

Artículo de investigación

PRESENCIA DE LA ENZIMA GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA EN CUERPO LÚTEO BOVINO.

Presence of Glutathione-S-transferase enzyme in bovine luteal body.

Márquez AA^{1,2}; Aranguren-Parra AJ^{1,3}; Salas YJ^{1,4}; Márquez YC^{*1,2}; López-Ortega AA^{1,3}.

1. Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales "Dr. Haity Moussatche" 2. Área de Fisiología Veterinaria; 3. Área de Biología Celular y Molecular; 4. Área de Patología Veterinaria del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA). Barquisimeto-Venezuela. Telefono: 0251-2592630. e-mail: isabelmarquez@ucla.edu.ve

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue identificar la presencia de la enzima Glutación-S-transferasa (GST) con la técnica de inmunofluorescencia directa en cuerpos lúteos (CL) maduros y en regresión de bovinos lecheros. Para lo cual se muestrearon, 133 CL de vacas Holstein, adultas no preñadas, y con dos o más lactancias, de una explotación comercial ubicada en el municipio Jiménez estado Lara en Venezuela, sacrificadas en dos mataderos industriales. Una vez obtenidos los ovarios fueron trasladados en una solución buffer fosfato salina a una temperatura de 4 a 8 °C hasta la Unidad de Investigación "Dr Haity Moussatche" del Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA (DCV-UCLA). Fueron clasificados y luego se obtuvieron cortes de 5 micras donde se determinó en cada muestra, la presencia de la enzima GST los cuales se incubaron con el anticuerpo GST diluido. Para el análisis de los resultados se aplicó estadística descriptiva. Se observó que en los CL maduros el 71,25% presentó un alto contenido de gránulos fluorescentes (presencia de la enzima) mientras que el 28,75% restante presentó moderado contenido. Por su parte en los CL en regresión se evidenció escasa cantidad de gránulos verdes fluorescentes lo que indica poca expresión de la enzima. Se concluye que en los CL maduros hay una alta expresión de enzima GST, lo cual indica un importante mecanismo de defensa celular, porque ya se conoce que en la fase de madurez del CL el proceso de peroxidación lipídica luteal se encuentra incrementado.

Palabras clave: Glutación-S-transferasa, cuerpo lúteo bovino, inmunofluorescencia, Holstein.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to identify the presence of enzyme Glutathion-S-transferase with direct immunofluorescence technique in mature luteal bodies (LC) and in regression of dairy cattle. For this purpose, 133 CL of Holstein cows, non-pregnant adults, and two or more lactations were sampled from a commercial farm located in the municipality of Jiménez, Lara State, Venezuela, slaughtered in two industrial slaughterhouses, once obtained the ovaries were transferred in a phosphate buffered saline solution at a temperature of 4 to 8 °C to "Dr Haity Moussatche" Research Unit Laboratory of the Veterinary Sciences Dean of UCLA (DVS-UCLA) To be assayed, 5 µm slices were subsequently taken where the presence of GST enzyme was determined in each sample and incubated with diluted GST antibody. Descriptive statistics were applied for results analysis. It was observed that in the mature LC, 71.25% had a high content of fluorescent granules (presence of the enzyme) while the remaining 28.75% presented moderate content. On the other hand the LC in regression showed little amount of fluorescent green granules indicating little expression of the enzyme.

Key words: Glutathione-S-transferase, bovine corpus luteum, immunofluorescence, Holstein.

Recibido: 20-03-2017

Aceptado: 23-04-2017

INTRODUCCIÓN

Las reacciones de biosíntesis de hormonas esteroideas están acompañadas de la formación de radicales de oxígeno en la mitocondria, proceso que ocurre continuamente en el cuerpo luteo (CL) durante la síntesis de progesterona (P4); estos tejidos esteroideogénicos también contienen altos niveles de antioxidantes, tales como ascorbato, α -tocoferol, β -caroteno y las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutathion peroxidasa (GPx), glutathion-S-transferasa y glutathion reductasa. La función de estos antioxidantes es la protección del tejido contra radicales del oxígeno producidos durante dicha esteroideogénesis [1, 2].

La involución del CL ha sido relacionada con un aumento en la generación de formas reactivas del oxígeno, tales como el radical superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por el ovario intacto [3]. El radical superóxido, se genera de forma continua, como resultado de la actividad metabólica normal, en la mitocondria. Este oxi-radical en el caso de la rata durante la luteólisis es producido por la membrana plasmática de células luteales [4]. El H_2O_2 por su parte es generado en el CL en la fase de regresión luteal [5] y en células luteales de rata se produce rápidos efectos antigonaotrópicos. Sin embargo, los mecanismos por medio de los cuales interrumpe la síntesis de progesterona son poco conocidos. En estudios realizados por Musicki [6] los autores concluyeron que el H_2O_2 puede inhibir tanto la síntesis de ARNm, o incrementar la degradación de mismo lo que perjudica su eficiencia. El período de tiempo para que el H_2O_2 pueda causar los efectos inhibitorios sobre la síntesis de proteínas y ARNm es muy rápido y coincide con la inhibición de la esteroideogénesis

Las especies reactivas del Oxígeno (ERO) como el radical O_2^- son eliminados mediante la acción de la enzima SOD la cual forma H_2O_2 , y éste es convertido a H_2O por acción de la GPx o de la catalasa [7, 8]. Además, la actividad de estas dos enzimas, en el CL cambia de forma similar a las concentraciones de P4 plasmática durante la preñez, lo que sugiere un papel importante de éstas en la regulación de la función luteal, de acuerdo a resultados obtenidos en ratas [9].

En el CL bovino existe un complejo patrón de regulación relacionado a la función de enzimas y compuestos antioxidantes, que son un elemento clave para la producción de P4. La correlación de los niveles de algunos de ellos con la esteroideogénesis indicaría que los mecanismos de defensa antioxidante se activarían al instalarse el estado de estrés oxidativo celular que va asociado a la síntesis de hormonas esteroideas [10; 11].

En este contexto la Glutathion-S-transferasa (GST) forma parte de una familia de isoenzimas metabólicas presente tanto en células eucariotas como en

procariotas, son enzimas principales en la desintoxicación enzimática y se encuentran principalmente en el citosol. Además de su papel en la catalización de la conjugación de sustratos electrofílicos a glutathion, estas enzimas también llevan a cabo una serie de funciones en las células [12, 13], tales como la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la regeneración de proteínas S-tioladas (ambas consecuencias del estrés oxidativo). Otra de las funciones de esta enzima sería la catálisis de conjugaciones con ligandos endógenos y la catálisis de reacciones en vías metabólicas no asociadas con la desintoxicación. Además, protegen a las células de la lipoperoxidación de membrana inducida por las ERO [14].

Al-Gubory et al. [15] indican que en la reproducción las enzimas GST pueden estar ligadas a las ERO generadas continuamente en las células luteales esteroideogénicamente activas, y pueden estar implicadas en el mantenimiento de la actividad esteroideogénica y en la integridad celular luteal también se han asociado como un posible indicador de envejecimiento de las células de la granulosa y ovocitos [16]. Por otra parte, en el fluido folicular de ovocitos envejecidos en humanos, se ha observado disminución de la expresión y actividad de las enzimas glutathion transferasa y catalasa [17].

Hay métodos que hacen posible detectar la ubicación de la SOD dentro de la célula, tal es el caso de inmunofluorescencia [18, 19, 20]. Márquez et al. [21] identificaron la presencia de enzima CuZn-SOD por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cuerpo lúteo bovino. Estos resultados establecieron que ésta se ubica en el citoplasma de las células del CL maduro y en menor grado en células del CL en regresión. Sobre la base de estos antecedentes se planteó como objetivo identificar la presencia de la enzima Glutathion-S-transferasa a través de la técnica de inmunofluorescencia directa en CL maduros y en regresión, de bovinos lecheros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En total fueron analizados 133 cuerpos lúteos obtenidos de 133 vacas (*Bos taurus*) lecheras y como criterios de selección se estableció que sólo pertenecerían a la muestra vacas mestizas Holstein adultas no preñadas, con condición corporal 2,5 a 3,5 según la escala de Pullman [22], con dos o más lactancias, los animales provenían de una explotación lechera comercial ubicada en el Municipio Jiménez Estado Lara, durante el primer semestre del año.

Se realizó un muestreo dirigido, un día antes de ser enviada las vacas al matadero, en la finca se les determinó la presencia de cuerpo lúteo por palpación

transrectal y de acuerdo a los criterios de selección, antes mencionados, fueron escogidas las unidades experimentales. Inmediatamente después del sacrificio en el área de vísceras del matadero se procedió a separar los ovarios y colocarlos en una solución buffer fosfato salina (PBS) 0,1 M pH 7,6 para luego ser trasladados en una cava a una temperatura de 4 °C, a la Unidad de Investigación “Dr. Haity Moussatché” (UNIHM) del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (DCV-UCLA), para su procesamiento. En la UNIHM se clasificaron en cuerpos lúteos maduros y en regresión, para lo cual se tomó como referencia los criterios descritos por Márquez [23]. Los CL fueron fijados en formol buferado al 10% y trasladados al Laboratorio de Diagnóstico del Área de Patología del Hospital Veterinario “Dr. Humberto Ramírez Daza” del DCV-UCLA, donde se procedió a cortarlos en fragmentos de aproximadamente 1 x 0,5 x 0,5 cm y colocados en un procesador automatizado de tejidos (CitadelR 2000) por un período de 18 horas [24]. Posteriormente se prepararon los bloques de parafina de cada CL [25], a partir de los cuales, mediante el uso del micrótopo marca Jung AG (Heidelberg, Alemania), se realizaron 2 cortes de 5 micras, uno para realizar el estudio histopatológico y otro para la identificación de la Glutination-S-transferasa.

Identificación de la enzima Glutación-S-transferasa (GST) mediante inmunofluorescencia directa (IFD)

Los cortes sobre láminas portaobjeto, se desparafinaron y se realizó 3 lavados en solución buferada fosfatada (PBS) a 4°C, luego se permeabilizó la membrana con Tritón 0,1% durante 5 minutos en hielo y nuevamente se procedió a lavar 3 veces en PBS durante 5 minutos cada lavado. Posteriormente se incubó con pepsina 4 mg/ml en HCL 0,01 N por 10 minutos en hielo, se lavó y se bloqueó con albúmina sérica bovina al 3% por 30 min a 37°C.

Para determinar la presencia de la enzima, se incubaron las muestras con el anticuerpo GST (B-14) FITC (Santa Cruz Biotchnology) diluido PBS 1:200 (dilución previamente estandarizada), y se dejó reposar durante 30 min a 37°C. La muestra utilizada como control negativo no fue incubada con albúmina sérica bovina al 3%. Finalmente, cada muestra se le agregó el medio de montaje para fluorescencia y se protegió con cubreobjeto para ser observadas en el microscopio de fluorescencia Lieder (ME-600 Series Microscopes, American Scientific, Portland, OR, USA).

Análisis Estadístico

Para analizar los resultados se realizó distribución de frecuencia empleando el paquete estadístico SPSS 10.0 para Windows.

RESULTADOS

Cuerpo lúteo maduro

La técnica de Inmunofluorescencia directa que se aplicó en todos los cortes histológicos de los CL maduros, mostró la presencia de abundantes gránulos fluorescentes homogéneos de variado tamaño distribuidos de forma multifocal e intracitoplasmáticos en las células luteales grandes, de igual forma el tejido de fondo no presentó fluorescencia (Figura 1A). En la Figura 2 se compara la presencia en mayor o menor grado de los gránulos fluorescentes, se obtuvo que 57 de los cuerpos lúteos maduros (71,25%) presentaron cualitativamente un alto contenido de gránulos fluorescentes, mientras que 22 de ellos (27,5%) presentó moderado contenido y sólo 1 (1,25%) su contenido fue leve.

Cuerpo lúteo en regresión

En lo que respecta a los cortes histológicos del total de los CL en regresión se observó al microscopio de fluorescencia, pequeños gránulos verdes fluorescentes homogéneos, contenidos en el citoplasma de las células luteales y distribuidos multifocalmente en escasa cantidad (Figuras 1B y 1C), lo que indica poca expresión de la enzima GST en el citoplasma de las células del cuerpo lúteo en regresión. En la Figura 3 se compara la presencia en mayor o menor grado de los gránulos de fluorescencia, se observa que 38 de los CL en regresión (71,69%) presentaron cualitativamente un leve contenido de gránulos fluorescentes, mientras que los restantes 15 CL (28,3%) presentaron moderado contenido de gránulos fluorescentes.

La eficiencia de la técnica se confirmó al comparar todos los resultados con el control negativo, Figura 1D en el cual se aprecia la ausencia de gránulos fluorescentes definidos.

DISCUSIÓN

La formación, desarrollo y regresión del CL involucran mecanismos que resultan complejos y variados en diferentes especies de mamíferos. Se ha demostrado que en las células del CL maduro del bovino existe una alta demanda metabólica, lo cual produce un gran consumo de sustratos de oxígeno y energía, con la consecuencia de una alta producción de ERO [23]. Estas especies reactivas del O₂ en CL se generan a través de vías enzimáticas del citocromo P450 mitocondrial [26] y su producción debe estar controlada por los sistemas antioxidantes, los cuales son uno de los elementos centrales, en los mecanismos involucrados en la función, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular [27]. Es por ello que

Glutation-S-transferasa en cuerpo lúteo.

las enzimas antioxidantes que controlan las ERO, juegan un papel importante en el rescate del CL de la luteólisis de la gestación, en varias especies de mamíferos [11]. Los resultados de esta investigación muestran que la presencia de la enzima GST es mayor en las células de los CL maduros cuando se comparan con las células de los cuerpos lúteos en regresión, esto coincide con lo reportado por algunos investigadores que observaron un incremento en la actividad de esta enzima en las células de CL de ovejas posiblemente implicadas en el mantenimiento de la actividad

esteroidogénica y la integridad celular luteal [15] y el aumento de la expresión de la proteína GSTA1 en CL de ovejas [23]. En otras investigaciones realizadas también en CL bovino, se ha demostrado que la ausencia de GPx, es un potente inductor de la apoptosis de células lúteas [29], este hecho sugiere que las enzimas antioxidantes protegen las células lúteas contra el daño oxidativo inducido por ROS y la apoptosis.

Figura 1. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA EN CUERPO LÚTEO. A. Cuerpo lúteo maduro, presenta numerosas partículas fluorescentes intracitoplasmáticas en células lúteas grandes 100X. B y C. Cuerpo lúteo en regresión, muestra escasas partículas fluorescentes intracitoplasmáticas en células lúteas grandes, 100X. D. Control negativo. Microscopio de fluorescencia 10 X.

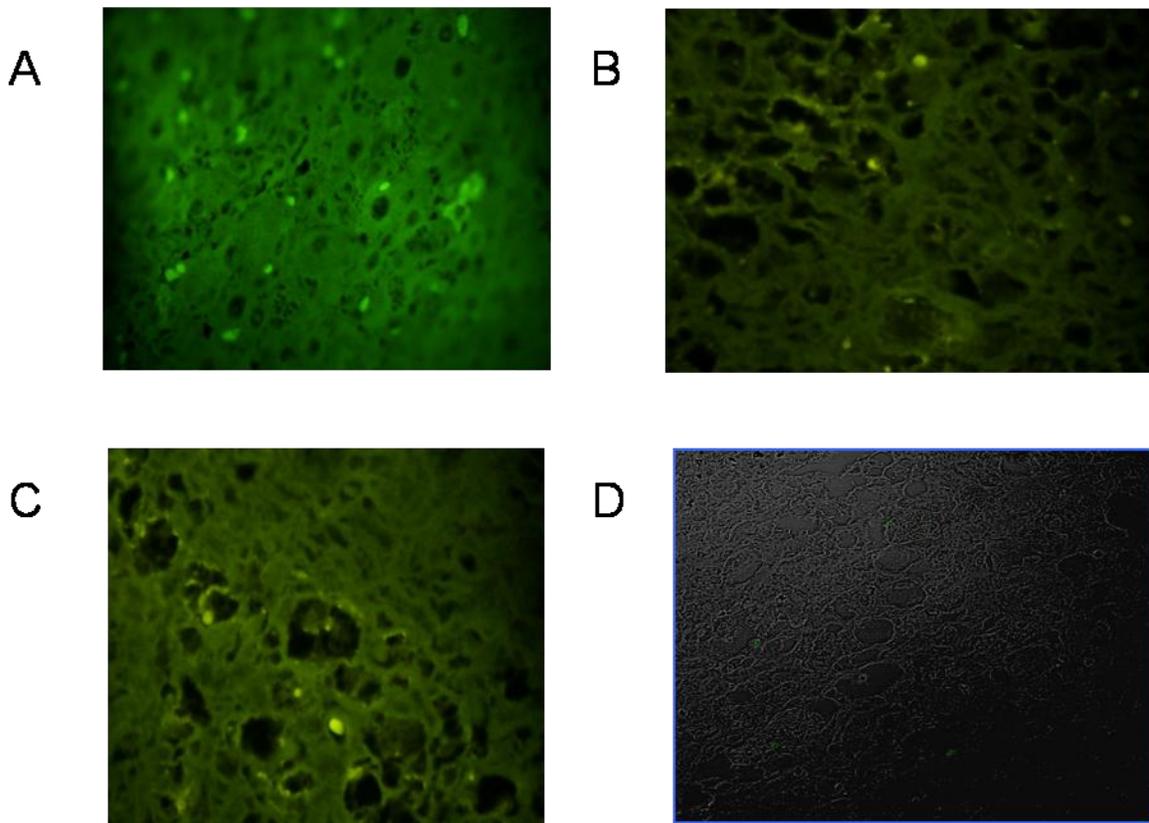


Figura 2. GRADO DE IFD EN CUERPOS LÚTEOS MADUROS

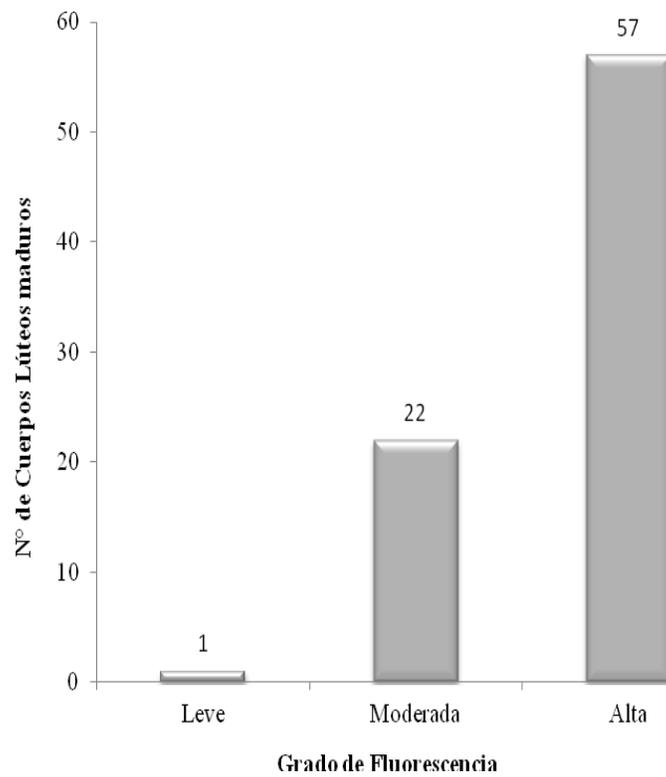
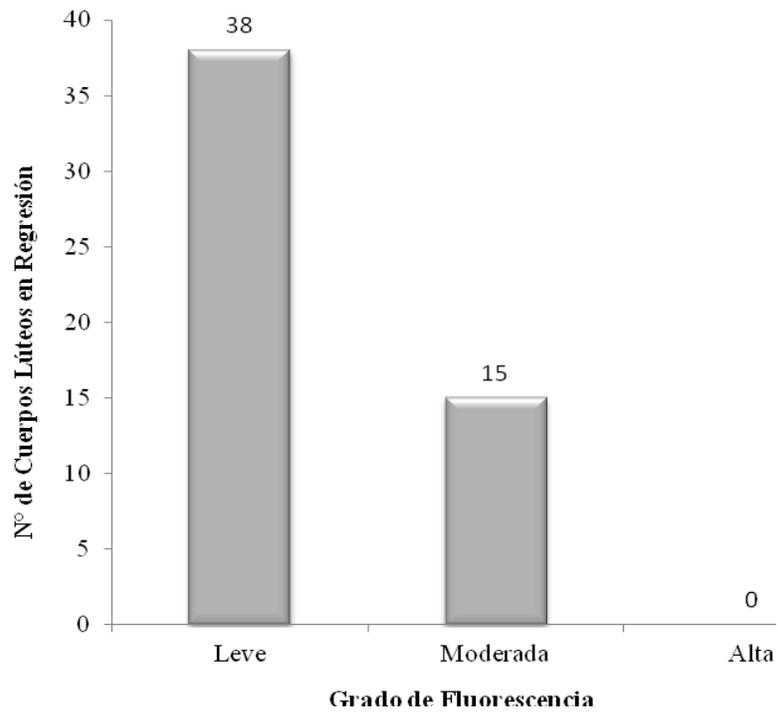


Figura 3. GRADO DE IFD EN CUERPOS LÚTEOS EN REGRESIÓN



CONCLUSIÓN

La presencia de la enzima GST en los cuerpos lúteos maduros, como sistema antioxidante, juega un papel importante en la integridad y la función del CL bovino, ya que es conocido que en la fase de madurez del CL se producen altas cantidades de P4, proceso mediado por el citocromo P-450, lo que genera ROS, esta es la razón por la cual se activa en este momento el complejo de enzimas antioxidantes, ya que esto es lo que asegura que no ocurra involución del CL prematuro, hecho que daría como resultado la presencia de CL subfuncionales con los subsecuentes problemas reproductivos que esto conlleva.

AGRADECIMIENTOS

Al CDCHT de la UCLA por el financiamiento para realizar este estudio (proyecto código 22-VE-2005) y a la Organización El Tunal C.A. por facilitar los animales.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Riley J, Behrman H. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 781-791.

[2] Quinlan CL, Pervoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD: Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol* 2013; 1: 304-312.

[3] Minegishi K, Tanaka M, Nishimura O, Taniyaki S, Miyakoshi K, Ishimoto H, Yoshimura Y. Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F₂α-induced luteolysis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: 1308-1315.

[4] Sawada M, Carlson J. Studies on the mechanism controlling generation of superoxide radical in luteinized rat ovaries during regression. *Endocrinology* 1994; 135 (4): 1645-1250.

[5] Miller J, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen F. Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci* 1993; 76(9): 2812-2823.

[6] Musicki B, Aten R, Behrman H. Inhibition of protein synthesis and hormone-sensitive steroidogenesis in response to hydrogen peroxide in rat luteal cells. *Endocrinology* 1994; 134 (2): 588-595.

[7] Sugino N, Nakamura Y, Takeda O, Ishimatsu M, Kato H. Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 347-351.

[8] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

[9] Sugino N, Kato H. The role of ischemia-reperfusion injuries in generation reactive oxygen

species during luteolysis. *Adv Contracep Deliv Syst* 1994; 10: 95-106.

[10] Rapoport R, Sklan D, Wolfenson D, Shaham-Albalancy A, Hanukoglu I. Antioxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. *Biochim. Biophys Acta* 1998; 1380: 133-140.

[11] Al-Gubory KH, Garrel C, Faure P, Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reproduc BioMed Online* 2012; 25: 551-560.

[12] Udomsinprasert R, Pongjaroenkit S, Wongsantichon J, Oakley AJ, Prapanthadara LA, Wilce MC, Ketterman AJ. Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochem J* 2005; 388: 763-771.

[13] Allocati N, Federici L, Masulli M, Di Ilio C. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS J* 2009; 276 (1): 58-75.

[14] Sheehan D, Meade G, Foley V, Dowd C. Structure, function and evolution of Glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001; 360: 1-16.

[15] Al-Gubory K, Bolifraud P, Germain G, Nicole A, Ceballos-Picot I. Antioxidant enzymatic defence system in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Reprod Res* 2004; 128 (6): 767-774.

[16] Ito M, Muraki M, Takahashi F, Imai M, Tsukui T, Yamakawa N, et al. Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility. *Fertil Steril* 2008; 90 (4): 1026-1035.

[17] Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 639-643.

[18] Suzuki K, Tatsumi H, Satoh S, Senda T, Nakata T, Fujii J, Taniguchi N. Manganese-superoxide dismutase in endothelial cells: Localization and mechanism of induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1993; 265: 1173-1178.

[19] Rueda B, Tilly K, Hansen T, Hoyer P, Tilly J. Expression of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the bovine corpus luteum: evidence supporting a role for oxidative stress in luteolysis. *Endocrine* 1995; 3: 227-232.

[20] Zhong W, Yan T, Lim R, Oberley L. Expression of Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione peroxidase in Glioma cells. *Free Rad. Biol. Med* 1999; 27(12): 1334-1345.

[21] Márquez YC, Márquez A; Fuentes M; Salas Y; López-Ortega A. Estado oxidativo de cuerpos lúteos maduros y regresivos en bovinos. *Rev. Vet* 2011. 22: 1, 25-31.

[22] Pullman N. Condition scoring in Fulani cattle. *Tropical Ani. Health* 1978; 10: 118-120.

[23] Márquez Y. Determinación de los parámetros de peroxidación lipídica en células lúteales de hembras bovinas lecheras. Trabajo de Ascenso. Decanato de Ciencias Veterinarias. UCLA. Venezuela 2001.

[24] Edna P. Procesamiento de Tejidos: Deshidratación, Aclaramiento, e Infiltración. Métodos Histotecnológicos. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) y por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 1995; pp. 31-33.

[25] Bob M. Orientación del Espécimen. Métodos Histotecnológicos. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) y por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 1995; pp. 35-46.

[26] Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 199, 316-331.

[27] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem. Cell Biol* 2007; 39, 44-84.

[28] Arianmanesh M, McIntosh R, Lea RG, Fowler PA, Al-Gubory KH. Ovine corpus luteum proteins, with functions including oxidative stress and lipid metabolism, show complex alterations during implantation. *J Endocrinol* 2011; 210, 47-58.

[29] Nakamura T, Ishigami T, Makino N, Sakamoto K. The downregulation of glutathione peroxidase causes bovine luteal cell apoptosis during structural luteolysis. *J Biochem* 2001; 129, 937-942.