



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**RECEPTORES DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS  
SEXUALES EN CERVIX OVINO**

**Estudios en Corderas Pre-púberes y en Ovejas Adultas Durante el  
Ciclo Estral Natural e Inducido**

por

**Marcelo Rodríguez-Piñón**

**Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de  
Veterinaria, Montevideo, Uruguay**

**TESIS DE MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY**

**2006**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**RECEPTORES DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS  
SEXUALES EN CERVIX OVINO**

**Estudios en Corderas Pre-púberes y en Ovejas Adultas Durante el  
Ciclo Estral Natural e Inducido**

por

**Marcelo Rodríguez-Piñón**

**Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de  
Veterinaria, Montevideo, Uruguay**

**Directora de Tesis: Prof. Dra. Elsa G. Garófalo**

**TESIS DE MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY**

**2006**



### **Miembros del Tribunal:**

Profesor Dr. Daniel Cavestany, DMV, M.Sc., Ph.D.  
Profesor Titular de Teriogenología, Departamento de Reproducción.  
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo-  
Uruguay.

Profesor Dr. Marcelo Aba, DMV, M.Sc., PhD.  
Profesor Adjunto de Endocrinología y Vice Decano.  
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la  
Provincia de Buenos Aires, Tandil-Argentina.

Profesor Dr. Edgardo Rubianes, M.Sc., PhD.  
Profesor Adjunto de Fisiología de la Reproducción, Departamento de  
Producción Animal y Pasturas.  
Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo-  
Uruguay.

*Diego era boliviano y no conocía la mar. El padre, lo llevó a descubrirla.  
Viajaron al sur.*

*Ella, la mar, estaba mas allá de los altos médanos, esperando.*

*Cuando el niño y su padre alcanzaron aquellas cumbres de arena,  
después de mucho caminar, la mar estalló ante sus ojos. Y fue tanta la  
inmensidad de la mar, y tanto su fulgor, que el niño quedo mudo de su  
hermosura.*

*Y cuando por fin consiguió hablar, temblando, tartamudeando, pidió a su  
padre:*

*Ayúdame a mirar”.*

*Eduardo Galeano*

*A mi familia y amigos  
Ladrillos de mi Castillo*

## Agradecimientos

Los estudios presentados en ésta tesis se realizaron en el Área de Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay; excepto las determinaciones de E<sub>2</sub>, LH y FSH, que se realizaron en el Departamento de Química Clínica, Universidad Sueca de Ciencia Agrícola, Uppsala-Suecia. La financiación provino de la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEDEC) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República, del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) de la Universidad de la República y de la Dirección Nacional de Ciencia y Tecnología (DINACYT), Ministerio de Educación y Cultura (MEC), República Oriental del Uruguay. Agradezco profundamente a las personas que integran éstas Instituciones.

Me complace agradecer a las siguientes personas, por ser parte natural de esta tesis:

A mi orientadora **Elsa G. Garófalo**, Directora de ésta tesis, que me abrió la puerta al mundo de la investigación, guió mis primeros pasos y me enseñó a mirar el mundo con ojos científicos. Una mujer infinitamente generosa. Gracias por tu criticismo, creatividad y positividad al escribir esta tesis. A **Celia Tasende**, compañera en docencia e investigación y co-autora, que me enseñó el rigor del método científico y del trabajo, abnegada defensora de lo justo y constructora de nuestra Cátedra de Bioquímica. Gracias por tirarme los flotadores con esta tesis. A **Ana Meikle**, también compañera en docencia e investigación y co-autora, pionera de los postgrados en nuestra Cátedra, ejemplo de vigor, empuje e inteligencia. A **Mats Forsberg**, generoso científico sueco, que dirigió su mirada al Sur del continente y, a manera de la mejor “gauchada” criolla, ayudó a desarrollar la investigación por éstos lados, con atenta y humana tutela. A **Daniel Ucar**, impresionante docente y rigurosísimo investigador, hombre de calma e infinita paciencia y generosa personalidad. A **Perla Rubianes**, nuestra asistente técnica y mucho mas que eso, ser cálido que cualquier grupo humano desearía y debería tener. A **Isabel Sartore**, también asistente técnica, efectiva, simple y rápida en sus tareas, ejemplo de que todo es posible. A **Pablo Puime**, ayudante en mi línea de investigación, una persona grande (en todos los sentidos) y siempre listo a dar una mano, compañero de buenas y malas. A **Delma de Lima**, atentísima compañera en Bioquímica, en las buenas y malas también. A **Sebastián Acuña**, **Juan Pablo Damián**, **Cecilia Sosa** e **Inés Sachi**, compañeros de Bioquímica, que recogieron el guante de la docencia y la investigación; constructores del futuro. A **Edgardo Rubianes**, incansable investigador, ser integral, filósofo y político; un ejemplo corajudo de tentempié. A **Rodolfo Ungerfeld**, otro incansable investigador y organizador, de amistosa rigurosidad. A **Alejandro Bielli**, también investigador, de la misma calaña que lo anteriores, de generosa talla. A **Jorge Gil Laureiro**, también investigador, que conocí fundamentalmente en Suecia, donde me dió una mano impresionante. A **Hugo Gómez**, funcionario de Facultad y mucho más que eso, ejemplo de persona y de vida. A **Enrique Nogueira**, funcionario de CSIC y colega, por demostrar siempre su fe en nosotros. A **Teresa de Castro**, **Betita Carbajal**, **Leticia Luengo**, **Manuel Figueroa**, **Cristina Gonzalez**, **Ricardo Rodriguez**, **Carolina Viñoles**, **Marcelo Tedros**, **Claudio Borteiro** y **Virginia Russi**, compañeros de la grandiosa generación 90', compañeros de mil historias y cuya amistad estará siempre en mi corazón. A

**Fernando Perdigón** y a **Lucy Sosa**, colegas que me hicieron sentir siempre como en casa en el Campo Experimental No 1 de Facultad.

A **Mamá** (Ma del Carmen) y a **Papá** (Antolín) que, sin quererlo, un día me regalaron una lupa con la cual miré por primera vez el mundo mas allá de mis ojos y fue el germen de lo que hoy les devuelvo en ésta tesis. Incondicionales padres e incansables trabajadores, siempre le pusieron y le pondrán el pecho a la balas primero que ninguno. A **Alejandro** y su compañera **Danielle**, a **Sebastián** y a **Felipe**, mis hermanos, compañeros de innumerables aventuras y rutas. A mis abuelos, **Antolín** y **Juan Carlos**, **Neca** y **Chuchú**, por que siempre fueron motivo de mis asombro y a mis sobrinos, **Lucía** y **Santiago**, porque siempre lo serán. A **Eduardo**, compañero de fierro, amigo de aquellos, incondicional, inseparable, mi gemelo.

A **Leti**, mi compañera, madre de mis hijos, mi faro personal. Mujer bondadosa, justa y hermosa en una amalgama irreproducible y, por demás, amorosa. A **Martina**, mi hija, responsable de que los estantes donde se alojaban mis valores y mis amores sufriera el mas grande de los reordenamientos. Espejo de mi mismo (imagen mejorada) y desafío constante. A **Simón**, mi hijo, otro gajo de mi, que (tan chiquito) ya mira el mundo entre estupefacto y atento.

## Índice

### A. INTRODUCCIÓN (pag. 1)

#### El cervix ovino como barrera biotecnológica (pag. 1)

#### Reproducción en la oveja (pag. 2)

1. Pre-pubertad (pag. 2)
2. Ciclo estral (pag. 3)
3. Gestación y parto (pag. 4)
4. Anestro posparto (pag. 7)
5. Anestro estacional (pag. 7)

#### Esteroides sexuales y mecanismo de acción (pag. 8)

1. Hormonas esteroideas ováricas (pag. 8)
2. Receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) (pag. 8)
3. Subtipos de RE, isoformas de RP y acción no genómica de los esteroides ováricos (pag. 9)
4. Regulación de RE y RP (pag. 10)

### B. ANTECEDENTES (pag. 11)

1. El cervix ovino (pag. 11)
2. RE y RP en el tracto reproductivo de corderas durante el desarrollo (pag. 11)
3. RE y RP en el tracto reproductivo de la oveja adulta (pag. 12)

### C. OBJETIVOS (pag. 14)

### D. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN (pag. 14)

### E. MATERIALES Y MÉTODOS (pag. 16)

1. Diseños experimentales (pag. 16)
2. Determinación de hormonas por R.I.A (pag. 18)
3. Determinación de RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm (pag. 18)
4. Determinación de RE y RP (pag. 19)
5. Análisis estadístico (pag. 20)

### F. RESULTADOS (pag. 21)

1. Corderas prepúberes tratadas con E2 (Diseño 1) (pag. 21)
2. Ovejas adultas ciclando en la estación reproductiva (Diseño 2) (pag. 23)
3. Ovejas adultas en anestro estacional e inducidas a ovular (Diseño 3) (pag. 26)

### G. DISCUSIÓN (pag.29)

### H. CONCLUSIONES (pag. 35)

#### Perspectivas Futuras (pag. 35)

### I. REFERENCIAS (pag. 37)

#### ANEXO - Publicación I (pag. 50)



## Resumen

El objetivo de ésta tesis fue estudiar la sensibilidad y capacidad de respuesta a los estrógenos (E) y a la progesterona (P), en términos de concentración de sus receptores (RE, RP) y de sus correspondientes transcritos, en cervix de corderas prepúberes y de ovejas adultas en diferentes estados reproductivos. Las concentraciones de RE y RP se midieron por ensayos de unión y las de transcritos (RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm) por hibridización en solución. En corderas prepúberes, el tratamiento con diferentes dosis de E<sub>2</sub> modificó la expresión de RE y RP en el tracto reproductivo en forma bifásica, siendo el cervix el órgano que mostró una respuesta de mayor magnitud a nivel transcripcional. Durante el ciclo estral, las concentraciones de RE y RP fueron mayores al estro que en la fase luteal, tanto en cervix craneal, como en caudal; mientras que el RE $\alpha$ -ARNm fue mayor al estro solo en cervix caudal. En ovejas en anestro estacional tratadas con P+GnRH, las variaciones en la expresión de RE y RP al momento de la ovulación y en la fase luteal temprana fueron similares a las encontradas en ovejas ciclando en el cervix craneal, mientras que en el cervix caudal no se encontraron variaciones. Los resultados, en su conjunto, demuestran que el cervix tiene una elevada sensibilidad y capacidad de respuesta a E y P y que los mecanismos moleculares que modulan la sensibilidad del cervix a las hormonas esteroideas ováricas pueden ser diferentes según el estado reproductivo y la región cervical.

## Summary

The aim of this thesis was to study the sensibility and capacity of response to the estrogens (E) and to the progesterone (P), in terms of their receptors (ER, PR) and their respective transcripts concentrations, in cervix of prepubertal lambs and adult ewes at different reproductive states. The ER and PR concentrations were measured by binding assays and their transcripts (ER $\alpha$ -mRNA, PR-mRNA) concentrations by solution hybridization. In prepubertal lambs, the treatment with different doses of E<sub>2</sub> modified the ER and PR expression in the reproductive tract in a biphasic manner, being the cervix the organ that showed the highest response at transcriptional level. During the estrous cycle, the ER and PR concentrations were higher at estrus than in the luteal phase in cranial and caudal cervix, while the ER $\alpha$ -mRNA was higher at estrus only in the caudal cervix. In seasonal anestrus ewes treated with P+GnRH, the variations in the ER and PR expression at the ovulation and in the early luteal phase were similar to the cycling ewes in the cranial cervix, while in the caudal cervix variations were not found. The whole results demonstrate that the cervix has a high sensibility and capacity of response to E and P and that the molecular mechanisms that modulate the sensibility of cervix to the steroid ovarian hormones can be different according to the reproductive state and the cervical region.

## A. INTRODUCCIÓN

### **El cervix ovino como barrera biotecnológica**

En el Uruguay, luego de 12 años de disminución del stock ovino, existen indicios de que la tendencia se está revirtiendo (M.G.A.P., 2005). La producción ovina significó más de 220 millones de dólares en la zafra 2004-2005 (S.U.L., 2005a), representando el 13% de las exportaciones agropecuarias del país (M.G.A.P., 2005). El Uruguay cuenta con aproximadamente 10 millones de ovejas (DI.CO.SE., 2005), de las cuales dos tercios son de la raza Corriedale (S.U.L., 2005b).

En ovinos, la inseminación artificial (IA) y la transferencia de embriones (TE) no han alcanzado aún el nivel de desarrollo que tienen en otras especies, limitando su progreso genético y productivo. Se estima que en el Uruguay se inseminan artificialmente el 2% de las hembras al año (Fernández-Abella, 1995). Los bajos porcentajes de preñez que se obtienen en general, limitan la aplicación comercial de la IA y la TE en la oveja. La baja fertilidad luego de la IA cervical con semen congelado en ovinos es un fenómeno multifactorial y uno de los factores más importantes es el lugar donde se realiza la deposición seminal (Salamon & Maxwell 2000). Se ha observado que la fertilidad aumenta proporcionalmente a la profundidad en que se realiza la deposición seminal en el canal cervical (IA cervical), a razón de un 7 a 12 % por cm (Eppleston et al. 1994) y es máxima cuando se hace directamente en la luz uterina (IA uterina transcervical) (Sayre & Lewis, 1997).

La aplicación de la IA y la TE quirúrgicas, por laparoscopia o laparotomía media ventral, accediendo directamente al cuerno uterino (IA uterina) ha mejorado los índices de concepción (Armstrong & Evans, 1984; Windsor et al. 1994; Fair et al. 2005). Sin embargo, las técnicas quirúrgicas son de riesgo y de alto costo, por lo cual, la IA uterina transcervical es una alternativa que genera gran expectativa (Salamon & Maxwell, 2000). Lamentablemente, la canulación transcervical en la oveja es dificultosa. Comparado con el bovino, el cervix ovino es de difícil acceso y no es posible su manipulación bimanual; además, la presencia de anillos que constriñen el canal cervical, dificultan el pasaje de la cánula (Halbert et al. 1990b; Windsor et al. 1994). Se ha reportado que la IA uterina transcervical fue exitosa en forma variable, entre el 43 al 76 % de las ovejas inseminadas (Windsor et al. 1994). Para facilitar la canulación transcervical en ovinos se han desarrollado dos estrategias: la apertura física del cervix y la inducción hormonal de la dilatación cervical.

La apertura física del cervix utilizando fórceps (Halbert et al, 1990b) e instrumental diseñado especialmente para ovinos (Wulster-Radcliffe & Lewis, 2002) ha mejorado los índices de concepción, pero son de manejo engorroso y pueden producir lesiones que afectarían la fertilidad (Campbell et al. 1996). Recientemente, se ha descrito que la estimulación cervico-vaginal por parte de la cánula de IA, limitaría dramáticamente el número de corderos nacidos, sugiriendo la activación de un factor hormonal que interrumpiría la preñez (Wulster-Radcliffe et al. 2004). La inducción hormonal de la dilatación cervical en ovinos está basada en los mecanismos endocrinos estudiados principalmente en humano y ratón. Se han propuesto varias hormonas que, administradas solas o combinadas, inducirían la dilatación del cervix ovino:  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) (Owiny et al. 1992); oxitocina

(Ox) (Khalifa et al. 1992; Sayre & Lewis, 1996 y 1997; King et al. 2004); relaxina (Akinbami et al. 1990); prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Owiny & Fitzpatrick 1990); E<sub>2</sub> mas Ox (Khalifa et al. 1992; Flohr et al. 1999) y E<sub>2</sub> mas PGE<sub>2</sub> (Barry et al. 1990; Mylne et al. 1992). El éxito de la inducción hormonal de la dilatación del cervix depende de que no afecte la fertilidad, como ha sido reportado para el tratamiento con Ox (Stellflug et al. 2001; King et al. 2004).

Los resultados de la inducción hormonal de la dilatación del cervix ovino no han sido utilizados más allá de la fase experimental. Las bases endocrinas y moleculares de éste fenómeno todavía no están claras, lo que limita la elección de la hormona, su dosis, su vía de administración y el efecto esperado de la misma. El estudio de los mecanismos endocrinos y moleculares de la funcionalidad del cervix ovino podría aportar nuevos elementos para orientar una estrategia de manipulación hormonal de la dilatación cervical.

## **Reproducción en la oveja**

La oveja presenta la primera ovulación (pubertad) a los 6-9 meses de edad, pero con gran variabilidad, dependiendo de factores genéticos, ambientales y nutricionales (Hafez 1987). La oveja se comporta como poliéstrica estacional y los ciclos estrales ocurren entre fines de verano y otoño (estación reproductiva), interrumpiéndose el resto del año (anestro estacional). En la raza Corriedale, los ciclos estrales ocurren entre diciembre y junio y en Uruguay se encarneran aproximadamente el 75% de las ovejas entre febrero y marzo (Cardellino, 1992). Puesto que la gestación dura entre 140-156 días, los nacimientos ocurren en primavera, cuando las condiciones climáticas y nutricionales son favorables para la supervivencia (por revisión ver Goodman 1994). En la oveja, el período entre el parto y el primer estro (anestro posparto) usualmente se solapa con el anestro estacional, por lo cual las ovejas no pueden quedar preñadas hasta la próxima estación reproductiva; a menos que, tras un breve anestro posparto, se utilicen tratamientos hormonales para inducir la ovulación, lograr la preñez y obtener partos durante la estación reproductiva (Crosby et al. 1991; Fukui et al. 1991; Knights et al. 2001; Husein & Kridli, 2003; Knights et al. 2003),

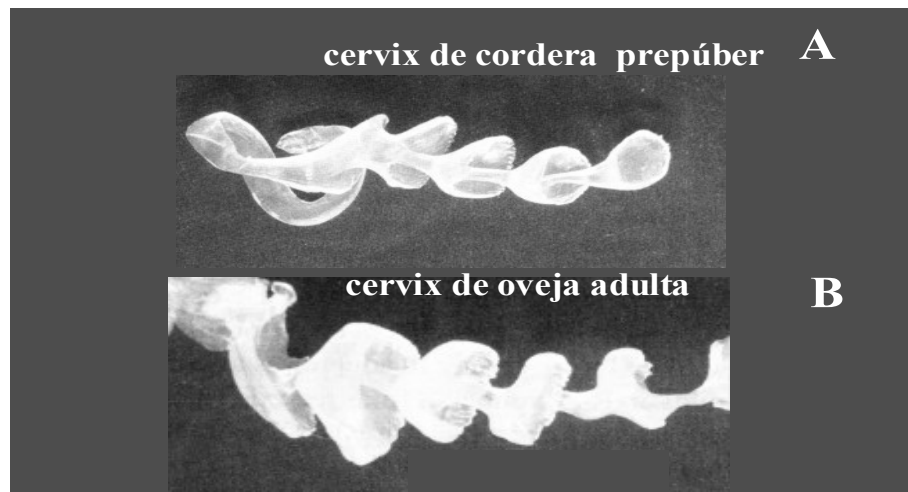
### **1. Pre-pubertad**

El período pre-puberal se caracteriza por la ausencia de ovulación y la baja concentración circulante de estrógenos (E) y progesterona (P) (Ryan et al. 1991). En éste período, a pesar de que los componentes del sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal maduran tempranamente (Foster & Karsch, 1975; Worthington & Kennedy, 1979; Foster et al. 1988; Manning et al. 1993; Meikle et al. 1998), la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) está disminuida (Foster & Ryan, 1979). Los E producidos por el ovario ejercerían una retroalimentación negativa sobre el centro liberador de GnRH (teoría gonadostática) (Foster & Ryan, 1979), que se perdería paulatinamente al acercarse la pubertad (Day et al. 1987).

El tracto reproductivo debe llegar a la pubertad con el desarrollo suficiente para poder garantizar una exitosa monta, transporte espermático, fecundación y mantenimiento de la gestación. En corderas se ha detectado un aumento transitorio de E<sub>2</sub> entre los días 14 a 42 luego del nacimiento, concomitante con un empuje en la adenogénesis uterina (Taylor et al. 2000). Se ha propuesto que la maduración del

útero ovino es bifásica, siendo independiente de las hormonas sexuales antes del nacimiento y en la primera etapa postnatal (hasta el día 14) y dependiente después (Bartol et al. 1999). La dependencia de la maduración uterina a los esteroides sexuales ha sido confirmada en ratones RE-“knockout” y RP-“knockout”, a los que se les provocó la disrupción de los genes que codifican las proteínas receptoras de E (RE) y de P (RP). Las ratonas RE-“knockout” y RP-“knockout”, presentan un tracto reproductivo completo, pero hipoplásico e indiferenciado (Couse & Korach, 1999; Conneely et al. 2001).

Muy poco se sabe de las características del desarrollo del cervix ovino previo a la pubertad. El cervix prepúber es pequeño en largo y en peso y también posee anillos internos más pequeños que en adultas (Naqvi et al. 2005) (Figura 1). A su vez, se ha logrado canular menos profundamente el cervix de corderas prepúberes que el de ovejas adultas (Eppleston et al. 1994; Kershaw et al. 2005) y se han reportado bajos porcentajes de preñez luego de la pubertad, respecto a los subsiguientes celos (Hare & Briant, 1985). Sin embargo, a excepción de una tendencia a retener un número de espermatozoides menor en el tracto reproductivo, las corderas en su primer estro no tendrían como factor limitante el transporte y distribución espermática para quedar preñadas (Lane et al. 1993). Estos aspectos hacen que el cervix cobre particular importancia como factor limitante de la IA en corderas.



**Figura 1** – Moldes de silicona del canal cervical de cordera prepúber (A) y de oveja adulta (B) (Naqvi et al. 2005).

## 2. Ciclo estral

El ciclo estral es el resultado de una cadena de eventos donde el cerebro, la hipófisis, los ovarios y el útero establecen vías neuro-endocrinas y endocrinas de comunicación, que coordinan la función reproductiva (por revisión ver Goodman, 1994). El ciclo ovárico en la oveja, está regulado por la interrelación entre las hormonas producidas por éstos órganos: GnRH del hipotálamo, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) de la hipófisis, E e inhibina de los folículos ováricos, P y Ox del cuerpo lúteo (CL) y prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) del útero (por revisión ver Goodman, 1994).

La oveja tiene un ciclo estral con una duración promedio de 17 días. La fase folicular es corta y se caracteriza por la presencia de un folículo ovulatorio que produce altas concentraciones de  $E_2$  y por el comportamiento estral (estro) que dura entre 24-36 h (por revisión ver Goodman, 1994). En el día del estro (día 0) se produce el pico preovulatorio de LH y la ovulación ocurre aproximadamente a las 24 h del mismo (Scaramuzzi et al. 1993). Posee una fase luteal prolongada, caracterizada por el desarrollo del CL, el aumento paulatino de las concentraciones circulantes de P y que finaliza con la luteólisis en los días 14 o 15 del ciclo (por revisión ver Goodman, 1994). En el intervalo interestros se suceden de 2-5 (comúnmente 3) ondas de crecimiento folicular, cada una acompañada del correspondiente incremento en las concentraciones circulantes de  $E_2$  (Ginther et al. 1995; Viñoles et al. 1999; Evans et al. 2000). Los E y la P controlan el ritmo del ciclo estral, participando en los mecanismos de retroalimentación negativos y positivos (“feedback loops”) entre el eje ovario-hipotálamo-hipofisario (por revisión ver Goodman, 1994; Wathes & Lamming, 1995; McCracken et al. 1999).

La bibliografía es coincidente respecto al rol regulatorio de los esteroides sexuales ováricos sobre la funcionalidad y, más específicamente, sobre los procesos de remodelación del cervix (Gorodeski, 1996). El cervix ovino se hace permeable al ascenso de los espermatozoides en el estro y permanece firmemente cerrado en la fase luteal (Heydon & Adams, 1979). El cervix actuaría como reservorio de espermatozoides controlando su transporte hacia el tracto reproductivo craneal, valiéndose de profundas criptas en su mucosa, revestida de células ciliadas y secretoras de mucus (Wergin, 1985). Además, en el cervix ovino durante el ciclo estral se han observado modificaciones histológicas (Wergin, 1979), mioeléctricas (Ayad et al. 2004; Cavaco-Goncalves et al. 2006) y de las características físico-químicas del mucus cervical (Heydon & Adams, 1979), que coinciden con las variaciones cíclicas de los E y la P.

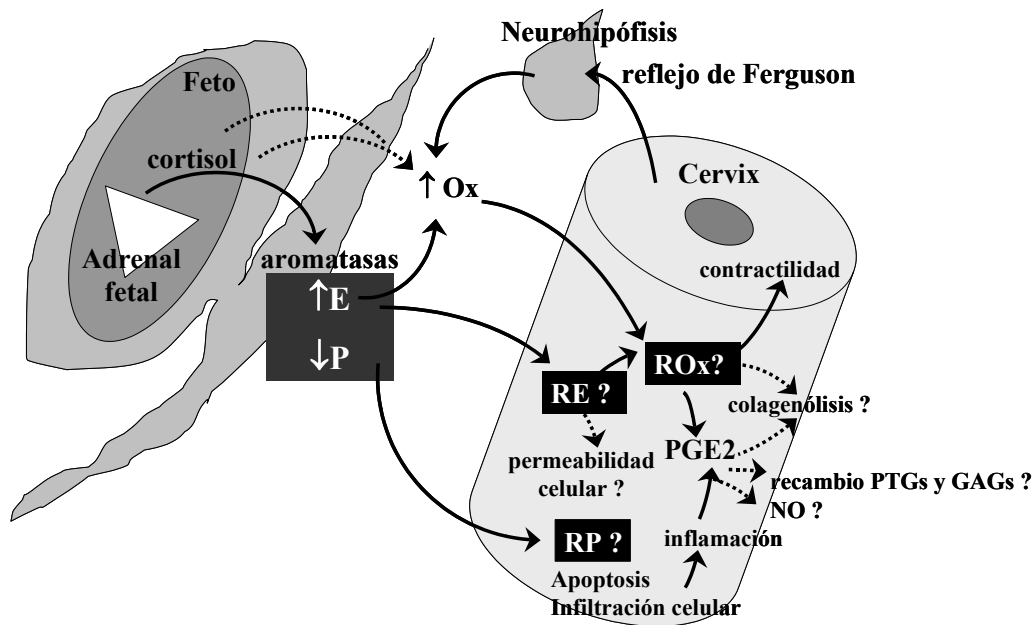
### 3. Gestación y parto

El establecimiento de la preñez requiere el desarrollo de señales moleculares entre el embrión y la madre, con el objetivo de evitar la luteólisis y retener el embrión. En rumiantes, el interferón- $\tau$  (IFN- $\tau$ ) secretado por el concepto interrumpe el “feedback” positivo entre la Ox ovárica y la  $PGF2\alpha$  uterina y evita la luteólisis (Mann et al. 1999). Durante la gestación en la oveja, los niveles de P se mantienen altos, inhibiendo la actividad contráctil del tracto reproductivo (García-Villar et al. 1984; Fuchs et al. 1996). En ésta especie, la primera mitad de la gestación depende del CL y posteriormente se vuelve dependiente de los esteroides sexuales secretados por la unidad feto-placentaria (Caton & Kalra, 1990).

En ovinos, se ha propuesto que el parto se desencadena por un aumento de la secreción de adenocorticotrofina (ACTH) hipofisaria fetal, que genera un incremento del cortisol a partir de las adrenales fetales (Kendall et al. 1977) (Figura 2). El cortisol fetal estimula la actividad de las aromatasas placentarias, desviando la producción de P y andrógenos, hacia la síntesis y producción de  $E_2$  (Leung et al. 1998). Por lo tanto, la baja relación E/P en la circulación materna que caracterizaba a la preñez, se invierte antes del parto por disminución de la P y aumento de E (Leung et al. 1998). La alta relación E/P induce una serie de eventos moleculares y celulares

que modifican el tracto reproductivo y lo preparan para la expulsión del feto (Leung et al. 1998, Fuchs et al 2001) (Figura 2).

El cervix sufre cambios profundos durante el proceso de gestación y parto, basados especialmente en un activo metabolismo de su matriz extracelular, dependiente de los esteroides ováricos (Gorodeski, 1996). Al momento del parto, coexisten y se interrelacionan fenómenos moleculares y celulares, mayoritariamente descritos en la mujer y en roedores (El Maradny et al. 1997), por lo cual la comprensión global de la dilatación del cervix es dificultosa y aún oscura. La coordinación de éstos fenómenos depende de los E y la P, actuando a través de sus receptores específicos RE y RP (Gorodeski, 1996; Stjernholm et al. 1996), directamente o a través de otras hormonas (Figura 2).



**Figura 2** – Esquema de los procesos vinculados a la dilatación cervical durante el parto. Las flechas punteadas y los signos de interrogación indican que el evento fue descrito en especies diferentes de la ovina. PTGs: proteoglicanos, GAGs: glucosaminoglicanos; NO: óxido nítrico.

A nivel molecular, se ha reportado que la producción de colagenasas intersticiales en cervix de cobaya es estimulada por los E, bloqueada por la P, y mediada por Ox y PG (Rajabi et al. 1991a y 1991c; Rajabi & Cybulsky, 1995) (Figura 2). En cervix de rata, los E y la P modulan la actividad de la Ox regulando la expresión su propio receptor (ROx) (Murata et al. 2003) (Figura 2). Un mecanismo bien conocido de retroalimentación de la secreción de Ox en el parto es el reflejo neuroendocrino de Ferguson (Flint et al. 1978) (Figura 2). Por otra parte, la síntesis de PGE2 depende de la P, que inhibe una de las enzimas claves en su síntesis (la ciclo oxigenasa-2), previniendo el inicio del parto en coneja, (Sato et al. 2001) (Figura 2). Además, la actividad colagenolítica en cervix de humano a término aumenta con la aplicación local de PGE2 (Osmers et al. 1991). A su vez, en cervix a término, también se han registrado la activación de la degradación y/o remodelación del colágeno (Rajabi et al. 1991b; Sato et al. 1991; Wolf et al. 1996; Imada et al. 1997 y 2002), modificaciones en el recambio de glucosaminoglicanos y proteoglicanos (Rath et al.

1993; Osmer et al. 1995) y la producción de óxido nítrico (Ledingham et al. 2000) (Figura 2). El mecanismo por el cual el óxido nítrico induce la maduración cervical podría estar mediado por PG (Ledingham et al., 1999) (Figura 2).

A nivel celular, la disminución de la P al parto posibilitaría la muerte celular programada (apoptosis) de fibroblastos y de células del tejido muscular liso (Leppert, 1998) y la invasión de leucocitos (Timmons & Mahendro, 2006) en cervix murino (Figura 2). Además, se han detectado el recambio (Leppert, 1998) y la infiltración de células de la línea blanca sanguínea (Ramos et al. 2000 y 2002; Timmons & Mahendro 2006) que liberan mediadores de la respuesta inflamatoria (Ito et al. 1994; Stjernholm-Vladic et al. 2004a) (Figura 2).

Otros fenómenos dependientes de los esteroides ováricos y vinculados a la dilatación cervical son: la contractilidad cervical (García-Villar et al. 1984) y la permeabilidad del epitelio cervical (Gorodeski, 1998; Gorodeski & Pal, 2000) (Figura 2).

Específicamente en el cervix ovino, se han reportado variaciones en el metabolismo y en la organización de los componentes de la matriz extracelular a medida que progresa la gestación (Fitzpatrick & Dobson, 1979; Fosang et al. 1984; Fosang & Handley, 1988; Owiny et al. 1987; Anderson et al. 1991; Regassa & Noakes, 2001). En particular, se han detectado modificaciones estructurales en las fibras de colágeno de la matriz cervical, asociadas a la disminución de la P y al aumento del E<sub>2</sub> al parto (Fitzpatrick, 1977) (Figura 2). El cervix ovino durante la gestación aumenta de tamaño (Aughey et al. 1983) y de peso (Regassa & Noakes, 2001), pero mantiene su contenido de agua entre 76 y 80% (Regassa & Noakes, 2001). Por otra parte, en cervix de ovejas a término, disminuye la concentración de colágeno (Regassa & Noakes, 2001); a pesar de que no se detectó aumento de la actividad colagenasa a lo largo de la gestación en experimentos *in vitro* (Raynes et al. 1988), ni tampoco modificaciones aparentes en la cantidad relativa de colágeno en experimentos *in vivo* (Aughey et al. 1983; Regassa & Noakes, 2001). Esto ha planteado la interrogante sobre la existencia de modificaciones en la cantidad y/o distribución del conjuntivo cervical y cual es el sistema mediador entre las hormonas esteroideas y la maduración del cervix ovino (Figura 2). Se ha reportado que la extensibilidad del cervix ovino al parto puede ser mediada por PG, puesto que es posible bloquearla utilizando inhibidores de su síntesis (Ledger et al. 1985; Owiny et al. 1987) y se ha vinculado a la PGE<sub>2</sub> como responsable de ésta mediación (Ellwood et al. 1980; Ledger et al. 1983, Wu et al. 2005) (Figura 2). Al parecer, la remodelación del cervix ovino al parto, se basaría fundamentalmente en la formación de glucosaminoglucanos y su efecto sobre la desagregación de las conexiones entre las fibras de colágeno (Fosang et al. 1984; Fosang & Handley, 1988; Regassa & Noakes, 2001), evento regulado por las hormonas esteroideas sexuales a través del sistema Ox/PG (Figura 2). Si bien existen múltiples evidencias de que los fenómenos de remodelación del cervix ovino al parto están regulados por los E y P, la determinación de los RE y RP al parto no se ha realizado todavía en ésta especie, pero se han determinado en humano y rata (Gorodeski & Pal 2000; Ramos et al. 2000; Stygar et al. 2001; Wang et al. 2001; Murata et al. 2003, Stjernholm-Vladic et al. 2004b).

El complejo modelo que se ha propuesto para explicar la secuencia de eventos moleculares, celulares y fisiológicos que llevan a la dilatación cervical en el parto

ovino, podría tener cierta similitud con los mecanismos que operan en las modificaciones cervicales al estro; dado que, previo al mismo, también se registra la inversión en las concentraciones de E/P.

#### 4. Anestro posparto

Dado que, en la oveja, el anestro posparto se solapa con el anestro estacional, el estudio aislado de éste período implica la inducción hormonal de la ovulación durante el anestro estacional y la obtención de partos durante la estación reproductiva. El anestro posparto se caracteriza por la ausencia de ovulación (Rubianes & Ungerfeld, 1993) y la baja secreción pulsátil de LH (Wright et al. 1983; Clarke et al. 1984), al tiempo que involucre el tracto reproductivo. La involución macroscópica del útero y la reasunción de la actividad cíclica ovárica se alcanzan alrededor de la tercera o cuarta semana posparto (Mallampati et al. 1971; Rubianes & Ungerfeld, 1993; Hauser & Bostedt, 2002), al igual que la recuperación de la sensibilidad uterina a las hormonas esteroideas (Tasende et al. 1996). Luego del parto, la reasunción de la actividad reproductiva depende de factores genéticos, ambientales y nutricionales (por revisión ver Novoa, 1984) y se basa en el aumento de la frecuencia de liberación de GnRH (Wise et al. 1990), que promueve un aumento de la pulsatilidad de LH (Schirar et al. 1990) y el reinicio de la ciclicidad ovárica.

Si se tiene en cuenta que el cervix ovino sufre una reducción de al menos 5 veces su peso (Regassa & Noakes, 2001) en aproximadamente tres semanas luego del parto, es de suponer una activa remodelación cervical en éste período. Si bien la infiltración de leucocitos en el cervix ovino se presenta durante la gestación, su actividad (en términos de actividad mieloperoxidasa) es máxima al parto, por lo cual han sido vinculados a la remoción posparto de desechos de la matriz extracelular (Owiny et al. 1995). En el cervix humano, la remodelación del tejido cervical posparto estaría dada por el aumento en la síntesis de colágeno y de pequeños proteoglicanos, con participación de factores de crecimiento (Westergren-Thorsson et al. 1998) y procesos de carácter inflamatorio, como la infiltración celular (Bosquiazzo et al. 2005) y la liberación de citoquinas (Young et al. 2002; Timmons & Mahendroo 2006).

#### 5. Anestro estacional

En el anestro estacional, las concentraciones circulantes de E<sub>2</sub> y P son basales (Tasende et al. 2002) y el crecimiento folicular en ondas es continuo (Souza et al. 1996), pero no se produce la ovulación. Sin embargo, la administración de gonadotrofinas o E<sub>2</sub> puede inducir la ovulación (Karsch & Foster, 1975; Caraty et al. 1989) y existen diversos protocolos desarrollados con esta finalidad (McLeod et al. 1982; Crosby et al. 1991; Fukui et al. 1991; Knights et al. 2001; Tasende et al. 2002; Husein & Kridli, 2003; Knights et al. 2003). La falta de ovulación espontánea se debe a la disminución de la pulsatilidad de la LH, como consecuencia de la alta sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisiario al “feedback” negativo de los E (Karsch et al. 1980). Se ha propuesto que la oveja detecta las variaciones fotoperiódicas a través de la secreción nocturna de melatonina (Malpoux et al. 1989), cuya duración provee la información sobre el ciclo luz-oscuridad. Las variaciones estacionales en la secreción de la melatonina son capaces de modular la liberación de GnRH y el patrón



de secreción de gonadotrofinas. La salida de la estación reproductiva se produce cuando se revierte el “feedback” negativo de los E sobre la secreción de la LH, permitiendo la aparición del pico preovulatorio de LH y la ovulación (Ravindra & Rawlings, 1997).

Hasta el momento, no existe información sobre las características del cervix en ovejas en anestro estacional e inducidas a ovular hormonalmente. Se ha reportado que la profundidad de la canulación cervical podría ser menor en ovejas fuera de la estación reproductiva que durante la misma (Kershaw et al. 2005). En la gata en anestro, el cervix no permite el pasaje de líquido radiopaco y la profundidad de la canulación transcervical es menor que en el estro (Zambelli et al. 2005).

## **Esteroides sexuales y mecanismo de acción**

### **1. Hormonas esteroideas ováricas**

Las hormonas esteroideas ováricas E y P, son sintetizadas a partir del colesterol en los folículos ováricos y en el CL, bajo el control de las gonadotrofinas (por revisión ver Scaramuzzi et al 1993; Driancourt & Thuel, 1998). Éstas hormonas circulan en el plasma sanguíneo unidas débilmente a la albúmina sérica de baja especificidad o firmemente unidas a globulinas específicas (por revisión ver Clark et al. 1992). Son moléculas pequeñas y liposolubles, que atraviesan las membranas celulares libremente. Al no ser acumuladas en las glándulas de síntesis y secreción y dado que el “clearance” de los esteroides es generalmente estable, la concentración sanguínea de la hormona refleja su tasa de síntesis (por revisión ver Edqvist & Forsberg, 1997).

### **2. Receptores de estrógenos y de progesterona (RE y RP)**

Los E y la P ejercen su acción a través de sus proteínas receptoras específicas (RE y RP, respectivamente), presentes en los tejidos blanco. Los RE y RP componen la familia de receptores nucleares, que funcionan como factores de transcripción cuando se unen a la hormona correspondiente y regulan la expresión de determinados genes (Clark & Mani, 1994). Los receptores de esteroides tienen una estructura molecular común, con dominios funcionales diferenciados: el dominio de unión a la hormona, el dominio de unión a sitios específicos del ADN -cuya secuencia definida de bases es llamada elementos de respuesta a esteroides (“SER”)- y el dominio de activación de la transcripción (Tsai & O’Malley, 1994). Los esteroides sexuales se unen a su receptor específico y el complejo hormona-receptor formado se dimeriza, se une a los SER e induce el reclutamiento de factores reguladores de la transcripción, para activar o reprimir aquellos genes hormono-dependientes cuyos productos están involucrados con la acción de las hormonas esteroideas en los procesos reproductivos (Pettersson & Gustafsson, 2001).

En los últimos años, se ha avanzado significativamente en el conocimiento del mecanismo de acción de las hormonas esteroideas ováricas. Se han descubierto diferentes tipos de RE nucleares (Kuiper et al. 1996) y de isoformas de RP nucleares (por revisión ver Conneely et al 2001) y existen actualmente evidencias experimentales que muestran una vía de acción no genómica de las hormonas esteroideas en los tejidos reproductivos (por revisión ver Revelli et al. 1998).

### 3. Subtipos de RE, isoformas de RP y acción no genómica de los esteroides ováricos

Se han descrito dos tipos de RE, denominados RE alfa ( $RE\alpha$ ) y RE beta ( $RE\beta$ ) (Kuiper et al. 1996). Estas proteínas son productos de diferentes genes y poseen alta homología en los dominios de unión al ADN, homología parcial en los dominios de unión a la hormona y escasa homología en los dominios de activación de la transcripción (Kuiper et al. 1996 y 1997; Pettersson & Gustafsson, 2001). Al menos en ratones y ratas, el  $RE\alpha$  es predominante en oviducto, útero y cervix, donde el  $RE\beta$  es indetectable o se expresa muy poco. El  $RE\beta$  es predominante en el ovario, donde el  $RE\alpha$  se expresa en menor cantidad (Kuiper et al. 1997, Couse & Korach, 1999; Wang et al. 1999 y 2000; Mowa & Iwanaga, 2000). Los ratones hembra  $RE\alpha$ -“knockout” -con disrupción del gen  $RE\alpha$ -, exhiben tractos reproductivos hipoplásicos, pobremente diferenciados e insensibles a los E, mientras que los  $RE\beta$ -“knockout” -con disrupción del gen  $RE\beta$ -, presentan problemas de fertilidad pero desarrollan tractos reproductivos aparentemente normales (Couse & Korach, 1999; Hewitt & Korach, 2003). Se ha sugerido que, en algunos tipos celulares y tejidos, las funciones biológicas del  $RE\beta$  podrían ser dependientes de la presencia del  $RE\alpha$  (Couse et al. 1997)

En ovinos, el  $RE\alpha$  fue detectado en el útero, oviducto y cervix de corderas prepúberes (Taylor et al. 2000; Meikle et al. 2001; Morrison et al. 2003) y en útero de ovejas adultas (Ing & Ott 1999; Tasende et al 2005a) y se sugiere que es el predominante y el responsable de la acción estrogénica clásica sobre el tracto reproductivo (por revisión ver Meikle et al. 2004). El  $RE\beta$  fue detectado por inmunohistoquímica en útero de corderas inmaduras (Morrison et al. 2003), pero la expresión del gen  $RE\beta$  no fue detectada en el útero neonatal (Carpenter et al. 2003). En úteros de ovejas adultas fueron detectados transcritos de ambos tipos, siendo el  $RE\alpha$  más abundante que el  $RE\beta$  (Whitley et al. 2000). En el cervix-vagina de rata (Wang et al. 2000) y en cervix humano (Wang et al. 2001), se han descrito ambos subtipos de RE, siendo el  $RE\alpha$  predominante. En cervix humano, el  $RE\alpha$  estaría involucrado en el aumento E-dependiente de la permeabilidad cervical (Gorodeski & Pal, 2000), aunque no se puede descartar que el  $RE\beta$  participe en algunos procesos de remodelación cervical (Wang et al. 2001).

Se han descrito dos diferentes isoformas del RP, llamadas RP-A y RP-B, que derivan de un mismo gen con sitios alternativos de regulación de su expresión (Conneely et al. 2001). Las dos isoformas tienen similares dominios de unión a la hormona y al ADN, pero presentan importantes diferencias en los dominios de activación de la transcripción. El RP-B posee una secuencia de aminoácidos extra en el dominio transcripcional, que ha sido vinculada con una diferente función de activación de la transcripción (Conneely et al. 2001). Los trabajos en útero de ratas con disrupción selectiva de las isoformas -RP-A o RP-B “knockout”-, señalan que el RP-A sería el responsable de la acción antiestrogénica de la P y el RP-B de sus efectos proliferativos. A su vez, el RP-A actuaría como represor y el RP-B como activador de la transcripción del  $RE\alpha$  (Conneely et al. 2001, Conneely et al, 2002). En cervix humano se reportaron ambas isoformas del RP y se describió una regulación diferencial en el proceso del parto (Stjernholm-Vladic et al. 2004b).

Además de la clásica acción genómica vía los receptores nucleares, los E y la P pueden ejercer sus efectos a través de receptores ubicados en la membrana celular (por revisión ver Revelli et al. 1998). Las acciones no genómicas de los esteroides sexuales ováricos, se caracterizan por ser rápidas (segundos a minutos) e independientes de inhibidores de la transcripción (Bramley, 2003; por revisión ver Revelli et al. 1998). A modo de ejemplo, existen evidencias experimentales “*in vitro*” que han reportado como acciones no genómicas la supresión de la secreción de LH pituitaria a partir de los E (Arreguin-Arévalo & Nett 2006) y la inhibición de la unión entre la Ox y su receptor endometrial por parte de la P (Bishop & Stormshak 2006). El debate acerca de la naturaleza y el rol fisiológico de éstos receptores de membrana recién ha comenzado.

#### 4. Regulación de RE y RP

El grado de respuesta de los tejidos efectores a las hormonas está determinado, en parte, por la concentración de la hormona circulante, las características cinéticas de la unión hormona-receptor y concentraciones tisulares del receptor (Clark et al. 1992). Se han utilizado las determinaciones de la afinidad de la unión hormona-receptor y de la concentración de los receptores hormonales como indicadores de la sensibilidad de los tejidos a las hormonas esteroides ováricas (Clark et al. 1992) y de madurez del tracto reproductivo durante el desarrollo (Greco et al. 1993; Gorski & Hou, 1995; Meikle et al. 2004).

La regulación de la concentración de RE y RP en los tejidos efectores la ejercen los propios E y P, estimulando o inhibiendo la expresión de diversos genes, incluidos los genes que codifican a sus propios receptores (Clark et al. 1992; Clark & Mani, 1994). El complejo E-RE es capaz de estimular la expresión de RE y RP, mientras el complejo P-RP inhibe la expresión de ambos receptores esteroideos (Clark et al. 1992; Ing et al. 1993; Clark & Mani 1994).

## B. ANTECEDENTES

### 1. El cervix ovino

El cervix ovino es un órgano único, tubular, alargado y fibroso. En el adulto, mide 5 a 7 cm de largo y 3 a 6 mm de diámetro interno. Los pliegues de la mucosa interfieren la luz del canal cervical, formando 5 a 7 anillos con forma de embudo y el vértice hacia caudal (Halbert et al. 1990a). Los orificios en el vértice de éstos anillos suelen disponerse en forma excéntrica y no coincidente (Figura 1) (Halbert et al. 1990a; Naqvi et al. 2005; Kershaw et al. 2005). La pared cervical comprende 3 capas definidas: la mucosa cervical, el estroma y la muscular (Wergin, 1979; Moré, 1984). La mucosa cervical presenta un epitelio estratificado escamoso hacia caudal y un epitelio columnar simple hacia craneal, el cual se profundiza en forma arborizada, formando criptas que actuarían como reservorio de espermatozoides luego de la eyaculación (Moré, 1984). Por debajo del epitelio cervical, el estroma está constituido por tejido conectivo, en el cual están incluidas células musculares lisas (Moré, 1984). La matriz extracelular del tejido conectivo contiene principalmente colágeno, siendo la proteína mayoritaria del cervix. Se ha reportado que el cervix ovino posee 4 veces más cantidad de colágeno que el útero (Regassa & Noakes, 2001). Además de las diferencias en el tipo de epitelio de la mucosa cervical (Moré, 1984), en el canal cervical se pueden diferenciar dos regiones anátomo-funcionales a lo largo de su eje longitudinal: la región caudal, contigua a la vagina, desde el vestíbulo de entrada hasta el tercer o cuarto anillo y la región craneal, contigua al cuerpo uterino. La primera posee el menor diámetro de luz cervical, siendo la principal barrera para la IA transcervical, mientras que la segunda contiene los anillos más pequeños e indefinidos (Halbert et al. 1990a; Kershaw et al. 2005). Para el orificio cervical caudal se han descrito hasta cinco tipos morfológicos, según la disposición de los pliegues de la mucosa vaginal a su alrededor (Halbert et al. 1990a; Naqvi et al. 2005; Kershaw et al. 2005).

Debido al rol modulador que los E y la P cumplen sobre el desarrollo, la morfología y la funcionalidad del cervix ovino (Fitzpatrick, 1977; Fitzpatrick & Dobson, 1979; Aughey et al. 1983; Fosang et al. 1984; Fosang & Handley, 1988; Owiny et al. 1987; Anderson et al. 1991; Regassa & Noakes, 2001; Ayad et al. 2004), resulta importante conocer su sensibilidad y capacidad de respuesta a éstas hormonas, en términos de afinidad y concentración de los RE y RP cervicales y estudiar de que manera se distribuyen estos receptores en cervix de corderas prepúberes y en ovejas adultas en diferentes estados reproductivos.

### 2. RE y RP en el tracto reproductivo de corderas durante el desarrollo

Los E y la P estimulan la proliferación y diferenciación celular y el desarrollo y crecimiento del tracto reproductivo de las hembras prepúberes (Clark & Mani, 1994). En útero, la expresión del RE $\alpha$  es baja o no detectable en corderas neonatas y una semana después aumenta considerablemente, acompañando las primeras etapas de diferenciación de las glándulas endometriales que se completaría hacia los 2 meses de edad (Taylor et al. 2000). Se han determinado los RE y RP uterinos en corderas desde los 2 a los 9 meses de edad (Garófalo & Tasende 1996, Meikle et al. 1997; Meikle et al. 2000b) y se ha sugerido que los niveles de expresión de los RE y RP

uterinos disminuyen en la medida que la cordera madura (por revisión ver Meikle et al, 2004). Mediante el tratamiento de corderas prepúberes con hormonas esteroideas sexuales, se comprobó que ambos receptores son fisiológicamente activos antes de que comience la actividad cíclica ovárica (Meikle et al. 1997). El tratamiento con P de corderas pre-púberes de 2 meses de edad, aumentó el peso del útero y disminuyó la concentración de RE y RP. El tratamiento con E<sub>2</sub> aumentó el peso del útero (Meikle et al. 1997) y reguló en forma bifásica las concentraciones de RE y RP uterinos, con una primera fase de inhibición, seguida de una fase de recuperación de ambos receptores (Meikle et al. 2000b). La fase inhibitoria de las concentraciones de RE y RP uterinos es un efecto transitorio y concomitante con la inducción de la transcripción de ambos receptores (Meikle et al. 2000b). La disminución temprana de los RE y RP tras el tratamiento estrogénico pudo deberse a la disminución de la síntesis o al aumento de la inactivación o de la degradación de las proteínas receptoras (Zhou et al. 1993; Alarid et al. 1999). Para el RE, ésta última posibilidad fue demostrada a través de la detección del RE $\alpha$  uterinos mediante enzimoimmunoensayos e inmunohistoquímica (Meikle et al. 2000a y b).

En cervix y oviducto de corderas prepúberes, fueron caracterizados los RE y RP, demostrándose que tienen similares constantes de disociación aparente (K<sub>d</sub>) que los uterinos, pero las concentraciones fueron menores (Meikle et al. 2001). Contrariamente a lo que sucedió en útero, en cervix y en oviducto de corderas de 2 meses de edad el tratamiento con P no modificó el peso (Meikle et al. 1997), la concentración de los RE y RP, ni la de sus transcritos (RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm) (Meikle et al. 2001). Esto podría deberse a que el cervix y el oviducto prepúber poseen menor concentración de RP y necesitarían un estímulo previo con E para lograr aumentar los niveles de RP y la capacidad de respuesta a la hormona (Meikle et al. 2001). El tratamiento de corderas prepúberes con E<sub>2</sub> aumentó el peso de ambos órganos (Meikle et al. 1997) y, en el cervix, aumentó los niveles de RE $\alpha$ -ARNm y de RP-ARNm sin registrarse incrementos significativos en las concentraciones de las proteínas receptoras RE y RP (Meikle et al. 2001). En el oviducto de las mismas corderas, no se encontraron variaciones en la concentración de las proteínas receptoras ni en la de sus transcritos tras el tratamiento estrogénico (Meikle et al. 2001). Para dilucidar éstas aparentes contradicciones, es que se plantea estudiar la dinámica de expresión de los RE y RP en cervix y oviducto de corderas tratadas con E<sub>2</sub> a diferentes dosis y tiempos de administración.

### 3. RE y RP en el tracto reproductivo de la oveja adulta

En la oveja adulta ciclando, existe bibliografía concordante que demuestra que las concentraciones de RE y RP en útero son más altas en el estro que en la fase luteal (Miller et al. 1977; Rexroad, 1981a; Ott et al. 1993; Tasende et al. 2005b) y están en acuerdo con las variaciones en las concentraciones de sus respectivos transcritos - RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm- (Ott et al. 1993). Por el contrario, es escasa la información sobre la presencia de RE y RP en cervix de ovejas ciclando. En el único trabajo encontrado, los RE y RP fueron detectados por inmunohistoquímica al estro en el epitelio cervical y no fueron evidentes en la fase luteal (Zhao et al. 1999). Teniendo en cuenta que se encontró solamente un estudio de índole cualitativa y considerando la importante influencia de los E y la P sobre la morfología y funcionalidad del cervix, se plantea determinar las concentraciones tisulares de RE y RP y sus

mecanismos de regulación a lo largo del cervix, en los momentos clave del ciclo estral, como el día de la IA y el de la TE.

Durante la gestación ovina y mediante inmunohistoquímica, se encontraron escasas células RE positivas en el tejido conectivo y escasas células RP positivas en tejido muscular liso y vasos sanguíneos del cervix (Zhao et al. 1999). Hasta el momento no se han encontrado determinaciones cuantitativas de RE y RP en cervix de ovejas durante la gestación y el parto, situaciones en las que el cervix sufre las transformaciones más importantes.

Durante el posparto ovino en estación reproductiva se caracterizaron los RE y RP en cervix, los cuales mostraron valores de Kd similares a los uterinos y sus concentraciones fueron mayores en el posparto tardío que en el temprano, coincidiendo con la presencia de folículos E-activos en los ovarios (Rodríguez-Piñón et al. 2000). Parecería que la recuperación de la sensibilidad del cervix a los E y a la P refleja la involución cervical posparto. Los resultados sugieren que los E producidos por el reinicio de la actividad ovárica en el posparto tardío, inducen la recuperación de los receptores esteroideos en el cervix y estos podrían estar vinculados a los eventos moleculares y celulares de remodelación cervical durante el posparto ovino en estación reproductiva.

En ovejas en anestro estacional, hemos encontrado altas concentraciones de RE y RP en útero (Tasende et al. 2002), que disminuyen tras el tratamiento con P y se recuperan con tratamientos con GnRH para inducir la ovulación (Tasende et al. 2002). Sin embargo, en cervix de ovejas en anestro estacional ninguna o muy poca inmunoseñal de ambos receptores fue reportada (Zhao et al. 1999), coincidiendo con la escasa concentración de RE en cervix de ovejas ovariectomizadas (Tang & Adams 1981 y 1986). La hipótesis de trabajo en este caso, se basa en que los tratamientos hormonales de inducción de la ovulación en ovejas en anestro estacional, podrían modificar la sensibilidad y capacidad de respuesta del cervix a la acción de los E y P. Dado que la obtención de gestaciones mediante IA o TE a contraestación es una tecnología reproductiva de interés, es importante la caracterización y cuantificación de RE y RP y como se distribuyen a lo largo del cervix, en los momentos clave luego de la inducción de la ovulación de ovejas en anestro estacional.

## **C. OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales**

Contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares que modulan la sensibilidad y la capacidad de respuesta del cervix a los esteroides sexuales, aportando conocimientos básicos para el desarrollo de tecnologías apropiadas para la IA y TE en ovinos.

### **Objetivos Específicos**

- Investigar el efecto del tratamiento con E<sub>2</sub>, en el tiempo y a diferentes dosis, sobre la expresión de los RE y RP en cervix de corderas prepúberes y compararlo con el oviducto y el útero.
- Estudiar la expresión de los RE y RP en diferentes regiones cervicales y correlacionarlos con los niveles de estrógenos y progesterona circulantes, durante el ciclo estral de la oveja en estación reproductiva
- Caracterizar la expresión de los RE y RP en diferentes regiones cervicales en ovejas en anestro estacional y durante el estro y la fase luteal temprana inducidos.

## **D. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

Se plantea estudiar la concentración de RE y RP como una medida de la sensibilidad a los E y a la P del cervix ovino, en varias situaciones reproductivas: corderas prepúberes tratadas con E<sub>2</sub>, ovejas adultas ciclando naturalmente y ovejas adultas en anestro estacional e inducidas a ovular. Para comprender como se modula la sensibilidad y la capacidad de respuesta a las hormonas esteroideas sexuales, se utilizó la determinación conjunta de las concentraciones circulantes de E<sub>2</sub> y P y las concentraciones tisulares en cervix de los transcritos de receptores esteroideos (RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm) y de las proteínas receptoras nucleares (RE y RP) correspondientes.

Se realizaron tres diseños experimentales en ovinos Corriedale: Diseño 1, en corderas prepúberes de 3 meses de edad tratadas con E<sub>2</sub>; Diseño 2, en ovejas adultas ciclando durante la estación reproductiva y Diseño 3, en ovejas adultas en anestro estacional e inducidas hormonalmente a ovular. Los experimentos fueron realizados en el Campo Experimental No 1 de la Facultad de Veterinaria del Uruguay (35°LS) y los animales fueron mantenidos con luz natural sobre pasturas nativas. El manejo y el sacrificio de los animales se realizaron con la aprobación del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Veterinaria del Uruguay.

En los tres diseños, se determinaron las concentraciones de RE y RP por ensayos de unión con las hormonas radiactivas correspondientes, ensayos que determinan la afinidad y capacidad de unión de E y P a sus receptores, pero que no discriminan entre los diferentes subtipos del RE (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ) ni entre las isoformas del RP (RP-A y RP-B). Para las determinaciones del RE-ARNm se utilizó una sonda marcada

que detecta específicamente el RE $\alpha$ -ARNm en ovinos, dado que sería el responsable de la acción estrogénica clásica sobre el tracto reproductivo (Meikle et al. 2004) y para el RP-ARNm en corderas prepúberes se utilizó una sonda que no discrimina entre las dos isoformas del RP.

El **Diseño 1** apunta a determinar la dinámica de regulación de RE y RP en cervix a diferentes dosis y tiempos de la administración de E<sub>2</sub>, comparándolo con el oviducto y con el útero. El tratamiento con E<sub>2</sub> consta de 3 dosis de la hormona separadas por 24 h. Los animales se estudiaron, sin tratamiento, con una, dos o tres dosis de E<sub>2</sub> y se sacrificaron a las 12, 24 o 48 h de la última administración. La frecuencia de éste muestreo permite estudiar los efectos del E<sub>2</sub> en cervix y oviducto durante el período de tratamiento.

En el **Diseño 2** se utilizaron ovejas adultas ciclando normalmente, cuyos estros fueron sincronizados para facilitar la obtención precisa de tejido cervical en las etapas que nos interesaban estudiar del ciclo estral: estro (momento de la IA), fase luteal temprana (momento de la TE) y fase luteal tardía. La expresión de RE y RP se estudió en las dos regiones cervicales que se han descrito para el cervix ovino, la región próxima al útero (craneal) y la próxima a vagina (caudal).

El **Diseño 3** se realizó con ovejas adultas en anestro estacional tratadas con P y GnRH para inducir la ovulación. La expresión y regulación de los RE y RP cervicales se estudiaron en el anestro estacional y en la ovulación inducida (momento de la IA) y la fase luteal temprana (momento de la TE); tanto en cervix craneal como en el caudal. Se realizaron dos ensayos, en el primero se trataron ovejas en anestro estacional con P+GnRH, se sacrificaron 1 día luego del tratamiento (ovulación inducida) y se realizaron los respectivos controles (sin tratar, tratadas con P y tratadas con GnRH). En el segundo ensayo, se trataron ovejas en anestro estacional con P+GnRH y se sacrificaron 1 día (momento de la ovulación inducida) o 5 días (fase luteal temprana) luego del tratamiento. Se ha reportado que el tratamiento de inducción a la ovulación mediante un “priming” de P, seguido de microdosis de GnRH y luego un bolo de GnRH, sincroniza el pico preovulatorio de LH y la ovulación, además de producir un alto porcentaje de animales con fases luteales normales (McLeod et al. 1982; Tasende et al. 2002 y 2005a). Esto permitió obtener los cervixes de grupos de animales bajo un status endocrino previamente determinado.



## E. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Diseños experimentales

#### Diseño 1 - Corderas prepúberes tratadas con E<sub>2</sub> (Publicación I)

Veinte corderas Corriedale de 3 meses de edad fueron asignadas aleatoriamente a cinco grupos de tratamiento (n=4 en cada uno). Un grupo no fue tratado (Grupo 0 h, control) y los otros fueron tratados con una (Grupo 12 h y 24 h), dos (Grupo 48 h) o tres (Grupo 72 h) inyecciones de 17β-estradiol (1 μg/kg de peso, im), a intervalos de 24 h. La efectividad de los tratamientos fue confirmada midiendo los niveles de 17β-estradiol plasmáticos por RIA (Meikle et al. 1998). Los animales se sacrificaron a las 0 h (Grupo 0 h), 12 h (Grupo 12 h) y 24 h (Grupo 24 h), 48 h (Grupo 48 h) o 72 h (Grupo 72 h) después de la primera inyección (ver Publicación I).

Al sacrificio, se disecó el tracto reproductivo, se pesaron el cervix y los oviductos, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. En ambos tejidos se determinó la concentración de RE y RP por ensayos de unión con las hormonas tritadas correspondientes y la concentración de los transcriptos -REα-ARNm y RP-ARNm- por hibridización en solución con sondas específicas marcadas.

#### Diseño 2 - Ovejas adultas ciclando en la estación reproductiva

El experimento se desarrolló entre Febrero y Marzo, durante la estación reproductiva de la raza Corriedale en el Uruguay. Cuarenta ovejas que mostraron tener al menos un ciclo de duración normal (16 a 17 días, confirmado con carneros vasectomizados pintados con tiza de color durante 45 días previo al experimento) fueron sincronizadas con 2 dosis de un análogo de PGF2α (150 μg, Glandinex, Universal Lab., Montevideo, Uruguay) separadas por 6 días (modificado por Menchaca et al. 2004). Diez días luego del primer estro, los animales fueron alojados con carneros vasectomizados pintados con tiza de color y los estros fueron detectados cada 12 h. Se seleccionaron 24 animales cuyo estro fue detectado el mismo día (día 0), para ser sacrificados al día 1 (D1), 6 (D6) o 13 (D13) del ciclo (n=8 en cada grupo). En el momento de la selección, los promedios (X±s.e.m, n=24) del peso corporal y de la condición corporal (escala de 0 a 5, 0: emaciada, 5: obesa; Russell et al. 1969) fueron de 39.1±0.85 kg y 2.4±0.1, respectivamente. Inmediatamente luego del sacrificio, el cervix fue disecado, pesado y registradas sus características morfológicas. El orificio cervical caudal fue clasificado morfológicamente de acuerdo con Halbert et (1990a) en 4 tipos de orificio cervical externo diferentes, según la disposición de los pliegues de la mucosa vaginal a su alrededor: dos pliegues que conforman una “cola de pato” (“duckbill”), un pliegue único formando una especie de solapa (“flap”), pliegues apiñados que forman una roseta (“rosette”) y la conformación espiralada (“spiral”). La profundidad de la penetración cervical (penetrabilidad en cm) se obtuvo mediante la introducción de una sonda metálica graduada (diámetro No 14) a través del orificio cervical caudal, con el tracto reproductivo “*ex situ*”. Tras realizar movimientos suaves de rotación y de adelante a atrás, se profundizó la sonda hasta tener clara evidencia de resistencia, anotándose la canulación máxima lograda luego de tres intentos en cada cervix. Los cervices fueron seccionados transversalmente en tercios,

congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C. En los tercios craneal y caudal del cervix se determinó la concentración de RE y RP por ensayos de unión y la del transcripto RE $\alpha$ -ARNm por hibridación en solución, mientras que el tercio medio se almacenó para estudios posteriores.

Para confirmar el estado endocrino, se obtuvieron muestras sanguíneas que inmediatamente fueron centrifugadas y el plasma fue almacenado a -20°C hasta las determinaciones hormonales. Para la determinación de P, la extracción se hizo diariamente desde la segunda dosis de PGF2 $\alpha$  hasta el sacrificio y para la determinación de E<sub>2</sub>, se realizaron ventanas de muestreo con una frecuencia de 8 h durante las últimas 48 h previas al sacrificio. Cuatro ovejas fueron excluidas del estudio por las razones que se detallan a continuación. En el grupo D1, una oveja no mostró signos ovulatorios en la superficie ovárica y sus perfiles de E<sub>2</sub> no fueron compatibles con una fase folicular. En el grupo D6, una oveja presentó un tracto reproductivo hipoplásico y otra fue rechazada por razones sanitarias. En el grupo D13, una oveja presentó perfiles de P compatibles con una luteólisis en el día 12 del estro. El número de animales que finalmente se analizó en cada grupo fue: D1, n=7; D6, n=6 y D13, n=7.

### Diseño 3 - Ovejas adultas en anestro estacional e inducidas a ovular

Se realizaron dos ensayos utilizando ovejas en anestro estacional (Setiembre), confirmado con carneros vasectomizados marcados durante los dos meses previos a los experimentos. En ambos ensayos las ovejas fueron tratadas con un implante intravaginal con 0.33 g de P natural (CIDR, EASI-BREED CIDR, Hamilton, New Zealand) por 10 días y, a partir del retiro del implante, se indujo la ovulación con 9 microdosis de 6.7 ng de un análogo sintético de GnRH (acetato de buserelina, Receptal, Hoechst, Buenos Aires, Argentina) i/v cada dos horas. A las dos horas de la última administración de GnRH, se administró un bolo i/v de 4  $\mu$ g de GnRH (Receptal) (Tasende et al. 2002 y 2005a) para sincronizar el pico preovulatorio de LH e inducir la ovulación. Los animales fueron cateterizados en la yugular para facilitar el tratamiento y la extracción de sangre (Tasende et al. 2002 y 2005a).

#### *Ensayo 1 – Anestro estacional y ovulación inducida*

De un total de 15 animales (peso corporal, X $\pm$ sem, 42.0 $\pm$ 1.2 kg), un grupo de animales se sacrificó sin tratamiento (anestro, grupo A, n=4), otro al retirar el CIDR (Grupo P, n=4) y otros dos grupos a las 24 horas de la administración del bolo de GnRH, uno sin tratamiento previo con P (grupo GnRH, n=4) y el otro con tratamiento previo con P (grupo P+GnRH, n=3) (Tasende et al. 2002).

#### *Ensayo 2 – Ovulación y fase luteal temprana inducidas*

En el segundo ensayo, 11 animales (peso corporal, X $\pm$ sem, 42.5 $\pm$ 1.8 kg) fueron tratados con el mismo protocolo del grupo P+GnRH. Un grupo de animales fue sacrificado 1 día luego de la administración del bolo de GnRH (D1 ind, n=6) (ind: inducido) y otro grupo 5 días luego de la administración del bolo de GnRH (D5 ind, n=5) (Tasende et al. 2005a).

En ambos ensayos, el cervix fue seccionado transversalmente en tercios que fueron pesados y congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En los tercios craneal y caudal del cervix se determinó la concentración de RE y RP por ensayos de unión y la del transcripto RE $\alpha$ -ARNm por hibridización en solución, mientras que el tercio medio se almacenó para estudios posteriores.

Para confirmar el anestro estacional y la efectividad de los tratamientos, se determinaron las concentraciones séricas de LH, E<sub>2</sub> y P, mediante RIAs específicos publicados previamente (Tasende et al. 2002 y 2005a). En ambos ensayos, todas las ovejas tratadas con GnRH mostraron un pico de LH sincronizado, que comenzó 1 h luego de la administración del bolo, llegó al máximo a las 2 h y tuvo una duración de 8 h. En el ensayo 1, las concentraciones séricas de P (nmol/L, X $\pm$ sem) al momento del sacrificio fueron más altas en el grupo P que en los grupos A, GnRH y P+GnRH (5.2 $\pm$ 0.6, 1.3 $\pm$ 0.6, 1.3 $\pm$ 0.3 y 0.6 $\pm$ 0.3, respectivamente) y las de E<sub>2</sub> (pmol/L, X $\pm$ sem) al momento del sacrificio fueron más altas en el grupo GnRH respecto a los grupos A, P y P+GnRH (28.6 $\pm$ 1.7, 7.2 $\pm$ 1.1, 10.2 $\pm$ 0.9 y 12.5 $\pm$ 3.3). En el ensayo 2, las concentraciones de P (nmol/L, X $\pm$ pooled s.e.) al momento del sacrificio fueron más bajas en el día 1 (D1 ind) que en el día 5 (D5 ind) luego de la administración del bolo de GnRH (0.8 $\pm$ 0.3 y 6.5 $\pm$ 0.5, respectivamente), mientras no hubo diferencias de día en las concentraciones de E<sub>2</sub> (pmol/L, X $\pm$ pooled s.e.) al momento del sacrificio (15.0 $\pm$ 2.0 y 17.2 $\pm$ 3.0, respectivamente).

## 2. Determinación de hormonas por R.I.A

Las determinaciones de P y E<sub>2</sub> circulantes de las ovejas de los Diseños 1 y 3 fueron publicadas previamente (Meikle et al. 1998 y Tasende et al. 2002 y 2005a, respectivamente).

En el diseño 2, las concentraciones de P fueron determinadas por radioinmunoanálisis (<sup>125</sup>I-RIA) en fase sólida (Count-A-Count TKPG; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante y previamente validado para plasma ovino (Garófalo & Tasende, 1996). Todas las muestras se determinaron por duplicado en el mismo ensayo, con una sensibilidad de 0.1 nmol/L y un coeficiente de variación intraensayo del 10%. Para las determinaciones de E<sub>2</sub>, las muestras fueron extractadas con éter dietílico y analizadas en duplicado y con un <sup>125</sup>I-RIA (estradiol double antibody, KE2D; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), descrito previamente para plasma ovino (Meikle et al. 1998, Tasende et al. 2002). Todas las muestras fueron procesadas en el mismo ensayo, con una sensibilidad de 4.0 pmol/L y coeficientes de variación intraensayo para tres controles de 25% (7 pmol/L), 8% (44 pmol/L), y 6% (122 pmol/L).

## 3. Determinación de RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm

Se utilizaron ensayos de hibridización en solución para determinar los ARNm específicos para RE $\alpha$  y RP en cervix ovino. La técnica fue validada para diferentes tejidos reproductivos ovinos por Meikle et al. (2000b) y descrita en la Publicación I. Se utilizaron sondas sintetizadas in vitro y marcadas con <sup>35</sup>S-UTP, obtenidas de plásmidos que contenían fragmentos de ADNc de 360 y 314 pb de RE $\alpha$  y RP ovino

respectivamente, generosamente donados por la Dra. Nancy Ing (USA). El tratamiento con enzimas de restricción, EcoRI para el vector que contiene un fragmento del ADNc de oRE $\alpha$  (pGEM4Z) y HindIII para el vector que contiene el ADNc de oPR (pCRII), permitió la síntesis de ARNs anti-sentido usando T7 ARN-polimerasa (Meikle et al. 2000b).

Los ácidos nucleicos totales (ANT) fueron obtenidos digiriendo un homogeneizado de tejido (200-250 mg) con proteinasa K en un buffer conteniendo SDS, seguido por una extracción con fenol-cloroformo. En el Diseño 1, la concentración de ADN en las muestras de ANT fue determinada con el reactivo HD-33258 (Hoechst) y medida fluorométricamente a una longitud de onda de 458 nm (Publicación I). En los Diseños 2 y 3, la concentración de ANT fue determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm. Las muestras de ANT fueron hibridizadas con sondas específicas para RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm marcadas con <sup>35</sup>S-UTP, a dos niveles de concentración diferentes (20,000-40,000 cpm/tubo), en 40  $\mu$ L de buffer (0.6 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.75 mM DTT y 25% de formamida, pH 7.5), bajo dos gotas de aceite de parafina. Se incubaron a 70°C toda la noche para lograr la hibridización y luego se trataron con 1 ml de buffer RNasa (0.3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 40  $\mu$ g RNasa A, 118 U RNasa T1 y 100  $\mu$ g de ADN de timo de ternero, pH 7.5) durante 45 min a 37°C, para digerir el ARN no hibridizado. Los híbridos marcados no digeridos por la RNasa fueron precipitados con ácido tricloroacético (100  $\mu$ L, 6 M) y se colectaron por filtración con papel Whatman. La radioactividad fue determinada en un contador de centelleo líquido. Todas las muestras de un mismo diseño fueron determinadas en el mismo ensayo y por triplicado. Las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm se obtuvieron por regresión lineal y se expresaron en amol/ $\mu$ g de ADN en el Diseño 1 (Publicación I) y en amol/Unidades Relativas de Absorbancia (URA) en los Diseños 2 y 3.

#### 4. Determinación de RE y RP

Los RE y RP se caracterizaron y cuantificaron por ensayos de unión, competencia y saturación con los ligandos radiactivos y no radiactivos correspondientes. Estos ensayos han sido validados para corderas prepúberes y ovejas adultas y en diferentes tejidos (Garófalo & Tasende 1996; Rodríguez-Piñón et al. 2000; Tasende et al. 2005b).

Las muestras de tejido fueron laminadas a -40°C, homogeneizadas en buffer de ensayo (TRIS 50 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 1 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 16.5 mM, Glicerol 10% v/v, pH=7.4) a 0-4°C en un Polytron a 27000 rpm 5 veces durante 5 s, con intervalos de enfriamiento de 1 min. Los homogenizados se centrifugaron a 1000 x g durante 15 min y los sobrenadantes se centrifugaron a 40000 x g por 90 min. En los sobrenadantes (fracción soluble) se ensayaron los RE y RP. La unión total se determinó incubando por duplicado alícuotas de la fracción soluble con 5-6 concentraciones crecientes de (2,4,6,7-<sup>3</sup>H)-estradiol-17 $\beta$ , 86 Ci/mmol (<sup>3</sup>H-E, 0.15 a 15 nM) para RE y de <sup>3</sup>H-ORG 2058 (16 $\alpha$ -ethyl-21-hydroxy-19-nor[6,7,3H]pregn4en-3,20-dione), 40 Ci/mmol (0.25 a 30 nM) para RP. En paralelo, las mismas muestras se incubaron por duplicado, con un exceso de 200 veces de los ligandos no marcados (DES y ORG 2058), para determinar la unión no específica. Luego de 18 horas de incubación, los esteroides libres fueron separados por el método del Carbón-Dextrano (carbón 1% p/v, dextrano 0.1% p/v en buffer de ensayo). La radioactividad

del sobrenadante se midió por centellografía líquida. La unión específica se obtuvo por la diferencia entre la unión total y la inespecífica.

Los resultados se analizaron por el modelo de Scatchard inverso (Braunsberg 1984), estimando la constante de disociación aparente ( $K_d$ , nM) y la concentración de receptores (fmol/mg proteína o fmol/mg de tejido). La concentración de proteínas en la fracción soluble se determinó por el método de Lowry, utilizando BSA como estándar (Lowry et al. 1951).

Con la finalidad de chequear el proceso de extracción de la fracción soluble de las diferentes muestras, se estudió la correlación entre la concentración de proteína en la fracción soluble (mg proteína/ml) con la concentración de tejido en el buffer de ensayo (mg tejido/ml). Se detectaron correlaciones positivas, tanto en el cervix craneal en el Diseño 1 ( $r=0.7291$ ,  $P<0.0003$ ,  $n=20$ ), como en el craneal y caudal en los Diseños 2 ( $r=0.4251$ ,  $P<0.01$ ,  $n=40$ ) y 3 (ensayo 1:  $r=0.5448$ ,  $P<0.0002$ ,  $n=30$  y ensayo 2:  $r=0.6014$ ,  $P<0.005$ ,  $n=22$ ). Esto refleja que el proceso de extracción de la fracción soluble fue similar en todas las muestras de cervix.

## 5. Análisis estadísticos

Los pesos de los órganos, las concentraciones de RE, RP, RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm fueron analizadas por ANOVA aplicando el modelo general lineal para el análisis de varianzas (GLM Procedure, Statistical Analysis System, SAS, Institute Inc., 1998, Cary, NC, USA). El modelo estadístico incluyó los efectos de grupo en los Diseños 1, 2 y 3, de tejido (oviducto vs. cervix) en el Diseño 1 y de región del cervix (craneal vs. caudal) en los Diseños 2 y 3. Para establecer relaciones entre las variables, se utilizó el test de correlación (Statgraphics Plus for Window 2.0, Statistical Graphics Corp., 1994).

En el Diseño 2, el tipo de orificio cervical externo y la penetrabilidad cervical fueron analizados por el mismo modelo de ANOVA (GLM Procedure, SAS) incluyendo el efecto de grupo (día del ciclo). Las concentraciones circulantes de E<sub>2</sub> y P fueron analizados por ANOVA (Mixed Procedure, SAS) para muestras repetidas, incluyendo los efectos de tiempo de muestreo, grupo (día del ciclo) y la interacción entre ellos.

Para establecer correlaciones (Statgraphics Plus for Window 2.0, Statistical Graphics Corp., 1994) entre el peso del cervix, las concentraciones cervicales de RE, RP, RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm con las hormonas circulantes, se utilizó el promedio de las concentraciones de cada hormona (E<sub>2</sub> y P) en las 48 h previas al momento del sacrificio en el Diseño 2 y las concentraciones al momento del sacrificio en el Diseño 3.

Los resultados se expresan como la media de mínimos cuadrados  $\pm$  error estándar de la media ( $X \pm \text{sem}$ ), tomando como nivel de significación  $P<0.05$ .

## F. RESULTADOS

### 1. Corderas prepúberes tratadas con E<sub>2</sub> (Diseño 1, Publicación I)

No hubo diferencias significativas en los pesos corporales promedios (pc, kg) de las corderas en los diferentes grupos (Tabla I). Los pesos relativos al peso corporal (mg/kg pc) del cervix y los oviductos aumentaron respecto a los controles a las 12 h de la primera dosis de E<sub>2</sub> y se mantuvieron altos durante todo el experimento (Tabla I)

**Tabla I** - Peso corporal y pesos del cervix y los oviductos relativos al peso corporal, de corderas prepúberes tratadas con una, dos o tres dosis de E<sub>2</sub> cada 24 h (X±sem, n=4 en cada grupo).

Horas desde la primera dosis, número de dosis	Peso corporal (pc) (kg)	Cervix (mg/kg pc)	Oviducto (mg/kg pc)
0 h, control	17.9±2.0 a	76.4±17.4 a	18.0±2.7 a
12 h, una dosis	16.9±1.4 a	173.7±24.0 b	28.3±3.4 b
24 h, una dosis	17.0±1.0 a	162.2±24.4 b	26.5±2.4 b
48 h, dos dosis	18.1±1.3 a	151.2±19.2 b	30.2±0.8 b
72 h, tres dosis	17.2±0.9 a	170.7±23.7 b	32.5±3.0 b

Las letras indican diferencias significativas (P<0.02).

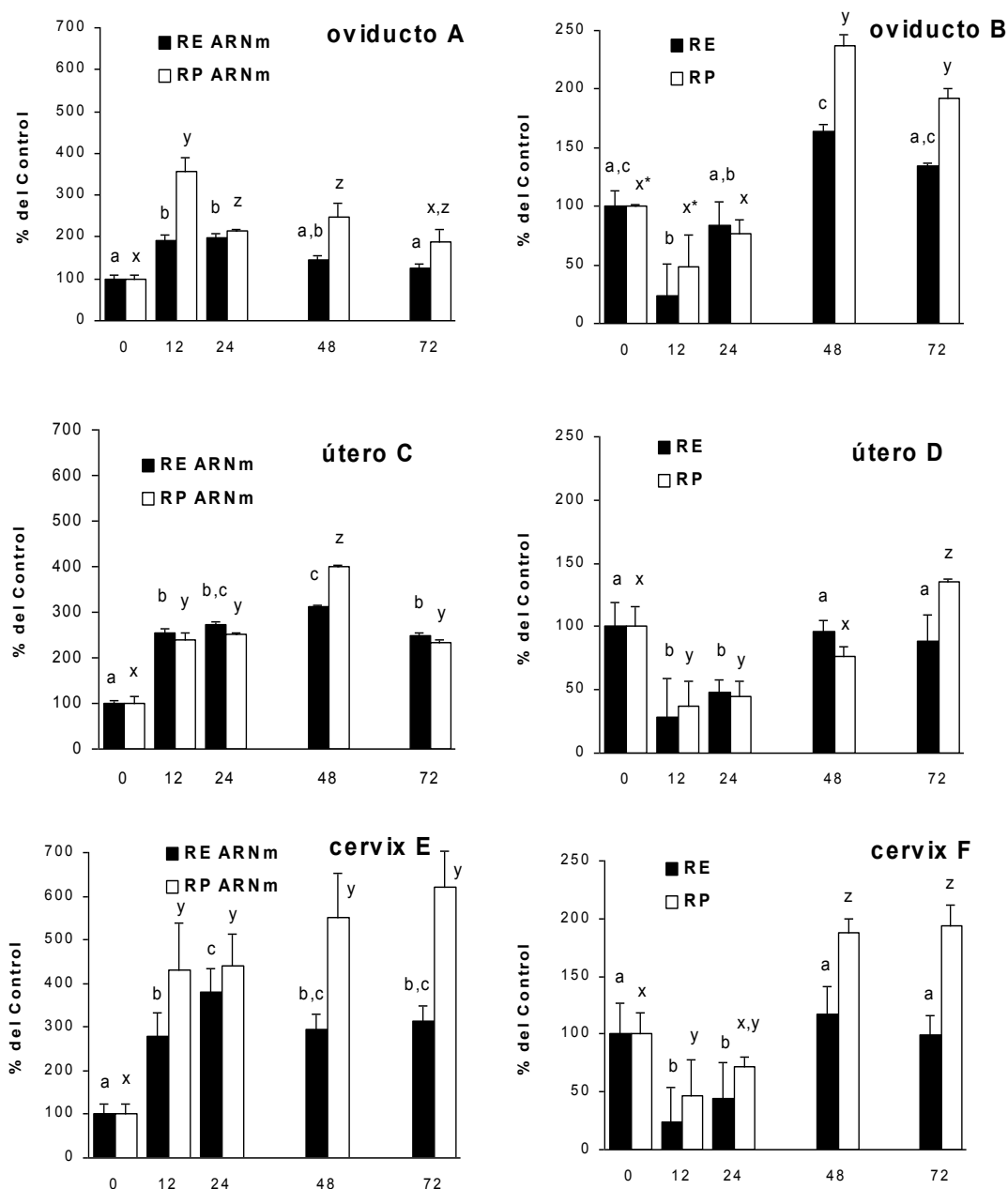
En las corderas no tratadas (grupo 0 h, control), las concentraciones de REα-ARNm y de RP-ARNm (amol/μg ADN) y de las proteínas receptoras RE y RP (fmol/mg proteína), no fueron diferentes entre cervix y oviducto (Tabla II).

**Tabla II** - Concentraciones (X±sem) de REα-ARNm, RP-ARNm, RE y RP en cervix y oviducto de corderas prepúberes sin tratar (0 h, control).

	REα-ARNm (amol/μg ADN)	RP-ARNm (amol/μg AND)	RE (fmol/mg prot.)	RP (fmol/mg prot.)
Cervix	32.7±7.9	1.51±0.37	569±155	524±97
Oviducto	48.0±4.2	3.16±0.27	334± 44	436± 4

Las concentraciones de REα-ARNm y RP-ARNm (amol/μg ADN) fueron afectadas por el tratamiento con E<sub>2</sub> en cervix y oviducto (P<0.001) y por la interacción entre el tratamiento y tipo de órgano (P<0.05). La primera dosis de E<sub>2</sub> incrementó las concentraciones de REα-ARNm y RP-ARNm a las 12 h en cervix y oviducto (Figura 3, A y E). La máxima inducción de REα-ARNm se encontró a las 24 h en cervix y a las 12 h en oviducto y la de RP-ARNm se detectó a las 12 h en ambos tejidos (Figura 3, A y E). En el cervix, las concentraciones de REα-ARNm y RP-ARNm permanecieron altas en todos los tiempos estudiados. En el oviducto, se encontraron

incrementos en las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm solo a la primera dosis E<sub>2</sub> (grupos 12 h y 24 h) y de RP-ARNm a la primera y segunda dosis (grupos 12 h, 24 h y 48 h) (Figura 3, A y E).



**Figura 3** – Concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm (paneles izquierdos) y de RE y RP (paneles derechos) expresadas como porcentaje de los controles en oviducto (A y B), útero (C y D) y cervix (E y F) de corderas control (0), y corderas tratadas con una (12 y 24), dos (48), o tres (72) inyecciones de E<sub>2</sub> (n=4 en cada grupo). Los tejidos fueron obtenidos 0, 12, 24, 48 o 72 h luego de la primera inyección. Las barras (X $\pm$ sem) marcadas con distintas letras difieren con una P<0.05, dentro de cada serie y las marcadas con asterisco tienden a ser diferentes con una P=0.09. Los datos de oviducto y cervix son del Diseño 1 (Publicación I) y los datos de útero fueron tomados de Meikle et al. 2000b.

En los ensayos de unión, los valores de Kd (X $\pm$ sem, nM) para RE y RP no fueron diferentes para los diferentes tratamientos ni entre ambos tejidos (0.44 $\pm$ 0.23 y

0.82±0.24, n=20, en cervix; 0.46±0.12 y 0.56±0.19, n=20, en oviducto; para RE y RP respectivamente).

Las concentraciones de RE y RP (fmol/mg proteína) en cervix y oviducto, disminuyeron luego de la primera inyección de E<sub>2</sub> (a las 12 h) y posteriormente aumentaron significativamente (P<0.001) (Figura 3, B y F). Las concentraciones de RE volvieron a ser similares a las de los controles, aunque antes en el oviducto (24 h de la primera inyección) que en el cervix (48 h de la primera inyección). En ambos tejidos, las concentraciones de RP llegaron a ser el doble respecto a los controles a las 48 y 72 h de la primera inyección.

Los resultados obtenidos en el útero (Meikle et al 2000b), fueron incorporados a la tesis (Figura 3, C y D) a los efectos de compararlos con los de cervix y oviducto. En útero, las variaciones en las concentraciones de transcritos (RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm) y de proteínas receptoras (RE y RP), tuvieron perfiles diferentes a los encontrados tanto en cervix como en oviducto.

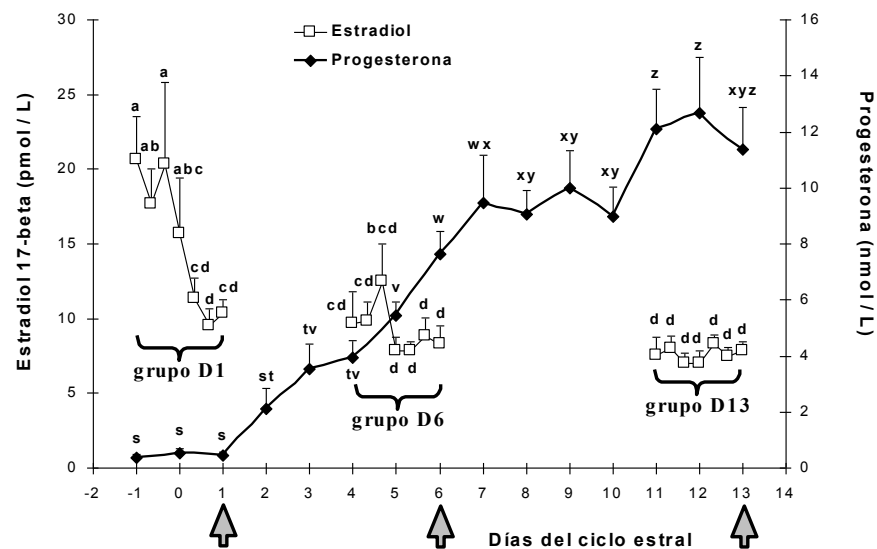
## 2. Ovejas adultas ciclando en la estación reproductiva (Diseño 2)

### *Determinaciones hormonales*

Las concentraciones plasmáticas de P y de E<sub>2</sub> se muestran en la Figura 4. Las concentraciones de P (nmol/L) fueron basales en el día 0 y aumentaron paulatinamente desde el día 3, llegando al máximo entre los días 11 y 13. Las concentraciones de E<sub>2</sub> (pmol/L) fueron máximas en los días -1 y 0, manteniéndose en niveles bajos el resto de los días. Los perfiles sanguíneos de las hormonas confirman para cada grupo, la etapa del ciclo estral en que fueron sacrificados. Los cervices del grupo D1 estuvieron expuestos a bajas concentraciones de P y concentraciones preovulatorias de E<sub>2</sub> (fase folicular). Los cervices del grupo D6 estuvieron expuestos a concentraciones crecientes de P y bajas de E<sub>2</sub> (fase luteal temprana). En el grupo D13, los cervices se obtuvieron luego de la exposición a concentraciones máximas de P y basales de E<sub>2</sub> (fase luteal tardía).

La concentración de P (nmol/L) promedio de las 48 h previas al sacrificio, fue diferente entre los días del ciclo estral (P<0.0001), siendo menor en el grupo D1 y mayor en el D13 (X±sem, 0.4±0.1, 7.8±0.6 y 12.0±1.5 para los grupos D1, n=7; D6, n=6 y D13, n=7; respectivamente). Las concentraciones de E<sub>2</sub> (pmol/L), promedio durante las 48 h previas al sacrificio fueron (X± sem): 14.2±1.8, 9.3±1.0 y 7.6±0.2 en los grupos D1, n=7; D6, n=6 y D13, n=7; respectivamente, siendo mayor en el grupo D1 que en los otros grupos (P<0.005).





**Figura 4** – Concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> (pmol/L) y P (nmol/L) en ovejas durante el ciclo estral, (día 0=día del estro). Las ovejas fueron sacrificadas 1 (D1), 6 (D6) o 13 (D13) días (flechas) luego del estro. Para los niveles de P, hasta el día 1, n=20; hasta el día 6, n=13 y hasta el día 13, n=7. Para los niveles de E<sub>2</sub>; en el grupo D1, n=7; en el D6, n=6 y en el D13, n=7. Para cada hormona, los valores (X±sem) marcados con distintas letras indican diferencias significativas (P<0.05).

#### *Aspectos morfológicos, penetrabilidad y peso del cervix*

En todas las ovejas estudiadas se encontraron solo dos tipos morfológicos de orificio cervical externo: tipo “flap” (n=14) y tipo “rosette” (n=6), que se distribuyeron homogéneamente entre los días estudiados, no encontrándose diferencias durante el ciclo estral. No se encontraron diferencias en la penetrabilidad cervical (cm) entre los días del ciclo estral (X±sem, 1.5±0.3, 2.2±0.4 y 1.9±0.4, para los grupos D1, n=7; D6, n=6 y D13, n=7; respectivamente) y tampoco entre los tipos de orificio cervical externo. El peso del cervix (g) fue mayor en el día 1 del ciclo estral (grupo D1, n=7) que en los días 6 y 13 (grupos D6, n=6 y D13, n=7) (X±sem, 10.4±0.4, 7.4±0.5 y 7.9±0.9, respectivamente). El peso del cervix no se correlacionó con las concentraciones circulantes de E<sub>2</sub> y se correlacionó negativamente con las de P (r= -0.6278, P<0.005, n=20).

#### *Determinaciones de REα-ARNm*

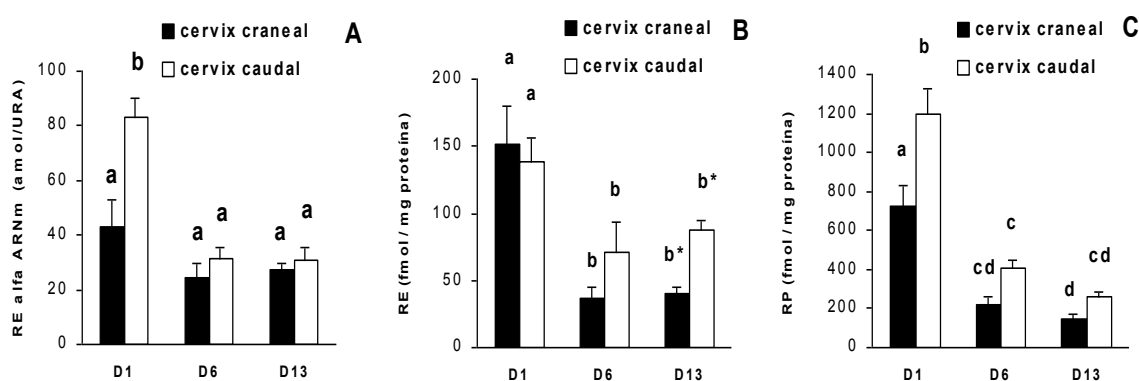
Los niveles de REα-ARNm (amol/URA) fueron afectados por el día del ciclo estral (P<0.0001), por la región cervical (P<0.005) y por la interacción entre ambos (P<0.05) (Figura 5, A). La concentración de REα-ARNm no varió en el cervix craneal, pero en el caudal fue mayor en el día 1 del ciclo estral (grupo D1, n=7), respecto a los otros días (grupos D6, n=6 y D13, n=7). El cervix craneal tuvo menor concentración que el caudal. Las concentraciones de REα-ARNm en el cervix craneal no se correlacionaron con los niveles de hormonas circulantes. En el cervix caudal, las concentraciones de REα-ARNm se correlacionaron positivamente con las

concentraciones de  $E_2$  ( $r=0.5794$ ,  $P<0.01$ ,  $n=20$ ) y negativamente con las de  $P$  ( $r=-0.7381$ ,  $P<0.01$ ,  $n=20$ ).

### Determinaciones de RE y RP

En todas las muestras de cervix se detectó un único sitio de unión, saturable y de alta afinidad para  $E$  o  $P$ . Los valores de  $K_d$  ( $X\pm sem$ , nM) para RE ( $0.56\pm 0.06$ ,  $n=40$ ) y RP ( $1.04\pm 0.07$ ,  $n=40$ ) no fueron diferentes entre los días del ciclo estral ni entre las regiones cervicales.

La concentración de RE (fmol/mg proteína) fue afectada por el día del ciclo estral ( $P<0.0001$ ) y se muestra en la Figura 5, B. Las concentraciones de RE fueron mayores en el día 1 del ciclo estral (grupo D1,  $n=7$ ) que en los otros días (grupos D6,  $n=6$  y D13,  $n=7$ ), para ambas regiones cervicales. En el día 13 del ciclo estral (D13), los niveles de RE en el cervix craneal tendieron a ser menores respecto al caudal ( $P=0.054$ ). Cuando la concentración de RE se expresa en fmol/mg tejido, la influencia de la región cervical es significativa ( $P<0.0001$ ), siendo menor en el cervix craneal respecto al caudal, en todos los días del ciclo. En el cervix craneal, las concentraciones de RE no se correlacionaron con las de  $E_2$  y tendieron a correlacionarse negativamente con las concentraciones de  $P$  ( $r=-0.4292$ ,  $P=0.059$ ,  $n=20$ ). En el cervix caudal, los niveles de RE se correlacionaron positivamente con las concentraciones de  $E_2$  y negativamente con las de  $P$  ( $r=0.5133$  y  $r=-0.6938$ ,  $P<0.03$ ,  $n=20$ , respectivamente).



**Figura 5** – Concentraciones de REα-ARNm (amol/URA) (A), RE (fmol/mg proteína) (B) y RP (fmol/mg proteína) (C) en cervix craneal y caudal de ovejas adultas ciclando. Los tejidos se obtuvieron 1 (D1,  $n=7$ ), 6 (D6,  $n=6$ ) o 13 (D13,  $n=7$ ) días luego del estro (día = 0). Para cada variable, los valores ( $X\pm sem$ ) marcados con distintas letras difieren con una  $P<0.05$  y las marcadas con un asterisco tienden a ser diferentes con una  $P=0.054$ .

La concentración de RP (fmol/mg proteína) fue afectada por el día del ciclo estral ( $P<0.0001$ ) y la región cervical ( $P<0.0004$ ), como se muestran en la Figura 5, C. Las concentraciones de RP fueron mayores en el día 1 del ciclo estral (grupo D1,  $n=7$ ) respecto a los días 6 y 13 (grupos D6,  $n=6$  y D13,  $n=7$ ) y fueron menores en el cervix craneal respecto al caudal. Cuando la concentración de RP fue expresada en fmol/mg tejido, la influencia de la interacción entre día del ciclo y región cervical es significativa ( $P<0.0003$ ). Las concentraciones de RP se correlacionaron positivamente con las de  $E_2$  ( $r=0.6147$ ,  $P<0.005$ ,  $n=20$ ) y negativamente con las de  $P$  ( $r=-0.7626$ ,  $P<0.0001$ ,  $n=20$ ) en el cervix craneal y en forma similar en el caudal ( $r=0.4367$ ,  $P=0.058$ ,  $n=20$  y  $r=-0.7037$ ,  $P<0.0005$ ,  $n=20$ , respectivamente).

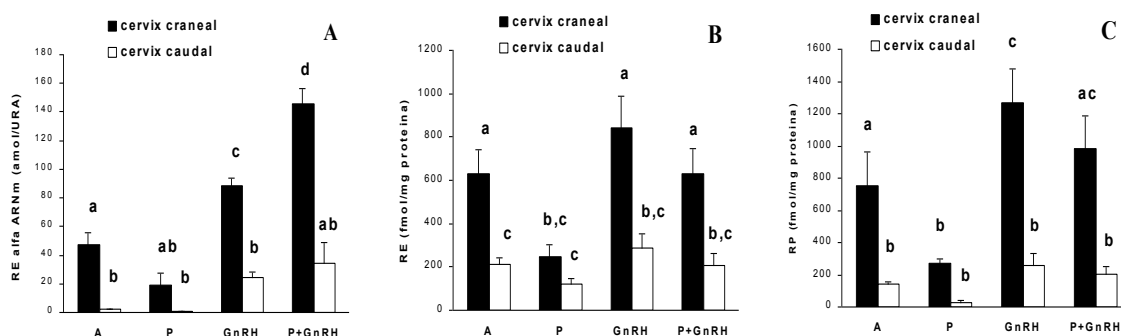
Las concentraciones de RE (fmol/mg proteína) se correlacionaron positivamente con las de RE $\alpha$ -ARNm (amol/URA) en el cervix caudal ( $r=0.5216$ ,  $P<0.02$ ,  $n=20$ ), pero no en el craneal. Las concentraciones de RE se correlacionaron con las de RP en cervix craneal y caudal ( $r=0.5223$ ,  $n=20$  y  $r=0.7983$ ,  $n=20$ , respectivamente,  $P<0.02$ ), independientemente de la forma de expresión utilizada (fmol/mg proteína o fmol/mg tejido).

### 3. Ovejas adultas en anestro estacional e inducidas a ovular (Diseño 3)

#### *Ensayo 1 – Anestro estacional y ovulación inducida*

El peso del cervix (g) ( $X\pm sem$ ) no fue diferente entre los grupos de tratamiento ( $7.42\pm 0.61$ ,  $n=15$ ) y se correlacionó positivamente con las concentraciones circulantes de E<sub>2</sub> (pmol/L) al momento del sacrificio ( $r=0.5886$ ,  $p<0.001$ ,  $n=15$ ), pero no con las de P (nmol/L).

La concentración de RE $\alpha$ -ARNm (amol/URA) fue afectada por los tratamientos ( $P<0.0001$ ), por la región cervical ( $P<0.0001$ ) y por la interacción entre ambos ( $P<0.004$ ) (Figura 6, A). En el cervix craneal, el tratamiento con GnRH (grupos GnRH y P+GnRH) aumentó las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm respecto a los grupos A y P y el grupo P+GnRH tuvo mayor concentración que el grupo GnRH. En el cervix caudal, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm entre los grupos. El cervix craneal tuvo mayores concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm que el cervix caudal. No hubo correlación entre las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm (amol/URA) de ninguna de las regiones cervicales y las concentraciones de E<sub>2</sub> o P al momento del sacrificio.



**Figura 6** – Concentraciones ( $X\pm sem$ ) de RE $\alpha$ -ARNm (amol/URA, A), RE (fmol/mg proteína, B) y RP (fmol/mg proteína, C) en cervix craneal y caudal de ovejas en anestro estacional (grupo A,  $n=4$ ), tratadas con P (grupo P,  $n=4$ ), GnRH (grupo GnRH,  $n=4$ ) o P+GnRH (grupo P+GnRH,  $n=3$ ). Los animales fueron sacrificados al inicio del experimento (grupo A), al retirar el CIDR (grupo P) y a las 24 h del bolo de GnRH (grupos GnRH y P+GnRH). Para cada variable, las columnas con distintas letras difieren con una  $P<0.05$ .

En todas las muestras de cervix se detectó un único sitio de unión, saturable y de alta afinidad para cada hormona. Los valores de Kd ( $X\pm sem$ , nM) para RE y RP no fueron diferentes entre los grupos ni entre las regiones cervicales, siendo  $0.42\pm 0.06$ ,  $n=30$  y  $1.05\pm 0.07$ ,  $n=30$ , respectivamente.

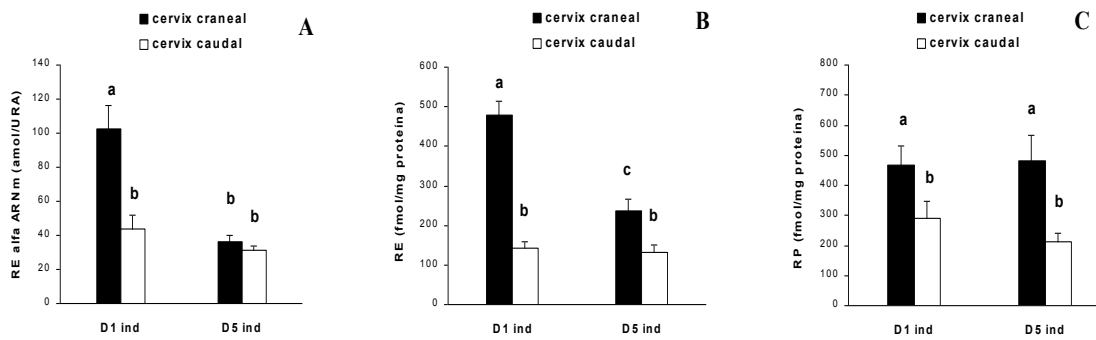
La concentración de RE (fmol/mg proteína) fue afectada por los grupos de tratamiento ( $P < 0.002$ ) y por la región cervical ( $P < 0.0001$ ) (Figura 6, B). En el cervix craneal, el grupo P tuvo menor concentración de RE que los otros grupos. En el cervix caudal, los tratamientos no afectaron la concentración de RE. El cervix craneal tuvo mayor concentración de RE que el cervix caudal. La concentración de RP (fmol/mg proteína) fue afectada por los grupos de tratamiento ( $P < 0.001$ ), por la región cervical ( $P < 0.0001$ ) y por la interacción entre ambos ( $P < 0.05$ ) (Figura 6, C). En el cervix craneal, el grupo P tuvo la menor concentración de RP y el grupo GnRH tuvo mayor concentración que los grupos A y P. En el cervix caudal, los tratamientos no afectaron la concentración de RP. El cervix craneal tuvo mayor concentración de RP que el cervix caudal.

Independientemente de la región cervical, las concentraciones de RE y de RP (fmol/mg proteína) se correlacionaron positivamente con las de  $E_2$  (pmol/L) al momento del sacrificio ( $r = 0.3857$ ,  $P < 0.04$ ,  $n = 30$ , para RE y  $r = 0.4200$ ,  $P < 0.02$ ,  $n = 30$ , para RP) y negativamente con las de P (nmol/L) ( $r = -0.3982$ ,  $P < 0.03$ ,  $n = 30$ , para RE y  $r = -0.4010$ ,  $p < 0.03$ ,  $n = 30$ , para RP). En ambas regiones cervicales, las concentraciones de RE (fmol/mg proteína) se correlacionaron positivamente con las de  $RE\alpha$ -ARNm (amol/URA) y con las de RP (fmol/mg proteína) ( $r = 0.7171$ ,  $n = 30$  y  $r = 0.9608$ ,  $n = 30$ , respectivamente,  $P < 0.0001$ ). Los mismos resultados se obtienen si las concentraciones de RE y RP son referidas a la cantidad de proteína (fmol/mg proteína) o a la cantidad de tejido (fmol/mg tejido).

### *Ensayo 2 – Ovulación y fase luteal temprana inducidas*

El peso del cervix (g) ( $X \pm sem$ ) no varió entre los días del ciclo inducido ( $7.76 \pm 0.65$ ,  $n = 11$ ) y tampoco se correlacionó con las concentraciones circulantes de  $E_2$  (pmol/L) ni de P (nmol/L) al momento del sacrificio.

La concentración de  $RE\alpha$ -ARNm fue afectada por el día ( $P < 0.0001$ ), por la región cervical ( $P < 0.0003$ ) y por la interacción entre ambos ( $P < 0.004$ ) (Figura 7, A). En el cervix craneal, las concentraciones de  $RE\alpha$ -ARNm fueron mayores al día 1 (D1 ind) que al día 5 (D5 ind) del tratamiento. En el cervix caudal, no hubo diferencia entre los días. El cervix craneal tuvo mayor concentración de  $RE\alpha$ -ARNm que el cervix caudal. Las concentraciones de  $RE\alpha$ -ARNm (amol/URA) no se correlacionaron con las concentraciones circulantes al momento del sacrificio de ninguna de las dos hormonas esteroideas medidas ( $E_2$  y P), en ninguna de las dos regiones cervicales.



**Figura 7** – Concentraciones ( $X \pm \text{sem}$ ) de RE $\alpha$ -ARNm (amol/URA, A), RE (fmol/mg proteína, B) y RP (fmol/mg proteína, C) en cervix craneal y caudal de ovejas en anestro estacional inducidas (ind) a ovular con P+GnRH, sacrificadas 1 (D1 ind, n=6) o 5 (D5 ind, n=5) días luego del bolo de GnRH. Para cada variable, las columnas con distintas letras difieren con una  $P < 0.05$ .

En todos los cervixes se detectó un único sitio de unión, saturable y de alta afinidad para cada hormona, cuyos valores de  $K_d$  ( $X \pm \text{sem}$ , nM) no fueron diferentes entre los días ni entre las regiones cervicales, siendo  $0.73 \pm 0.08$ ,  $n=22$  y  $0.95 \pm 0.06$ ,  $n=22$ , para RE y RP respectivamente.

La concentración de RE fue afectada por el día ( $P < 0.0001$ ), por la región cervical ( $P < 0.0003$ ) y por la interacción entre ambos ( $P < 0.002$ ) (Figura 7, B). En el cervix craneal, la concentración de RE fue mayor al día 1 (D1 ind) que al día 5 (D5 ind) del tratamiento. Por el contrario, en el cervix caudal no hubo diferencias entre los días. El cervix craneal tuvo mayor concentración de RE que el cervix caudal. La concentración de RP (fmol/mg proteína) fue afectada solo por la región cervical ( $P < 0.0005$ ) (Figura 7, C) y el cervix craneal tuvo mayor concentración de RP que el caudal.

Las concentraciones de RE y de RP (fmol/mg proteína) no se correlacionaron con las concentraciones circulantes de  $E_2$  ni de P al momento del sacrificio, en ninguna de las dos regiones cervicales. Independientemente de la región cervical, las concentraciones de RE (fmol/mg proteína) se correlacionaron positivamente con las de RE $\alpha$ -ARNm (amol/URA) y con las de RP (fmol/mg proteína) ( $r=0.7591$ ,  $P < 0.005$ ,  $n=22$  y  $r=0.5877$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n=22$ , respectivamente). Los mismos resultados se obtienen si las concentraciones de RE y RP son referidas a la cantidad de proteína (fmol/mg proteína) o a la cantidad de tejido (fmol/mg tejido).

## F. DISCUSIÓN

En la serie de experimentos que comprenden ésta tesis se determinaron los efectos de la administración de  $E_2$  sobre la expresión de los RE y RP en cervix de corderas prepúberes y se identificaron y cuantificaron por primera vez los RE y RP en cervix de ovejas adultas durante el ciclo estral en la estación reproductiva y de ovejas adultas en anestro estacional e inducidas a ovular. Los resultados en su conjunto demuestran, a través de la detección de receptores nucleares específicos, que el cervix ovino es un órgano blanco de la acción genómica de los E y la P.

En el cervix de corderas prepúberes y de todas las ovejas adultas estudiadas en diferentes condiciones reproductivas, se encontraron bajos valores de  $K_d$ , que son indicativos de receptores esteroideos de alta afinidad y capaces de responder a bajas concentraciones de E y P. Los valores de  $K_d$  para cada receptor se mantuvieron dentro del rango previamente descrito para útero, oviducto, cervix e hipófisis de ovejas inmaduras y adultas (Garófalo & Tasende, 1996; Tasende et al. 1996; Meikle et al. 1997; Rodríguez Piñón et al. 2000; Meikle et al. 2000b; Meikle et al. 2001; Tasende et al. 2002; Tasende et al. 2005a; Tasende et al. 2005b), sugiriendo que, desde el punto de vista de la unión hormona-receptor, se trata de las mismas proteínas receptoras. Los valores de  $K_d$  de RE y RP no variaron en corderas prepúberes con diferentes tratamientos estrogénicos (Publicación I), en ovejas adultas durante el ciclo estral, ni en ovejas en anestro estacional con tratamientos de inducción de la ovulación. Esto indicaría que la sensibilidad y capacidad del cervix ovino de responder a la acción de los E y la P, está regulada a través de las variaciones en las concentraciones tisulares de RE y RP y no a través de modificaciones en la afinidad de la unión hormona-receptor.

En cervix de corderas prepúberes (Diseño 1, Publicación I), el tratamiento con  $E_2$  aumentó en forma importante las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm y de RP-ARNm, que se mantuvieron elevadas durante todo el experimento, mientras que en oviducto el aumento fue menor, más temprano y transitorio. En útero de las mismas corderas (Meikle et al. 2000b), fue reportado que el estímulo de la transcripción de RE $\alpha$ -ARNm y de RP-ARNm fue transitorio, pero más tardío que en oviducto; siendo una respuesta intermedia entre la del oviducto y la del cervix (Figura 3, A, C y E). Por otra parte, el tratamiento estrogénico produjo una regulación bifásica de las concentraciones de RE y RP, tanto en cervix y en oviducto, como en útero (Meikle et al. 2000b) de corderas prepúberes (Figura 3, B, D y F). La fase inhibitoria inicial de los RE y RP pudo deberse a una disminución en la síntesis, a un incremento en la degradación y/o en la inactivación o procesamiento de los receptores esteroideos. Dado que las concentraciones de RE y RP fueron mínimas cuando las de RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm fueron elevadas (Figura 3), la disminución de las proteínas receptoras podría deberse a un mecanismo de inhibición post-transcripcional y/o a un mecanismo E-dependiente de degradación de las proteínas receptoras (Zhou et al. 1993; Alarid et al. 1999). Por otra parte, se ha detectado una disminución aún más temprana en la tasa de transcripción del RE $\alpha$ -ARNm en útero de la rata, entre 6 h (Sahlin et al. 1994) y 8 h (Zhou et al. 1993) luego de una inyección de  $E_2$ , por lo cual una inhibición transcripcional temprana del RE $\alpha$  no se puede descartar en nuestros experimentos en corderas prepúberes. Se ha propuesto que la fase de disminución de la concentración de RE en respuesta a E, puede ser parte de un mecanismo de retro-inhibición (“homologous down-regulation”) con la finalidad de limitar la duración

del estímulo estrogénico en las células blanco (Meikle et al. 2004). Es de destacar que también se demostró en el tracto reproductivo una fase de disminución de la concentración de RP en respuesta a los E<sub>2</sub> (“heterologous down-regulation”). Estos resultados están en acuerdo con experimentos previos en útero de corderas (Meikle et al 1997) y pueden ser consecuencias de la disminución previa de RE -del que RP es dependiente- o a un efecto inhibitorio directo sobre RP, como ha sido descrito para oviducto de conejo (Hyde et al. 1989) y útero de rata (Parczyk et al. 1997). La inducción de la transcripción de RE $\alpha$  y RP a lo largo del tracto reproductivo (Figura 3), sugiere que la fase de recuperación de las concentraciones de las proteínas receptoras es debida a la síntesis de nuevos RE y RP, mas que al reciclaje de receptores ya utilizados o procesados. Estos resultados en corderas de tres meses de edad coinciden parcialmente con los reportados en cervix de corderas de dos meses de edad tratadas con E<sub>2</sub>, donde se encontraron estímulos de la transcripción de RE $\alpha$  y RP, que no se acompañaron con incrementos en las concentraciones de las proteínas receptoras RE y RP (Meikle et al. 2001). Sin embargo, en las corderas de dos meses de edad, los tejidos reproductivos fueron obtenidos 24 h luego de la tercera dosis diaria de E<sub>2</sub> y no fue posible detectar variaciones tempranas en la expresión de los receptores, como fueron detectadas en el presente trabajo. En conjunto los resultados sugieren que los efectos de los estrógenos sobre la expresión de RE y RP tanto en cervix, como en útero y oviducto de corderas prepúberes, pueden ser estimulatorios o inhibitorios dependiendo de la dosis administrada y del tiempo de exposición.

Los resultados del Diseño 1 demuestran que el tratamiento de corderas prepúberes con E<sub>2</sub> afecta la expresión de RE y de RP de manera bifásica y órgano-dependiente, siendo el cervix el tejido que mostró una respuesta de mayor magnitud en cuanto a la inducción de la transcripción de RE $\alpha$  y RP. Esta elevada capacidad de respuesta molecular, podría explicar que el cervix, frente a la exposición a fitoestrógenos (Adams, 1990) y xenoestrógenos (Morrison et al. 2003) durante el desarrollo, sea el órgano que sufre mayores alteraciones histológicas y funcionales que se manifiestan en forma permanente. La respuesta órgano-dependiente de la expresión de RE y RP a la administración de E<sub>2</sub>, podría deberse a la variedad de tipos celulares que componen los órganos del tracto reproductivo, a que están en diferentes etapas del desarrollo y a la diferente concentración y/o distribución de receptores esteroideos.

En cervix de ovejas adultas se encontraron diferencias en la expresión de RE y RP durante el ciclo estral en estación reproductiva (Diseño 2) y en anestro estacional inducidas a ovular (Diseño 3), así como diferencias significativas en la expresión de los receptores esteroideos entre las distintas regiones del cervix estudiadas, tales como la próxima al útero (cranial) y la próxima a vagina (caudal).

En cuanto a las características macroscópicas del cervix de ovejas adultas ciclando, el peso cervical fue mayor en el estro que en la fase luteal (Diseño 2), en acuerdo con la dominancia de los E en el estro y la dominancia de la P en la fase luteal. Considerando que el largo del cervix no varió por la presencia o ausencia de un CL (Kershaw et al. 2005), el aumento del peso cervical al estro no dependería de ésta dimensión. Dado que el peso cervical se correlacionó negativamente con la concentración circulante de P (Diseño 2), podría existir un efecto antagónico entre los E y la P, a partir de la alta relación entre las concentraciones circulantes de E/P al estro y su inversión durante la fase luteal. Sin embargo, el tratamiento con P no afectó el peso cervical en ovejas adultas en anestro estacional (Diseño 3), sugiriendo

que el aumento de peso del cervix al estro dependería fundamentalmente de los E. Las variaciones cíclicas de las hormonas sexuales ováricas provocan modificaciones cíclicas en algunas características del cervix ovino que ya han sido reportadas, como en los tipos celulares del epitelio luminal del cervix (Wergin, 1979), en el tamaño nuclear, distribución y densidad celular (Bott et al. 2006) y en las cualidades físico-químicas del mucus cervical (Heydon & Adams 1979). Sin embargo, a excepción del peso cervical (Diseño 2), no han sido reportadas otras modificaciones físicas del cervix en ovejas durante el ciclo estral.

No se encontraron diferencias en la penetrabilidad del cervix a lo largo del ciclo estral (Diseño 2), contrariamente a lo reportado por Kershaw et al. (2005), donde la penetrabilidad cervical fue mayor en ovejas sin CL, que con CL. Hasta el momento no se han encontrado trabajos que concluyan al respecto, sin embargo es generalizada la experiencia de que la penetrabilidad del cervix ovino al momento de la IA no es satisfactoria (Salamon & Maxwell, 2000). Con relación a la morfología del cervix ovino, se encontraron dos tipos de orificio cervical caudal en ovejas adultas ciclando, los denominados “*flap*” y “*rosette*” (Diseño 2), los que han sido reportados como los más frecuentes en razas europeas (Halbert et al. 1990a; Kershaw et al. 2005) y menos frecuentes en razas nativas indias (Naqvi et al. 2005), en acuerdo con el origen de la raza Corriedale. Teniendo en cuenta que el tipo morfológico del orificio cervical caudal no varió a lo largo del ciclo estral (Diseño 2), no tuvo relación con el largo (Halbert et al. 1990a), el peso (Halbert et al. 1990a; Diseño 2) ni el número de anillos del cervix y, además, no afectó la penetrabilidad cervical (Diseño 2); no sería aconsejable utilizarlo para inferir sobre la dificultad de la canulación cervical.

En ovejas adultas en estación reproductiva (Diseño 2), los resultados demuestran que la expresión de RE en cervix ovino se modifica durante el ciclo estral, alcanzando niveles mayores de expresión en el estro y menores en la fase luteal (Figura 5, A y B). Esto está de acuerdo con la acción inductiva de los altos niveles circulantes de E<sub>2</sub> al estro y con la acción inhibitoria de los altos niveles de P en la fase luteal, sobre la expresión de RE $\alpha$ . Similar perfil fue descrito en útero ovino (Rexroad, 1981a; Ott et al. 1993; Spencer & Bazer, 1995; Tasende et al. 2005b).

En el cervix caudal de ovejas durante el ciclo estral (Diseño 2), los niveles de RE $\alpha$ -ARNm acompañaron el perfil de regulación del RE, mientras que en el cervix craneal no (Figura 5, A y B). Esto sugiere que la regulación de la expresión del RE $\alpha$  se ejerce a diferente nivel según la región cervical, predominando la regulación transcripcional en el cervix caudal y post-transcripcional en el craneal. En el cervix caudal, la existencia de una regulación transcripcional del RE $\alpha$ -ARNm está apoyada por la correlación positiva entre los niveles de RE $\alpha$ -ARNm y los de RE. A su vez, los niveles de RE $\alpha$ -ARNm se correlacionaron positivamente con las concentraciones de E<sub>2</sub> y negativamente con las de P, indicando la dependencia de ésta regulación a las hormonas esteroideas ováricas. La posible regulación post-transcripcional en el cervix craneal podría deberse a un aumento en la estabilidad del RE $\alpha$ -ARNm (Ing & Ott, 1999) y/o a la expresión diferencial de los subtipos de RE que unen E (Wang et al. 2001). Por otra parte, se ha reportado en cervix humano durante el embarazo que la concentración de RE $\beta$ -ARNm aumentó a término (Wang et al. 2001; Ekman-Ordeberg et al. 2003), a pesar de que los RE y RP y los transcritos RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm disminuyeron (Stjernholm et al. 1996; Wang et al. 2001; Ekman-



Ordeberg et al. 2003). La detección inmunohistoquímica del RE $\alpha$  en el cervix craneal de ovejas ciclando (datos no publicados), indica que el aumento del RE encontrado al estro se debe al subtipo RE $\alpha$ .

El perfil de expresión del RP fue similar al de RE mostrando, en ambas regiones cervicales, mayor concentración en el estro que en la fase luteal (Figura 5, C). Esto sería consecuencia de que la expresión de RP depende del RE, como fue reportado en útero ovino (Rexroad, 1981 a y b; Ott et al. 1993; Spencer & Bazer, 1995; Tasende et al. 2005b). Éstos resultados coinciden parcialmente con los reportados por Zhao et al. (1999), que por inmunohistoquímica encontraron mayor inmuno-señal del RE cervical en el estro respecto al resto del ciclo estral ovino, pero poca o ninguna inmuno-señal del RP. En este mismo trabajo se encontró muy poca inmuno-señal del RP en cervix de corderas prepúberes y de ovejas adultas en anestro estacional (Zhao et al. 1999), cuando nosotros hemos detectado por “binding” elevadas concentraciones de RP en cervix, tanto en corderas (Diseño 1) como en ovejas adultas en anestro (Diseño 3). Esta discordancia podría deberse a que en la detección inmunohistoquímica de RP, el anticuerpo utilizado no tendría la sensibilidad adecuada para cervix.

Es interesante notar que en el cervix caudal de las ovejas ciclando, se halló mayor concentración de RE $\alpha$ -ARNm, RE y RP respecto a lo hallado en el craneal (Figura 5). A su vez, en cervix de vacas ciclando (Breeveld-Dwarkasing et al. 2002), fue reportado que el porcentaje de células RE y RP positivas fue mayor en la región del cervix próxima a la vagina que en la próxima al útero, aunque cuando el número de células positivas a ambos receptores fue expresado por densidad celular, éstas diferencias no fueron aparentes. Esto podría ser reflejo de la distinta constitución histológica entre ambas regiones cervicales, lo que fue reportado en ovinos (Heydon & Adams, 1979) y también en vacas ciclando, donde el segmento uterino del cervix demostró tener mayor densidad celular que el segmento vaginal (Breeveld-Dwarkasing et al. 2002).

Se ha reportado que la expresión del ROx es sensible a la regulación positiva de los E y negativa de la P en útero de rata (Soloff et al. 1983), en útero y oviducto de oveja (Ayad et al. 1991) y en cervix de vaca (Fuchs et al. 1996), aunque el mecanismo molecular de ésta regulación todavía no está claro (por revisión ver McCracken et al. 1999; Goff et al. 2004). Las altas concentraciones de E<sub>2</sub> circulantes y de RE en cervix encontradas en el estro (Diseño 2), podrían explicar el aumento de la concentración del ROx en cervix de ovejas en estro (Matthews & Ayad 1994; Ayad et al. 2004). Se ha propuesto que la dilatación cervical en ovinos al parto es un evento regulado por las hormonas esteroideas sexuales a través del sistema Ox/PGE<sub>2</sub> (Fosang et al. 1984; Fosang & Handley, 1988; Regassa & Noakes, 2001). Dado que la Ox ha sido vinculada en el control de la síntesis y secreción de PGE<sub>2</sub> cervical en vacas al estro (Shemesh et al. 1997; Fuchs et al. 2002) y que han sido reportados los receptores de PGE en cervix de ovejas ciclando (Audicana et al. 1998); se sugiere que, en rumiantes, las modificaciones del cervix al estro podrían deberse a un mecanismo en parte similar al que operaría en la dilatación cervical al parto. En apoyo de esto, se ha reportado que durante el procedimiento de IA en la oveja en estro, fue posible incrementar las contracciones uterinas mediante la estimulación cervico-vaginal del reflejo de Ferguson (Raynal & Houdeau, 2004).

En ovejas adultas en anestro estacional inducidas a ovular (Diseño 3), los tratamientos con GnRH o P+GnRH aumentaron las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm en el cervix craneal respecto a las ovejas controles (en anestro o tratadas solo con P) (Figura 6, A), en concordancia con la alta relación en los niveles de E/P circulantes lograda con el tratamiento. Contrariamente, el tratamiento con GnRH no modificó las concentraciones de RE respecto a las ovejas sin tratar (Figura 6, B). Esto podría deberse a que no fue suficiente el tiempo transcurrido entre la inducción de la transcripción del RE $\alpha$ -ARNm y la aparición de su producto o a la existencia de mecanismos post-transcripcionales de regulación de la proteína RE, como el aumento en su procesamiento (Zhou et al. 1993; Alarid et al. 1999). Por otra parte, el tratamiento con P no modificó los niveles de transcripción de RE $\alpha$ -ARNm, pero disminuyó las concentraciones de RE (Figura 6, A y B). Estos resultados sugieren que, en el cervix craneal, el efecto inhibitorio de la P se ejercería predominantemente a nivel post-transcripcional, afectando la velocidad de procesamiento y/o de degradación de la proteína RE sin afectar en forma aparente la tasa de transcripción del RE $\alpha$  (Zhou et al. 1993). Es interesante notar que, en el cervix craneal, el tratamiento con P+GnRH aumentó las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm y las de RE respecto al tratamiento solo con P (Figura 6, A y B), lo que sugiere que la administración de GnRH estimula la transcripción de RE $\alpha$ -ARNm y la síntesis de RE, cuando se administra luego de un tratamiento prolongado con P. El perfil de respuesta de los RE en cervix craneal fue similar al reportado en útero de las mismas ovejas con los mismos tratamientos (Tasende et al. 2002).

Con relación al RP, los tratamientos con GnRH y P+GnRH, incrementaron su concentración en cervix craneal respecto a lo encontrado en ovejas en anestro y tratadas con P, sugiriendo un estímulo global de la expresión de RP por los tratamientos de inducción de la ovulación. Un hallazgo interesante fue que el tratamiento solo con P a ovejas en anestro estacional fue capaz de inhibir la expresión del RP en el cervix craneal (Figura 6, C) y lo mismo sucedió con el RP-ARNm (datos no publicados). Estos resultados sugieren que la inhibición de la P sobre su propio receptor se ejerce a nivel transcripcional y el tratamiento posterior con GnRH y la consiguiente inversión de la relación E/P, fueron capaces de revertir dicho efecto, incrementando las concentraciones de RP. En forma similar a lo encontrado para RE, el perfil de respuesta de los RP en cervix craneal fue similar al reportado en útero de las mismas ovejas con los mismos tratamientos (Tasende et al. 2002).

Los estudios realizados en la región craneal del cervix durante la ovulación inducida con P+GnRH en ovejas adultas en anestro estacional, confirmaron que esta región presenta elevados niveles de expresión de los receptores esteroideos al momento de la ovulación (D1 ind) y demostraron que las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm y RE son mayores en el momento de la ovulación inducida (D1 ind) y menores en fase luteal temprana (D5 ind) (Figura 7, A y B). Similares variaciones de la expresión de RE fueron reportadas para el útero durante la ovulación inducida y la fase luteal temprana, en animales con los mismos tratamientos (Tasende et al. 2005a). Estos resultados sugieren que el aumento de la concentración de P en fase luteal temprana inhibe la expresión de RE en cervix craneal, a nivel predominantemente transcripcional. En apoyo de esta hipótesis, se encontró una correlación positiva entre las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm y de RE en el cervix craneal, independientemente del día luego de la ovulación inducida. Contrariamente a lo

encontrado para RE, las concentraciones de RP (Figura 7, C) no fueron diferentes al momento de la ovulación y en fase luteal temprana (D1 ind y D5 ind, respectivamente). Resultados similares fueron encontrados para útero en la ovulación y fase luteal temprana (Tasende et al. 2005a). Los resultados sugieren que los niveles de P alcanzados al día 5, no fueron suficientes para inhibir la expresión de su propio receptor en cervix craneal y en útero, cuando fueron capaces de inhibir la expresión de RE. Esta aparente contradicción aporta evidencias a favor de la hipótesis sobre la RE-dependencia del RP, y sugiere que los cambios en la expresión de RP podrían ser posteriores a los de RE. En apoyo de esto, cuando se hicieron las determinaciones al día 6 del ciclo estral en la estación reproductiva, se encontró una franca disminución de las concentraciones de RE y RP respecto al estro tanto en cervix craneal (Figura 5, B y C), como en útero (Tasende et al. 2005a).

La región caudal del cervix de ovejas en anestro estacional no mostró cambios aparentes en la expresión de RE y RP con los diferentes tratamientos (Figura 6, B y C), sugiriendo que presenta una baja capacidad de respuesta -en términos de receptores esteroideos- a los tratamientos hormonales de inducción de la ovulación. Estudios posteriores en ovejas en anestro tratadas con P+GnRH y analizadas en el momento de la ovulación (D1 ind) y en fase luteal temprana (D5 ind), confirmaron el bajo nivel de expresión de RE y RP y la escasa capacidad de respuesta de la región caudal del cervix ovino (Figura 7, B y C).

Los datos obtenidos en ovejas en la estación de anestro, demuestran que los tratamientos con GnRH (con o sin P previa) para inducir la ovulación, modifican en forma región-dependiente la expresión de los RE y RP cervicales y por lo tanto su sensibilidad a las hormonas esteroideas. Las diferencias entre las regiones cervicales sugieren que el cervix craneal es más sensible que el caudal a la acción de E y P en la estación de anestro y durante la ovulación inducida por manipulación hormonal. Estas diferencias podrían deberse a diferencias morfológicas y funcionales entre las regiones craneal y caudal del cervix, e indican que el cervix craneal presenta una respuesta -en términos de receptores- similar a la del útero, cuando se induce la ovulación en ovejas en anestro estacional.

Comparando los resultados obtenidos en ovejas adultas ciclando con los obtenidos en ovejas adultas en anestro estacional, se pueden apreciar que las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm, RE y RP fueron mayores en el cervix caudal de las ovejas ciclando respecto al craneal (Figura 5), pero lo inverso sucedió en el cervix de las ovejas en anestro estacional tratadas o no tratadas ( Figuras 6 y 7). Por otra parte, las variaciones en la expresión de RE y RP en el cervix craneal de ovejas en anestro inducidas a ciclar (Figura 7) fueron similares a las encontradas en el cervix craneal de ovejas ciclando (Figura 5), sin embargo, en el cervix caudal de las ovejas inducidas a ciclar no se encontraron variaciones (Figura 7). Además, el peso del cervix varió según el día del ciclo estral (Diseño 2), pero no fue afectado por los tratamientos de ovejas en anestro estacional, ni por el día del ciclo estral inducido (Diseño 3). Estas observaciones podrían estar indicando que la regulación de la capacidad de respuesta a las hormonas esteroideas no estaría funcionando en forma similar en ovejas ciclando en la estación reproductiva respecto a ovejas en anestro estacional inducidas a ovular, lo cual debería de ser tomado en cuenta en el diseño de protocolos de dilatación hormonal del cervix ovino.

En suma, el cervix ovino en las diferentes situaciones reproductivas evaluadas, posee concentraciones importantes de RE y RP, lo que determina que sea blanco de la acción genómica de los esteroides sexuales. La concentración de los RE y RP cervicales está sujeta a la regulación positiva de los E y negativa de la P, aunque ésta regulación es dependiente del estado reproductivo y de la región del cervix en su eje longitudinal. La región caudal del cervix de ovejas en anestro estacional inducidas a ovular, no mostró un perfil de regulación similar respecto a las ovejas ciclando en la estación reproductiva.

## H. CONCLUSIONES

1. La capacidad del cervix ovino de responder a la acción de los E y la P en todas las situaciones reproductivas evaluadas estaría regulada a través de las variaciones en las concentraciones tisulares de RE y RP y no a través de modificaciones en la afinidad de la unión hormona-receptor.
2. El tratamiento de corderas prepúberes con E<sub>2</sub> afecta la expresión de RE $\alpha$  y de RP del tracto reproductivo de manera bifásica y órgano-dependiente, siendo el cervix el tejido que mostró una respuesta de mayor magnitud en cuanto al estímulo de la expresión de RE y RP.
3. La expresión de RE y RP en cervix ovino se modifica durante el ciclo estral, alcanzando niveles mayores en el estro y menores en la fase luteal, en acuerdo con la regulación positiva de los E y negativa de la P. La regulación de la expresión del RE $\alpha$  se ejerce a diferente nivel según la región cervical, predominando la regulación transcripcional en el cervix caudal y post-transcripcional en el craneal.
4. La expresión de RE y RP cervicales en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular mediante tratamientos con GnRH (con o sin P previa), está sometida a regulación por parte de las hormonas esteroideas en forma región dependiente. Las diferencias entre las regiones cervicales sugieren que el cervix craneal es más sensible que el caudal a la acción de E y P en la estación de anestro y durante la ovulación inducida por manipulación hormonal.
5. Las concentraciones de RE $\alpha$ -ARNm, RE y RP en las ovejas ciclando fueron mayores en el cervix caudal respecto al craneal, pero lo inverso sucedió en el cervix de las ovejas en anestro estacional tratadas o no tratadas, indicando que la sensibilidad del cervix a las hormonas esteroideas ováricas podría estar modulada en forma diferente según el estado reproductivo y la región cervical.

### **Perspectivas futuras**

Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en la expresión de RE y RP y su regulación hormonal, la localización por inmunohistoquímica de los receptores esteroideos en las diferentes regiones del cervix ovino durante el ciclo estral natural e inducido, brindará información complementaria sobre la distribución celular y tisular de los mismos. Este enfoque apuntará a comprender la influencia de las hormonas esteroides sexuales sobre la morfología del cervix.

Considerando las diferencias en la expresión de los RE y RP a lo largo del cervix ovino, la influencia de las hormonas esteroideas sobre la capacidad de respuesta a la Ox y el eventual rol del sistema Ox/PGE2 en las modificaciones del cervix ovino durante el ciclo estral, la determinación del ROx por binding e inmunohistoquímica en las diferentes regiones cervicales durante el ciclo estral también sería relevante.

Las mismas consideraciones se pueden aplicar al cervix de ovejas en anestro estacional tratadas para inducir la ovulación, tendiendo a explicar las diferencias obtenidas entre éstas y las ovejas ciclando durante la estación reproductiva.

Los conocimientos resultantes de éste enfoque de investigación, podrían sentar las bases moleculares para el desarrollo de métodos transcervicales de IA o TE en ovejas, lo que posibilitaría la disminución del costo de estas tecnologías reproductivas y generalizar su utilización. La realización de trabajos a campo utilizando diferentes hormonas para inducir la dilatación cervical sería la culminación natural de éste proceso.

## I. REFERENCIAS

1. Adams NR. (1990). Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens. *Aust Vet J* 67: 197-201.
2. Akinbami M, Meredith S, Warren J, Anthony R, Day B. (1990). Cervical dilatation, conception rate and concentration of progesterone and  $17\beta$ -estradiol, in postpartum ewes treated with porcine relaxin. *Theriogenology* 34: 927-940.
3. Alarid E, Bakopoulus N, Solodin N. (1999). Proteasome-mediated proteolysis of estrogens receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol* 13: 1522-1534.
4. Anderson JC, Raynes JG, Fitzpatrick RJ, Dobson H. (1991). Increased hyaluronate synthesis and changes in glycosaminoglycan ratios and molecular weight of proteoglycans synthesised by cultured cervical tissue from ewes at various stages of pregnancy. *Biochim Biophys Acta* 1075: 187-190.
5. Armstrong DT, Evans G. (1984). Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *J Reprod Fertil* 71: 89-94.
6. Arreguin-Arevalo JA, Nett TM. (2006). A non-genomic action of estradiol as the mechanism underlying the acute suppression of secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes. *Biol Reprod* 74: 202-208.
7. Audicana L, Aughey E, O'Shaughnessy PJ. (1998). Sensitivity of the early luteal phase ovine cervix to prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and expression of EP3 receptor mRNA. *Res Vet Sci* 64: 177-179.
8. Aughey E, Calder AA, Coutts JR, Fleming R, McManus TJ, Munro CD. (1983). Pregnancy-associated changes in the physical and microscopic characteristics of the ovine cervix. *J Anat* 136: 389-399.
9. Ayad VJ, Guldenaar SEF and Wathes DC. (1991). Characterization and localization of oxytocin receptors in the uterus and oviduct of the non-pregnant ewe using an iodinated receptor agonist. *J Endocrinol* 128: 187-195.
10. Ayad VJ, Leung ST, Parkinson TJ, Wathes DC. (2004). Coincident increases in oxytocin receptor expression and EMG responsiveness to oxytocin in the ovine cervix at oestrus. *Anim Reprod Sci* 80: 237-250.
11. Barry DM, van Niekerk CH, Rust J, van der Walt T. (1990). Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E<sub>2</sub> and estradiol. *Theriogenology* 33:190 (Abstr.).
12. Bartol FF, Wiley AA, Floyd JG, Ott TL, Bazer FW, Gray CA and Spencer TE. (1999). Uterine differentiation as a foundation of subsequent fertility. *J Reprod Fert* 54: 287-302.
13. Bishop CV, Stormshak F (2006). Nongenomic action of progesterone inhibits oxytocin-induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F<sub>2</sub> secretion in the ovine endometrium. *Endocrinology* 147: 937-942.
14. Bosquiazzo VL, Durando M, Varayoud J, Ramos JG, Rodríguez HA, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. (2005). Macrophage density in the pregnant rat uterine cervix is modulated by mast cell degranulation. *J Reprod Immunol* 65: 147-158.
15. Bott EM, Young IR, Jenkin G, McLaren WJ. (2006). Detection of morphological changes of the ovine cervix in response to sex steroids using a fluorescence confocal endomicroscope. *Am J Obstet Gynecol* 194:105-112.
16. Bramley T. (2003). Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 125: 3-15.

17. Braunsberg H. (1984). Mathematical analysis of data from receptor assay. En: Clinical Interest of Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer. Recent Results in Cancer Research (1984). Ed. Leclercq G, Toma S, Paridaens R, Heuson JC, Springer-Verlag, Berlin, Cap. 91, pp.18-31.
18. Breeveld-Dwarkasing VNA, de Boer-Brower M, Möstl E, Soede NM, van der Weijden GC, Taverne MAM, van Dissel-Emiliani FMF. (2002). Immunohistochemical distribution of estrogen and progesterone receptors and tissue concentrations of estrogens in the cervix of non-pregnant cows. *Reprod Fertil Dev* 14: 487-494.
19. Campbell JW, Harvey TG, McDonald MF, Sparksman RI. (1996). Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology* 45: 1535-1544.
20. Caraty A, Locatelli A, Martin GB. (1989). Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *J Endocrinol* 123: 375-382.
21. Cardellino R. (1992). Caracterización de los planteles ovinos en el Uruguay. II Seminario sobre Mejoramiento Genético en Lanares, Piriápolis, Uruguay, P-25.
22. Carpenter KD, Gray CA, Bryan TM, Welsh TH, Spencer TE. (2003). Estrogen and antiestrogen effects on neonatal ovine uterine development. *Biol Reprod* 69: 708-717.
23. Caton D, Kalra PS. (1990). Patterns of variation in progesterin in pregnant sheep. *J Endocrinol* 126: 37-42.
24. Cavaco-Goncalves S, Marques CC, Horta AE, Figueroa JP. (2006). Increased cervical electrical activity during oestrus in progestagen treated ewes: Possible role in sperm transport. *Anim Reprod Sci*. En Prensa.
25. Clark JH, Mani SK. (1994). Actions of ovarian steroid hormones. En: The Physiology of Reproduction (1994). Eds. Knobil E, Neill JD, Raven Press Ltd. New York, Cap. 17, pp.1011-1046.
26. Clark JH, Schrader WT, O'Malley BW. (1992). Mechanisms of steroid hormones action. En: Textbook of Endocrinology (1992). Eds JD Wilson, DW Foster, WB Saunders, Philadelphia, Cap. 3, pp.35-90.
27. Clarke IJ, Wright PJ, Chamley WA, Burman K. (1984). Differences in the reproductive endocrine status of ewes in the early post-partum period and during seasonal anoestrus. *J Reprod Fertil* 70: 591-597
28. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. (2002). Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 57: 339-355.
29. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP, De Mayo FJ. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol* 179:97-103.
30. Couse JF, Korach KS. (1999). Estrogens receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?. *Endocr Rev* 20: 358-417.
31. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138: 4613-4621.
32. Crosby TF, Boland MP, Gordon I. (1991). Effect of progestagen treatments on the incidence of oestrus and pregnancy rates in ewes. *Anim Reprod Sci* 24: 109-118.

33. Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE. (1987). Endocrine mechanisms of puberty in heifers: role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod.* 37: 1054-1065.
34. DI.CO.SE., Dirección de Contralor de Semovientes (2005), Declaración jurada del año 2004, [www.mgap.gob.uy/DGSG/DICOSE](http://www.mgap.gob.uy/DGSG/DICOSE).
35. Driancourt MA, Thuel B. (1998). Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reprod Nutr Dev* 38: 345-362.
36. Edqvist LE, Forsberg M. (1997). Clinical Reproductive Endocrinology. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (1997). Eds. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, Academic Press 5<sup>a</sup> ed. San Diego, pp.589–617.
37. Ekman-Ordeberg G, Stjernholm Y, Wang H, Stygar D, Sahlin L. (2003). Endocrine regulation of cervical ripening in humans--potential roles for gonadal steroids and insulin-like growth factor-I. *Steroids* 68: 837-847.
38. El Maradny E, Kanayama N, Kobayashi H, Hossain B, Khatun S, Liping S, Kobayashi T, Terao T. (1997). The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Hum Reprod* 12: 1080-1088.
39. Ellwood DA, Mitchell MD, Anderson AB, Turnbull AC. (1980). Specific changes in the in vitro production of prostanoids by the ovine cervix at parturition. *Prostaglandins* 19: 479-488.
40. Eppleston J, Salamon S, Moore NW, Evans G. (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 36: 211-225.
41. Evans AC, Duffy P, Hynes N, Boland MP. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53: 699-715.
42. Fair S, Hanrahan JP, O'Meara CM, Duffy P, Rizos D, Wade M, Donovan A, Boland MP, Lonergan P, Evans AC. (2005). Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology* 63: 1995-2005.
43. Fernández-Abella DH. (1995). Temas de reproducción ovina e inseminación artificial en bovinos y ovinos. Ed. Universidad de la República, Montevideo.
44. Fitzpatrick RJ, Dobson H. (1979). Parturition in the sheep and goat. The cervix of the sheep and goat during parturition. *Anim Reprod Sci* 2: 209-224.
45. Fitzpatrick RJ. Changes in cervical function at parturition. (1977). *Ann Rech Vet* 8: 438-449.
46. Flint AP, Forsling ML, Mitchell MD. (1978). Blockade of the Ferguson reflex by lumbar epidural anaesthesia in the parturient sheep: effects on oxytocin secretion and uterine venous prostaglandin F levels. *Horm Metab Res* 10: 545-547.
47. Flohr SF, Wulster-Radcliffe MC, Lewis GS. (1999). Technical note: development of a transcervical oocyte recovery procedure for sheep. *J Anim Sci* 77: 2583-2586.
48. Fosang AJ, Handley CJ, Santer V, Lowther DA, Thorburn GD. (1984). Pregnancy-related changes in the connective tissue of the ovine cervix. *Biol Reprod* 30:1223-1235.
49. Fosang AJ, Handley CJ. (1988). Connective tissue remodelling in the ovine cervix during pregnancy and at term. *Connect Tissue Res* 17: 277-285.



50. Foster DL, Ebling FJP, Vannerson LA, Wood RI, Fenner DE. (1988). Regulation of puberty in the lamb: internal and external cues. En: Progress in Endocrinology (1988). Ed. H Imura, K Shizume, S Yoshida, Elsevier, Amsterdam, Vol 2, pp.861-866.
51. Foster DL, Karsch FJ. (1975). Development of the mechanism regulating the preovulatory surge of luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology* 97: 1205-1209.
52. Foster DL, Ryan KD. (1979). Endocrine mechanisms governing transition into adulthood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. *Endocrinology* 105: 896-904.
53. Fuchs AR, Graddy LG, Kowalski AA, Fields MJ. (2002). Oxytocin induces PGE2 release from bovine cervical mucosa in vivo. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 70: 119-129.
54. Fuchs AR, Ivell R, Fields PA, Chang SMT and Fields MJ. (1996). Oxytocin receptors in bovine cervix: distribution and gene expression during the estrous cycle. *Biol Reprod* 54: 700-708.
55. Fuchs AR, Ivell R, Ganz N, Fields MJ, Giménez T. (2001). Secretion of oxytocin in pregnant and parturient cows: corpus luteum may contribute to plasma oxytocin at term. *Biol Reprod* 65: 1135-1141.
56. Fukui Y, Kobayashi K, Hirose Y, Ono H. (1991). Effects of GnRH and HCG injections on lambing rate of estrus-induced ewes during the non-breeding season. *Jpn J Anim Reprod* 37: 243-250.
57. García-Villar R, Toutain P, Ruckebusch Y. (1984). Differential responsiveness to oxytocin of the uterus and cervix in the ovariectomized ewe. *Anim Reprod Sci* 7: 421-431.
58. Garófalo EG, Tasende C. (1996). Uterine estrogen and progesterone receptors in prepubertal ewe: Distribution in myometrium, endometrium and caruncles. *Vet Res* 27: 177-183.
59. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43: 689-703.
60. Goff AK. (2004). Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biol Reprod* 71: 11-16.
61. Goodman RL. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. En: The Physiology of Reproduction (1994). Eds. E Knobil, JD Neill 2<sup>a</sup> ed. Raven Press Ltd, New York, Cap. 2, pp.659-709.
62. Gorodeski GI, Pal AD. (2000). Involvement of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the regulation of cervical permeability. *Am J Physiol* 278: 689-696.
63. Gorodeski GI. (1996). The cervical cycle. En: Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology (1996). Eds. Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Cap. 14, pp.301-324.
64. Gorodeski GI. (1998). Estrogen increases the permeability of the cultured human cervical epithelium by modulating cell deformability. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: 888-899.
65. Gorski J, Hou Q. (1995). Embryonic estrogen receptors: do they have a physiological function?. *Environ Health Perspect* 103: 69-72.
66. Greco TL, Duello TM, Gorski J. (1993). Estrogen receptors, estradiol and diethylestilbestrol in early development: the mouse as a model for the study of

- estrogen receptors and estrogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tracts. *Endocr Rev* 14: 59-71.
67. Hafez ESE. (1987). Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. Hafez ESE 5a ed. South Carolina-USA.
  68. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990a). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 33: 977-992.
  69. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990b). A technique for transcervical intrauterine insemination of the ewes. *Theriogenology* 33: 994-1010.
  70. Hare L, Bryant MJ. (1985). Ovulation rate and embryo survival in young ewes mated either at puberty or at the second or third oestrus. *Anim Reprod Sci* 8: 41-52.
  71. Hauser B, Bostedt H. (2002). Ultrasonographic observations of the uterine regression in the ewe under different obstetrical conditions. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49: 511-516.
  72. Hewitt SC, Korach KS. (2003). Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in reproductive tissues. *Reproduction* 125: 143-149.
  73. Heydon RA, Adams NR. (1979). Comparative morphology and mucus histochemistry of the ruminant cervix: differences between crypt and surface epithelium. *Biol Reprod* 21: 557-562.
  74. Husein MQ, Kridli RT. (2003). Effect of progesterone prior to GnRH-PGF2alpha treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes. *Reprod Domest Anim* 38: 228-232.
  75. Hyde BA, Blaustein JD, Black DL. (1989). Differential regulation of progestin receptor immunoreactivity in the rabbit oviduct. *Endocrinology* 125: 1479-1483.
  76. Imada K, Ito A, Sato T, Namiki M, Nagase H, Mori Y. (1997). Hormonal regulation of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B gene expression in rabbit uterine cervical fibroblasts. *Biol Reprod* 56: 575-580.
  77. Imada K, Sato T, Hashizume K, Tanimoto A, Sasaguri Y, Ito A. (2002). An antiprogestone, onapristone, enhances the gene expression of promatrix metalloproteinase 3/prostromelysin-1 in the uterine cervix of pregnant rabbit. *Biol Pharm Bull* 25: 1223-1227.
  78. Ing NH, Ott TL. (1999). Estradiol up-regulates estrogen receptor- $\alpha$  messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol Reprod* 60: 134-139.
  79. Ing NH, Tsai SY, Tsai MJ. (1993). Progesterone and estrogen. En: *Genes in Mammalian Reproduction* (1993). Ed. Gwatkin RBL, Wiley-Liss Inc., New York, pp.271-291.
  80. Ito A, Imada K, Sato T, Kubo T, Matsushima K, Mori Y. (1994). Suppression of interleukin 8 production by progesterone in rabbit uterine cervix. *Biochem J* 301: 183-186.
  81. Karsch FJ, Foster DL. (1975). Sexual differentiation of the mechanism controlling the preovulatory discharge of luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology* 97: 373-379.
  82. Karsch FJ, Goodman RL, Legan SJ. (1980). Feedback basis of seasonal breeding, test of an hypothesis. *J Reprod Fert* 58: 521-535.
  83. Kendall JZ, Challis JR, Hart IC, Jones CT, Mitchell MD, Ritchie JW, Robinson JS, Thorburn GD. (1977). Steroid and prostaglandin concentrations in the

- plasma of pregnant ewes during infusion of adrenocorticotrophin or dexamethasone to intact or hypophysectomized foetuses. *J Endocrinol* 75: 59-71.
84. Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 64: 1225-1235.
  85. Khalifa R, Sayre B, Lewis G. (1992). Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *J Anim Sci* 70: 38-42.
  86. King ME, McKelvey WA, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJ, Stewart E, Robinson JJ. (2004). Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology* 62: 1236-1244.
  87. Knights M, Baptiste QS, Dixon AB, Pate JL, Marsh DJ, Inskip EK, Lewis PE. (2003). Effects of dosage of FSH, vehicle and time of treatment on ovulation rate and prolificacy in ewes during the anestrus season. *Small Rumin Res* 50: 1-9.
  88. Knights M, Maze TD, Bridges PJ, Lewis PE, Inskip EK. (2001). Short-term treatment with a controlled internal drug releasing (CIDR) device and FSH to induce fertile estrus and increase prolificacy in anestrus ewes. *Theriogenology* 55: 1181-1191.
  89. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 138: 863-870.
  90. Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930.
  91. Lane MA, Berardinelli JG, Cárdenas H, Staigmiller RB. (1993). Sperm transport and distribution during the puberal transition in ewe lambs. *J Anim Sci* 71: 707-713.
  92. Ledger WL, Ellwood DA, Taylor MJ. (1983). Cervical softening in late pregnant sheep by infusion of prostaglandin E-2 into a cervical artery. *J Reprod Fertil* 69: 511-515.
  93. Ledger WL, Webster MA, Anderson AB, Turnbull AC. (1985). Effect of inhibition of prostaglandin synthesis on cervical softening and uterine activity during ovine parturition resulting from progesterone withdrawal induced by epostane. *J Endocrinol* 105: 227-233.
  94. Ledingham MA, Denison FC, Kelly RW, Young A, Norman JE. (1999). Nitric oxide donors stimulate prostaglandin F(2 $\alpha$ ) and inhibit thromboxane B(2) production in the human cervix during the first trimester of pregnancy. *Mol Hum Reprod* 5: 973-982.
  95. Ledingham MA, Thomson AJ, Young A, Macara LM, Greer IA, Norman JE. (2000). Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod* 6: 1041-1048.
  96. Leppert PC. (1998). Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogestone onapristone. *Am J Obstet Gynecol* 178: 713-725.
  97. Leung ST, Reynolds TS, Wathes DC. (1998). Regulation of oxytocin receptor in the placentome capsule throughout pregnancy in the ewe: the possible role of

- oestradiol receptor, progesterone receptor and aromatase. *J Endocrinol* 158: 173-181.
98. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
  99. M.G.A.P., Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2005). Carne ovina: situación actual y perspectivas para el 2005, Ing. Agr. Gonzalo Muñoz, [www.mgap.gob.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario04](http://www.mgap.gob.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario04).
  100. Mallampati RS, Pope AL, Casida LE. (1971). Effect of suckling on postpartum anestrus in ewes lambing in different seasons of the year. *J Anim Sci* 32: 673-677.
  101. Malpaux B, Robinson JE, Wayne NL, Karsch FJ. (1989). Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *J Endocrinol* 122: 269-278.
  102. Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. (1999). The regulation of interferon- $\tau$  and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil* 54: 317-328.
  103. Manning J.M., Herbosa C.G., Pelt J., Karsch F.J., Foster D.L. (1993). Pattern of GnRH secretion in the pituitary portal circulation of the female sheep during puberty. *Soc Neurosci* 19: 258 (Abstr.).
  104. Matthews EL, Ayad VJ. (1994). Characterization and localization of a putative oxytocin receptor in the cervix of the oestrus ewe. *J Endocrinol* 142: 97-405.
  105. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323.
  106. McLeod BJ, Haresign W, Lamming GE. (1982). Response of seasonally anestrus ewes to small-dose multiple injections of GnRH with and without progesterone pretreatment. *J Reprod Fertil* 65: 223-230.
  107. Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M and Sahlin L. (2000a). An immunohistochemical study on estradiol regulation of estrogen receptor in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nut Dev* 40: 587-596.
  108. Meikle A, Forsberg M, Sahlin L, Masironi B, Tasende C, Rodríguez-Piñón M, Garófalo EG. (2000b). A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor content in the lamb uterus. *Reprod Nut Dev* 40: 283-293.
  109. Meikle A, Garófalo EG, Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Sahlin L. (2001). Regulation by gonadal steroids of estrogen and progesterone receptors along the reproductive tract in female lambs. *Acta Vet Scand* 42: 161-169.
  110. Meikle A, Tasende C, Rodríguez-Piñón M, Garófalo E.G. (1997). Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology* 48: 1105-1113.
  111. Meikle A, Tasende C, Sosa C, Garófalo EG. (2004). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fert Dev* 16: 385-394.
  112. Meikle A, Tasende C., Garófalo EG, Forsberg M. (1998). Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion. *Anim Reprod Sci* 54: 75-85.
  113. Menchaca A, Miller V, Gil J, Pinczak A, Laca M, Rubianes E. (2004). Prostaglandin F $2\alpha$  treatment associated with timed artificial insemination in ewes. *Reprod Domest Anim* 39: 352-355.

114. Miller BG, Murphy L, Stone GM. (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *J Endocrinol* 73: 91-98.
115. Moré J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anat (Basel)* 120: 156-159.
116. Morrison AG, Callanan JJ, Evans NP, Aldridge TC, Sweeney T. (2003). Effect of endocrine disrupting compounds on the pathology and oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  distribution in the uterus and cervix of ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol* 25: 329-343.
117. Mowa CN, Iwanaga T. (2000). Differential distribution of oestrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNAs in the female reproductive organ of rats revealed by in situ hybridization. *J Endocrinol* 165: 59-66.
118. Murata T, Narita K, Honda K, Matsukawa S, Higuchi T. (2003). Differential regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNAs in the rat uterus during pregnancy and labor: possible involvement of estrogen receptors in oxytocin receptor regulation. *Endocr J* 50: 579-587.
119. Mylne MJA, McKelvey WAC, Fernie K, Matthews K (1992). Use of a transcervical technique for embryo recovery in sheep. *Vet Rec* 130: 450-451.
120. Naqvi SM, Pandey GK, Gautam KK, Joshi A, Geethalakshmi V, Mittal JP. (2005). Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Anim Reprod Sci* 85: 337-344.
121. Novoa C. The postpartum ewe. (1984). *Proceeding of XI Intl. Congr. Anim. Reprod. Urbana, IL. VII:24-VII:30.*
122. Osmers R, Rath W, Adelman-Grill BC, Fittkow C, Szeverenyi M, Kuhn W. (1991). Collagenase activity in the human cervix uteri after prostaglandin E2 application during the first trimester. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 42: 29-32.
123. Osmers RG, Adelman-Grill BC, Rath W, Stuhlsatz HW, Tschesche H, Kuhn W. (1995). Biochemical events in cervical ripening dilatation during pregnancy and parturition. *J Obstet Gynaecol* 21: 185-194.
124. Ott TL, Zhou Y, Mirando MA, Stevens C, Harney JP, Ogle TF, Bazer FW. (1993). Changes in progesterone and oestrogen receptor mRNA and protein during maternal recognition of pregnancy and luteolysis in ewes. *J Mol Endocrinol*, 10: 171-183.
125. Owiny J, Fitzpatrick R, Spiller D. (1992). Changes in the extensibility of the ovine cervix uteri following infusion of estradiol-17 $\beta$  at term. *Small Rum Res* 7: 75-83.
126. Owiny J, Gilbert R, Wahl C, Nathanielsz P. (1995). Leukocytic invasion of the ovine cervix at parturition. *J Soc Gynecol Investig* 2: 593-596.
127. Owiny JR, Fitzpatrick RJ, Spiller DG, Appleton J. (1987). Scanning electron microscopy of the wall of the ovine cervix uteri in relation to tensile strength at parturition. *Res Vet Sci* 43: 36-43.
128. Owiny JR, Fitzpatrick RJ. (1990). Effect of intravaginal application of prostaglandin E2 gel on the mechanical properties of the ovine cervix uteri at term. *Am J Obstet Gynecol* 163: 657-660.
129. Parczyk K, Madjno R, Michna H, Nishino Y, Schneider MR. (1997). Progesterone receptor repression by estrogens in rat uterine epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63: 309-316.
130. Pettersson K, Gustafsson JA. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 63: 165-192.

131. Rajabi M, Solomon S, Poole AR. (1991a). Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig. *Endocrinology* 128: 863-71.
132. Rajabi MR, Cybulsky AV. (1995). Phospholipase A2 activity is increased in guinea pig uterine cervix in late pregnancy and at parturition. *Am J Physiol* 269: 940-947.
133. Rajabi MR, Dodge GR, Solomon S, Poole AR. (1991b). Immunochemical and immunohistochemical evidence of estrogen-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilatation in the guinea pig at parturition. *Endocrinology* 128: 371-378.
134. Rajabi MR, Solomon S, Poole AR. (1991c). Biochemical evidence of collagenase-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilatation at parturition in the guinea pig. *Biol Reprod* 45: 764-772.
135. Ramos J, Varayaud J, Bosquiaz V, Luque E, Muñoz de Toro M. (2002). Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationships to estrogen and progesterone receptors dynamics. *Biol Reprod* 67: 735-742.
136. Ramos JG, Varayoud J, Kass L, Rodriguez H, Muñoz de Toro M, Montes GS, Luque EH. (2000). Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. *Steroids* 65: 409-414.
137. Rath W, Osmers R, Adelman-Grill BC, Stuhlsatz HW, Szevereny M, Kuhn W. (1993). Biochemical changes in human cervical connective tissue after intracervical application of prostaglandin E2. *Prostaglandins* 45: 375-384.
138. Ravindra JP, Rawlings NC. (1997). Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. *J Reprod Fertil* 110: 279-289.
139. Raynal P, Houdeau E. (2004). Comparison of the uterine reflex activity during artificial insemination and mating in the ewe. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 33: 725-733.
140. Raynes JG, Anderson JC, Fitzpatrick RJ, Dobson H. (1988). Increased collagenase activity is not detectable in cervical softening in the ewe. *Coll Relat Res* 8: 461-469.
141. Regassa F, Noakes D. (2001). Changes in the weight, collagen concentration and content of the uterus and cervix of the ewe during pregnancy. *Res Vet Sci* 70: 61-66.
142. Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. (1998). Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 19: 3-17.
143. Rexroad CE Jr. (1981a). Estrogen and progestagen binding in the myometrium of the ewe. I. During the estrous cycle. *J Anim Sci* 53: 1057-1069.
144. Rexroad CE Jr. (1981b). Estrogen and progestogen binding in the myometrium of the ewe II. Regulation by estradiol and progesterone. *J Anim Sci* 53: 1070-1076.
145. Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Meikle A, Garófalo EG. (2000). Estrogen and progesterone receptors in the ovine cervix during the postpartum period. *Theriogenology* 53: 743-750.
146. Rubianes E, Ungerfeld R. (1993). Uterine involution and ovarian changes during early postpartum in autumn-lambing Corriedale ewes. *Theriogenology* 40: 365-372.
147. Russell AJF, Doney JM, Gunn RG. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 72: 451-454.

148. Ryan KD, Goodman RL, Karsch FJ, Legan SJ, Foster DL. (1991). Patterns of circulating gonadotropins and ovarian steroids during the first periovulatory period in the developing sheep. *Biol Reprod* 45: 471-477.
149. S.U.L., Secretariado Uruguayo de la Lana (2005b) [www.sul.org.uy/uruguay.htm](http://www.sul.org.uy/uruguay.htm).
150. S.U.L., Secretariado Uruguayo de la Lana. Mercados. (2005a) [www.sul.org.uy/mercados](http://www.sul.org.uy/mercados)
151. Sahlin L., Norstedt G., Eriksson H. (1994). Estrogen regulation of the estrogen receptor and insuline-like growth factor-I in the rat uterus: a potential coupling between effects of estrogen and IGF-I. *Steroids* 59: 421-430.
152. Salamon S, Maxwell W. (2000). Storage of ram semen. *Anim Rep Sci* 62: 77-111.
153. Sato T, Ito A, Mori Y, Yamashita K, Hayakawa T, Nagase H. (2001). Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol-17 beta. *Biochem J* 275: 645-650.
154. Sato T, Michizu H, Hashizume K, Ito A. (1991). Hormonal regulation of PGE2 and COX-2 production in rabbit uterine cervical fibroblasts. *J Appl Physiol* 90: 1227-1231.
155. Sayre B L, Lewis, GS. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology* 48: 267-275.
156. Sayre BL, Lewis GS. (1996). Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology* 45:1523-1533.
157. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 5: 459-478.
158. Schirar A, Cognié Y, Louault F, Poulin N, Meusnier C, Levasseur MC, Martinet J. (1990). Resumption of gonadotrophin release during the post-partum period in suckling and non-suckling ewes. *J Reprod Fertil* 88: 593-604.
159. Shemesh M, Dombrowski L, Gurevich M, Shore LS, Fuchs AR, Fields MJ. (1997). Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reprod Fertil Dev* 9: 525-530.
160. Soloff MS, Fernstrom MA, Periyasamy S, Soloff S, Baldwin S, Wieder M. (1983). Regulation of oxytocin receptor concentration in rat uterine explants by estrogen and progesterone. *Can J Biochem Cell Biol* 61: 625-630.
161. Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. (1996). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrous. *J Reprod Fert* 108: 101-106.
162. Spencer TE, Bazer FW. (1995). Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod* 53: 1527-1543.
163. Stellflug J N, Wulster-Radcliffe MC, Hensley E L, Cowardin E A, Seals RC, Lewis GS. (2001). Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *J Anim Sci* 79: 568-573.
164. Stjernholm Y, Sahlin L, Akerberg S, Elinder A, Eriksson HA, Malmstrom A, Ekman G. (1996). Cervical ripening in humans: potential roles of estrogen,

- progesterone, and insulin-like growth factor-I. *Am J Obstet Gynecol* 174: 1065-1071.
165. Stjernholm-Vladic Y, Stygar D, Mansson C, Masironi B, Akerberg S, Wang H, Ekman-Ordeberg G, Sahlin L. (2004a). Factors involved in the inflammatory events of cervical ripening in humans. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 74.
  166. Stjernholm-Vladic Y, Wang H, Stygar D, Ekman G, Sahlin L. (2004b). Differential regulation of the progesterone receptor A and B in the human uterine cervix at parturition. *Gynecol Endocrinol* 18: 41-46.
  167. Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. (2001). Co-localization of oestrogen receptor beta and leukocyte markers in the human cervix. *Mol Hum Reprod* 7: 881-887.
  168. Tang BY, Adams NR. (1981). Oestrogen receptors and metabolic activity in the genital tract after ovariectomy of ewes with permanent infertility caused by exposure to phyto-oestrogens. *J Endocrinol* 89: 365-370.
  169. Tang BY, Adams NR. (1986). Apparently normal oestrogen receptor system in ovariectomized ewes with impaired response to oestrogen after prolonged grazing on oestrogenic pasture. *J Endocrinol* 109: 251-255.
  170. Tasende C, Forsberg M, Rodríguez-Piñón M, Acuña S, Garófalo EG. (2005a). Experimentally induced subnormal or normal luteal phases in sheep: reproductive hormone profiles and uterine sex steroid receptor expression. *Reprod Fertil Dev* 17: 565-571.
  171. Tasende C, Meikle A, Rubianes E, Garófalo EG. (1996). Recovery of uterine estrogen and progesterone receptors during the ovine postpartum. *Theriogenology*, 45: 1545-1552.
  172. Tasende C, Rodríguez-Piñón M, Acuña S, Garófalo EG, Forsberg M. (2005b). Corpus luteum life span and pituitary oestrogen and progesterone receptors in cyclic and gonadotrophin-releasing hormone-treated anoestrus ewes. *Reprod Fertil Dev* 17: 721-726.
  173. Tasende C, Rodríguez-Piñón M, Meikle A, Forsberg M, Garófalo EG. (2002). Estrogen and progesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin releasing hormone-treated anoestrus ewes. *Theriogenology* 57: 1719-1731.
  174. Taylor KM, Allison-Gray C, Joyce MM, David-Stewart M, Bazer FW, Spencer TE. (2000). Neonatal ovine uterine development involves alterations in content of receptors for estrogen, progesterone, and prolactin. *Biol Reprod* 63: 1192-1204.
  175. Timmons BC, Mahendroo MS. (2006). Timing of neutrophil activation and expression of proinflammatory markers do not support a role for neutrophils in cervical ripening in the mouse. *Biol Reprod* 74: 236-245.
  176. Tsai MO, O'Malley BW. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63: 451-486.
  177. Viñoles C, Meikle, Forsberg M, Rubianes E. (1999). The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51: 1351-1361.
  178. Wang H, Eriksson H, Sahlin L. (2000). Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod* 63: 1331-1340.
  179. Wang H, Masironi B, Eriksson H, Sahlin L. (1999). A comparative study of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the rat uterus. *Biol Reprod* 61: 955-964.



180. Wang H, Stjernholm Y, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. (2001). Different regulation of oestrogen receptors alpha and beta in the human cervix at term pregnancy. *Mol Hum Reprod* 7: 293-300.
181. Wathes DC, Lamming GE. (1995). The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fert* 49: 53-67.
182. Wergin W. (1979). Cyclic changes in the surface structure of the cervix from the ewe as revealed by scanning electron microscopy. *Tissue Cell* 11: 359-370.
183. Wergin WP. (1985). Interactions between spermatozoa and the crypts, cilia, and mucus of the cervix in the ewe. *Scan Electron Microsc* 3: 1191-1199.
184. Westergren-Thorsson G, Norman M, Bjornsson S, Endresen U, Stjernholm Y, Ekman G, Malmstrom A. (1998). Differential expressions of mRNA for proteoglycans, collagens and transforming growth factor-beta in the human cervix during pregnancy and involution. *Biochim Biophys Acta* 1406: 203-213.
185. Whitley JC, Giraud AS, Mahoney AO, Clarke IJ, Shulkes A. (2000). Tissue-specific regulation of gastrin-releasing peptide synthesis, storage and secretion by oestrogen and progesterone. *Endocrinol* 166: 649-658.
186. Windsor DP, Széll AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC. (1994). Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 42: 147-157.
187. Wise ME. (1990). Gonadotropin-releasing hormone secretion during the postpartum anestrus period of the ewe. *Biol Reprod* 43: 719-725.
188. Wolf K, Sandner P, Kurtz A, Moll W. (1996). Messenger ribonucleic acid levels of collagenase (MMP-13) and matrilysin (MMP-7) in virgin, pregnant and postpartum uterus and cervix of rat. *Endocrinology* 137: 5429-5434.
189. Worthington CA, Kennedy JP. (1979). Ovarian response to exogenous hormones in six-week-old lambs. *Aust J Biol Sci* 32: 91-95.
190. Wright PJ, Geytenbeek PE, Clarke IJ and Findlay JK. (1983). LH release and luteal function in post-partum acyclic ewes after the pulsatile administration of LH-RH. *J Reprod Fertil* 67: 257-262.
191. Wu WX, Coksaygan T, Chakrabarty K, Collins V, Rose JC and Nathanielsz PW. (2005). Sufficient progesterone-priming prior to estradiol stimulation is required for optimal induction of the cervical prostaglandin system in pregnant sheep at 0.7 gestations. *Biol Reprod* 73: 343-350.
192. Wulster-Radcliffe MC, Lewis GS. (2002). Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology* 58: 1361-1371.
193. Wulster-Radcliffe MC, Wang S, Lewis GS. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology* 62: 990-1002.
194. Young A, Thomson AJ, Ledingham M, Jordan F, Greer IA, Norman JE. (2002). Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod* 66: 445-449.
195. Zambelli D, Cunto M. (2005). Vaginal and cervical modifications during the estrus cycle in the domestic cat. *Theriogenology* 64: 679-684.
196. Zhao Y, Williams LM, Hannah LT, Ross AW, Mc Kelvey WAC, Robinson JJ. (1999). Oestrogen and progesterone receptor immunoreactivity and c-fos expression in the ovine cervix. *J Reprod Fert* 115: 287-292.

197. Zhou Y, Chorich LP, Mahesh VB, Ogle TF. (1993). Regulation of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid by estradiol and progesterone in rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46: 687-698.

## **ANEXO – Publicación I**