el post menopáusico. Los esteroides gonadales son factores críticos para la supervivencia, neurotrofismo y neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas del cuerpo estriado, las que se degeneran en la enfermedad del Parkinson. También ha sido demostrada la producción de este neuroesteroide en ovarios. En estudios previos demostramos que ALLO intracerebroventricular (i.c.v.) indujo cambios en la dinámica del sistema dopaminérgico hipotalámico mediante un mecanismo no-genómico, interactuando a nivel de diferentes sistemas de neurotransmisión como Dopamina, GABA y NMDA, y en forma genómica determinada por la activación de receptores intracelulares a esteroides ováricos. Este fenómeno es de importancia en la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal que regula la reproducción por su acción sobre PRL, entre otras. Los neuroesteroides varían durante el ciclo estral, la preñez y en situaciones de estrés. Previamente probamos que ALLO, icv y en dosis sub-máximas de stress (6uM) ejerce efectos sobre parámetros de la reproducción. Encontramos que ALLO (6uM) inhibió la secreción de hormona luteinizante (LH), la ovulación y la receptividad sexual, además, indujo un aumento de los niveles de Pg y prolactina. A nivel central se conoce que ejerce sus efectos a través del receptor GABA, pero en el ovario aún se desconocen los mecanismos. Hipotetizamos que el efecto de ALLO podría extenderse hacia la morfo-fisiología ovárica. Determinamos, entonces, con la misma dosis los efectos de ALLO i.c.v. sobre el proceso de regresión lútea, la concentración de Pg ovárica y sérica, el proceso de apoptosis en folículos y la morfometría de las distintas estructuras ováricas junto con la evaluación de la proliferación celular en folículos ováricos, y angiogénesis en cuerpos lúteos.

## DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

### Objetivos generales:

- Evaluar el efecto de la administración de ALLO intrabursa a las 24 y 120 h (2 estros consecutivos) 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 modelo experimental de administración vía intra-bursa ovárica (5  $\mu$ l/ovario). Se probarán 5 puntos comenzando por la dosis farmacológica de 6000nM (6  $\mu$ M), 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:
  - 1-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.
  - 2-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 ( $\alpha$ -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.
  - 3-Estudios Endócrinos: Mediante Radioinmunoanálisis determinar las concentraciones de hormonas en suero y en muestras de tejido ovárico. El día del sacrificio, se colectará

la sangre troncal de los animales (24 y 120 h posteriores a la administración de los neuroesteroides. Las muestras de suero se conservarán a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de Es y Pg.

4-Estudios Enzimológicos: Medir en tejido ovárico la actividad de la enzima  $3\beta$ -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  $3\beta$ -HSD y la  $20\alpha$ -HSD con el modelo i.c.v. en HMB y ovario.

5- 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.

6- Determinar si la acción de Allo en el ovario es mediada por la activación de los receptores de membrana de progesterona.

7- Medir los niveles de pregnenolona, progesterona y ALLO por la técnica de HPLC en líquido folicular y en suero de ratas.

## RESULTADOS ESPERADOS

Se propone a Allopregnanolona como un esteroide modulador de la función reproductiva de la hembra, pudiendo tener efectos nocivos en dosis altas (situaciones de stress) o efectos protectores de la funcionalidad celular ovárica en dosis fisiológicas.