



Expresión endometrial del eje somatotrófico durante el ciclo estral de la vaca

M. Carriquiry¹, C. Chalar², C. Sanguinetti², D. Crespi³, D. Cavestany^{3,4}, A. Meikle³

¹Facultades de Agronomía, ²Veterinaria y ³Ciencias, UDELAR, Montevideo, Uruguay.

⁴INIA La Estanzuela

Resumen

Se determinó la expresión endometrial de receptor de hormona de crecimiento (GHR), factores de crecimiento similares a la insulina tipo-I (IGF-I) y tipo-II (IGF-II), y receptor de IGF tipo-1 (IGF-1R) en biopsias transcervicales obtenidas los días 0 (estro), 5, 12 y 17 del ciclo estral en vaquillonas Holando (n=8) mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativo usando la expresión génica de la proteína ribosomal L19 (PRL19) como control interno (gen housekeeping). La expresión endometrial de GHR e IGF-I mRNAs fue mayor en las fases iniciales del ciclo estral (días 0 y 5) mientras que la abundancia de IGF-II e IGF-1R fue máxima al día 12 del ciclo estral. Estos resultados muestran que los componentes del eje GH-IGF están regulados de forma distintiva durante el ciclo estral y sugieren que estas hormonas juegan un rol en el desarrollo temprano (GH, IGF-I) y/o tardío (IGF-II) del blastocisto, y/o en la regulación de la función uterina.

Introducción

El eje somatotrófico está compuesto por la hormona de crecimiento (GH), los factores de crecimiento similares a la insulina tipo-I (IGF-I) y tipo-II (IGF-II) y sus proteínas de unión. Componentes de este eje se expresan en el útero bovino durante el ciclo estral y la preñez temprana y son candidatos a jugar un importante rol en la regulación del desarrollo del embrión y útero. A pesar de encontrarse en la literatura internacional información contradictoria (Geisert *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 2000; Meikle *et al.*, 2001) sobre la regulación cíclica de la expresión de IGF-I mRNA en el útero, estaría generalmente aceptado que la abundancia de IGF-I mRNA se incrementa alrededor del estro probablemente resultado de la inducción por estrógenos. Resultados recientes (Rhoads *et al.*, 2008) demostraron que este aumento de IGF-I mRNA endometrial al estro es acompañado de un aumento de la expresión del receptor de GH (GHR) mRNA. La información sobre la regulación durante el ciclo estral de la expresión de IGF-II y IGF-1R es escasa (Geisert *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 2000) y no concluyente. El objetivo de este trabajo es describir la expresión endometrial del GHR, IGF-I, IGF-II, IGF-1R mRNAs a lo largo del ciclo estral de la vaca lechera.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 8 vaquillonas Holando (26 meses de edad, peso vivo de 452±14 kg y condición corporal de 2.8±0.3 unidades) del tambo de INIA La Estanzuela, que fueron sincronizadas con una inyección de prostaglandina F2₂ (800µg de delprostenato) y que mostraron celo el mismo día (día 0) y que presentaron fases lúteas de normal duración (determinada por concentraciones de progesterona en sangre). Se obtuvieron muestras endometriales a los días 0, 5, 12 y 17 del ciclo estral mediante biopsias

transcervicales. En las muestras de endometrio, se aisló RNA total, se sintetizó cDNA y se cuantificaron los transcritos de los genes de interés (GHR, IGF-I, IGF-II, IGF-1R) y del control interno (proteína ribosomal L19; PRL19) mediante SYBR Green-PCR en tiempo real. Los datos de expresión de los genes de interés fueron normalizados respecto a la expresión del PRL19 y se expresaron en términos relativos a un control positivo (método de delta-delta Ct; Livak y Schmittgen, 2001) previa validación de la expresión y eficiencia de las reacciones mediante curvas de titulación (Ct vs diferentes inputs de cDNA). El efecto del día del ciclo estral sobre la abundancia de mRNA se analizó por análisis de varianza (Proc MIXED; SAS Institute, 2001). Las medias fueron consideradas diferentes cuando $P < 0.05$.

Resultados y Discusión

La expresión en el endometrio de PRL19 mRNA fue similar entre animales y días demostrando ser un buen gen para ser usado como control interno (housekeeping). La expresión génica de GHR, IGF-I, IGF-II, e IGF-1R en el endometrio sufrió cambios moderados (de 2 a 3 veces en magnitud) a lo largo del ciclo estral (Figura 1).

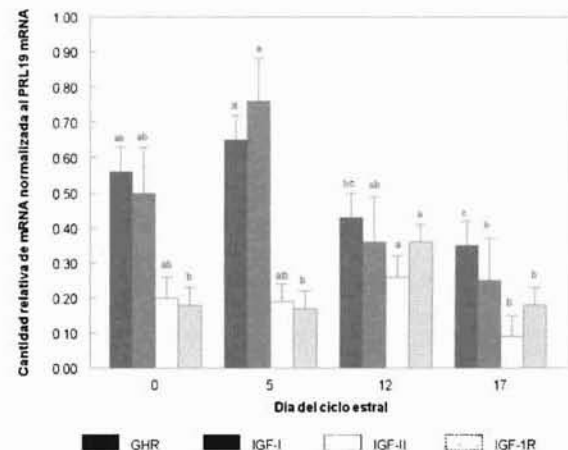


Figura 1. Expresión endometrial de GHR, IGF-I, IGF-II, e IGF-1R mRNA a lo largo del ciclo estral de vaquillonas Holando. Distintas letras en la misma serie, $P < 0.05$.

La abundancia de mRNA de GHR e IGF-I mostró un mismo patrón, siendo máxima al estro y día 5 del ciclo estral (100%) y disminuyendo posteriormente alcanzando 54 y 33% de los valores iniciales al día 17 del ciclo estral, respectivamente. La expresión de IGF-II mRNA, es alta al inicio del ciclo estral (día 0 y 5) y alcanza su máximo valor el día 12, disminuyendo drásticamente (37% del valor máximo) al día 17 del ciclo. Finalmente, la abundancia de IGF-1R se duplica al día 12 con respecto a los valores de los días 0, 5 y 17 del ciclo estral.



La unión de la GH a su receptor (GHR) estimula la síntesis de IGF-I no solo en hígado sino también en diferentes tejidos periféricos, incluyendo tejidos del tracto reproductivo (Eherton, 2004). De manera similar a lo reportado por Rhoads *et al.* (2008), el incremento de GHR en las fases iniciales del ciclo estral puede haber aumentado la sensibilidad uterina a la GH, incrementando la síntesis de IGF-I. Además, Meikle *et al.* (2001) mostraron una asociación entre los niveles de estradiol y la expresión de IGF-I en el útero, por lo que se debería considerar como alternativa que el incremento de GHR e IGF-I mRNA puede estar controlado por un mecanismo común como el aumento de estrógenos al estró. La mayor expresión de IGF-I mRNA en las fases iniciales del ciclo estral parece incrementar la actividad secretoria del útero y mejorar el ambiente uterino para el desarrollo embrionario (Robinson *et al.*, 2000).

El aumento en la expresión endometrial de IGF-II e IGF-1R mRNA observado al día 12 del ciclo estral no concuerda con reportes previos donde no se observaron variaciones cíclicas en la expresión de IGF-II (Geisert *et al.*, 1991) e IGF-1R (Robinson *et al.*, 2001), lo cual podría estar explicado por diferencias en las metodologías de detección de mRNA (realtime PCR vs Northern blot o hibridización *in situ*). El incremento en la abundancia de IGF-II mRNA y de la sensibilidad de útero a las IGFs (al aumentar la expresión de IGF-1R mRNA) refuerza el rol de IGF-II en la preñez temprana, no solo en el desarrollo del embrión sino también en la regulación de la función uterina. En conclusión, estos resultados muestran que los componentes del eje GH-IGF están regulados de forma diferencial durante el ciclo estral

y sugieren que estas hormonas juegan un rol en el desarrollo temprano (GH, IGF-I) y/o tardío (IGF-II) del blastocisto, y/o en la regulación de la función uterina.

Summary

The expression of the growth hormone receptor (GHR), insulin-like growth factors type-I (IGF-I) and type-II (IGF-II), and IGF receptor type-1 (IGF-1R) mRNAs was determined on endometrial transcervical biopsies collected on days 0 (estrus), 5, 12 and 17 of estrous cycle in Holstein heifers (n=8) by quantitative RT-realtime PCR using ribosomal protein L19 (RPL19) as housekeeping gene. Endometrial expression of GHR and IGF-I mRNAs was greater during the early phases of the estrous cycle (days 0 and 5) whereas abundance of IGF-II and IGF-1R peaked at day 12 of the estrous cycle. These results show that these components of the GH-IGF axis are distinctively regulated during the estrous cycle and suggest that these hormones play a role in the early (GH-IGF-I) and/or late (IGF-II) blastocyst development, and/or in the regulation of uterine function.

Referencias bibliográficas

- Eherton. 2004. J. Anim. Sci. 82 (E. Supl):E239-244.
Geisert *et al.* 1991. Biol. Reprod. 45:975-983.
Meikle *et al.* 2001. Anim. Reprod. Sci. 68:45-56.
Livak y Schmittgen. 2001. Methods 25:402-408.
Rhoads *et al.* 2008. J. Dairy Sci. 91:140-150.
Robinson *et al.* 2000. J. Endocrinol. 165:231-243.