

CONTENIDO DE COLÁGENO Y PROTEINAS TOTALES EN CERVIX DE OVEJAS DURANTE EL CICLO ESTRAL

R. González¹, P. Genovese², M. Rodríguez-Piñón¹ Área de Bioquímica¹, Área de Histología y Embriología², Facultad de Veterinaria, Lasplaces 1550, C.P. 11.600, Montevideo-Uruguay.

RESUMEN

El objetivo de éste trabajo fue determinar el contenido de colágeno y de proteínas del cervix ovino durante el ciclo estral. Los cervices se obtuvieron en los días 1 (n=5), 6 (n=5) y 13 (n=5) luego del estro. Se midió el peso, el contenido de agua, las concentraciones de colágeno y proteínas totales de las muestras cervicales. El peso del cervix aumentó alrededor del estro, concomitante con una disminución del contenido de agua, colágeno y proteínas. Las evidencias sugieren la coexistencia de al menos dos mecanismos E-dependientes de reblandecimiento del tejido cervical al estro: la acumulación de moléculas no proteícas y al aumento de la degradación del colágeno.

INTRODUCCIÓN

El colágeno es la proteína predominante en la matriz extracelular del conjuntivo cervical (5) y es una de las moléculas blanco mediante los cuales los estrógenos (E) y la progesterona (P) modifican la consistencia del cervix (10). El mecanismo molecular de éste fenómeno es variable según las especies y no está del todo dilucidado. En la oveja, la concentración de colágeno cervical disminuye en el último período de la gestación (7), a pesar de que no se detectó un aumento de la actividad colagenasa (6), quedando abierta la interrogante sobre la existencia de modificaciones en la cantidad y/o distribución del colágeno cervical en el cervix ovino durante la gestación. Durante el ciclo estral no se detectaron variaciones en la concentración del colágeno del cervix de vaca, sin embargo, se describió su gradiente a lo largo de su eje longitudinal (2). No se ha reportado hasta el momento la determinación de colágeno a lo largo del cervix de ovejas durante el ciclo estral. El objetivo de éste trabajo fue determinar el contenido de colágeno y proteínas totales a lo largo del cervix ovino durante el ciclo estral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ovejas Corriedale (39.6±4.0 Kg) fueron sincronizadas con dos dosis (150 mg c/u, i.m.) de Prostaglandina-F2a (Delprostenate, Glandinex, Universal Lab, Uruguay) separadas 6 días. En los días 1 (n=5), 6 (n=5) y 13 (n=5) luego de detectado el estro (día 0), el cervix fue retirado, pesado, seccionado transversalmente en tercios (craneal, medio y caudal) y congelado a -80oC. Fracciones de las muestras fueron pesadas y desecadas en homo Pasteur hasta peso cons-

tante, calculándose el porcentaje de agua por diferencia entre ambas pesadas. La concentración de Colágeno se estimó mediante la cuantificación espectrofotométrica de Hidroxiprolina (Pro-OH) (1) utilizando Pro-OH (Sigma-Aldrich, Stenheim, Germany) como estándar (0.5 a 15 mg/mL, r=0.9976, P<0.0001). Todas las muestras fueron analizadas en el mismo ensayo, con una curva de calibración significativa, una sensibilidad de 0.5 mg/mL y un CV intraensayo de 7%. La concentración de colágeno se obtuvo considerando que la Pro-OH es un 14% del peso del total de la proteína, expresándose en mg colágeno en función de los g de tejido húmedo o seco. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (4), utilizando BSA (Fracción IX, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) como estándar (0.05 a 0.6 mg/mL, r=0.9960, P<0.0001). Todas las muestras fueron analizadas en el mismo ensayo, con una sensibilidad de 0.05 mg/mL y un CV intraensayo de 4%. La concentración de proteínas se expresó en mg proteína en función de los g de tejido húmedo o seco. Los datos se analizaron por ANOVA (General Lineal Model procedure, S.A.S. Institute Inc., 1994), incluyendo los efectos de día y de región del cervix, tomando como significativo P<0.05. No hubo efecto de la región del cervix en ninguna de las variables medidas, por lo que los datos fueron pooleados y presentados como mean±s.e.m. para un n=15 en cada uno de los días del ciclo estral.

RESULTADOS

El peso del cervix (g) fue mayor en el día 1 (10.6±1.2, n=5) que en los días 6 (7.7±0.9, n=5) y 13 (8.3±1.1, n=5) del ciclo estral (P<0.005). El porcentaje de agua fue mayor en el día 13 (71.9±1.1, n=15) que en los días 1 (67.3±1.7, n=15) y 6 (65.4±1.7, n=15) (P<0.01). La concentración de colágeno relativa al peso húmedo fue menor en el día 1 que en el día 6, siendo intermedia pero no diferente de los otros días en el día 13 (P<0.04) (Figura 1A, en blanco). La concentración de colágeno relativa al peso seco fue menor en el día 1 que en los días 6 y 13 (P<0.04) (Figura 1B, en negro). La concentración de proteínas relativa al peso húmedo fue menor al día 1, intermedia al día 6 y mayor al día 13 (P<0.0004) (Figura 1B, en blanco). La concentración de proteínas relativa al peso seco fue menor en los días 1 y 6 que en el día 13 (P<0.0001) (Figura 1B, en negro).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El peso del cervix fue mayor alrededor del estro que en la fase luteal, concomitante con las mayores concentracio-



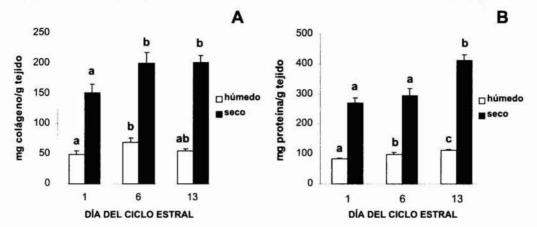


Figura 1 - Concentraciones (mean \pm s.e.m) de colágeno (mg colágeno/g tejido, A) y de proteínas totales (mg proteína/g tejido, B) relativas al peso húmedo (series en blanco) y al peso seco (series en negro) del cervix de ovejas al día 1 (n=15), 6 (n=15) y 13 (n=15) del ciclo estral (día 0=día del estro). Para cada serie, columnas con diferentes letras difieren significativamente (P<0.04).

nes de E circulantes y del receptor de E cervical (8, 9). A pesar de que es aceptado que el aumento del peso del útero debido a edema es una acción estrogénica clásica, el porcentaje de agua del cervix disminuyó al estro, lo que permitiria descartar el edema E-inducido como el origen del mayor peso cervical. Similarmente, el peso cervical aumentó mientras el contenido de agua se mantuvo constante en ovejas durante la gestación (7). Por otra parte, el aumento del peso inducido por los E podría deberse a proliferación celular mediada por factores de crecimiento (ej. IGF-I o Thioredoxina) como fue reportado en útero ovino, sin embargo esta misma asociación no pudo ser comprobada en cervix de las mismas ovejas (11). Tampoco existió una asociación entre el peso cervical y la concentración de colágeno o de proteínas totales, ya que ambas fueron bajas alrededor del estro, recuperándose en la fase lutea. En conjunto, las evidencias sugieren que el aumento del peso del cervix alrededor del estro podría deberse a la acumulación de moléculas no proteicas. En ése sentido, se ha reportado que el cervix ovino durante último período gestación, de acumula glucosaminoglucanos sulfatados de alto peso molecular, que desagregarían las fibras de colágeno y permitirían la dilatación al parto (10). Por otra parte, la menor concentración de colágeno cervical alrededor del estro coincide con una mayor penetrabilidad del canal cervical (3). Esto podría indicar que una activación E-dependiente de la colagenólisis estaría involucrada en la mejora en las condiciones para la canulación cervical. La concentración de colágeno cervical no varió a lo largo del eje longitudinal del cervix, en desacuerdo con lo reportado en vaca, que fue de mayor a menor desde caudal a craneal (2). En conclusión, las evidencias sugieren la posible coexistencia de al menos dos mecanismos E-dependientes de reblandecimiento del tejido cervical alrededor del estro: la acumulación de moléculas no proteicas y al aumento de la degradación del colágeno.

FINANCIACIÓN: CSIC, Universidad de la República; DINACYT, Ministerio de Educación y Cultura.

SUMMARY

The aim of this work was to determine the collagen and proteins content of the ovine cervix during the estrous cycle. The cervix were obtained at days 1 (n=5), 6 (n=5) and 13 (n=5) after estrus. The weight, the water content, the collagen and total protein concentrations were measured in the cervical samples. There was an increase in cervical weight around the estrus, concomitant with a decrease in water content, in collagen and protein concentrations. The evidences suggest the coexistence of two E-dependent mechanisms of the cervical softening at estrous: the accumulation of the non-protein molecules and the collagen degradation.

BIBLIOGRAFÍA

- Bergman I & Loxley R. (1963). Analytical Chemistry 35: 1961-1965.
- 2.Breeveld-Dwarkasing VNA et al. (2003). Biol Reprod 69, 1600-1607.
- Kershaw CM et al. (2005). Theriogenology 64: 1225-1235.
 - 4.Lowry OH et al. (1951). J Biol Chem 193: 265-275.
 - 5.Moré J. (1984). Acta Anat (Basel) 120: 156-159.
 - 6.Raynes J.G. et al. Coll Relat Res 8: 461-469.
- 7.Regassa F., Noakes D. (2001). Res Vet Sci 70: 61-66.
- 8.Rodríguez-Piñón M et al. 6º Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba-Argentina, 24 al 26 de junio de 2005.
- 9.Rodríguez-Piñón M et al. 5º Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba-Argentina, 27 al 29 de junio de 2003.
- 10. Taverne MAM. (1992). Anim. Reprod. Sci. 28, 433-440.
- van Lier E., et al. Acta Veterinaria Scandinavica (in press).