



# INMUNOEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE SHOCK TÉRMICO HSP70 EN TESTÍCULOS DE FETOS OVINOS TRATADOS IN UTERO CON GLUCOCORTICOIDES

## RESUMEN

Bajo condiciones de estrés, existe un aumento en la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) y están vinculadas al desarrollo testicular fetal. Condiciones estresantes también estimulan la producción de hormonas como los glucocorticoides, por lo que testeamos si la administración prenatal de glucocorticoides afecta la expresión de HSP70 en el parénquima testicular fetal de ovinos. Ovejas Merino preñadas (n=12) fueron asignadas al azar para recibir 3 dosis de betametasona (grupo tratado) a los 104, 111 y 118 días de gestación (DG), o solución salina (grupo de control). Los fetos machos fueron sacrificados a los 121 DG y sus testículos fueron fijados y procesados para histología, e inmunohistoquímica. Se cuantificó por análisis de imágenes la inmunoexpresión de HSP70 en el parénquima testicular fetal de animales tratados y controles. La inmunoexpresión de HSP70 aumentó en el grupo tratado con betametasona comparando con el grupo control a los 121 DG ( $8,6 \pm 0,3$  versus  $6,1 \pm 0,3$ ). Hasta donde sabemos esta es la primera descripción de la expresión de HSP70 en testículos de fetos ovinos. Concluimos que los glucocorticoides regulan la expresión de la proteína HSP70 en células testiculares fetales.

## SUMMARY

Under stressful conditions, there is an increase in the expression of heat shock proteins (HSP) and this response is linked to testicular development in the fetus. Stressful conditions also stimulate the production of glucocorticoid hormones, so we tested whether prenatal administration of glucocorticoids affects the expression of HSP70 in the fetal testicular parenchyma of the sheep. Pregnant Merino ewes (n = 12) were randomly allocated to receive 3 doses of saline (control) or betamethasone at 104, 111 and 118 days of gestation (DG). At 121 DG, samples of fetal testis were fixed and processed for histology and evaluation of immunexpression of HSP70 in the testicular parenchyma. There was more immunostaining for HSP70 in treated animals than in controls DG ( $8,6 \pm 0,3$  versus  $6,1 \pm 0,3$ ). To our knowledge this is the first description

of HSP70 expression in fetal sheep testis and it has shown that HSP70 expression is regulated by glucocorticoids. It seems likely that stress during pregnancy would exert similar effects.

## INTRODUCCIÓN

Las proteínas de shock térmico o HSPs, o “proteínas de estrés”, son proteínas altamente conservadas en organismos procariotas y eucariotas (Welch 1992). Las HSPs, son inducidas por el estrés químico y físico, como el shock térmico (Kampinga & Craig 2010) y se expresan constitutivamente en niveles bajos en condiciones fisiológicas normales (Niino et al. 2000). La HSP70 juega un rol importante durante la proliferación celular, en la meiosis y apoptosis de células germinales en ratón. demostró por la presencia de espermatoцитos paquiténicos apoptóticos detenidos en la fase G2/M de la meiosis en ratones knock-out para el gen de Hsp70 (Mori et al. 1997), y carentes de espermátidas y espermatozoides en la edad adulta (Dix et al. 1997). En conejos se ha evaluado en testículos que el estrés por calor aumenta la expresión de la proteína HSP70 (Pei et al. 2012). Por lo tanto el presente estudio buscó determinar los efectos de un modelo de estrés fetal farmacológico, como es la administración de glucocorticoides, sobre la inmunoexpresión de la HSP70 en testículos de fetos ovinos.

## OBJETIVOS

Determinar la expresión de la proteína de shock térmico HSP70 en fetos ovinos a los 121 días de gestación luego de la administración in utero de betametasona.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos y protocolo experimental utilizados fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Departamento de Agricultura de Australia Occidental. Se utilizaron ovejas Merino Australiano preñadas (n = 12) con un único feto, asignadas al azar en dos grupos. El grupo tratado recibió 3 dosis de betametasona intramuscular de 0,5 mg / kg,



y el grupo control recibió suero salino, ambos a los 104, 111 y 118 días de gestación (DG). Las crías machos fueron obtenidas por cesárea y sacrificadas a los 121 DG (n=6 por grupo) para la obtención de sus testículos, que fueron fijados en solución de Bouin durante 12 hs para su posterior procesamiento histológico. Luego obtenidos los cortes histológicos por microtomía a 5  $\mu$ m se realizó la técnica de inmunohistoquímica. Los cortes de testículo fueron incubados con anticuerpo primario monoclonal de ratón anti HSP70 (Invitrogen, clon: MB-H1) a una concentración de 5  $\mu$ g/ml. Luego los cortes fueron incubados con anticuerpo secundario biotinilado goat anti mouse IgG (Kit ab64259, abcam, USA) Se reveló con diaminobencidina (DAB) y se contra coloreó con hematoxilina de Mayer. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital conectada a microscopio (Premiere Profesional binocular, Model MRP-5000, Manassas, USA). Se midió el porcentaje de área inmunomarcada para la HSP70 en parénquima testicular a 400 aumentos, con el programa (ImageJ). El área marcada de HSP70 se calcula como un porcentaje mediante el análisis de segmentación de color, extrayéndose todos los objetos de un color específico (marrón). Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media. Las medias de los grupos se compararon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA)  $p < 0,05$  con Statgraphics Plus<sup>®</sup> 5.1 (Statistical gráfico Corp, Rockville, Maryland, EE.UU., 1994-2000).

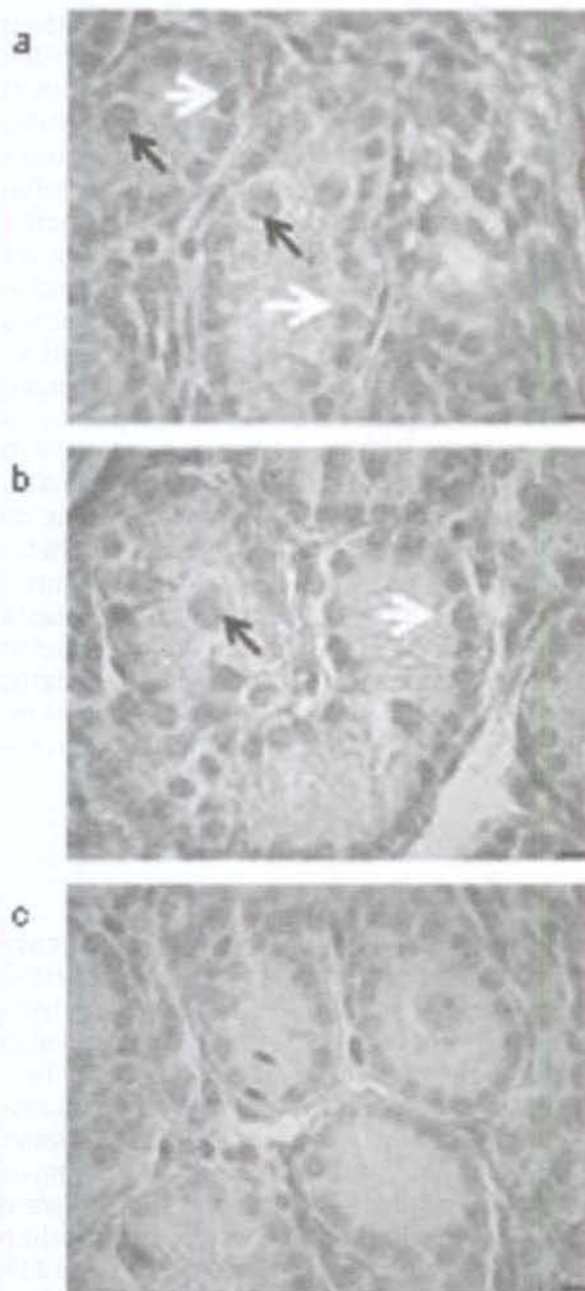
### RESULTADOS

La inmunoexpresión de HSP70 se observó en los testículos de animales tratados y control, siendo mayor la expresión en los tratados con betametasona comparando con el grupo control ( $8,6 \pm 0,3$  versus  $6,1 \pm 0,3$ ). En animales tratados la inmunoexpresión fue marcada en todas las células principalmente en células germinales (gonocitos), Sertoli y Leydig (Figura 1a). En animales controles a nivel de los cordones sexuales se observó una leve inmunoexpresión en gonocitos, y leve expresión en células de Sertoli. En el tejido intersticial la inmunomarcación se evidenció en forma leve a moderada en células de Leydig, siendo algunas células intersticiales negativas a HSP70 (Figura 1b).

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El presente trabajo es hasta donde sabemos la primera descripción de la expresión de HSP70 en el testículo de ovinos Merino australiano y

durante el desarrollo fetal. La importancia de este estudio radica en que los resultados indican que los glucocorticoides regulan una proteína clave como la HSP70 en los procesos de diferenciación y establecimiento de células de la línea germinal en el testículo en desarrollo (Dix et al. 1996). El rol de la proteína HSP70 en testículos es motivo de investigación dada la relevancia de la misma como factor anti-apoptótico. Resta evaluar a lo largo del desarrollo fetal y la vida postnatal si estos cambios persisten afectando la espermatogénesis futura.



**Figura 1.** Localización de la proteína HSP70 en los testículos de ovinos a los 121 días de gestación tratados in utero con betametasona (a), grupos control con suero salino (b) y control negativo de la técnica de inmunohistoquímica sin



incubación de anticuerpo primario anti-HSP70 (c). En a) observe la marcada tinción positiva (color marrón) en parénquima testicular en fetos ovinos, a nivel de gonocitos (flechas negras) y en células de Sertoli (flechas blancas). Barra de escala: 20 micras.

### BIBLIOGRAFÍA

- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM 1996. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 3264–3268.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Poorman-Allen P, Mori C, Blizard DR, Brown PR, Goulding EH, Strong BD, Eddy EM 1997. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124: 4595–4603.

- Kampinga HH, Craig E a 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 579–592.
- Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, Eddy EM 1997. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. *Dev. Dyn.* 208: 125–136.
- Niino K, Yamakawa M, Yamaguchi K 2000. Heat Shock Protein 72/73 was Expressed Ubiquitously on Follicular Dendritic Cells in Lymphoid Follicles. *J. Clin. Exp. Hematop.* 41: 51–60.
- Pei Y, Wu Y, Qin Y 2012. Effects of chronic heat stress on the expressions of heat shock proteins 60, 70, 90, A2, and HSC70 in the rabbit testis. *Cell Stress Chaperones* 17: 81–87.
- Welch WJ 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063–1081

## CRECIMIENTO DE LANA EN CORDEROS EN ENGORDE SOBRE CAMPO NATURAL SUPLEMENTADOS MEDIANTE AUTOALIMENTACION CON RACIÓN TOTALMENTE MEZCLADA

Liliana Criado<sup>2\*</sup>, Antonia Scarsi<sup>1</sup>, Diego Gimeno<sup>1</sup>, Lucía Piaggio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Secretariado Uruguayo de la Lana. Servando Gómez 2408. Montevideo-Uruguay

<sup>2</sup> Departamento de ovinos y Lanas-Facultad de Veterinaria-Universidad de la República. Las Placas 1550

\* Autor de correspondencia: [criadoliliana@gmail.com](mailto:criadoliliana@gmail.com)

### RESUMEN

En los años noventa debido a la crisis del valor de la lana se impulsó otra alternativa complementaria a la producción de la fibra lo que fue la producción de carne ovina de calidad, definiéndose así el producto Cordero Pesado “Tipo Sul”. El engorde a campo natural es una forma de alimentación limitada por la estacionalidad de la oferta y calidad de la misma. Hay información actualizada sobre el desempeño de corderos sobre campo natural suplementados con concentrados en términos de ganancia de peso vivo, sin embargo en lo referente al crecimiento de lana en estas condiciones es escasa la información disponible.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación del crecimiento de lana durante 48 días mediante la técnica de Dye-banding. Se suministró dos formas físicas de suplemento: molido y peleteada, la ración totalmente mezclada (RTM) con-

tenía cáscara de arroz como fuente de fibra. Se utilizaron 90 corderos cruza, hijos de ovejas Corriedale y padres asignados al azar puros Finnish y cruza simple Finnish- Milchschaf, en un diseño de parcelas en bloques al azar de 2 tratamientos con 3 repeticiones. En relación al crecimiento de lana se obtuvo en promedio un crecimiento de 7,6 gd-1, no se detectaron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre las formas físicas de RTM. No fueron detectados ( $P > 0.05$ ) efectos de raza paterna y tipo de parto sobre el crecimiento de la lana. La técnica de Dye-banding fue efectiva para hacer evaluaciones de crecimiento de lana en períodos cortos.

### SUMMARY

Due to the wool crisis which occurred in the nineties, a complementary alternative for wool production, called “Heavy lamb SUL type” was developed to encourage high quality meat pro-