Demostración de la actividad esteroidogénica de las células de granulosa bovinas in vitro mediante la utilización del DELFIA

Ruth Sánchez de Estrada*; Jesús Alfredo Berdugo Gutiérrez, Diana Patricia Acosta Cuervo.**

RESUMEN: La unidad básica funcional del ovario es el folículo, este consiste en una capa externa de células las de la teca, y una interna, las células de granulosa. Para determinar la funcionalidad de las células de granulosa invitro, se midió la producción de 17-beta estradiol utilizando el DELFIA. Se hicieron cultivos de 25 ovarios, puncionando folículos entre 3 y 5 mm de diámetro. Se pudo establecer cultivo y demostrar la producción de 17b-estradiol en el material recuperado de todos los ovarios. Se obtuvieron entre 9.200 y 160.000 células viables/ml. Los niveles de estradiol variaron entre 89.9 pg/ml y 6.665 pg/ml. Se demostró que la producción de 17-beta estradiol es dependiente de la cantidad de células cultivadas ($p < 0.001$). Se demostró la actividad esterioidogénica de las células de granulosa bovinas in vitro y se confirmó la utilidad del DELFIA para la determinación de los niveles hormonales.

PALABRAS CLAVES:Células de la granulosa bovina, B estradiol DELFIA.

SUMMARY: The functional unit of the ovary is the follicle. It consists of an outer layer teca cells and an inner layer of granulosa cells. In order to asses the functionability of the granulosa cells in vitro, the production of 17-beta estradiol was measured using DELFIA. 25 cultures from equal number of ovaries were done. The granulosa cells were obtained from follicles, between 3 and 5 mm of diameter. The range of viable cells obtained per ovary was 9.200 to 160.000 cells/ml. The production of 17-beta estradiol of each culture was between 89.9 and 6.655 pg/ml. The relationship between viable cell concentration and 17- beta estradiol production was demostrated ($p < 0.001$).

KEY WORDS: Shepp Granulosa cells, Beta estradiol DELFIA.

Introducción

Una de las consideraciones más importantes en el éxito del cultivo de células in vitro es que estas mantengan su funcionalidad, esto es, que las células puedan comportarse de una forma similar a como lo hacen in vivo.

Se sabe que la unidad básica del ovario es el folículo, éste consiste en una capa externa de células, las células de la teca , y una capa interna de células, las células de la granulosa. Algunas células de la granulosa también rodean el oocito y forman el complejo oocito-cumulus. En respuesta a la producción cíclica de gonadotropinas, las diferentes células del folículo interactuan de una manera integral para producir esteroides sexuales (estrógenos y progesterona) y un oocito maduro (1).

Desde hace algunos años se ha demostrado la capacidad esteroidogénica de las células de granulosa in vitro y esta característica ha sido base de los experimentos en los que se demostró el papel del cAMP como segundo mensajero en la actividad de las hormonas gonadotrópicas (2,3), el papel de las uniones entre las células de granulosa en la maduración del oocito (4.5) y el efecto de las gonadotropinas sobre las mismas.

El 17b estradiol (Estra - 1,3,5, (10) - triene 3, 17b-diol) es una hormona esteroidea producida principalmente por el folículo de Graff en el ovario de la hembra y en pequeñas cantidades por los testículos en el macho. En las hembras no gestantes hay una variación cíclica, siendo el pico el día anterior a la ovulación. (7,8). El mecanismo de feed-back positivo es considerado esencial para la ocurrencia del pico preovulatorio de la hormona luteinizante para desencadenar la ovulación (9). Durante la gestación las concentraciones séricas de 17b estradiol se incrementan considerablemente.

Los métodos de determinación hormonal han sido utilizados ampliamente tanto in vivo como in vitro, entre ellos podemos mencionar el radioinmuno ensayo (RIA), análisis inmunoenzimático (ELISA) , Irma (Inmuno radiometric assay), y análisis fluorométricos (DELFIA).

El DELFIA* es un fluroinmunoanálisis en fase sólida, basado en la competitividad entre una hormona marcada con europio y una muestra por un anticuerpo policlonal. Utiliza una fase sólida por consiguiente solo necesita un procedimiento único de incubación.

El objetivo del presente trabajo fue demostrar los estudios preliminares tendientes a desarrollar la técnica del cultivo de células de granulosa bovinas in vitro utilizando como marcador de funcionalidad de la célula el 17b estradiol.

* Laboratorio de Endocrinología Instituto Materno Infantil

** Instructor Asistente. Facultad de Medicina Veterinaria. Sección Genética. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.

* DELFIA es una marca registrada de Wallas Co.

Materiales y Métodos

Para el presente trabajo fueron utilizados 25 ovarios de hembras bovinas, sacrificados en el frigorífico San Martín y en la Planta de Sacrificio del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), de la Universidad Nacional de Colombia, en la ciudad de Bogotá. El tiempo transcurrido entre el sacrificio del animal y la recuperación de los ovarios no fue mayor de 20 minutos. 14 ovarios provenían de hembras no gestantes y 14 de hembras gestantes, en este caso se escogió el ovario contralateral al cuerpo lúteo de gestación. Los ovarios fueron llevados al laboratorio en frascos con solución salina bufferada (PBS) sin tener precauciones de temperatura (10).

Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados con PBS y se les retiró la mayor cantidad de sangre posible. Se puncionaron los folículos existentes en cada ovario que medían entre 2 y 5 mm de diámetro (la medida se realizó utilizando una regla), debido a que las células de los folículos de este diámetro poseen una mayor actividad aromatasa y por tanto una mayor actividad proliferactiva.

La punción se realizó con una aguja calibre 18 adherida a una jeringa de 1cc, el líquido folicular (LF) aspirado de cada ovario fue centrifugado y el pellet que contenía las células de granulosa resuspendido en 1 ml de Medio RPMI 1640 (Grand Island Biological Co.), suplementado con 20% de suero fetal bovino (12).

Se hicieron las determinaciones de concentración, utilizando el método de hemocitómetro, y de viabilidad celular, utilizando el test de eosina.

Posteriormente se sembró el contenido celular obtenido de cada ovario en cajas de 24 pozos (Falcon Petri Dishes 2004), y se llevaron a incubación durante 48 horas en una estufa con 5% de CO_2 en aire y 37°C de temperatura.

Se reemplazó el medio por medio fresco cada 24 horas, con el fin de determinar la producción de 17beta-estradiol. Los sobrenadantes fueron congelados y enviados al laboratorio de endocrinología del Instituto Materno Infantil en la ciudad de Bogotá, para las determinaciones hormonales utilizando el DELFIA

Para tratar de establecer si existe alguna relación entre el número de células sembradas, la vitalidad y la producción de 17beta estradiol, se tomaron 300 pg/ml (nivel de estradiol de una mujer normal en período periovulatorio) como límite para hacer dos grupos que fueron comparados utilizando el método de la t de Student.

Para la determinación hormonal, se tomaron 50ul de los patrones, sueros control y muestras, colocando cada muestra con su diluyente en el micropozo correspondiente.

Cada micropozo va recubierto con el segundo antisuero, anti Ig G de Conejo. A cada pozo se le agregan 100 ul del trazador (estradiol marcado con Europio) en un buffer ácido y 100 ul de anticuerpo antiestradiol en la misma solución buffer. Se deja incubar por 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave, se lavan los pozos y se agregan 200 ul de una solución amplificadora de la reacción, cuya función es disociar los iones europio del estradiol marcado para así formar quelatos altamente fluorecentes. Hay que tener en cuenta que la fluorecencia producida por este método es altamente estable y que el ensayo es muy sensible. El límite de detección es de 2 pmol/1, el coeficiente de variación interensayo es del 4.7% e intraensayo 6.1%.

Se deja incubando a temperatura ambiente por 5 minutos y se hace las mediciones. Las mediciones fueron hechas en un fluorometro de resolución en el tiempo, LKB 1300 ARgus, especialmente diseñado (14, 15).

Resultados

Se pudieron establecer cultivos y hacer determinaciones hormonales en el material obtenido de todos los ovarios. De los folículos aspirados por ovario se obtuvo 0,46 ml de LF en promedio, con variaciones entre 0,1 y 1,2 ml dependiendo del número de folículos aspirados por ovario.

De cada ovario se recuperaron entre 9.200 y 160.000 células/ml. La vitalidad varió entre el 10% y el 50%. Hay que anotar que las diferencias en la vitalidad hicieron variar el número de células viables por pozo que se sembraron. Aún en aquellos pozos donde la cantidad de células viables sembradas por pozo fue menor se demostró la actividad esteroidogénica de las mismas. En la tabla 1 se puede observar la cantidad de células sembradas, la vitalidad y la producción de 17beta estradiol de las células obtenidas de cada ovario en el experimento.

Tabla 1
PRODUCCION DE 17B ESTRADIOL POR CELULAS DE GRANULOSA IN VITRO

Pozo R	Vitalidad %	Células sembradas	Producción de 17b estradiol pg/ml
1	50	200.000	1.303,3
2	50	380.000	2.361,3
3	20	150.000	220,9
4	20	80.000	438,0
5	40	240.000	4.218,0
6	40	400.000	6.655,8
7	40	250.000	3.659,1
8	30	380.000	2.006,8
9	30	380.000	4.308,0
10	10	98.000	291,0
11	30	108.000	209,9
12	30	106.000	1.881,4
13	10	112.000	608,4
14	10	92.000	122,7
15	10	110.000	147,2
16	10	130.000	190,9
17	10	140.000	1.336,0
18	20	92.000	89,9
19	20	3.400.000	1.117,9
20	30	860.000	730,7
21	20	64.000	463,5
22	30	94.000	2.391,2
23	10	120.000	561,7
24	40	250.000	870,5
25	20	140.000	312,8

Se pudo establecer una relación directa entre la cantidad de células viables sembradas y la producción de estradiol ($p < 0.001$).

Las células sembradas se adhieren a las cajas de petri entre 10 y 12 horas después de iniciado el cultivo y profileran rápidamente hasta formar monocapas después de 4 a 6 días de cultivo.

Para las determinaciones hormonales se recuperó en promedio 0,7 ml de los cuales se utilizaron en las mediciones 100 ul.

Discusión

De los datos obtenidos se desmuestra que las células de granulosa bovinas obtenidas a partir de hembras de matadero, son capaces de producir niveles detectables por DELFIA, de 17beta estradiol in vitro.

La alta estabilidad y la larga vida de la fluorescencia del europio como trazador permite leer la prueba varios días después de realizado el ensayo como consecuencia se puede leer la prueba después que se ha eliminado la fluorescencia de fondo.

Al establecer los cultivos se pudo determinar que las células pueden producir estradiol hasta por 48 horas aunque los niveles caen drásticamente después de las 24 horas de cultivo (datos no publicados). Esta situación puede deberse a una falta de andrógenos para aromatizar por parte de las células de granulosa (11) o a un cambio en las rutas metabólicas, de forma que pueden existir otros esteroides en los sobrenadantes que no fueron medidos. Se ha demostrado que las células de granulosa bovinas producen in vitro andrógenos y pregnenolona (12).

Se demuestra una relación directa entre la concentración célular sembrada y la producción de 17beta estradiol. Se obtuvo suficiente material del sobrenantes como para realizar 3 ó 4 determinaciones hormonales.

El medio RPMI 1640 suplementado con 20% de SBF es capaz de mantener el crecimiento activo de las células de granulosa bovinas in vitro aún en períodos superiores a las 48 horas, evidenciado por la formación de monocaás después de 4 a 6 días en cultivo. Las células se adhieren a las cajas de cultivo y toman una forma elongada fibroblastoide, recuperando su forma redondeada inicial después de tripsinizar los cultivos.

Es un problema en el establecimiento de los cultivos la contaminación con sangre, pues aunque no se demostró ningún efecto de la contaminación de eritrocitos, sobre la producción de 17 beta estradiol, en los sitios donde existen las células de granulosa no crecen, en las cajas de petri se observa que las células adheridas al plato se abren camino por entre los eritrocitos. Aunque se hagan lavados de los ovarios las muestras de LF se contaminan con eritrocitos, se piensa en utilizar ficoll o sistemas de lisis para tratar de dejar los cultivos libres de los mismos. En el LF obtenido vienen suficientes células para establecer cultivos. Es variable la calidad de las mismas, aunque determinar el por qué se sale de los objetivos de este trabajo, reconocemos que al utilizar folículos de este diámetro (2 - 5mm) no es posible macroscópicamente determinar si son atrésicos o si son folículos creciendo en una onda folicular (13).

Para tener más homogenidad podrían utilizarse los folículos existentes en los ovarios de hembras en un día específico del ciclo, de estos se podría inferir la funcionalidad de los mismos estimando el tamaño del mismo.

Este trabajo deja abierta la posibilidad de cultivar células de granulosa humana (experimentos iniciales en curso), basados en los conocimientos adquiridos en esta experiencia. Además, válida la utilización del DELFIA como método de determinación hormonal.

Agradecimientos al Doctor Fernando Escobar del Frigorífico San Martín, y a los Doctores Guillermo Quiroga y Luis Echeverry de la planta de carnes del ICTA por su colaboración en el suministro del material biológico para los experimentos.

BIBLIOGRAFIA

1. Hsueh, et al AJW, Jones, P., Adashi, E., Wang, C.,Zhuang, L.,Wlesh, TJr. Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rats. J. Reprod. Fert. 1983; 69: 325-342.
2. Bornslaeger, E., Schultz, RM. Regulation of mouse oocyte maturation: Effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. Biol Reprod. 1985; 33: 698-704.
3. Sirard, M. , First, N. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. Biol Reprod. 1988; 39: 229-234.
4. Colonna, C., Magnia, F. Mechanisms of aminoacid uptake in cumulus inclosed mouse oocytes. Biol. Reprod. 1983; 28: 797-803.
5. Ball, GD, Wieben, ED, Byers, A. DNA, RNA and protein synthesis by porcine oocyte cumulus complexes during expansion. Biol Reprod. 1985; 33: 739-744.
6. Baird, DT. Ovarian steroid secretion and metabolism in women. In The endocrine function of the human ovary. Eds V.H.T. James, Serio, M. Guisti, G. Academic Press. London. 1976; 125-133
7. Abraham, G, Odell, W, Swerdloff, R. Hopper K. Simultaneous radioinmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxiprogesterone and estradiol 17b levels during menstrual cycle. J. Clin. End. Metab. 1972; 34:312-318.
8. Punnonen, R, Nummi, S, Ylikorkala, O, Alapiessa, U, Karvonen, P, Viinikka, L. A composite picture of the normal menstrual cycle. Acta. Obstet. Gynecol. Scand. Suppl. 1975; 51:63 -70.
9. Jaffe, R. (1974) Regulation of the menstrual cycle. In Physiology and Genetics of Reproduction, Part A. Eds. E. M. Coutihno and Fuchs F. Plenum Press New York, 371-383.
10. Sato, E, Kawamura, N, Ishibashi, T. Chemical influencing maturation, activation and degeneration of bavine oocytes in culture. J. Dairy Sci. 1988; 71(12): 3482-3488.
11. Dorrington, J, Moor, Y, Armstrong, D. Estradiol 17 beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle stimulant hormone. Endocrinol. 1975; 97: 1328-1331.
12. Fortune, J. E. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. Biol. Reprod. 1986; 35: 292-299.
13. McNatty, K, Gibb, M, Dobson, C, Ball, K, Custer, J, Heath, D, Thurley, D. Preovulatory follicular development in sheep treated with PMSG and/or prostaglandin. J. Anim. Sci. 1982; 56 (2): 305 - 307.
14. Sioni, E. and Kojola, H. Time resolved fluorometer for lanthanide chelates a new generation of non isotopic immunoassays. Clin. chem. 1983; 29: 65-68.
15. Hemmilä, I, Dakubu, S, Mukkala, V, Siitiari, H, Lövgren T. Europium as a label in time-resolved immnuofluorometric assays. Anal. Biochem. 1984; 137: 335-343.