



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Postgrados Académicos

**Estudios endócrino-moleculares, histológicos y
bioquímicos en el Cérvix ovino durante el Ciclo
Estral y el Anestro Estacional.**

Marcelo Rodríguez-Piñón

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

Tesis de Doctorado

ORIENTACIÓN: Producción Animal

2015

RESUMEN

La presente Tesis está basada en 5 estudios, en los que se investigaron aspectos endócrino-moleculares, histológicos y bioquímicos involucrados con la remodelación de la matriz extracelular (MEC) y relajación del cérvix ovino. Los estudios se realizaron durante el ciclo estral en estación reproductiva y durante el anestro estacional en ovejas inducidas a ovular.

Se utilizaron 46 ovejas Corriedale y se realizaron tres experimentos: 1° Ovejas ciclando en estación reproductiva sacrificadas los días 1 (n=7), 6 (n=6) o 13 (n=7) de detectado estro (**Estudios I, II y III**). 2° Ovejas en anestro estacional tratadas con GnRH para inducir la ovulación con o sin progesterona (P4) previa y sacrificadas sin tratamiento (n=4), inmediatamente luego del tratamiento con P4 (n=4) y un día luego del tratamiento con GnRH (n=4) o P4+GnRH (n=3) (**Estudios IV y V**). 3° Ovejas en anestro tratadas con P4+GnRH para inducir la ovulación y sacrificadas los días 1 (n=6) o 5 (n=5) después del bolo de GnRH (**Estudios IV y V**). En los 3 experimentos se obtuvieron muestras de sangre para determinaciones de 17β -estradiol (E2) y P4 por RIA y al sacrificio se obtuvieron muestras de cérvix craneal y caudal para estudios moleculares, histológicos y bioquímicos. El transcripto del receptor de estrógenos subtipo α (ARNm RE α) fue determinado por hibridización en solución y las concentraciones de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) por ensayos de unión (**Estudios I y IV**). Los RE α , los receptores de LH (RLH) y de oxitocina (ROx) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) se localizaron y cuantificaron en los epitelios y estromas cervicales por inmunohistoquímica (**Estudio II**). Las metaloproteinasas de la MEC -2 y -9 (MMP-2 y MMP-9) fueron identificadas y localizadas por inmunohistoquímica y las formas Latente y Activa fueron determinadas por zimografía en SDS-PAGE. La distribución de las fibras y la concentración de colágeno se determinaron por la técnica tricrómica de van Giesson y por la cuantificación espectrofotométrica de hidroxiprolina, respectivamente (**Estudios III y V**).

Durante el ciclo estral en estación reproductiva, se encontraron mayores concentraciones cervicales de ARNm RE α , RE y RP alrededor de la ovulación luego del pico preovulatorio de E2 y menores concentraciones en fase lútea a predominio de P4 (**Estudio I**). Los niveles de expresión de RE α , RLH, ROx y COX-2 fueron mayores en los epitelios que en los estromas cervicales: para RE α la mayor expresión se encontró en epitelios luminales alrededor de la ovulación, mientras que para RLH, ROx y COX-2 la mayor expresión se encontró en fase lútea tardía (**Estudio II**). La MMP-2 fue predominante en cérvix ovino, ya que MMP-9 solo fue detectada en menos del 9% de las muestras. El área ocupada por las fibras de colágeno y la concentración de colágeno disminuyeron alrededor de la ovulación, asociadas al aumento de 10 a 20 veces en la concentración y en la actividad de la MMP-2, producida por los fibroblastos del estroma (**Estudio III**). Se sugiere que los E preovulatorios, a través del RE α epitelial, dirigen la cascada de eventos que llevan al

incremento de la desagregación y de la degradación enzimática del colágeno al estro, demostrando la coexistencia de estos dos procesos en los mecanismos de remodelación de la MEC.

Durante el anestro estacional, con concentraciones basales de E2 y P4 circulantes, el cérvix mostró expresión constitutiva de ARNm RE α , RE, RP y MMP-2, que se manifestó en forma diferencial en las zonas craneal y caudal (**Estudios IV y V**). En el cérvix craneal, las concentraciones de ARNm RE α , RE, RP y MMP-2 mostraron el efecto estimulador de E2 inducido por la GnRH y el efecto inhibitorio de la P4 y fueron mayores alrededor de la ovulación inducida que en fase lútea temprana. Sin embargo, en el cérvix caudal los niveles fueron menores y no fueron afectados por los tratamientos, sugiriendo que el anestro estacional condiciona la capacidad de respuesta a los E y el potencial colagenolítico de MMP-2, en forma dependiente de la zona cervical (**Estudios IV y V**). Al igual que en ciclo estral, la MMP-2 fue predominante en cérvix ovino. La concentración de colágeno fue menor y la actividad de la MMP-2 fue mayor alrededor de la ovulación inducida que en la fase lútea temprana, sugiriendo que el aumento de los E preovulatorios inducen la degradación del colágeno a través del estímulo de la actividad enzimática de la MMP-2 (**Estudio V**), a diferencia de lo encontrado durante el ciclo estral, donde el estímulo fue sobre la síntesis y la actividad de MMP-2. Se sugiere que el tratamiento con GnRH y P4 previa para inducir la ovulación en anestro, reproduce parcialmente los mecanismos de degradación del colágeno descritos en ovejas ciclando.

En todos los estudios realizados durante el ciclo estral en estación reproductiva y el ciclo inducido en anestro estacional se encontraron marcadas diferencias histomorfológicas y/o en la expresión de RE α , RP, RLH, ROx, COX-2 y MMP-2 entre cérvix craneal y caudal, lo que refleja distintos roles fisiológicos para estas zonas cervicales.

En conclusión, se demuestra que la mayor capacidad de respuesta a los E del cérvix ovino alrededor de la ovulación se asocia con mayor actividad colagenasa y mayor desagregación de las fibras y degradación de colágeno, tanto en ciclo estral natural como inducido en anestro estacional. Se infiere que la desagregación de las fibras y degradación de colágeno estimuladas directa o indirectamente por los E, están involucradas en la remodelación de la MEC y contribuyen a la relajación, dilatación y aumento de la penetrabilidad del cérvix al momento de la ovulación.

SUMMARY

This thesis is based on five studies, in which, endocrine-molecular, histological and biochemical aspects involved in the remodeling of extracellular matrix (ECM) and relaxation of the cervix were investigated. The studies were conducted in ewes during the estrous cycle in the breeding season and in ewes induced to ovulate during seasonal anestrus.

Forty six Corriedale ewes were used to perform three experiments: 1) Cycling sheep during the breeding season were sacrificed on days 1 (n=7), 6 (n=6) or 13 (n=7) after the estrus detection (**Studies I, II and III**). 2). Seasonal anestrus sheep treated with GnRH with or without progesterone (P4) priming to induce the ovulation were also used and were sacrificed without treatment (n=4), when the P4 was removed (n=4) or one day after the GnRH bolus injection with (n=3) or without (n=4) P4 priming (**Studies IV and V**). 3) Seasonal anestrous ewes treated with the same P4+GnRH treatment used in the experiment 2 were used and were sacrificed on days 1 (n=6) or 5 (n=5) after GnRH bolus injection (**Studies IV and V**). In the 3 experiments, blood samples were collected for estradiol-17 β (E2) and P4 determinations by RIA. Samples of cranial and caudal cervix were obtained at sacrifice for molecular, histological and biochemical studies. The transcript of estrogen receptor α (ER α mRNA) was determined by solution hybridization. Estrogen and P4 receptors (ER and PR, respectively) concentrations were determined by binding assays (**Studies I and IV**). The ER α , LH (LHR) and oxytocin (OxR) receptors and cyclooxygenase-2 (COX-2) in cervical epithelia and stroma were located and quantified by immunohistochemistry (**Study II**). The ECM metalloproteinases -2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) were identified and located by immunohistochemistry and the Latent and Active forms were determined by SDS-PAGE zymography. The collagen fibers distribution and the collagen concentration were determined by van Giesson trichrome technique and hydroxyproline spectrophotometric quantification, respectively (**Study III and V**).

During the estrous cycle in the breeding season, higher cervical ER α mRNA, ER and PR concentrations around ovulation -after the E2 preovulatory peak- and lower concentrations during the luteal phase -under P4 predominance- were found (**Study I**). The levels of expression of ER α , LHR, OxR and COX-2 were greater in the cervical epithelia than in the stroma: increased expression of RE α was found in luminal epithelia around the ovulation, while the highest expression for LHR, OxR and COX-2 was found during the late luteal phase (**Study II**). The MMP-2 was the predominant gelatinase in cervix since that the MMP-9 was only detected in less than 9% of the samples. The area occupied by collagen fibers and the collagen concentration decreased around ovulation, associated with 10 to 20 times increased in the MMP-2 concentration and activity, produced by stromal fibroblasts (**Study III**). Thus, the preovulatory E, acting through the epithelial ER α , trigger the cascade of events that induce the increase in collagen disaggregation and enzymatic

degradation at estrus, showing the coexistence of these two processes in ECM remodeling mechanisms.

During the seasonal anoestrus, with basal levels of circulating E2 and P4, the ovine cervix showed a constitutive expression of ER α mRNA, ER PR and MMP-2, which are expressed differentially in the cranial and caudal zones (**Studies IV and V**). In the cranial cervix, the concentrations of ER α mRNA, ER, PR and MMP-2 showed the stimulatory effect of E2 induced by GnRH treatment and the inhibitory effect of P4, and were higher around the induced ovulation than in the early luteal phase. However, in the caudal cervix, these levels were lower than in the cranial zone and were not affected by the treatments, suggesting that the seasonal anoestrus affects the capacity of response to the E and the collagenolytic potential of MMP-2 dependently in the cervical zone (**Studies IV and V**).

As during the estrous cycle, MMP-2 was the predominant gelatinase in the cervix of sheep in seasonal anestrus. The collagen concentration was lower and the activity of MMP-2 was higher around the induced ovulation than in the early luteal phase, suggesting that the increase of preovulatory E, induce the collagen degradation by stimulating the MMP-2 activity (**Study V**), while the increase of MMP-2 -E dependent- during the estrous cycle was demonstrated on both the synthesis and activity. It is suggested that the P+GnRH treatment to induce ovulation in anestrus ewes partially reproduces the collagen degradation mechanisms described in cycling ewes.

In the studies conducted during the natural estrous cycle in the breeding season as well as in the induced estrous cycle in the seasonal anestrus, histomorphologic differences and/or in the levels of ER, PR, RLH, ROx, COX-2 and MMP-2 expression were demonstrated between cranial and caudal cervix, reflecting their different physiological roles.

In conclusion, greater capacity of response to E around ovulation was demonstrated in the ewe cervix in natural estrous cycle as well as induced estrous cycle in seasonal anestrus. This greater capacity of response to E is associated with increased collagenase activity and greater collagen fibers disaggregation and degradation. It is inferred that the E, directly or indirectly, induce the collagen fibers disaggregation and degradation, which are involved in the ECM remodeling and contribute to relaxation, dilatation and increased penetration of the cervix around ovulation.

INDICE

Introducción y Antecedentes, 1

El cérvix ovino como barrera biotecnológica, 1

Morfología del cérvix ovino, 1

El cérvix en diferentes estadios reproductivos, 2

Gestación y parto, 3

Ciclo estral de la oveja, 3

Anestro estacional de la oveja, 4

Hormonas, mecanismos de acción y función cervical, 4

Estrógenos, Progesterona y sus receptores nucleares específicos, 4

Gonadotropinas y sus receptores específicos, 6

Oxitocina y su receptor de membrana, 7

Prostaglandinas y Ciclooxygenasas, 7

Mecanismos de dilatación cervical, 8

Metaloproteinasas de la matriz extracelular, 8

Remodelación de la Matriz Extracelular Cervical, 10

Hipótesis y objetivos, 12

Objetivos específicos, 12

Estrategia de investigación, 13

Materiales y Métodos, 13

Diseños experimentales, 13

Métodos, 15

Procedimientos de muestreo, 15

Determinaciones hormonales, 15

ARNm REa por hibridización en solución, 16

RE y RP por ensayos de unión, 16

Histología cervical, 17

REa, ROx, RLH y COX-2 por inmunohistoquímica, 17

Concentración de colágeno por espectrofotometría, 18

Distribución de colágeno por histoquímica, 19

Metaloproteinasas por zimografías en SDS-PAGE, 19

Actividad colagenasa y gelatinasa por zimografía in situ, 19

Metaloproteinasas por inmunohistoquímica, 20

Análisis estadísticos, 20

Resultados y Discusión, 22

Estudio I, 22

Estudio II, 25

Estudio III, 33

Estudio IV, 38

Estudio V, 43

Discusión general, 48

Conclusiones, 52

Referencias, 43

Agradecimientos, 66

Anexos: Publicaciones I, II, III y IV

Esta Tesis está basada en cinco Estudios referidos en el texto por números romanos (**Estudios I, II, III, IV y V**), que dieron lugar a cinco Publicaciones:

- I. Rodríguez-Piñón M., Tasende C., Puime P. and Garófalo E.G. (2008). Oestrogens and progesterone receptor binding proteins and oestrogens receptor alpha expression (ER α mRNA) along the cervix in cycling ewes. *Reprod Fertil Dev*, 20: 350–356. <http://www.publish.csiro.au/nid/44/paper/RD07186.htm>.

Rodríguez-Piñón M., Tasende C., Puime P. and Garófalo E.G. (2008). Capacidad de unión de los receptores de estrógenos y progesterona y expresión del receptor de estrógenos alfa (RE α mRNA) a lo largo del cérvix ovino durante el ciclo estral. *Trabajo científico galardonado con el Premio Academia Nacional de Veterinaria (ANV) 2008, Financiación ANV - Ministerio de Educación y Cultura (M.E.C.), Montevideo 02 de diciembre 2008.*

- II. Rodríguez-Piñón M., Gonzalez R., Tasende C., Bielli A., Genovese P. and Garófalo E.G. (2014). Cervical changes in estrogen receptor alpha (ER α), oxytocin receptor (OxR), LH receptor (LHR) and ciclooxigenase-2 (COX-2) depending on histological compartment, longitudinal axis and day of the ovine estrous cycle. *Theriogenology* 81: 813-824.
- III. Rodríguez-Piñón M., Tasende C., Casuriaga D., Bielli A., Genovese P. and Garófalo E.G. (2015). Collagen content and distribution and matrix metalloproteinases -2 and -9 abundance and activity along the cervix of the ewe during the estrous cycle. Aceptado en *Theriogenology* DOI:10.1016/j.theriogenology.2015.05.017.
- IV. Rodríguez-Piñón M., Tasende C., and Garófalo E.G. (2011). Cervical oestrogen and progesterone receptors in progesterone-primed and gonadotrophin releasing hormone-treated anoestrous ewes. *Animal Reproduction Science* 126: 50-56.
- V. Rodríguez-Piñón M., Tasende C., Genovese P., Bielli A., Casuriaga D., and Garófalo E.G. (2015). Collagen content and extracellular matrix metalloproteinases-2 and-9 (MMP-2 and mmp-9) activity along the cervix of anestrous ewes induced to ovulate. En redacción.

En la Publicación I, *Reproduction, Fertility and Development*, los derechos de autor fueron transferidos a la Editorial CSIRO Publishing, la que otorgó el permiso correspondiente para su inclusión en la presente Tesis. En las Publicaciones II y III, *Theriogenology* y IV, *Animal Reproduction Science*, los derechos de autor fueron transferidos a la Editorial Elsevier, pero por cláusula expresa los autores retienen dichos derechos para su utilización con propósitos académicos y de enseñanza.

Abreviaciones

AA: ácido araquidónico
AMPc: adenosina monofosfato cíclico
APMA: p-aminofenilmercuriato
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
CH: compartimentos histológicos
COX: prostaglandina endoperóxido sintasa
E: estrógenos
E₂: 17β-estradiol
EDTA: etilendiaminotetraacético
EP receptor: receptor de prostaglandina E2
FSH: hormona folículo estimulante
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas
IA: inseminación artificial
K_d: constante de disociación aparente
LH: hormonas luteinizante
MEC: matriz extracelular
MMP: metaloproteinasa de la matriz extracelular
Ox: oxitocina
P4: progesterona
PG: prostaglandinas
PGD2: prostaglandina D2
PGE2: prostaglandina E2
PGF2α: prostaglandina F2α
PGH2: prostaglandina H2
PGI2: prostaglandina I2
PLC: fosfolipasa C
RE: receptor de estrógenos
RFSH: receptor de hormona folículo estimulante
RIA: radioinmunoanálisis
RLH: receptor de hormonas luteinizante
ROx: receptor de oxitocina
RP: receptor de progesterona
SDS: dodecil sulfato sódico
TE: transferencia de embriones
TIMP: inhibidor tisular de las metaloproteinasas de la matriz extracelular

Introducción y Antecedentes

El cérvix ovino como barrera biotecnológica

La conformación anatómica particular del cérvix ovino constituye una barrera para la canulación transcervical, convirtiéndose en un factor limitante para el desarrollo de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA) (Halbert y col. 1990; Campbell y col. 1996) y la transferencia de embriones (TE) (Armstrong y Evans 1983; Kraemer 1989). En la gran mayoría de las ovejas solo es posible la IA en el canal cervical caudal, resultando en bajos índices de concepción (Salamon y Maxwell 2000). La tasa de nacimientos en la inseminación cervical cuando se utiliza semen congelado raramente supera el 50% (King y col. 2004, datos nacionales en Fierro y col. 2013) y éstos resultados mejoran con el aumento en la profundidad de la canulación cervical (Salamon y Maxwell 2000). La aplicación de IA con semen congelado directamente en el cuerno uterino mediante laparotomía o laparoscopia ha mejorado los indicadores reproductivos, pudiendo alcanzar el 70% de nacimientos (Salamon y Maxwell 2000, datos nacionales en Fierro y col. 2013). A su vez, para la TE, tanto la obtención como la deposición de los embriones es críticamente dependiente del acceso intrauterino, para lo cual se utiliza la laparoscopia (Cognie 1999, revisado en Menchaca y col. 2010). El acceso transcervical al útero se presenta como la alternativa más eficiente y menos costosa, por lo que conseguir la dilatación cervical ha sido objeto de estudios en los últimos años (revisiones de Robinson y col. 2011; Candappa y Bartlewsky 2012; Candappa y Bartlewsky 2014). Los primeros estudios apuntaron a desarrollar instrumental de inseminación especial para dilatar el cérvix, con aumentos escasos en la fertilidad. Posteriormente los estudios se dirigieron a la inducción hormonal de la dilatación cervical, todavía en fase experimental.

Se ha propuesto que el cérvix ovino en la estación reproductiva presenta mayor grado de relajación, dilatación y penetrabilidad durante la fase folicular que durante la luteal, características que han sido asociadas a los mayores niveles de E y gonadotrofinas preovulatorias (Kershaw y col. 2005; Leethongdee y col. 2007). En acuerdo con éste planteo, los esfuerzos están dirigidos a profundizar en el conocimiento de los mecanismos endócrinos, moleculares y bioquímicos que provocan la relajación y la dilatación e incrementan la penetrabilidad cervical, a los efectos de avanzar en biotecnologías reproductivas tanto en estación reproductiva como en el anestro estacional ovino.

Morfología del cérvix ovino

El cérvix de la oveja es un órgano tubular y fibroso, de 5 a 10 cm de largo dependiendo de la raza, compuesto principalmente de tejido conectivo con predominio de colágeno y músculo liso, con una capa serosa exterior y el epitelio luminal interior (Moré 1984). Hacia la luz, los pliegues de la mucosa forman 5 a 7

anillos excéntricos en forma de embudo con el vértice hacia caudal, que ocluyen la luz del canal cervical (Halbert y col. 1990; Kershaw y col. 2005; Naqvi y col. 2005). En su eje longitudinal se pueden diferenciar al menos dos regiones (Halbert y col. 1990; Kershaw y col. 2005). La región caudal, va desde el orificio cervical externo hasta el tercer o cuarto anillo, los que están muy desarrollados, constituyéndose en la principal barrera para la canulación transcervical. La región craneal, contigua al cuerpo uterino, posee anillos más pequeños y definidos. Existe una gran variabilidad en la morfología cervical entre razas, categorías e individuos, tanto en las dimensiones del órgano, número y alineación de los anillos, como en la disposición de pliegues de la mucosa vaginal que obstruyen el orificio cervical externo (Halbert y col. 1990; Naqvi y col. 2005; Kershaw y col. 2005).

Desde el punto de vista histológico, el cérvix ovino es un órgano de gran complejidad. La capa mucosa está revestida por epitelio luminal columnar por debajo del cual se encuentra un conjuntivo laxo. La mucosa se organiza en largos pliegues arborescentes, en la base de los cuales se abren glándulas tubulares (Lightfoot y Adams 1979). La presencia de glándulas tubulares no ha sido confirmada puesto que Moré (1984) no encontró evidencias de las mismas. El estroma incluye dos capas de tejido conjuntivo hacia la luz, una más laxa y otra más densa y 3 a 5 capas de músculo liso hacia la periferia (Moré 1984). Los diferentes tipos celulares que componen las capas del tejido cervical se comunican entre sí en forma autócrina y/o parácrina para modificar la composición de la matriz extracelular (MEC) (Schmitz y col. 2006).

Los componentes mayoritarios de la MEC cervical son el colágeno fibrilar y los glucosaminoglucanos, que se encuentran formando parte de complejos proteoglucanos de alto peso molecular o en forma libre, como el ácido hialurónico (Golichowski y col. 1980; Fosang y Handley 1988; Uldbjerg 1989; Kershaw-Young y col. 2009). Las interacciones bioquímicas entre estos elementos estructurales son críticas para el proceso de remodelación del cérvix que resulta en su dilatación (Word y col. 2007; Myers y col. 2008).

El cérvix en diferentes estadios reproductivos

El cérvix de los mamíferos experimenta profundos cambios morfológicos y funcionales, los que están modulados por variaciones en las concentraciones de hormonas en los diferentes estadios reproductivos (Gorodeski 1996; Gibb y col. 2006; Word y col. 2007). La mayoría de los estudios sobre los mecanismos hormonales de la remodelación del tejido cervical se han realizado en humanos y especies de laboratorio durante la gestación y fundamentalmente al parto, cuando se registra el máximo de dilatación cervical (Word y col. 2007).

Gestación y parto

La dilatación del canal de parto es consecuencia de un profundo proceso de remodelación del tejido conectivo cervical, proceso dependiente del entorno hormonal, que culmina con la expulsión del feto (Fuchs y Fuchs 1984; Hayashi 1993; Leppert 1995; Word y col. 2007). En la oveja a término, luego de un período prolongado de altos niveles de P4 durante la gestación, el cortisol fetal aumenta e induce la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) placentaria que, a su vez, aumenta la capacidad de la placenta para convertir la P4 a andrógenos y éstos a E (Challis y col. 2000). Como resultado, la concentración circulante de P4 disminuye, a la vez que se eleva la de E. Éste cambio en la relación E/P estimula la producción de prostaglandina F2 α (PGF2 α) y PGE2 uterina y de PGE2 cervical, la cual es reforzada por la participación de la oxitocina (Ox) liberada por la neurohipófisis materna y el establecimiento del reflejo de Fergusson en el trabajo de parto (Gibb y col. 2006; Weems y col. 2006). La PGE2 actuando a través de sus receptores cervicales, media la relajación del músculo liso y la síntesis de glucosaminoglucanos en el cérvix, en particular del ácido hialurónico (Challis y col. 2000). El ácido hialurónico es un glucosaminoglucano mayormente libre (no asociado a los peptidoglucanos) muy higroscópico y que, al acumularse entre las fibras de colágeno, interfiere con la formación de los puentes de hidrógeno que estabilizan la superestructura del tropocolágeno, desagregándolo y elongándolo (Winkler y col. 1997; Winkler y Rath 1999; Ruscheinsky y col. 2008; Yang y col. 2011; Anandagoda y col. 2012). Además, en cérvix humano al parto, se ha descrito la participación de la PGE2 en un proceso de tipo inflamatorio, donde la infiltración de leucocitos, producción de interleuquinas y la activación de colagenasas remodelarían la MEC y que desembocaría en la apertura del canal del parto (Wang y Stjernholm 2007; Myers 2012).

Ciclo estral de la oveja

Las ovejas son poliéstricas estacionales, con ciclos estrales de 16 y 17 días de intervalo inter-estro que ocurren en el verano y el otoño (estación reproductiva) (Goodman e Inskeep 2006; Bartlewski y col. 2011). El ciclo estral de la oveja es coordinado por interacciones hormonales entre el cerebro (hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH), la hipófisis (hormona luteinizante, LH y hormona folículo estimulante, FSH), los ovarios (folículos: E e inhibina; cuerpo lúteo: P4 y Ox) y el útero (PGF2 α) (por revisión ver Goodman e Inskeep 2006). El aumento de la pulsatilidad de la GnRH hipotalámica estimula el aumento de la pulsatilidad de LH que, en sinergia con la FSH, inducen el crecimiento de una onda folicular con el consiguiente aumento de E circulantes (fase folicular). El establecimiento de una retroalimentación positiva entre los E y las gonadotropinas desemboca en la producción del pico preovulatorio de E, la descarga de LH y la ovulación del folículo dominante (día 0 del ciclo estral). Durante la fase folicular, el aumento en la relación E/P es importante para la manifestación estral (puede haber o no). El estro en la

oveja dura de 24 a 36 h y la ovulación, que es espontánea, ocurre hacia el final del estro (Goodman e Inskeep 2006). Luego de la ovulación, el remanente folicular comienza su transformación en cuerpo lúteo (luteinización). A medida que el cuerpo lúteo se desarrolla (fase luteal), las concentraciones circulantes de P4 aumentan y se diferencian de los niveles basales a partir del día 5-6 del ciclo estral. Las altas concentraciones de P4 circulantes durante la fase luteal mantienen inhibida la retroalimentación positiva entre PGF2 α uterina y la Ox ovárica. En la oveja no gestada, entre los días 11 y 13 del ciclo estral, la P4 pierde su capacidad inhibitoria, desencadenando el mecanismo de destrucción del CL (luteólisis). La destrucción del cuerpo lúteo (días 14-15 del ciclo) lleva a la caída de los niveles de P4 circulantes y comienza una nueva fase folicular.

Durante el estro (momento de aplicación de la IA) el cérvix se encuentra levemente relajado y edematoso. Kershaw y col. (2005) reportaron que la penetrabilidad del cérvix ovino fue mayor en ovejas durante la fase folicular que en la luteal, sugiriendo que los altos niveles de E circulantes estimularían la relajación cervical y la elevada concentración de P4 en la fase luteal ejercería un efecto contrario. Al momento de realizar la TE tanto la oveja donante como la receptora se encuentran en la fase lútea temprana (alrededor de los días 6-7 del ciclo estral), con un cuerpo lúteo funcional y produciendo cantidades crecientes de P. En éste momento, el cérvix se encuentra firme y cerrado (Candappa y Bartlewsky 2012).

Anestro estacional de la oveja

El anestro estacional de la oveja Corriedale se extiende de junio-enero (Hemisferio Sur 33-34° de Latitud (Rodríguez Iglesias y col. 1993). Si bien durante el anestro existen ondas de crecimiento folicular similares a las de la estación reproductiva, la ovulación no ocurre (Souza y col. 1996; Malpaux 2006) debido a la baja frecuencia de pulsatilidad de la secreción de LH (Ravindra y Rawlings 1997). Esto determina que los E se encuentren en concentraciones basales y, al no haber ovulación ni formación de cuerpo lúteo, la P4 también permanezca basal. Durante el anestro estacional, el cérvix permanece cerrado y la producción de mucus cervical es escasa (Adams 1979).

Hormonas, mecanismos de acción y función cervical

Estrógenos, Progesterona y sus receptores específicos

El cérvix es un órgano blanco de la acción de las hormonas esteroideas ovárica y estas hormonas comandan las diferentes funciones del órgano. Desde las décadas 70 y 80 se han reportado evidencias del efecto de los esteroides ováricos sobre la fisiología cervical. Las hormonas esteroideas ováricas mostraron tener efecto sobre la capacidad cervical de retener los espermatozoides luego de la IA, el flujo sanguíneo (Allison y Robinson 1972; Croker y col. 1975; Brown y Mattner 1977), la composición del

mucus (Wergin 1979) y la actividad mioeléctrica (García-Villar y col. 1982). Incluso, el cérvix mostró ser blanco de la acción de los fitoestrógenos, sufriendo alteraciones profundas e irreversibles en corderas cuando el consumo es prolongado (Allison y Robinson 1972; Adams 1986; Adams y Sanders 1993).

Los E y la P4 ejercen sus acciones genómicas a través de sus proteínas receptoras específicas (RE y RP, respectivamente), localizadas en el núcleo de las células de los tejidos efectores (Couse y col. 2006). La unión de E y P4 a su receptor resulta en la formación de un complejo hormona-receptor con actividad de factor de transcripción, capaz de modular la expresión de genes específicos de la acción de E y P4 (Couse y col. 2006). La capacidad de respuesta de los tejidos efectores a una determinada hormona depende de la concentración de la hormona circulante, de la concentración tisular del receptor y de la afinidad de la hormona por su receptor (Clark y col. 1992). La regulación de la expresión de RE y RP la ejercen los propios E y P, estimulando o inhibiendo la expresión de los genes que los codifican (Couse y col. 2006). En general se ha demostrado que el complejo E-RE estimula la expresión de RE y RP, mientras el complejo P-RP inhibe la expresión de ambos receptores (Ing y col. 1993; Couse y col. 2006). Se han descrito dos tipos de RE, llamados α y β que están codificados en distintos genes y que tienen estructura molecular y función diferente (Kuiper y col. 1997, Couse y col. 2006). El RE α es predominante en útero y en cérvix de roedores (Wang y col. 2000; Gorodeski y Pal 2000) y de oveja (Morrison y col. 2003) (por revisión ver Meikle y col. 2004). El RE β fue reportado en útero de roedores (Wang y col. 2000) y oveja (Morrison y col. 2003), pero no fue detectado en cérvix ovino. Se ha propuesto que, además de las acciones genómicas de E y P4, que tardan minutos, horas o incluso días, las hormonas esteroideas ováricas pueden tener acciones no genómicas, caracterizadas por una duración de segundos y que estarían mediadas por receptores de membrana (Revelli y col. 1998; Stormshak y Bishop 2008). No se han reportado acciones de E o P4 a través de receptores de membranas en cérvix.

La sensibilidad del cérvix ovino a los E y a P4, en términos de la capacidad de unión de dichas hormonas a sus receptores específicos, fue reportada por primera vez en ovejas prepúberes (Meikle y col. 2001). En dicho experimento, la administración de E₂ o de P4 aumentó las concentraciones de ARNm RE α y RP ARNm, sin afectar la concentración de RE y RP. En un estudio posterior, utilizando muestreos cervicales seriados luego del tratamiento con E₂, se describió que el efecto inductor del E₂ sobre la transcripción de RE α y RP se traducía en un efecto bifásico (disminución seguida de aumento) sobre la capacidad de unión a las proteínas receptoras de E y P4 (Rodríguez-Piñón y col. 2005). En ovejas adultas, en postparto durante la estación reproductiva, la concentración de RE y RP en cérvix fue baja en el posparto inmediato y aumentó en el posparto tardío (Rodríguez-Piñón y col. 2000), en asociación con el reinicio de la actividad ovárica (Tasende y col. 1996). Estos resultados están de acuerdo con la regulación aceptada para RE y RP por parte de E y P. La capacidad de unión de E y P4 a sus receptores (RE y RP) en cérvix de ovejas durante el ciclo estral y en ovejas en

anestro estacional no ha sido reportada, aunque la inmunoseñal de RE y RP fue detectada solo en los primeros 3 días luego del estro en cérvix de ovejas ciclando (Zhao y col. 1999). En este trabajo, la inmunoseñal de RE se restringió al epitelio luminal y la de RP abarcó la capa muscular, además del epitelio luminal (Zhao y col. 1999). Por otra parte, en cérvix bovino, la inmunoreactividad a RE y RP fue mayor en el estroma profundo respecto al estroma subepitelial y al epitelio luminal, y fue mayor en la región caudal que en la craneal (Breeveld-Dwarkasing y col. 2000, 2002). En cérvix de ovejas en anestro estacional no fue detectado inmunomarcado a RE, mientras que a RP fue observado solo en musculo liso y epitelio luminal (Zhao y col. 1999). En conjunto estos antecedentes sugieren que los RE y RP cervicales estarían sometidos a complejos mecanismos de regulación en los que participan los E y la P4 circulantes, así como otras hormonas y factores locales dependientes de los diferentes tipos celulares y regiones cervicales.

Gonadotrofinas y sus receptores específicos

Los niveles circulantes de LH y FSH durante el ciclo estral presentan patrones muy bien establecidos y cumplen roles fundamentales en el desarrollo folicular, la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo (Baird y McNeilly 1981; Goodman e Inskoop 2006). La LH y la FSH son hormonas glucoproteicas compuestas por dos subunidades diferentes (α y β) unidas no covalentemente, que ejercen su acción a través de sus receptores específicos de membrana (RLH y RFSH) acoplados a proteínas G (Catt y Dufau 1991). A partir de la primera comunicación de la existencia de receptores a gonadotrofinas en tejidos diferentes de las gónadas (Ziecik y col. 1986), comenzaron los estudios para aclarar cuáles podrían ser los nuevos roles biológicos de éstas hormonas en tejidos extragonadales.

En útero, los sitios de unión a LH/hCG (RLH) y/o sus ARNm fueron reportados en varias especies, incluyendo humano, primate, cerda, vaca y oveja (revisado en Fields y Shemesh 2004). En bovino, la acción de la LH a través del RLH endometrial fue asociada a la producción de PGF2 α , adjudicándosele un rol en el comienzo del proceso luteolítico (Fields y Shemesh 2004). En cambio, en ovino, se le adjudicó un efecto luteotrófico a través de la producción de PGE2 (Weems y col. 2003).

En cérvix, el RLH también fue reportado en varias especies (Ziecik y col. 2005). En cérvix bovino, altos niveles de RLH y de su transcritto fueron encontrados en la fase luteal (Fields y Shemesh 2004) y estudios *in vitro* demostraron que el tratamiento con LH de tejido cervical inducía la producción de PGE2 (Mizrachi y Shemesh 1999). En el mismo trabajo se describió que el RLH regula la producción de PGE2 mediante las vías de señalización del AMPc y de la fosfolipasa C (PLC). En cérvix de ovejas sincronizadas, se reportaron altos niveles del RLH ARNm en epitelio respecto al estroma subepitelial (Leethongdee y col. 2010), pero la proteína RLH y su ubicación histológica no ha sido reportada. Aún no es claro el rol de los componentes del sistema LH/PGE2 en la fisiología del cérvix.

Oxitocina y su receptor de membrana

Se ha reportado que la oxitocina estimula la contractilidad cervical en la oveja al estro (Ayad y Leung 2004) e induce la dilatación cervical en la gestación a término en la mujer (MacKenzie 2006). En cérvix bovino, se ha reportado *in vivo* e *in vitro* que la Ox causa una estimulación selectiva de la liberación de PGE2 cervical, postulándose que los componentes del sistema Ox/PGE2 estaría involucrado en algunas funciones cervicales como la dilatación cervical, la capacitación espermática e incluso como soporte luteotrófico (Fuchs y col. 1996; Shemesh y col. 1997; Fuchs y col. 2002).

La Ox es un oligopéptido sintetizado en la neurohipófisis y en el cuerpo lúteo que ejerce su acción a través de su receptor de membrana específico (ROx) (por revisión, ver Gimpl y Fahrenholz 2001). En cérvix ovino, la expresión del ROx estaría regulada por los niveles circulantes de E y P4 (Matthews y Ayad 1994). La concentración del ROx cervical medida por ensayos de unión aumentó al momento de la luteólisis y permaneció alta al estro, descendiendo posteriormente en la fase luteal y fue mayor en el estroma profundo que en la capa más superficial, que incluyó el epitelio (Matthews y Ayad 1994). Sin embargo, utilizando autoradiografía, los mismos autores detectaron el ROx solo en el epitelio luminal (Matthews y Ayad 1994). Por otra parte, Falchi y Scaramuzzi (2012) encontraron mayor expresión de la proteína ROx en cérvix luego de la descarga prevulatoria de LH en ovejas ciclando. Estas aparentes contradicciones dejan planteada la interrogante sobre la expresión y localización tisular del ROx en el cérvix de la oveja.

Prostaglandinas y Ciclooxygenasas

Las PG son hormonas lipídicas que cumplen importantes roles en la función reproductiva (Smyth y col. 2009). Las PG se sintetizan a partir del ácido araquidónico (AA) de la membrana plasmática, que es convertido a prostaglandina H2 (PGH2) por la ciclooxygenasas (COX) (Charpigny y col. 1997). La PGH2 es isomerizada por varias prostaglandinas sintasas tejido específicas para formar las PG activas: PGI2, PGE2, PGD2, PGF2 α y tromboxano (Smyth y col. 2009). Se han descrito dos isoenzimas de la COX, llamadas COX-1 y COX-2 (Dewitt y col, 1988). La COX-1 se expresa en forma constitutiva en la mayoría de los tejidos, mientras que COX-2 es regulada por hormonas, siendo una enzima clave en la síntesis de PG (Charpigny y col. 1997). En cérvix de ovejas gestadas, la expresión de COX-2 aumentó al final de la gestación (Wu y col. 2005), tras una prolongada exposición a la P4 y coincidiendo con el pico de E₂ previo al parto (Gibb y col. 2006). La administración de E₂ y de P4 a ovejas ovariectomizadas aumentó el transcripto y la proteína COX-2, exclusivamente en el epitelio cervical (Zhang y col. 2007). En ovejas ciclando, bajo el predominio estrogénico durante el período preovulatorio, el transcripto de COX-2 aumentó solo en el estroma cervical (Kershaw y col. 2007).

Estos antecedentes ponen en evidencia que aún no está clara la regulación de la expresión de COX-2 cervical durante el ciclo estral ovino y su localización tisular.

Las PG podrían mediar la dilatación del cérvix ovino, puesto que su administración aumentó la extensibilidad cervical (capacidad del tejido de deformarse al ser sometido a tracción) (Ledger y col. 1983), efecto que fue bloqueado mediante la administración de inhibidores de la síntesis de PG (Ledger y col. 1985) en experimentos *ex vivo*. Ellwood y col. (1980) detectaron aumento de la producción de PGE2 en cultivo de tejido cervical ovino al parto, sugiriendo que la PGE2 está involucrada en la dilatación cervical. La PGE2 actúa a través de receptores de membrana acoplados a proteína G (receptores EP), de los cuales se han descrito cuatro subtipos: EP1 al EP4 (Konya y col. 2013). El tratamiento con E₂ a ovejas ovariectomizadas aumentó la expresión de COX-2 y EP4 (Kershaw-Young y col. 2010) y, más recientemente, el tratamiento con E₂ de explantes cervicales obtenidos de ovejas durante la fase folicular aumentó la expresión de COX-2 (Falchi y Scaramuzzi 2015).

Mecanismos de dilatación cervical

La dilatación cervical es la culminación de un proceso precedido por el ablandamiento y remodelación del órgano, basado en modificaciones en la composición de la MEC del conjuntivo cervical. La MEC cervical contiene principalmente fibras de colágeno (Moré 1984), que le confieren su rigidez característica. Se ha propuesto que modificaciones tales como la desagregación y/o degradación de las fibras de colágeno están en la base de la dilatación cervical al parto (por revisión ver Gibb y col. 2006). La desagregación de las fibras de colágeno es consecuencia de la acumulación de glucosaminoglucanos como los hialuronatos, cuyo efecto higroscópico rompe los puentes de hidrógeno que estabilizan la superestructura de la fibra. La degradación del colágeno es consecuencia de la acción de proteasas específicas, llamadas genéricamente colagenasas.

Metaloproteinasas de la matriz extracelular

La homeostasis de la MEC es mantenida, en parte, por la acción de una familia específica de enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y por la presencia de sus inhibidores tisulares (TIMP) (por revisión ver Curry y Osteen 2003; Nagase y col. 2006; Iyer y col. 2012). La familia de las MMP está compuesta por más de 20 isoenzimas que degradan los componentes de la MEC y de la membrana basal de manera zinc-dependiente. La expresión de las MMP está controlada por citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, hormonas e interacciones célula-célula y dicho control es a nivel, transcripcional y post-transcripcional y es específico de tejido (Nagase y col. 2006). La actividad de la mayoría de las MMP es baja o despreciable en la mayoría de los tejidos y está regulada por el equilibrio entre su síntesis y su degradación y por la

activación de la pro-enzima (forma latente, L) en la forma activada (A) mediante proteólisis limitada. El balance entre la síntesis, degradación y activación de las MMP y la síntesis y degradación de los TIMP es crítico para la remodelación de la MEC (Curry y Osteen 2003; Nagase y col. 2006). En el tracto reproductivo de los mamíferos, la actividad de las MMP y la de los TIMP está regulada por hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Yoshida y col. 1993 y 2002; Hulboy y col. 1997; Curry y Osteen 2003), en particular por la PGE2 (Wallis y Hillier 1981 y 1982; Osmer y col. 1991; Rath y col. 1993; Challis y col. 2000; Wang y Stjernholm 2007; Perry y col. 2010 y 2012).

Las mayoría de las MMP comparten los siguientes dominios (**Figura 1**): péptido señal, necesario para su transporte extracelular; prodominio en la forma L o proMMP, que es eliminado cuando se activa resultando en la forma A; dominio catalítico, que tiene un sitio de unión al Zinc y un sitio de unión para el sustrato; región bisagra y dominio hemopexina, que media las asociaciones con los componentes de la MEC e inhibidores. Las MMP difieren en aquellos dominios encargados del reconocimiento y la especificidad de unión al sustrato (Curry y Osteen 2003).

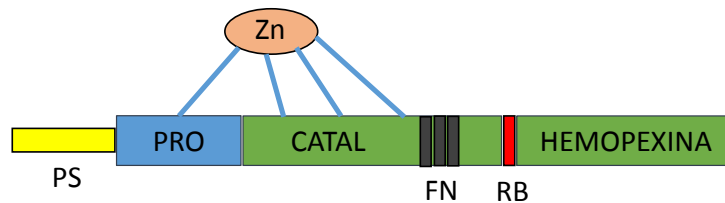


Figura 1. Estructura de los dominios de las Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). PS, péptido señal; PRO, prodominio; Catal, dominio catalítico; RB, región bisagra; Hemopexina, dominio Hemopexina y FN, dominio similar a fibronectina (adaptado de Krizkova y col. 2011).

Las MMP-1, MMP-8 y MMP-13 (colagenasas) son capaces de degradar el colágeno fibrilar, que se desnaturaliza parcialmente convirtiéndose en gelatina. Las MMP del grupo de las gelatinasas (o colagenasas tipo IV) las llamadas MMP-2 y MMP-9 (o Gelatinasas A y B, respectivamente), contienen una secuencia similar a la fibronectina (FN, **Figura 1**) en su dominio catalítico que les confiere mayor capacidad de degradar el colágeno parcialmente desnaturalizado respecto a las otras MMP (Hulboy y col. 1997; Curry y Osteen 2003; Krizkova y col. 2011). La capacidad de las MMP-2 y MMP-9 de degradar el colágeno parcialmente desnaturalizado les confiere un rol en aquellos procesos donde se producen grandes modificaciones de la MEC, como son los cambios cíclicos del endometrio durante el ciclo estral (Mitko y col. 2008; Mishra y col. 2010) o la dilatación cervical al parto (Stygar y col. 2002).

Remodelación de la Matriz Extracelular Cervical

La importancia de la desagregación de las fibras de colágeno y/o de su degradación en la remodelación de la MEC cervical difiere entre especies y situaciones fisiológicas (Leppert y col. 1995). En experimentos de biomecánica realizados en rata gestada a término se encontró aumento en la extensibilidad, distensibilidad (o plasticidad, capacidad de volver a su forma original luego de ser sometido a la tracción) y en la resistencia cervical (capacidad de soportar la tracción sin romperse) (Buhimschi y col. 2004). Los autores sugirieron que estas modificaciones no podrían ser atribuidas al aumento en la actividad colagenasa, puesto que la degradación de las fibras de colágeno disminuiría la distensibilidad y la resistencia. Por el contrario, en ratona gestada a término, se encontró un aumento en la degradación del colágeno concomitante con un aumento en la distensibilidad cervical al aproximarse el parto (Gonzalez y col. 2011). En cérvix humano, Wallis y Hillier (1981) reportaron que explantes cultivados *in vitro* sintetizan espontáneamente enzimas colagenolíticas cuya actividad es regulada en parte por E y P4. También en cérvix humano, la relación colagenasa/inhibidor de colagenasa aumenta desde la última etapa de la gestación hasta el parto (Rajabi y col. 1988). En particular, se detectó el aumento de las isoenzimas MMP-2 y MMP-9 en el cérvix de la mujer durante el trabajo de parto (Stygar y col. 2002) y también en cérvix bovino a término (van Engelen y col. 2008). En cérvix de cobaya gestada a término, estudios *in vitro* demostraron que células del epitelio cervical producen factores de bajo peso molecular, capaces de estimular la actividad colagenasa en el estroma (Rajabi y Singh 1995). Además de los E y la P4, hay evidencias que involucran a otros factores como reguladores de la actividad de desagregación o degradación de las fibras de colágeno cervical. En rata a término se reportó que los niveles cervicales de la MMP-9 aumentan luego de la administración de PGE2 (Lyons y col. 2002). En conejas preñadas, la aplicación local de ácido hialurónico indujo la remodelación cervical, concomitante con estimulación de la actividad colagenasa (El Maradny y col. 1997). En conjunto, las evidencias sugieren la coexistencia de ambos procesos: la desagregación y la degradación del colágeno, donde la desagregación de las fibras de colágeno aumentaría su susceptibilidad al ataque de las enzimas colagenolíticas (Flint 1972). La importancia relativa de cada proceso sería dependiente de la especie y de la situación reproductiva.

En oveja, los antecedentes de la desagregación y degradación del colágeno cervical son contradictorios. Si bien se reportó que la concentración de colágeno cervical durante la gestación hasta el parto disminuye (Fosang y col. 1984; Regassa y Noakes 2001) o permanece constante (Aughey y col. 1983; Fosang y Handley 1988), no se encontraron variaciones de la actividad colagenasa durante la gestación (Raynes y col. 1988a y b). A su vez, Fosang y Handley (1988) reportaron que la síntesis de ácido hialurónico, aumentó 10 veces al parto en relación a la gestación temprana. La extrapolación de los procesos involucrados en la remodelación de la MEC durante la gestación y el parto a lo que ocurriría en la oveja no gestada ciclando no puede ser realizada directamente, ya que el entorno hormonal y las funciones del cérvix son

diferentes en dichas situaciones reproductivas. Si bien existe una inversión de la relación E/P circulantes, tanto antes del parto (Challis y col. 2000) como antes de la ovulación (Goodman e Inskoop 2006), el aumento del cortisol fetal y de prostaglandinas (PG) placentarias, así como el establecimiento del reflejo de Ferguson al parto son condiciones endócrinas exclusivas del parto. Además, durante el ciclo estral, existen variaciones cíclicas de LH y FSH que son determinantes en el crecimiento folicular, ovulación y luteinización, que no se perciben durante la gestación y el parto en la oveja (Kuijper y col. 2013). Por lo tanto, es necesario profundizar sobre los mecanismos hormonales de dilatación cervical en ovinos en las situaciones reproductivas fuera de la gestación y el parto.

En ovejas ciclando, la PGE2 indujo la desagregación de las fibras de colágeno al estro mediante la inducción de la síntesis y acumulación de ácido hialurónico (Kershaw y col. 2007; Leethongdee y col. 2010, Perry y col. 2010 y 2012). Hasta el momento, no se ha caracterizado la actividad colagenasa en cérvix de ovejas ciclando y las MMP aún no han sido reportadas. El estudio de las bases endocrinas y bioquímicas de la remodelación del cérvix ovino durante el ciclo estral, tanto natural como inducido durante el anestro estacional, aportará nuevos conocimientos para orientar la estrategia de manipulación hormonal de la penetrabilidad cervical.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La hipótesis es que la remodelación de la MEC cervical de la oveja durante el ciclo estral natural e inducido en el anestro estacional, involucra una cascada de señales endócrinas y moleculares en las que participan las hormonas esteroideas ováricas, los sistemas LH/prostaglandinas y Oxitocina/prostaglandinas y que culmina en la desagregación y degradación de las fibras de colágeno que permiten la dilatación cervical. La sensibilidad del cérvix a las hormonas que integran ésta cascada de señales endócrinas y la remodelación del colágeno cervical, son dependientes del tipo celular y de la zona cervical en relación al eje longitudinal.

Objetivo general

El objetivo general es contribuir al conocimiento de los mecanismos endócrino-moleculares y bioquímicos involucrados en la remodelación de la MEC y la dilatación del cérvix de la oveja.

Objetivos específicos

En ovejas durante el ciclo estral natural en la estación reproductiva:

1. Determinar la expresión del ARNm RE α y la capacidad de unión de RE y RP a sus hormonas correspondientes en el tejido cervical en los días 1, 6 y 13 luego de detectado el estro (día 0) (**Estudio I**).
2. Estudiar la localización y la distribución cervical de RE α , ROx, RLH y COX-2 en los días 1, 6 y 13 luego de detectado el estro (día 0) (**Estudio II**).
3. Determinar el contenido y la distribución del colágeno y la distribución y actividad de las MMP-2 y MMP-9 en cérvix en los días 1, 6 y 13 luego de detectado el estro (día 0) (**Estudio III**).

En ovejas durante el ciclo inducido con GnRH y P en el anestro estacional:

4. Determinar la expresión del ARNm RE α y la capacidad de unión de RE y RP a sus hormonas correspondientes en el tejido cervical luego de la inducción de la ovulación con GnRH con o sin P4 previa (**Estudio IV**).
5. Estudiar el contenido y la distribución del colágeno y actividad de las MMP-2 y MMP-9 en cérvix luego de la inducción de la ovulación con GnRH con o sin P4 previa (**Estudio V**).

Estrategia de investigación

Para testear la hipótesis y cumplir con los objetivos, se realizó un experimento (Experimento 1) durante la estación reproductiva, utilizando ovejas adultas ciclando en las cuales se obtuvo suero y tejido cervical a lo largo del ciclo estral natural (**Publicaciones I, II y III**). Se realizaron dos experimentos durante el anestro estacional (Experimentos 2 y 3), obteniendo suero y tejido cervical de ovejas adultas antes y luego del tratamiento con P4 y GnRH para inducir la ovulación. Entre las distintas herramientas tecnológicas disponibles para la inducción de la ovulación en ovejas durante el anestro estacional, se eligió la administración de múltiples dosis pequeñas de GnRH previo tratamiento con P4. Este es un protocolo experimental de inducción a la ovulación que produce niveles fisiológicos preovulatorios de gonadotropinas, sincroniza la ovulación con alta eficiencia y produce baja incidencia de fases luteales cortas o subnormales (Tasende y col. 2005a, **Publicaciones IV y V**).

En los tres Experimentos se obtuvieron muestras de tejido cervical un día luego de detectado el estro (*Experimento 1*) o luego del momento esperado de la ovulación (*Experimentos 2 y 3*), cuando se aplica la IA y durante la fase lútea temprana (*Experimento 1 y 3*), cuando se realiza la TE. Se determinaron las concentraciones circulantes de E₂ y P. Considerando los antecedentes de la existencia de una regionalización morfológica, endócrino-molecular y funcional del cérvix ovino en su eje longitudinal, todos los estudios tisulares fueron realizados en las regiones craneal y caudal del cérvix ovino y comprendieron la determinación de los niveles de receptores hormonales (RE, RP, ROx, RLH), COX-2, niveles de colágeno y actividad y expresión de las MMP-2 y MMP-9.

Materiales y métodos

Diseños experimentales

Los tres Experimentos fueron realizados en el Campo Experimental No 1 de la Facultad de Veterinaria (Migues, Canelones, Uruguay; 35°S), avalados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria y la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), UDELAR. Todos los animales, de raza Corriedale, permanecieron bajo luz natural, pastando campo natural y disponibilidad de agua *ad libitum*. El Experimento 1 se realizó durante la estación reproductiva entre los meses de febrero y marzo. En los Experimentos 2 y 3 se utilizaron ovejas en anestro estacional, condición confirmada mediante la introducción en la majada de carneros vasectomizados y tizados durante los 2 meses previos al experimento, realizados en setiembre. En los tres Experimentos se obtuvo suero de las muestras de sangre periférica que luego se almacenó a -20°C hasta las determinaciones de hormonas circulantes.

Experimento 1. Ciclo estral natural (Estudios I, II y III).

Veinte ovejas Corriedale adultas fueron sincronizadas con dos dosis, separadas por 6 días, de un análogo de la PGF 2α intra-muscular (i.m.) (150 μ g, Glandinex, Laboratorio Universal, Montevideo, Uruguay). Desde el día 10 luego de la segunda dosis de PGF 2α , se introdujeron 2 carneros vasectomizados y tizados y se detectó estro cada 12 h (día del estro = día 0). Las ovejas se sacrificaron en los días 1 (n=7), 6 (n=6) o 13 (n=7) luego de la detección del estro.

Todas las ovejas sacrificadas en el día 1 tuvieron un folículo roto en la superficie ovárica y a los días 6 y 13 tuvieron un cuerpo lúteo (**Publicación I**). Las concentraciones de P4 circulantes fueron basales al día -1 y aumentaron a partir del día 3 hasta el 13. Las concentraciones de E $_2$ fueron máximas 24 a 8 h previo a la detección del estro (fase folicular) y luego se mantuvieron en niveles basales. Los animales sacrificados al día 1 de detectado el estro (alrededor de la ovulación) estuvieron previamente expuestos a concentraciones altas de E y basales de P4 y los sacrificados al día 6 y 13 estuvieron expuestos a concentraciones basales de E y altas de P, correspondientes a una fase luteal temprana o tardía (**Publicación I**).

Experimento 2. Inducción de la ovulación durante el anestro estacional (Estudios IV y V).

Para determinar el efecto del tratamiento de inducción a la ovulación con P4 y GnRH sobre las variables a medir en el cérvix al momento de la IA, se utilizaron 15 ovejas asignadas aleatoriamente a cuatro grupos: sin tratamiento (grupo A, anestro, n=4), tratamiento solo con P4 (grupo P, n=4), solo con GnRH (grupo GnRH, n=4) y el tratamiento combinado de P+GnRH (grupo P+GnRH, n=3). Las ovejas del grupo A fueron sacrificadas al principio del experimento. Las ovejas del grupo P4 fueron tratadas con 0.33 g de P4 (Controlled Internal Drug Release, EASI-BREED CIDR, Hamilton, New Zealand) por 10 días y sacrificadas inmediatamente de retirado el CIDR. El grupo GnRH fue tratado con microdosis de 6.7 ng (i/v) de GnRH (Busereline acetate; Receptal; Hoechst, Buenos Aires, Argentina) cada 2 h por 16 h, seguido de un bolo (i/v) de GnRH (4 μ g Receptal) a las 18 h. El grupo P+GnRH recibió el tratamiento combinado de los grupos P4 y GnRH comenzando el tratamiento de GnRH al momento de retirar el CIDR. Las ovejas de los grupos GnRH y P+GnRH fueron sacrificadas 1 día luego de bolo de GnRH (día 0).

Experimento 3. Ciclo estral inducido durante el anestro estacional (Estudios IV y V).

Para determinar el efecto del tratamiento de inducción a la ovulación sobre las variables a medir en el cérvix al tiempo que se realiza la TE (fase lútea temprana) comparado con el momento que se realiza la IA (alrededor de la ovulación), se

realizó un tercer Experimento. Se utilizaron 11 ovejas, que fueron tratadas como fue descrito en el Experimento 2 y sacrificadas aleatoriamente al día 1 o 5 (Grupos P+GnRH 1, n=6 y P+GnRH 5, n=5) luego del bolo de GnRH.

En los Experimentos 2 y 3, la respuesta hipofisaria al tratamiento con GnRH fue chequeada a través de la medida de los niveles de LH y FSH, y la respuesta ovárica a través de los niveles de E₂ y P4 (**Publicación IV**). En ambos Experimentos, todas las ovejas tratadas con GnRH tuvieron un pico de LH sincronizado con un máximo de concentración a las 2 h post-bolo de GnRH y 8 h de duración. Además, la concentración sérica de FSH aumentó 1 h post-bolo de GnRH y permaneció alta por 5 h para luego descender a los valores iniciales. Todas las ovejas tratadas con P4 en ambos Experimentos tuvieron un aumento de la concentración sérica de P4 a niveles luteales, los cuales disminuyeron al retirar el dispositivo (CIDR). En el Experimento 3, la concentración circulante de E₂ aumentó 10 h pre- a 10 h post-inyección del bolo de GnRH y la concentración circulante de P4 fue basal (<1 nmol/L) en las ovejas sacrificadas al día 1 y de 6.5± 0.54 nmol/L en las ovejas sacrificadas al día 5 (**Publicación IV**).

Métodos

Procedimientos de muestreo

En los tres Experimentos, el cérvix fue pesado (peso húmedo), disecado y seccionado en 3 segmentos, zona craneal (próxima al útero), media y caudal (próxima a la vagina), que a su vez fueron seccionadas en mitades longitudinales. Los ensayos se realizaron solo en las secciones longitudinales de las zonas craneal y caudal. Una de las secciones longitudinales de cada zona cervical fue congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80°C para las determinaciones bioquímicas de RE y RP, ARNm RE α , concentración de colágeno y proteínas solubles totales, actividad colagenasa y gelatinasa. En el Experimento 1, la otra sección longitudinal de cada zona cervical fue fijada en paraformaldehído e incluida en parafina para las determinaciones inmunohistoquímicas e histoquímicas.

Determinaciones hormonales

Las concentraciones de P4 y E₂ se midieron por radioinmunoanálisis (RIA). Para la determinación de la concentración de P4 se utilizó un ¹²⁵I RIA directo en fase sólida (Count-A-Count TKPG; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) descrito previamente en ovinos, expresándola en nM. Para la concentración de E₂, se utilizó un ¹²⁵I RIA (oestradiol double antibody, KE2D; Diagnostic Products Corporation), previa extracción de las muestras de suero con dietil éter, como fue descrito previamente en ovinos y los resultados se expresaron en pM. Todas las muestras se midieron por duplicado en el mismo ensayo, con una sensibilidad de 0.1 nM y 4.0 pM para P4 y E₂, respectivamente y coeficientes de variación intraensayo

menores al 10% para la determinación de P4 y de 25%, 8% y 6% para los estándares bajo, medio y alto para E₂ (**Publicaciones I y IV**).

ARNm RE α por hibridización en solución

La determinación de la concentración de ARNm RE α en las muestras de cérvix de los tres experimentos se realizó por hibridización en solución, descrita previamente para cérvix ovino (**Publicaciones I y IV**). Se utilizó una sonda sintetizada *in vitro* (ADNc de 360 y 314 pb de RE α ovino), marcada con ³⁵S-UTP contenida en plásmidos de los cuales se obtuvo el ARNs anti-sentido mediante el uso de enzimas de restricción y ARN-polimerasa. Los ácidos nucleicos totales (ANT) fueron obtenidos de las muestras cervicales mediante homogenización, digestión con proteinasa K y extracción con fenol-cloroformo. La concentración de ADN en las muestras de ANT fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm. Las muestras de ANT fueron hibridizadas con la sonda a dos niveles de concentración diferentes (20,000-40,000 cpm/tubo) a 70°C toda la noche y luego se digirió el ARN no hibridizado con RNasa. Los híbridos marcados no digeridos fueron precipitados con ácido tricloroacético y colectados por filtración. La radioactividad fue medida por centellografía líquida. Las muestras de un mismo Experimento fueron determinadas en el mismo ensayo y por triplicado, con un coeficiente de variación intra ensayo del 16%. Las concentraciones de ARNm RE α se obtuvieron por regresión lineal y se expresaron en amol/Unidades Relativas de Absorbancia (URA).

Receptores de estrógenos y progesterona por ensayo de unión

La determinación de la capacidad de unión de E y P4 a sus receptores específicos en las muestras de cérvix de los tres Experimentos se realizó por ensayos de unión con los ligandos radiactivos y no radiactivos correspondientes, descritos previamente para ovinos (**Publicaciones I y IV**). Los ensayos de unión permiten determinar la afinidad de unión ligando-receptor y la concentración de receptores, pero no discriminan entre los subtipos de RE. Todas las muestras de cérvix fueron laminadas congeladas, homogeneizadas en buffer de ensayo. Los homogenizados fueron sometidos a centrifugación diferencial para obtener la fracción soluble. La unión total se determinó incubando por duplicado alícuotas de la fracción soluble con 5-6 concentraciones crecientes de los ligandos radiactivos (³H-E, 0.15 a 15 nM para RE y ³H-ORG 2058, 0.25 a 30 nM para RP). En paralelo, las mismas muestras se incubaron con un exceso de 200 veces de los ligandos no marcados (Dietilestilbestrol para RE y ORG 2058 para RP), para determinar la unión no específica. Luego de la incubación, los esteroides libres fueron separados por el método del Carbón-Dextrano y la radioactividad 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, estimando la constante de disociación aparente (K_d, nM) y la concentración de receptores (fmol/mg proteínas). La concentración de proteínas en la fracción soluble se determinó por el método de

Lowry, utilizando BSA como estándar (**Publicaciones I y IV**).

Histología cervical

Luego de una inspección panorámica de los preparados del Experimento 1, los compartimentos histológicos (CH) de la mucosa cervical se definieron en relación a la localización a lo largo de los pliegues cervicales, profundidad respecto a la luz cervical y densidad celular aparente. En cérvix craneal, se establecieron dos CH epiteliales luminales: epitelio luminal apical (ALE) y basal (BLE) y dos epitelios glandulares: epitelio glandular superficial (SGE) y profundo (DGE). El cérvix caudal es aglandular, por lo tanto se definieron solo los CH epiteliales luminales (ALE y BLE). En ambas zonas cervicales se definieron cuatro CH estromales: estroma superficial (SFS) y profundo (DFS) de los pliegues y estroma superficial (SWS) y profundo (DWS) de la pared (**Figura 2, Publicación II**).

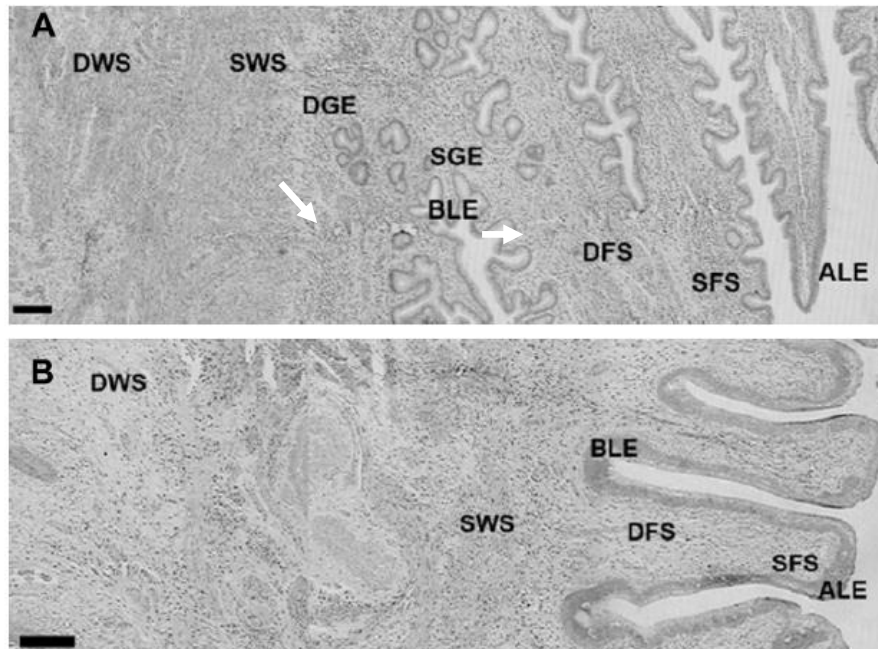


Figura 2. . Morfología del cérvix craneal (A) y caudal (B) de ovejas en el día 1 luego de detectado el estro (día 0). ALE y BLE, epitelios luminal apical y basal; SGE y DGE, epitelios glandular superficial y profundos; SFS y DFS, estromas superficial y profundo de los pliegues; y SWS y DWS, estromas superficial y profundo de la pared. Barra negra = 200 μ m.

RE α , RO α , RLH y COX-2 por inmunohistoquímica

Los RE α , RO α , RLH y la COX-2 se determinaron por inmunohistoquímica en los bloques de parafina de las muestras del Experimento 1, utilizando anticuerpos primarios específicos (**Publicación II**). Los controles negativos se realizaron por ausencia del anticuerpo primario. El reconocimiento de la inmunoseñal se realizó mediante el sistema avidina-biotina inmunoperoxidasa utilizando diaminobenzidina

como sustrato (ABC kit Elite, Vector Laboratories). Para estimar la inmunoseñal obtenida se utilizó un sistema de análisis de imagen (microscopio de luz conectado a una computadora). En el cérvix craneal se evaluaron todos los CH descritos en la sección *Histología cervical* y en el cérvix caudal se evaluaron los mismos CH excepto SGE y DGE (puesto que es aglandular). Para la evaluación de RE α , cuya inmunoseñal estuvo asociada a los núcleos celulares, se contaron los núcleos positivos y negativos en un total de 1000 núcleos en cada CH y se midió el área ocupada por cada CH en cada campo (Image-Pro Plus 6.0 software, Media Cybernetics Inc., WA, USA). Se calculó la densidad de núcleos totales (núcleos/mm²) y la proporción de núcleos positivos (%RE α). Para la evaluación de la inmunoseñal a ROx, RLH y COX-2, se obtuvieron imágenes de 10 campos de cada CH (40X). Se editó cada imagen de manera de dejar solo el CH a evaluar, removiendo los otros CH (Photo shop 6.0, Adobe Systems Inc., CA, USA). Luego se midió el área positiva en relación al total del área ocupada por el CH a evaluar (%ROx, %RLH y %COX-2) utilizando la discriminación de color del software (Image Pro Plus 6.0).

Concentración de Colágeno por espectrofotometría

La concentración del colágeno en las muestras de cérvix de los tres Experimentos se determinó espectrofotométricamente por el contenido de hidroxiprolina, componente casi exclusivo del colágeno (**Publicación III**). Las muestras fueron homogenizadas e hidrolizadas con HCl a 90°C. Las muestras hidrolizadas fueron neutralizadas con NaOH y oxidadas con Cloramina-T. En éstas condiciones, la hidroxiprolina libre se oxida y se la hace reaccionar con el reactivo cromogénico dimetilaminobenzaldehído. La lectura de la absorbancia resultante de las muestras se midió a 550 nm y se calculó la concentración de hidroxiprolina en función de una curva estándar de L-hidroxiprolina (0.5 a 30 $\mu\text{g/mL}$). Todas las muestras se determinaron en el mismo ensayo, con un coeficiente de variación del 7% y una sensibilidad de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de colágeno se calculó asumiendo que el contenido de hidroxiprolina es el 14% del total de colágeno y se expresó en mg/g de tejido seco, para eliminar el efecto de las posibles variaciones en el contenido de agua de la MEC sobre la concentración de colágeno. Para la determinación del contenido de agua en las diferentes muestras, fracciones paralelas y contiguas de cada muestra fueron pesadas y desecadas en horno Pasteur hasta peso constante.

Distribución de colágeno por histoquímica

La distribución de las fibras de colágeno se realizó en las muestras del Experimento 1. Se estudió por histoquímica mediante la tinción tricrómica de van Giesson, con la que el colágeno se visualiza de color rojo. La evaluación se realizó en cérvix craneal y caudal en los CH del estroma definidos en la sección *Histología cervical*, mediante la captura de imágenes digitalizadas de 10 campos (40X). El área teñida de rojo y el área total de color a evaluar (amarillo y rojo) de cada CH fueron determinadas luego

de remover los otros CH (Photo shop 6.0) y utilizando la herramienta de discriminación de color del software (Image Pro Plus 6.0). Los resultados se expresaron como el área porcentual de colágeno respecto al área del CH evaluado (%C) (**Publicación III**).

Metaloproteinasas por zimografías en SDS-PAGE

La determinación de la actividad gelatinolítica de las formas A y L de las MMP-2 y -9 en las muestras de cérvix de los tres Experimentos se realizó por zimografía en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 7.5% de poliacrilamida) incorporando al gel gelatina como sustrato (2.5mg/ml). En las corridas electroforéticas (100V por 2 h) se sembraron alícuotas de los homogeneizados cervicales diluidos en SDS-buffer. Posteriormente, los geles se incubaron en un buffer de renaturalización a 37°C para recuperar la actividad enzimática y teñidos con azul de Coomassie. Luego de desteñidos, la actividad enzimática de A y L se visualizó como bandas claras sobre el gel azul. Las bandas claras se deben a la degradación de la gelatina co-polimerizada con el gel. Como controles positivos se corrieron formas A y L de las MMP-2 y MMP-9 recombinantes de origen humano (M-9445 y M8945, Sigma Aldrich, respectivamente) y como control negativo se corrieron muestras pre-incubadas en buffer conteniendo EDTA, que captura el zinc necesario para la actividad enzimática. Para confirmar que la actividad enzimática provino específicamente de MMPs, se corrieron muestras pre-incubadas con p-aminofenilmercuriato (APMA) como activador específico de las MMPs. La cuantificación de las bandas de actividad A y L de cada isoenzima se realizó por densitometría (Image J 1.45, software libre). La actividad de las bandas correspondientes a la MMP-9 en las muestras cervicales de ambos Experimentos no fue evaluada debido a que su señal se identificó en pocas muestras y estuvo en el límite de detección. La actividad de las formas A y L de la MMP-2 se estimó en referencia a curvas de calibración realizadas con las enzimas recombinantes (5 a 0.08 ng/10 µL), expresándola en ng/mg de proteínas, calculándose, además, la relación entre la actividad de las formas A y L (**Publicación III**).

Actividad colagenasa y gelatinasa por zimografía in situ

La localización histológica de la actividad gelatinasa y colagenasa en muestras de tejido congelado del Experimento 1 se realizó por zimografía *in situ*, según descripción en **Publicación III**, utilizando gelatina o colágeno conjugados con fluoresceína (DQ gelatina de piel suina y DQ colágeno tipo 1 de piel bovina; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) como sustratos (25 mg/mL), respectivamente. Las muestras fueron cortadas con micrótopo, montadas en portaobjetos y cubiertas con la solución de sustrato correspondiente. Luego de la incubación, los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). Como control positivo se utilizaron cortes pre-tratados con un inhibidor específico de las MMPs (fenantrolina, Sigma Aldrich). Los preparados fueron observados en un

microscopio de fluorescencia (Olympus Corp., Birkerød, Denmark) y se obtuvieron imágenes digitalizadas de cada campo para cada canal de fluorescencia (verde para la fluoresceína y azul para el yoduro de propidio) las cuales fueron superpuestas utilizando el software Photo shop 6.0 (**Publicación III**).

Metaloproteinasas por inmunohistoquímica

La detección inmunohistoquímica de las MMP-2 y MMP-9 de las muestras del Experimento 1 se realizó utilizando el sistema estreptavidina-biotina-peroxidasa y anticuerpos primarios específicos contra MMP-2 y MMP-9 (**Publicación III**). Los anticuerpos primarios utilizados reconocen tanto las formas A como las L, dado que se unen a una secuencia aminoacídica situada en el extremo C-terminal de la enzima, que permanece luego de la activación por proteólisis limitada (que elimina el extremo N-terminal). Los controles negativos se realizaron por ausencia del anticuerpo primario. Debido a la escasa y esporádica presentación de la inmunoseñal de la MMP-9, solo se cuantificó la inmunoseñal de la MMP-2. La inmunoseñal obtenida de MMP-2 estuvo asociada a células claramente individualizables presentes exclusivamente en el estroma, por lo tanto se contaron las células positivas y negativas en un total de 1000 células en los CH estromales definidos en la sección *Histología cervical*. Se midió el área ocupada por cada CH en cada campo (10 campos por muestra) (Image-Pro Plus 6.0) para calcular la densidad de células positivas (MMP-2/mm²) y se calculó la proporción de núcleos positivos (%MMP-2) (**Publicación III**).

Análisis estadísticos

Las concentraciones de E₂ y P₄ circulantes y las concentraciones tisulares de RE, RP, ARN RE α , colágeno, proteínas solubles totales, niveles de densidad de núcleos, %RE α , %RLH, %ROx, %COX-2 y %C, así como la actividad de las L y A MMP-2 fueron analizadas por ANOVA Mixed Proc, Statistical Analysis Systems 1998, SAS Institute, Cary, NC, USA). Se incluyó el efecto fijo del tiempo (horas previas y posteriores al celo) para el análisis de las hormonas. Se incluyeron los efectos día en los Experimentos 1 (1, 6 y 13) y 3 (1 y 5); tratamiento (A, P, GnRH y P+GnRH) en el Experimento 2 y zona (craneal y caudal) en los tres Experimentos. En los resultados obtenidos por inmunohistoquímica e histoquímica (densidad de núcleos, %RE α , %RLH, %ROx, %COX-2 y %C), también se incluyó el efecto del CH (ALE, BLE, SGE, DGE, SFS, DFS, SWS y DWS). Para estudiar la relación entre RE, RP y ARNm RE α y la relación entre las concentraciones de colágeno y proteínas solubles totales con la cantidad de tejido homogeneizado se utilizó el test de correlación de Pearson. Las variables núcleos/mm², %ROx, %RLH, %COX-2, %MMP-2 y MMP-2/mm²) mostraron distribución sesgada no-normal (Kolmogorov-Smirnov Test, Statgraphics Centurion XV, 2011), por lo cual fueron normalizadas aplicando log 1/x (núcleos/mm² y %ROx), Ln (%RLH y %COX-2) o Log x (%MMP-2 y MMP-2/mm²) previo a la aplicación del ANOVA y del test de correlación de Pearson. Los

resultados fueron expresados como la media \pm error estándar pooleado (LSM \pm pooled s.e.) y el nivel de significación fue $P < 0.05$.

Resultados y Discusión

Estudio I. Expresión de RE α y capacidad de unión de RE y RP en cérvix de ovejas durante el ciclo estral natural (Publicación I).

Las concentraciones del transcripto RE α (amol/ARU) fueron afectadas por el día del ciclo estral ($P < 0.0001$), la zona cervical ($P < 0.0005$) y por la interacción entre ambos efectos ($P < 0.005$). Al día 1, la zona caudal presentó una mayor expresión de RE α que la craneal y mayor que en los días 6 y 13 (**Figura 3, A**). En la zona caudal durante el ciclo estral, las concentraciones del transcripto RE α se correlacionaron positivamente con los niveles circulantes de E₂ ($r = 0.59$; $P < 0.01$) y negativamente con los de P4 ($r = -0.74$; $P < 0.0005$).

La capacidad de unión del RE, en términos de concentración de proteína receptora (fmol/mg de proteína), fue afectada por el ciclo estral, siendo mayor en el día 1 que en los días 6 y 13 ($P < 0.005$). No se encontraron diferencias entre zonas cervicales, a excepción del día 13, donde la concentración de RE tendió a ser mayor en la zona caudal que en la craneal ($P = 0.054$) (**Figura 3, B**). Las concentraciones de RE se correlacionaron positivamente con los niveles circulantes de E₂ solo en zona caudal ($r = 0.48$; $P < 0.05$) y negativamente con los de P4 en ambas zonas ($r = -0.43$; $P < 0.05$ y $r = -0.69$; $P < 0.001$, zonas craneal y caudal, respectivamente). En zona caudal, las concentraciones de RE se correlacionaron positivamente con las del transcripto RE α ($r = 0.52$, $P < 0.01$).

La concentración de RP (fmol/mg de proteínas) fue afectada por el día del ciclo ($P < 0.0001$) y la zona cervical ($P < 0.0004$). El RP fue mayor en el día 1 que en los días 6 y 13 para ambas zonas cervicales (**Figura 3, C**). Al día 1 las concentraciones de RP fueron mayores en zona caudal que en craneal. Para ambas zonas durante el ciclo estral, las concentraciones de RP se correlacionaron positivamente con los niveles circulantes de E₂ ($r = 0.58$; $P < 0.01$ y $r = 0.44$; $P < 0.05$, zonas craneal y caudal, respectivamente) y negativamente con los de P4 ($r = -0.76$; $P < 0.0001$ y $r = -0.70$; $P < 0.0005$, zonas craneal y caudal, respectivamente). Las concentraciones de RP se correlacionaron positivamente con las de RE para ambas zonas cervicales ($r = 0.52$; $P < 0.01$ y $r = 0.80$; $P < 0.0001$, craneal y caudal, respectivamente), indicando una dependencia entre la expresión de ambos receptores y apoyando el concepto de que RP es un marcador de la acción estrogénica.

En todas las muestras se detectó un único sitio de unión para E y para P4, saturable y de alta afinidad. Los valores de K_d para RE y RP no fueron afectados por el día del ciclo estral ni por la zona cervical, siendo similares a los reportados en cérvix y útero ovino (Meikle y col. 2001, Tasende y col. 1996, 2002, 2005a y 2005b, Rodríguez-Piñón y col. 2000 y 2005), sugiriendo que los cambios en la capacidad de respuesta del cérvix a las hormonas esteroideas ováricas no depende de modificaciones en la afinidad de los receptores por sus respectivas hormonas sino de su concentración.

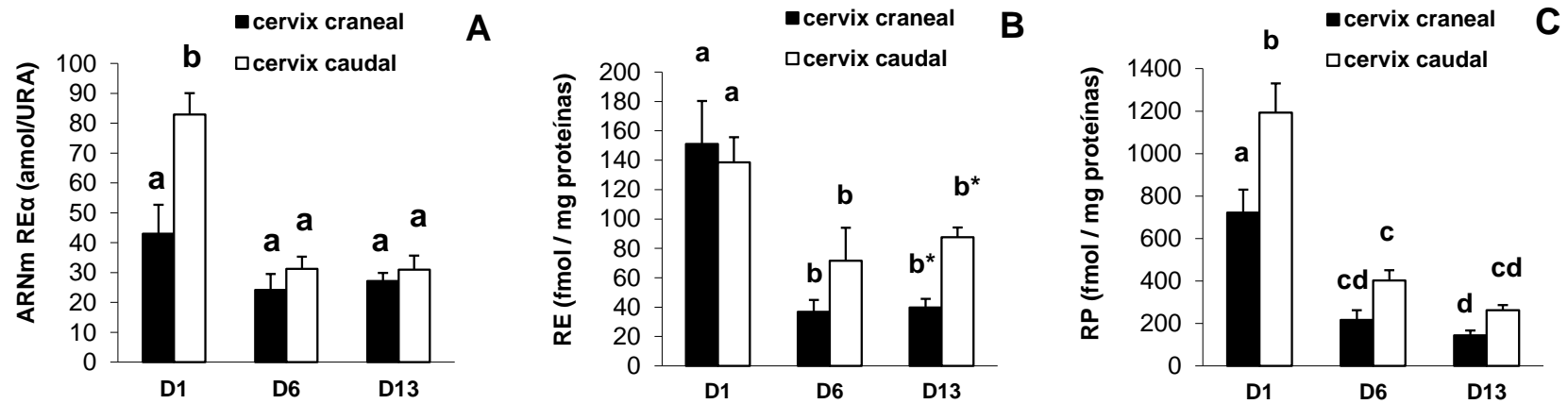


Figura 3. Concentraciones (mean \pm pooled s.e.m.) del mensajero del receptor de estrógenos α (ARNm RE α , amol/URA, panel A) y de los receptores (fmol/mg proteínas) de estrógenos (RE, panel B) y de progesterona (RP, panel C) en cervix craneal y caudal de ovejas sacrificadas en los días 1 (n=7), 6 (n=6) y 13 (n=7) luego de la detección del estro (día 0). Barras marcadas con distintas letras difieren significativamente entre días y zonas cervicales (P<0.05) y las barras con asteriscos tienden a ser diferentes (P=0.054).

Las concentraciones de las proteínas de unión RE y RP fueron mayores un día después del estro y menores en fase lútea, lo que sumado a las correlaciones positivas con E₂ y negativa con P₄, constituyen evidencias de los efectos estimulador de E₂ e inhibitorio de P₄ sobre los receptores esteroideos. Esto está de acuerdo con lo reportado en útero ovino (Ing y col. 1993 y 1996; Tasende y col. 2005b) y en cervix de cerda (Stanchev y col. 1984) y de rata (Wang y col. 2000). Sin embargo, en el presente estudio, el transcripto RE α en cervix ovino no varió significativamente a lo largo del ciclo estral, a excepción de los mayores niveles de ARNm RE α encontrados en zona caudal al Día 1. Estos resultados plantean que los altos niveles de E₂ preovulatorios (**Publicación I**) son capaces de estimular en forma temprana la transcripción de RE α , efecto que se manifiesta posteriormente sobre la síntesis de la proteína receptora y permanece al día 1. Esta interpretación está de acuerdo con los mayores niveles de proteína RE α alcanzados luego del pico preovulatorio de LH (Falchi y Scaramuzzi 2015). No se descarta que además de esta regulación transcripcional coexista una regulación post-transcripcional, sobre la estabilidad del transcripto RE α (Ing y col. 2008) o sobre la utilización y el recambio de la proteína de unión RE (Meikle y col. 2004). Las concentraciones de ARNm RE α y la capacidad de unión del RP fueron menores en cervix craneal que en caudal al Día 1, lo que plantea una regulación dependiente de la zona cervical, vinculada a diferencias morfológicas (Moré 1984) y funcionales (Hawk y col. 1978) que han sido descritas entre ambas regiones cervicales.

Las diferencias encontradas en la expresión y capacidad de unión de RE plantean la interrogante de cómo se distribuye la proteína receptora RE α en los diferentes tipos celulares y zonas cervicales durante el ciclo estral. Asimismo se plantea si la alta sensibilidad del cervix a los E, sumado a los elevados niveles hormonales preovulatorios, modifican la cascada de señales moleculares (RLH, ROx y COX-2) vinculadas a la relajación y dilatación cervical al estro.

Estudio II. Localización y distribución de RE α , RLH, ROx, y COX-2 en el cérvix de ovejas durante el ciclo estral natural (Publicación II).

Consideraciones histológicas

Las diferentes zonas cervicales estudiadas (craneal y caudal), presentaron características histológicas diferenciales. El cérvix craneal mostró pliegues arborescentes, con indentaciones primarias y secundarias (**Figura 2**). En la base de dichos pliegues se encontraron glándulas tubulares enrolladas y ocasionalmente ramificadas que desembocan en la luz cervical. En el cérvix caudal, los pliegues fueron más anchos y menos ramificados, con escasas estructuras glandulares poco desarrolladas. Estas diferencias entre cérvix craneal y caudal podrían explicar la controversia planteada acerca de la existencia de estructuras glandulares organizadas (Lightfoot y Adams 1979, Moré 1984).

La densidad de núcleos en los estromas (núcleos/mm².1000⁻¹) fue afectada por el CH (P<0.0001), zona cervical (P<0.0001) y día del ciclo estral (P<0.0001), encontrándose interacción entre los diferentes efectos (P <0.001). La densidad de núcleos fue menor en zona craneal que en caudal (8.8±0.6 y 13.4±1.5, respectivamente) y fue menor al día 1 del ciclo estral, intermedia al día 6 y mayor al día 13 (10.2±1.8, 10.8±3.0 y 11.8±2.6, respectivamente). La densidad de núcleos fue mayor en los estromas superficiales (18.4±1.3 y 17.4±1.2 en SFS y SWS, respectivamente) que en los profundos (9.1±1.8 y 8.4±0.5 en DFS y DWS, respectivamente), sustentando el estudio de los estromas superficiales y profundos por separado (ver Métodos, sección *Histología cervical*).

El aumento de la densidad de núcleos a lo largo del ciclo estral podría ser consecuencia del aumento de la tasa de proliferación celular y/o la disminución de la apoptosis celular, como fue reportado en cérvix de rata (Ramos y col. 2002). También podría ser relativo a modificaciones en el volumen de la MEC. En la oveja, se han reportado el aumento en el contenido de agua uterino y la acumulación de componentes sólidos de la MEC en cérvix, probablemente inducidos por los E preovulatorios (Bott y col. 2006, Kershaw-Young y col. 2009, Perry y col. 2010).

Localización y distribución de RE α , RLH, ROx, y COX-2

RE α

El RE α nuclear fue localizado en todos los CH estudiados y la proporción de núcleos positivos a RE α (%RE α) fue afectada por el día del ciclo estral (P<0.03), la zona cervical (P<0.0001) y el CH (P<0.0001), encontrándose interacción entre estos efectos (P<0.05). El %RE α fue mayor en los días 1 y 6 que en el día 13 del ciclo estral (53.4±1.0, 53.4±1.0 y 50.5±0.8, respectivamente), menor en la zona craneal que en la caudal (47.3±0.7 y 57.6±0.9, respectivamente) y mayor en el epitelio

glandular profundo (DGE, 64.9 ± 2.0) que en los demás CH (50.3 ± 3.6). En los epitelios luminales (ALE y BLE) el %RE α disminuyó del día 1 al 13 (**Figura 4, A y B**) y no se encontraron variaciones durante el ciclo estral en los epitelios glandulares (**Figura 4, C y D**). En la mayoría de los CH estromales (**Figura 4, E a F**), el %RE α aumentó del día 1 al 6 y disminuyó al día 13.

El alto % de núcleos positivos a RE α en los días 1 y 6 del ciclo estral podría ser explicado por el aporte de los epitelios luminales y estromales, respectivamente. También se han reportado variaciones regionales y temporales en el % de núcleos positivos a RE en epitelio y estroma de útero de corderas tratadas con E2 (Meikle y col. 2000). En los epitelios luminales, los E ejercerían una regulación positiva sobre la expresión de RE α , mientras que la P4 ejercería una regulación negativa, como fue descrito para RE mediante ensayos de unión en el tejido entero (**Estudio I**) y en acuerdo con lo obtenido por Falchi y Scaramuzzi (2013) para la proteína RE α . Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por inmunohistoquímica por Zhao y col. (1999), que detectaron el RE en el epitelio cervical de la oveja en los primeros 3 días del ciclo estral, pero no lo encontraron en la fase luteal mientras que en nuestro trabajo si fue detectado. Los resultados sugieren que la regulación ejercida por los niveles circulantes de hormonas esteroideas ováricas sobre el RE α está sujeta a una regulación específica de CH y de zona cervical.

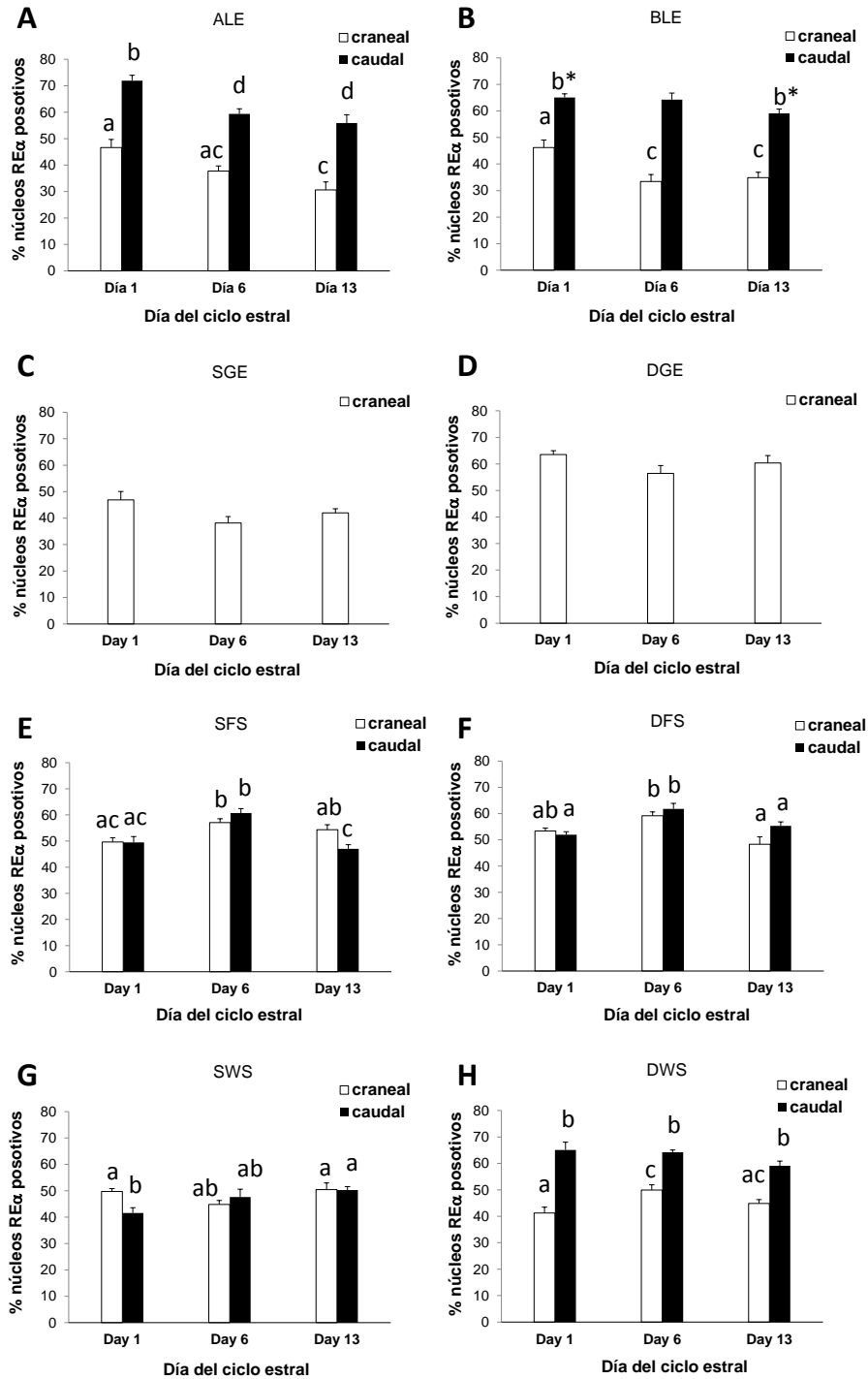


Figura 4. Porcentaje (mean±pooled s.e.m.) de núcleos positivos al receptor de estrógenos α (% núcleos RE α positivos) en distintos compartimentos histológicos del cérvix craneal y caudal de ovejas sacrificadas en los días 1 (n=6), 6 (n=5) y 13 (n=6) luego de la detección del estro (día 0). ALE y BLE, epitelios luminal apical y basal; SGE y DGE, epitelios glandular superficial y profundos; SFS y DFS, estromas de los pliegues superficial y profundo; y SWS y DWS, estromas de la pared superficial y profundo. Dentro de cada CH, las barras marcadas con distintas letras difieren significativamente ($P < 0.03$) y las marcadas con asteriscos tienden a ser diferentes ($P = 0.09$).

RLH

El porcentaje de área positiva a RLH (%RLH) fue afectado por el CH ($P<0.0001$), el del día del ciclo estral ($P<0.004$) y por la interacción entre zona cervical y día del ciclo estral ($P<0.002$). El %RLH fue mayor en los epitelios luminales (ALE y BLE, (40.6 ± 4.3 y 20.5 ± 2.5 , respectivamente), que en los demás CH (14.6 ± 2.9), fue menor en los días 1 y 6 que en el día 13 del ciclo estral (13.7 ± 2.3 , 16.0 ± 2.8 y 18.6 ± 2.7 , respectivamente) y tendió a ser mayor en la zona craneal que en la caudal (17.1 ± 2.9 y 14.8 ± 2.2 , respectivamente, $P=0.07$). En los epitelios luminales (ALE y BLE), el %RLH aumentó del día 1 al 6 (ALE) o al 13 (BLE) (**Figura 5, A y B**). En los epitelios glandulares (**Figura 5, C y D**) y en los estromas (datos no mostrados), los %RLH fueron iguales o menores a 15-10% y no se encontraron variaciones durante el ciclo estral (**Publicación II**).

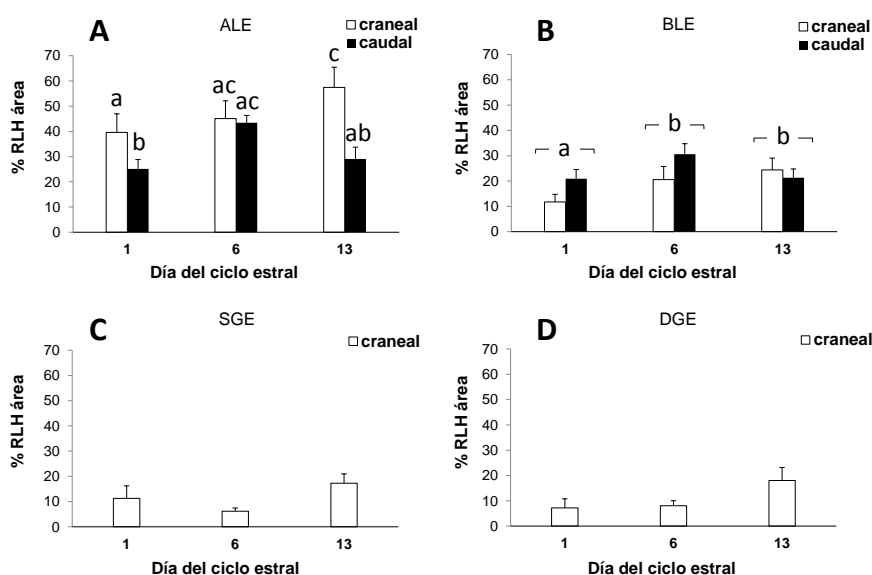


Figura 5. Porcentaje (mean±pooled s.e.m.) de área positiva al receptor de LH (%RLH área) en distintos compartimentos histológicos epiteliales del cérvix craneal y caudal de ovejas sacrificadas en los días 1 (n=6), 6 (n=5) y 13 (n=6) luego de la detección del estro (día 0). ALE y BLE, epitelios luminales apical y basal; SGE y DGE, epitelios glandulares superficial y profundo. Dentro de cada compartimento histológico, las barras marcadas con distintas letras difieren significativamente ($P<0.004$).

El predominio de la inmunoseñal al RLH en los epitelios luminales está en acuerdo con la mayor concentración del ARNm RLH en el epitelio respecto al estroma subepitelial reportada en cérvix de ovejas sincronizadas con progestágenos (Leethongdee y col. 2010). El aumento de los niveles de RLH en los epitelios luminales durante la fase luteal sugiere un efecto estimulador de la P4 sobre la expresión del RLH, en acuerdo con lo reportado en útero de cerda (Ziecik y col. 1992) y cérvix de vaca (Mizrachi y Shemesh 1999).

ROx

El porcentaje de área positiva a ROx (%ROx) fue afectado por la zona cervical, el CH ($P < 0.0001$), el día del ciclo estral ($P < 0.02$) y por la interacción entre zona cervical y CH ($P < 0.04$). El %ROx fue mayor en cérvix craneal que en caudal (27.3 ± 3.4 y 23.5 ± 3.5 , respectivamente), fue más alto en los epitelios luminales (ALE y BLE, 44.9 ± 2.7) que en los CH glandulares y estromales (16.5 ± 1.6) y fue menor en el día 1 que en los días 6 y 13 (23.8 ± 2.8 , 26.7 ± 3.5 y 26.0 ± 3.9 , respectivamente). En el epitelio luminal, la inmunoseñal a ROx fue más intensa en el borde apical que en el resto de la célula. El %ROx tendió a ser menor en el día 1 que 13 en ALE (**Figura 6, A**) y varió distinto según la zona cervical en BLE: aumentó en craneal y bajó en caudal al Día 13 (**Figura 6, B**). En los epitelios glandulares, el %ROx varió dependiendo de la profundidad de la ubicación: aumentó del Día 1 al 6 y bajó al 13 en el superficial (SGE) y aumentó del Día 1 al 13 en el profundo (DGS) (Figura 6, C y D). En los estromas (datos no mostrados), el %ROx presentó baja inmunoseñal y no se encontraron diferencias de ciclo estral (**Publicación II**).

El mayor % de área positiva a ROx en los epitelios luminales respecto a los estromas está en acuerdo con la predominancia de la localización epitelial reportada en cérvix ovino (Matthews y Ayad 1994; Ayad y Leung 2004). La mayor inmunoseñal a ROx en el borde apical del epitelio luminal apoya la hipótesis de la existencia de una acción autócrina de la Ox en células endometriales planteada en rata (Morel y col. 2001) y cerda (Hu y col. 2001), especies en donde el ROx y la Ox fueron co-localizados en el borde apical celular. El mayor nivel de ROx en la fase luteal tardía, probablemente como consecuencia del aporte de los epitelios, es coincidente con el aumento de la actividad de unión del ROx alrededor del momento de la luteólisis, reportado en el estrato superficial del cérvix ovino (Matthews y Ayad 1994). Los autores lo explican a través de la pérdida del efecto inhibitorio de la P4 al final de la fase luteal. A su vez, Falchi y Scaramuzzi (2013) encontraron mayores niveles de la proteína ROx luego del pico preovulatorio de LH inducido por GnRH respecto a la fase luteal (día 8). Incluso, el tratamiento con E₂ de explantes cervicales obtenidos de ovejas durante la fase folicular aumentó los niveles de ROx (Falchi y Scaramuzzi 2015). La pérdida del efecto inhibitorio de la P4 al final de la fase luteal y el inicio de la fase folicular (efecto estimulador de E) y diferencias temporales en la toma de muestras explicarían estas diferencias.

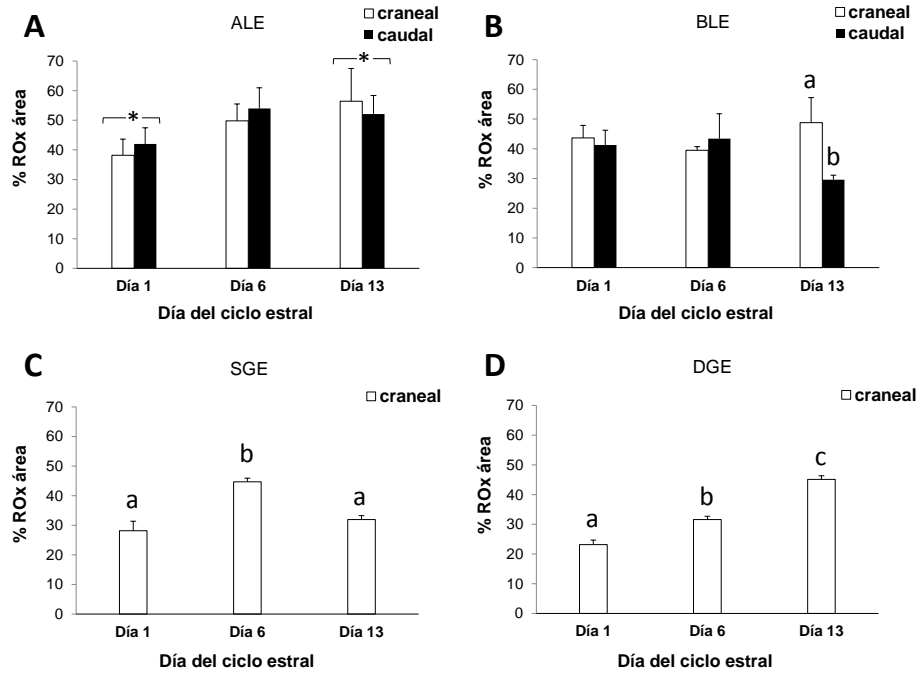


Figura 6. Porcentaje (mean±pooled s.e.m.) de área positiva al receptor de oxitocina (% ROx área) en los epitelios luminales y glandulares del cérvix craneal y caudal de ovejas sacrificadas en los días 1 (n=6), 6 (n=5) y 13 (n=6) luego de la detección del estro (día 0). ALE y BLE, epitelios luminal apical y basal; SGE y DGE, epitelios glandular superficial y profundo. Dentro de cada compartimento histológico, las barras marcadas con distintas letras difieren significativamente ($P < 0.04$) y las marcadas con asteriscos tienden a ser diferentes ($P = 0.09$).

COX-2

La inmunoseñal de COX-2 se localizó exclusivamente en los CH epiteliales. El porcentaje de área positiva a COX-2 (%COX-2) fue afectada por la zona cervical ($P<0.02$), por el CH ($P<0.03$), el día del ciclo estral ($P<0.05$) y por la interacción entre zona cervical y día del ciclo estral ($P<0.05$). El %COX-2 fue mayor en cérvix craneal que en caudal (21.6 ± 3.5 y 14.4 ± 3.2 , respectivamente) y fue mayor en el epitelio luminal apical (ALE, 24.5 ± 4.4) que en el basal (BLE, 14.4 ± 2.7) e intermedio en los glandulares (SGS y DGS, 22.3 ± 3.2 y 17.0 ± 1.9 , respectivamente). El %COX-2 fue menor en el día 1 del ciclo estral que en los días 6 y 13 (15.5 ± 3.2 , 22.6 ± 5.7 y 19.6 ± 2.9 , respectivamente). En el cérvix craneal, el %COX-2 aumentó del día 1 al 13 solo en el epitelio luminal basal (BLE) (**Figura 7, B**). En el cérvix caudal, el %COX-2 aumentó del día 1 al 6 en ambos epitelios luminales (ALE y BLE) y luego disminuye al día 13 solo en el basal (BLE) (**Figura 7, A y B**). No hubo variación del %COX-2 durante el ciclo estral en los epitelios glandulares (**Figura 7, C y D**).

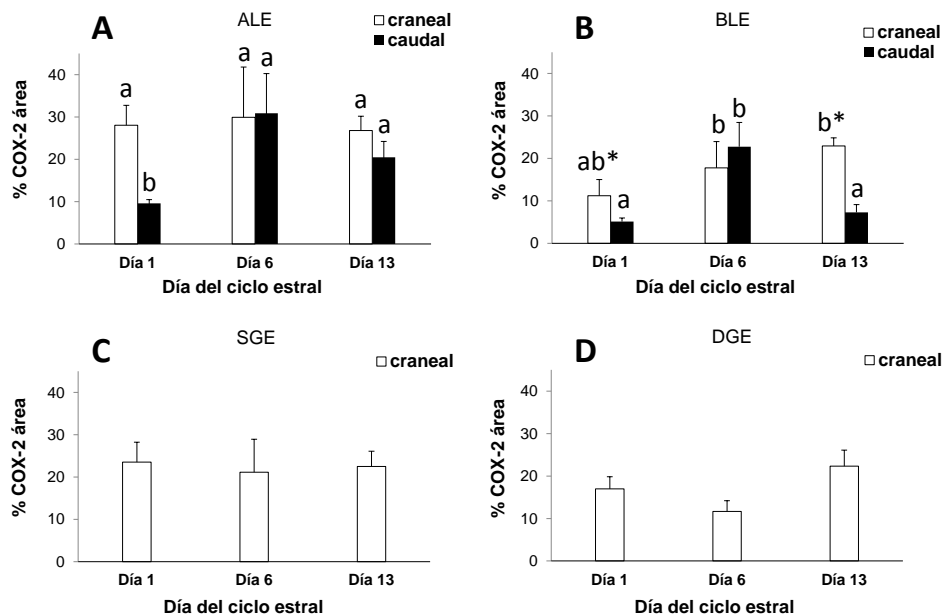


Figura 7. Porcentaje (mean±pooled s.e.m.) de área positiva a COX-2 (% COX-2 área) en epitelios luminales y glandulares del cérvix craneal y caudal de ovejas sacrificadas en los días 1 (n=6), 6 (n=5) y 13 (n=6) luego de la detección del estro (día 0). ALE y BLE, epitelios luminal apical y basal; SGE y DGE, epitelios glandular superficial y profundo. Dentro de cada compartimento histológico, las barras marcadas con distintas letras difieren significativamente ($P<0.05$) y las marcadas con asteriscos tienden a ser diferentes ($P=0.09$).

La localización exclusivamente epitelial de la inmunoseñal a COX-2 está en acuerdo con lo reportado en cérvix de ovejas preñadas (Wu y col. 2005) y ovariectomizadas (Zhang y col. 2007). El aumento de los niveles de COX-2 durante la fase luteal coincide con el efecto estimulador de la P4 sobre la expresión de COX-2 reportado

en cérvix de oveja (Zhang y col. 2007). A su vez, en la oveja hay evidencias que indican que la expresión COX-2 cervical es inducida por los E. La administración de E₂ aumentó los niveles del ARNm COX-2 (Kershaw-Young y col. 2010) y los niveles de la proteína COX-2 fueron mayores previo al pico preovulatorio de LH inducido por GnRH (Falchi y Scaramuzzi 2013). Probablemente, este aumento preovulatorio de la expresión de COX-2 haya sido previo al muestreo en el día 1 del ciclo estral del presente experimento. Tampoco se puede descartar un aumento en la expresión de COX-2 durante la fase luteal temprana (día 6) como el resultado de la inducción estrogénica producto del crecimiento de ondas foliculares postovulatorias.

En el presente estudio se demuestra que RE α en los epitelios cervicales es mayor alrededor de la ovulación, en acuerdo con lo encontrado en el **Estudio I**. Además en los epitelios se demuestra que RLH, ROx y COX2 son mayores en fase lútea que alrededor de la ovulación. Estos resultados sugieren que el epitelio cumple un rol directriz de la respuesta hormonal en la funcionalidad cervical. Además, se reportan diferencias histológicas de carácter cualitativo y cuantitativo entre el cérvix craneal y caudal ovino, apoyando el concepto de que serían funcionalmente diferentes, como fue sugerido en el **Estudio I**.

Considerando los resultados de los **Estudios I y II**, surge la hipótesis de si las variaciones encontradas en los marcadores moleculares de la función cervical se asocian temporal y/o espacialmente con modificaciones cualitativas o cuantitativas del colágeno, principal componente de la MEC cervical, y con la actividad de colagenasas.

Estudio III. Contenido y distribución del colágeno y actividad de las MMP-2 y MMP-9 en cérvix de ovejas durante el ciclo estral natural (Publicación III).

Colágeno y proteínas solubles totales

La concentración de colágeno (mg/g de tejido seco) mostró influencia del día del ciclo estral, siendo menor en el día 1 que en los días 6 y 13 ($P < 0.04$) (**Tabla 1**). La concentración de proteínas solubles totales (mg/g de tejido seco) mostró influencia del día del ciclo estral, siendo menor en los días 1 y 6 que en el día 13 ($P < 0.0002$) (**Tabla 1**).

El área ocupada por colágeno (%C) en el estroma fue afectada por el día del ciclo ($P < 0.02$), la zona ($P < 0.0001$) y los CH ($P < 0.0001$) y hubo interacción entre estos efectos ($P < 0.005$). El %C fue menor en los días 1 y 6 que en el día 13 (**Tabla 1**). El %C fue mayor en el cérvix craneal (47.1 ± 1.4) que en el caudal (32.7 ± 2.7) y fue distinto en todos los CH estromales evaluados, siendo menor en los estromas de los pliegues que en los de la pared y en los superficiales respecto a los profundos ($25.0 \pm 2.1\%$, $34.4 \pm 3.7\%$, $44.5 \pm 2.8\%$ y $53.0 \pm 1.8\%$ para SFS, DFS, SWS y DWS, respectivamente). En el estroma superficial de los pliegues (SFS), el %C fue mayor en los días 1 y 6 que en el día 13 en el cérvix craneal, mientras que fue menor en el días 1 respecto al día 13 en el caudal (**Tabla 2**). En el estroma profundo de los pliegues (DFS), el %C fue mayor en el día 1 que en los días 6 y 13 en el cérvix craneal y fue mayor en el día 1 que en el día 13 en el caudal. Los estromas de la pared no mostraron variaciones durante el ciclo estral en el cérvix craneal y aumentaron del día 1 al 13 en el caudal.

Peso cervical y contenido de agua

El peso húmedo cervical (g) fue mayor en el día 1 que en los días 6 y 13 (10.4 ± 0.4 , 7.4 ± 0.5 y 7.9 ± 0.9 , respectivamente, $P < 0.005$). No hubo efectos del día del ciclo estral ni de la zona cervical sobre el contenido de agua (rango de 66% al 74%).

Actividad de las MMP-2 y MMP-9

Se detectó actividad gelatinasa y colagenasa medidas por zimografía *in situ* en el espacio extracelular y en menor medida perinuclear. La actividad gelatinasa se localizó en el epitelio y en los estromas, mientras que la actividad colagenasa se localizó exclusivamente en el epitelio.

La actividad gelatinasa de las formas L y A de la MMP-2 (ng/mg de proteínas) fue afectada por el día del ciclo estral ($P < 0.006$) y la relación A/L tendió a ser afectada por el día del ciclo estral ($P = 0.054$) (**Tabla 3**). La actividad gelatinasa de las formas L y A de la MMP-2 fue mayor en el día 1 que en los días 6 y 13 y la relación A/L tendió a ser mayor en el día 1 que en el día 6.

Tabla 1. Concentración de colágeno y proteínas solubles totales (mg/g tejido seco) y porcentaje (%) del área ocupada por fibras de colágeno en cervix de ovejas en los días 1, 6 o 13 luego de detectado el estro (día 0).

	Colágeno (mg/g tejido seco)	Proteínas solubles totales (mg/g tejido seco)	% de fibras de colágeno
día 1 (n = 6)	151 ± 15 a	270 ± 18 a	37.8±1.7 a
día 6 (n = 5)	200 ± 18 b	294 ± 25 a	37.9±1.5 a
día 13 (n = 6)	201 ± 12 b	411 ± 20 b	43.0±1.8 b

Dentro de cada columna, los valores (mean±s.e.m.) marcados con distintas letras difieren significativamente (P<0.04).

Tabla 2. Área ocupada por fibras de colágeno (%) en los compartimentos histológicos estromales del cervix craneal y caudal de ovejas en los días 1, 6 y 13 luego del estro (día = 0).

	SFS		DFS		SWS		DWS	
	craneal	caudal	craneal	caudal	craneal	caudal	craneal	caudal
día 1 (n=6)	12.9±2.2 a	14.4±2.0 a	7.4±0.9 a	7.7±0.9 a	12.4±1.1 a	14.0±0.4 b	8.7±0.7 a	7.3±0.7 abc
día 6 (n=5)	13.8±2.6 a	18.7±2.0 b	8.2±1.4 a	9.1±1.6 ab	13.5±2.7 ab	20.6±2.4 c	6.5±0.6 c	8.7±1.1 ab
día 13 (n=6)	15.8±2.7 a	19.9±2.2 b	8.9±2.0 a	10.5±2.4 b	14.7±3.7 ab	20.3±2.9 c	7.1±0.7 bc	9.0±1.2 a

Dentro de cada columna, los valores (mean±pooled s.e.m.) con distintas letras difieren significativamente (P<0.005). SFS y DFS, estromas de los pliegues superficial y profundo; y SWS y DWS, estromas de la pared superficial y profundo.

Tabla 3. Actividad gelatinasa (ng/mg de proteínas) de las formas latente (L) y activada (A) de la metaloproteinasa de la matriz extracelular-2 (MMP-2) y relación entre las formas A/L, en cervix de ovejas en los días 1, 6 y 13 luego del estro (día = 0).

	L MMP-2 (ng/mg de proteínas)	A MMP-2 (ng/mg de proteínas)	Relación A/L
día 1 (n = 6)	8.0 ± 2.8 a	22.3 ± 6.3 a	3.4 ± 1.1 *
día 6 (n = 5)	2.4 ± 1.0 b	2.4 ± 1.1 b	1.0 ± 0.4 *
día 13 (n = 6)	---	---	---

Dentro de cada columna, los valores (mean±s.e.m.) con distintas letras difieren significativamente ($P < 0.0064$) y con asteriscos tienden a ser diferentes ($P = 0.08$). En el día 13, la actividad de la forma L de la MMP-2 (ng/mg de proteínas) fue detectada solo en una muestra (1.0) y la de la forma A en dos muestras (1.1 y 0.2) distintas, por lo cual la relación A/L no pudo ser calculada.

La actividad gelatinasa de la MMP-9 estuvo en el límite de detección de la técnica y se detectó solo en 5 de las 34 evaluadas muestras (la forma L en 3 y la A en 2), por lo que no se pudieron realizar estudios estadísticos.

Localización y distribución de las MMP-2 y MMP-9

La inmunoseñal a MMP-2 se localizó en el estroma, en el espacio extracelular de fibroblastos activos, algunos inactivos y ocasionalmente leucocitos. La inmunoseñal a MMP-9 fue débil y se presentó en escasas células, como plasmocitos, algunos macrófagos, pocos linfocitos y muy pocos fibroblastos del estroma.

El porcentaje de células positivas a MMP-2 (%MMP-2) fue afectado por la zona cervical ($P < 0.0001$) y el CH estromal ($P < 0.0001$) y mostró interacción entre el día del ciclo estrol y la zona cervical ($P < 0.0001$). El %MMP-2 fue menor en craneal que en caudal (0.32 ± 0.01 y 1.96 ± 0.06 , respectivamente) y fue menor en el estroma profundo de los pliegues (DWS, 0.24 ± 0.02) que en los otros CH evaluados (1.0 ± 0.05). En el cervix craneal, el %MMP-2 disminuyó del día 1 al 13, mientras que en el cervix caudal aumentó desde el día 1 al 13 (**Tabla 4**).

La menor concentración y distribución de colágeno un día después del estro comparados con la fase lútea sugieren que el E2 preovulatorio induce la degradación de colágeno y la P4 luteal la inhibe. En acuerdo con esta interpretación, el contenido y la distribución del colágeno cervical en ovejas gestadas disminuyeron a término (Regassa y Noakes 2001), con la caída de los niveles gestacionales de P4 y el aumento de los de E previo al parto (Challis y col. 2000). Por otra parte, los niveles

menores de colágeno, proteínas solubles y densidad nuclear (**Estudio II**) al día 1 del ciclo estral coinciden con el mayor peso cervical, indicando que el cérvix alrededor del estro acumula componentes no proteicos en su MEC, tales como los glucosaminoglucanos. La síntesis de glucosaminoglucanos, en particular del ácido hialurónico libre, aumenta en cérvix ovino alrededor de la ovulación y el ácido hialurónico es capaz de disgregar y desnaturalizar las fibras de colágeno (Kershaw-Young y col. 2009; Perry y col. 2010). En conjunto, estas evidencias sugieren que la dilatación cervical al estro es un proceso complejo que puede involucrar aumentos en la síntesis de glucosaminoglucanos que producen la desagregación de las fibras de colágeno y aumentos en la degradación del colágeno por activación de colagenasas.

Tabla 4. Porcentaje (%) de células positivas a MMP-2 en el cérvix craneal y caudal de ovejas en los días 1, 6 y 13 luego del estro (día 0).

	Craneal	Caudal
día 1 (n = 6)	0.77 ± 0.03 a*	0.94 ± 0.09 a
día 6 (n = 5)	0.34 ± 0.03 a*	1.17 ± 0.07 ab
día 13 (n = 6)	0.10 ± 0.01 c	3.10 ± 0.07 b

Dentro de cada columna, los valores (mean±s.e.m.) con distintas letras difieren significativamente ($P < 0.0001$) y con asteriscos tienden a ser diferentes ($P = 0.09$).

La expresión de MMP-2 estuvo asociada mayoritariamente a fibroblastos activos (células productoras de componentes de la MEC), en cambio la MMP-9 estuvo asociada a células vinculadas con fenómenos inflamatorios, en acuerdo con lo reportado en cérvix humano (Stygar y col. 2002). En cérvix de vaca gestante, la expresión de MMP-2 aumentó 5 días antes del parto, mientras que la expresión de MMP-9 aumentó al momento del parto, asociada a un proceso pro-inflamatorio dependiente de citoquinas (van Engelen y col. 2008). La baja actividad e inmunoseñal de la MMP-9 encontrada en cérvix de oveja ciclando podría deberse a la escasa participación de procesos inflamatorios en la remodelación cervical al estro. Si bien se detectó un aumento de la producción cervical de la interleuquina-8 (proinflamatoria) en ovejas al estro (Mitchell y col. 2002), su administración no tuvo efectos sobre la penetrabilidad cervical (Croy y col. 1999).

La actividad de las formas L y A de la MMP-2 fue entre 10 y 20 veces mayor alrededor de la ovulación que en fase lútea, sugiriendo incrementos tanto en la expresión de la proteína MMP-2 como en su actividad enzimática. El incremento sobre la expresión de MMP-2, podría ser el resultado del estímulo de los altos niveles de E preovulatorios y la mayor capacidad de respuesta del cérvix encontrados al estro (**Estudios I y II**). Existen evidencias de que los E regulan positivamente la expresión

de MMP-2 en el útero (Russo y col. 2009, Shan y col. 2013). El aumento de la relación A/L de la MMP-2 sugiere que, además de la inducción transcripcional de MMP-2, los E podrían inducir la activación de la enzima. Se sabe que la MMP-2 nativa se sintetiza en forma de pre-proenzima fosforilada e inactiva y que adquiere la conformación activa y la actividad enzimática mediante desfosforilación y proteólisis limitada (Sariahmetoglu y col. 2007; Jacob-Ferreira y col. 2013). Se ha propuesto que estos mecanismos involucran señales moleculares transmitidas por receptores de membrana y/o nucleares pero no se conocen en detalle (Curry y Osteen 2003). Los hallazgos del presente estudio sugieren que los E podrían ser una señal hormonal directa o indirecta de dichos mecanismos de activación de MMP-2.

En acuerdo con los resultados de actividad enzimática, el %MMP-2 en el cérvix craneal disminuyó a lo largo del ciclo estral. Sin embargo, el %MMP-2 en el cérvix caudal fue máximo en el Día 13, sin aumento concomitante de la actividad enzimática. El aumento temprano de la expresión de la MMP-2 en el cérvix caudal respecto al craneal sugiere la existencia de factores locales que interactúan con la regulación ejercida por los E y la P4 sobre la expresión de MMP-2. Que no hayamos encontrado aumento de la actividad enzimática podría deberse a que la MMP-2 este en su forma de pre-proenzima, detectable por inmunohistoquímica pero no por zimografía en gelatina (Jacob-Ferreira y col. 2013). La pre-proMMP-2 se activaría posteriormente bajo los efectos de los niveles crecientes de E producidos por la onda folicular ovulatoria. Esta diferencia en la expresión de MMP-2 a lo largo del eje longitudinal cervical podría estar vinculada a los diferentes roles biológicos que cumplirían ambas regiones cervicales alrededor de la monta.

A partir de las evidencias obtenidas en los **Estudios I, II y III**, surge como hipótesis que la mayor sensibilidad a los E del cérvix alrededor de la ovulación, asociada a una mayor capacidad colagenolítica y menor contenido de colágeno, pueden ser reproducidas luego del tratamiento para inducir la ovulación de ovejas en el anestro estacional.

Estudio IV. Expresión del RE α y capacidad de unión de RE y RP en cérvix de ovejas en anestro estacional luego de la inducción de la ovulación con P4 y GnRH (Publicación IV).

Las concentraciones del transcrito RE α (amol/ARU) fueron afectadas por el tratamiento ($P < 0.0001$), la zona cervical ($P < 0.0001$) y hubo interacción entre ambos efectos ($P < 0.0001$) (*Experimento 2*) (**Figura 8, A**). En el cérvix craneal, la concentración de ARNm RE α fue menor en el Grupo P y mayor en el Grupo GnRH respecto al Grupo A y fue mayor en el Grupo P+GnRH que en los grupos P y GnRH. En el cérvix caudal, no se detectó ARNm RE α en ninguna muestras de los Grupos A y P y en una muestra del Grupo P+GnRH, la concentración de mensajero fue similar en los Grupos GnRH y P+GnRH. La concentración de ARNm RE α fue mayor en el cérvix craneal que caudal en todos los grupos.

La concentración de RE, (fmol/mg de proteína), fue afectada por el tratamiento ($P < 0.0001$) y la zona cervical ($P < 0.0001$) (**Figura 8, B**). En el cérvix craneal, la concentración de RE fue menor en el grupo P respecto a los otros grupos, mientras que en el cérvix caudal no mostró variaciones entre los grupos de tratamiento. La concentración de RE fue mayor en cérvix craneal que en caudal en todos los grupos excepto en el Grupo P. Las concentraciones de RE se correlacionaron positivamente con las del transcrito RE α ($r = 0.5940$, $P < 0.005$).

Las concentraciones de RP (fmol/mg de proteínas) fueron afectadas por el tratamiento ($P < 0.001$), la zona cervical ($P < 0.0001$) y hubo interacción entre ambos factores ($P < 0.05$) (**Figura 8, C**). En el cérvix craneal, la concentración de RP fue menor en el Grupo P respecto a los otros grupos de tratamiento y fue menor en el Grupo A que en el Grupo GnRH. En el cérvix caudal no hubo variaciones entre los grupos. La concentración de RP fue mayor en cérvix craneal que en caudal en todos los grupos excepto en el Grupo P. Las concentraciones de RP se correlacionaron positivamente con las de RE ($r = 0.78$; $P < 0.002$), indicando una dependencia entre la expresión de ambos receptores.

En el *Experimento 3*, las concentraciones del transcrito RE α (amol/ARU) fueron significativamente afectadas por el día ($P < 0.0002$), la zona cervical ($P < 0.0001$) y hubo interacción entre ambos efectos ($P < 0.003$) (**Figura 9, A**). En el cérvix craneal, la concentración de ARNm RE α fue mayor en el día 1 que en el día 5. En el cérvix caudal no hubo variaciones entre los días. La concentración de ARNm RE α en el día 1 fue mayor en el cérvix craneal que caudal.

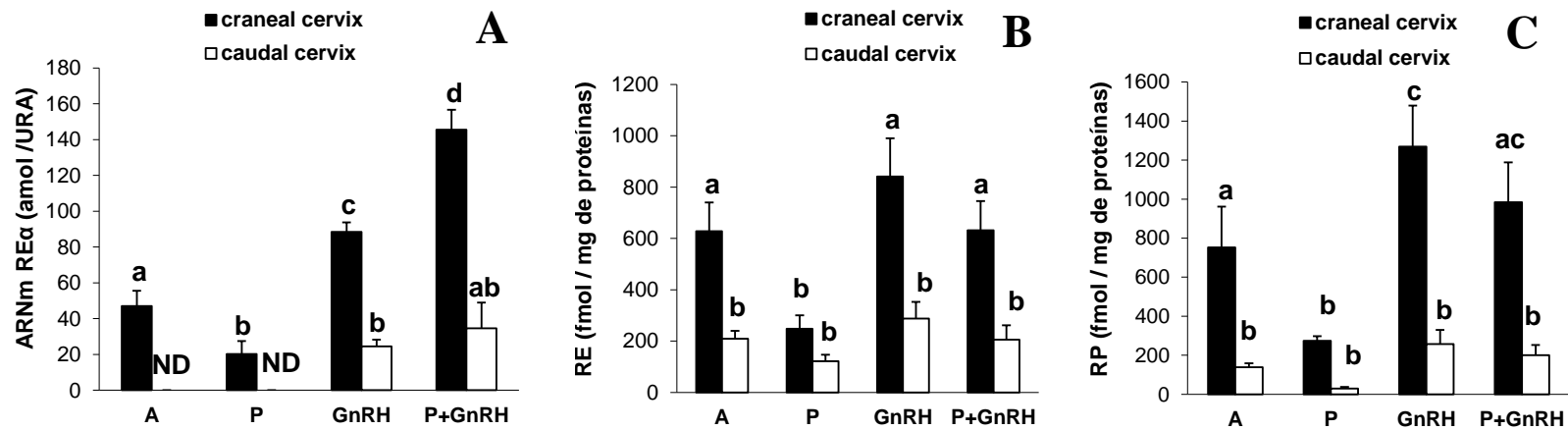


Figura 8. Concentraciones (mean \pm s.e.m.) del mensajero del receptor de estrógenos α (ARNm RE α , amol/URA, panel A), receptor de estrógenos (RE, panel B) y de progesterona (RP, panel C) (fmol/mg de proteínas), en cervix craneal y caudal de ovejas en anestro estacional (grupo A, n=4) tratadas con progesterona (grupo P, n=4), GnRH (grupo GnRH, n=4) o progesterona y GnRH (P+GnRH, n=3) sacrificadas al comenzar el experimento (grupo A), al retirar el CIDR (grupo P) o 24 h luego del bolo de GnRH (grupos GnRH y P+GnRH). ND: no detectable. Barras marcadas con distintas letras difieren entre grupos y zonas cervicales (P<0.005).

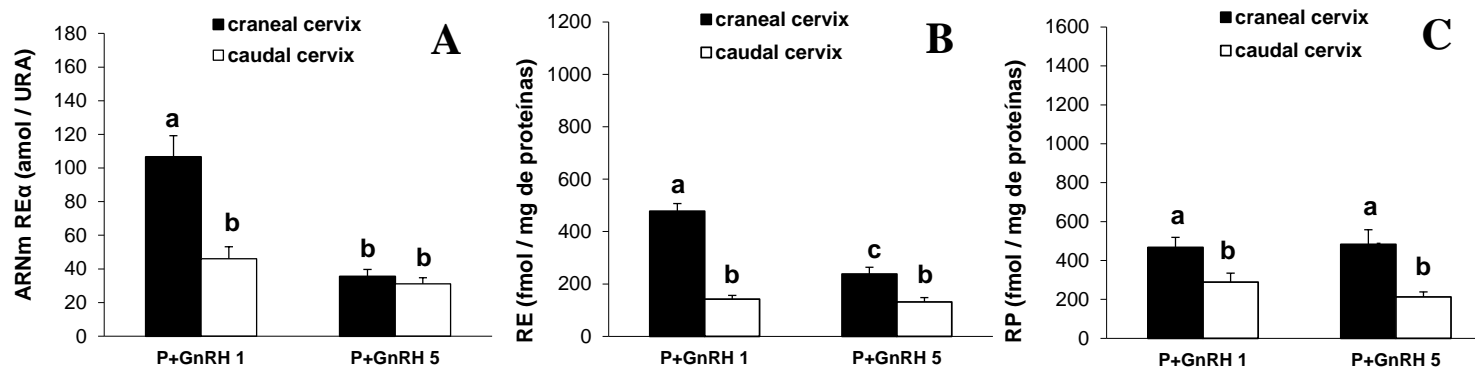


Figura 9. Concentraciones (mean \pm s.e.m.) del mensajero del receptor de estrógenos α (ARNm RE α , amol/URA, panel A), receptor de estrógenos (RE, panel B) y de progesterona (RP, panel C) (fmol/mg de proteínas), en cervix craneal y caudal de ovejas en anestro estacional tratadas con progesterona y GnRH, sacrificadas un día (P+GnRH 1, n=6) o cinco días (P+GnRH 5, n=5) luego del bolo de GnRH. Barras marcadas con distintas letras difieren entre grupos y zonas cervicales (P<0.05).

La concentración del RE, (fmol/mg de proteína), fue afectada por el día ($P < 0.0005$), la zona cervical ($P < 0.0001$) y hubo interacción entre ambos efectos ($P < 0.002$) (**Figura 9, B**). En el cérvix craneal, la concentración de RE mostró el mismo patrón que el ARNm RE α , siendo mayor en el día 1 que en el día 5. En el cérvix caudal, no hubo variaciones entre el día 1 y 5. La concentración de RE fue mayor en el cérvix craneal que caudal en ambos días. Las concentraciones de RP (fmol/mg de proteínas) fueron afectadas por la zona cervical ($P < 0.0001$), siendo mayor en craneal que en caudal en ambos días (**Figura 9, C**).

En todas las muestras de ambos *Experimentos* se detectó un único sitio de unión para E y para P4, saturable y de alta afinidad. Los valores de Kd no fueron afectados por los grupos experimentales ni por la zona cervical y fueron similares a los obtenidos en cérvix de ovejas durante el ciclo estral (**Estudio I**), reafirmando que los cambios en la capacidad de respuesta del cérvix a las hormonas esteroideas ováricas no depende de modificaciones en la afinidad de los receptores por sus respectivas hormonas sino que depende de la concentración de receptores.

En el cérvix craneal, los niveles de ARNm RE α , RE y RP fueron comparables con los encontrados en cérvix de ovejas en la estación reproductiva (**Estudio I**). Durante el anestro estacional, los niveles basales de E circulantes serían suficientes para mantener la expresión constitutiva de ambos receptores, mientras que los niveles basales de P4 circulante serían insuficientes para ejercer una regulación negativa, como fue propuesto en útero de corderas prepúberes (Garófalo y Tasende 1996) y de ovejas adultas en anestro estacional (Tasende y col. 2002). La insuficiencia de las concentraciones circulantes de P4 para ejercer regulación negativa sobre la expresión de RE y RP durante el anestro estacional es confirmada por la disminución de ARNm RE α , RE y RP luego el tratamiento con P4. El tratamiento con GnRH luego del tratamiento con P4 aumentó los niveles de ARNm RE α , RE y RP pudiendo deberse a la supresión de la inhibición de la P4 y/o al efecto estimulador del aumento del E₂ circulante inducido por el tratamiento con GnRH (Tasende y col. 2002). La correlación positiva que encontramos entre RE y ARNm RE α afirma el concepto de que los E y la P ejercen la regulación del RE α a nivel transcripcional. La mayor capacidad de unión de RE y la mayor concentración de ARNm RE α en el día 1 respecto al día 5 es consistente con el efecto estimulador de las altas concentraciones de E₂ circulantes alrededor de la ovulación y con el efecto inhibitorio del incremento de la P4 circulante en la fase luteal temprana (Tasende y col. 2005a). La correlación positiva encontrada entre RE y ARNm RE α indicaría un control transcripcional de E y P4 sobre la expresión del gen de RE α . La ausencia de modificaciones en los niveles de RP entre los días 1 y 5 no coincide con la disminución de la capacidad de unión RP durante la fase luteal temprana de las ovejas ciclando durante la estación reproductiva (**Estudio I**). Este desacuerdo podría deberse a que las muestras de las ovejas en anestro tratadas para inducir la ovulación fueron tomadas 1 día antes (día 5 vs. 6) y los niveles de P4 al día 5 podrían no ser suficiente ejercer su efecto inhibitorio sobre el RP. La correlación positiva hallada

entre la concentración de RE y RP es consistente con el concepto de que RP es un marcador de la acción estrogénica.

El cérvix caudal mostró menor concentración de ARNm RE α y capacidad de unión de RE y de RP que el craneal en ambos *Experimentos*, sugiriendo que estas zonas cervicales tienen diferente capacidad de respuesta a las hormonas esteroideas ováricas. Zhao y col. (1999) no pudieron detectar el RE y encontraron muy poca inmunoseñal del RP en una zona no indicada del cérvix de ovejas en anestro estacional, probablemente debido a que pudieron haber trabajado en cérvix caudal y a la menor sensibilidad de la metodología utilizada respecto a los ensayos de unión. Además, en el cérvix caudal, no hubo efecto de tratamiento (*Experimento 2*) ni de día (*Experimento 3*) sobre la capacidad de unión de RE y RP y solo hubo efecto de tratamiento en la concentración de ARNm RE α (*Experimento 2*). Éstos resultados estarían indicando que la condición de anestro estacional involucra la menor capacidad de respuesta del cérvix caudal a las hormonas esteroideas ováricas, aunque mantiene funcional el mecanismo de regulación transcripcional de la expresión del RE α .

En este Estudio se demuestra que la expresión de RE y RP en el cérvix craneal de ovejas en anestro estacional es modificada por los tratamientos con GnRH para inducir la ovulación, con o sin P4 previa, siendo regulada positivamente por los E y negativamente por la P. En cambio, en el cérvix caudal, la expresión de RE y RP es más baja y muestra poca o ninguna variación luego de los tratamientos, lo que podría limitar la utilización de estrategias hormonales para inducir la dilatación cervical en ésta especie.

A partir de las evidencias obtenidas en este Estudio y en los **Estudios I, II y III**, surge la hipótesis de que la concentración del colágeno cervical y la actividad colagenolítica en ovejas en anestro estacional puede ser modificada por los tratamientos con GnRH para inducir la ovulación, con o sin P4 previa y en forma diferencial en el eje longitudinal cervical.

Estudio V. Contenido y distribución del colágeno y actividad de las MMP-2 y MMP-9 en cérvix de ovejas en anestro estacional luego de la inducción de la ovulación con P4 y GnRH (Publicación V).

En el *Experimento 2*, la concentración de colágeno (mg/g de tejido seco) tendió a ser mayor en el Grupo P que en A y P+GnRH (**Tabla 5**). La concentración de proteínas solubles totales (mg/g tejido seco) fue afectada por el tratamiento ($P < 0.003$) y la zona cervical ($P < 0.05$). La concentración de proteínas solubles totales (mg/g de tejido seco) fue menor en los Grupos A y GnRH que en P y P+GnRH (**Tabla 5**) y fue mayor en cérvix craneal que caudal cérvix (291 ± 13 y 262 ± 11 , respectivamente).

El peso cervical total (g) tendió a ser menor en el Grupo A que en los Grupos GnRH y P+GnRH (5.6 ± 0.7 , 7.5 ± 1.1 , 8.8 ± 1.3 y 7.9 ± 1.6 , respectivamente, $P = 0.09$) (*Experimento 2*). El contenido de agua (%) fue menor en el Grupo A que en los Grupos P, GnRH y P+GnRH (74.5 ± 1.0 , 76.8 ± 0.4 , 76.9 ± 0.3 y 78.4 ± 0.9 , respectivamente, $P < 0.01$).

La actividad gelatinasa de las formas L y A de la MMP-2 fue detectada en todas las muestras analizadas. La actividad gelatinasa (ng/mg de proteínas) de la forma L de la MMP-2 fue afectada por la interacción entre el tratamiento y la zona cervical ($P < 0.05$). En el cérvix craneal, la actividad de la L MMP-2 fue mayor en el grupo A que en P, GnRH y P+GnRH, sin variaciones en caudal (**Tabla 5**). La actividad de la A MMP-2 (ng/mg de proteínas) y la relación A/L no fueron diferentes entre grupos y zonas cervicales (10.0 ± 2.6 y 0.35 ± 0.06 , respectivamente). La actividad gelatinásica de MMP-9 se detectó solo en una oveja por grupo y los valores encontrados estuvieron en el límite de detección de la técnica.

En el *Experimento 3*, la concentración de colágeno (mg/g tejido seco) fue menor en el día 1 que 5 ($P < 0.04$) (**Tabla 6**). La concentración de proteínas solubles totales (mg/g tejido seco) fue mayor en el cérvix craneal que caudal (335 ± 18 y 226 ± 11 , respectivamente, $P < 0.02$) (**Tabla 6**). El peso cervical total (g) no fue afectado por el día luego del tratamiento ni por la zona cervical (8.4 ± 0.7 , $n = 11$). Tampoco hubo efectos sobre el contenido de agua (%) (78.4 ± 0.6 , $n = 22$).

La actividad gelatinasa (ng/mg de proteínas) de las formas L y A de la MMP-2 fue detectada en todas las muestras analizadas. La actividad de la A MMP-2 y la relación entre las formas A y L de la MMP-2 fueron mayores al día 1 que al día 5 luego del tratamiento ($P < 0.03$ y $P < 0.02$, respectivamente). (**Tabla 6**). La actividad de la L MMP-2 no fue afectada por el día (41.1 ± 4.5). La actividad gelatinásica de MMP-9 se detectó en una oveja sacrificada al día 1 y en 2 sacrificadas al día 5 y los valores encontrados estuvieron en el límite de detección de la técnica.

Tabla 5. Concentración de proteínas solubles totales y colágeno (mg/g tejido seco) y actividad gelatinasa (ng/mg de proteínas) de la forma latente (L) de la metaloproteinasas de la matriz extracelular-2 (MMP-2), en cervix craneal y caudal de ovejas en anestro estacional (grupo A) tratadas con progesterona (grupo P), GnRH (grupo GnRH) o progesterona y GnRH (P+GnRH) sacrificadas al comenzar el experimento (grupo A), al retirar el CIDR (grupo P) o 24 h luego del bolo de GnRH (grupos GnRH y P+GnRH).

	Proteínas solubles totales (mg/g tejido seco)	Colágeno (mg/g tejido seco)	L MMP-2 (ng/mg de proteínas)	
			Craneal	Caudal
A (n=4)	248±15 a	172±12 *	42.4±10.3 a	19.3±7.4 b
P (n=4)	307±13 b	211±18 *†	20.4±8.0 b	27.2±3.7 ab
GnRH (n=4)	244±10 a	192±8	13.7±7.5 b	30.3±4.9 ab
P+GnRH (n=3)	308±15 b	158±12 †	13.7±4.6 b	16.9±4.2 b

Para cada columna, los valores (mean±s.e.m.) marcados con distintas letras difieren ($P < 0.04$) y si están marcados con asterisco ($P = 0.09$) o daga ($P = 0.07$) tienden a ser diferentes entre sí.

Tabla 6. Concentración de proteínas solubles totales y de colágeno (mg/g tejido seco), actividad gelatinasa (ng/mg de proteínas) de las formas latente (L) y activada (A) de la metaloproteínasa de la matriz extracelular-2 (MMP-2) y relación entre las formas A/L, en cervix craneal y caudal de ovejas en anestro estacional tratadas con progesterona y GnRH, sacrificadas uno (P+GnRH 1, n=6) o cinco (P+GnRH 5, n=5) días luego del tratamiento con GnRH y pretratamiento con progesterona.

	Proteínas solubles totales (mg/g tejido seco)	Colágeno (mg/g tejido seco)	L MMP-2 (ng/mg de proteínas)	A MMP-2 (ng/mg de proteínas)	Relación A/L
P+GnRH 1 (n=6)	306±15	155±12 a	37.2±8.1	12.5±2.8 a	0.28±0.06 a
P+GnRH 5 (n=5)	304±16	189±9 b	37.7±7.1	2.5±0.9 b	0.08±0.02 b

Para cada columna los valores (mean ± pooled s.e.m.) marcados con letras distintas difieren significativamente (P<0.05).

El peso y el contenido de agua del cérvix de ovejas durante el anestro estacional aumentan luego del tratamiento para inducir la ovulación con P4 y/o GnRH, a valores similares a los de ovejas ciclando durante la estación reproductiva (**Estudio III**), dando cuenta de la quiescencia del órgano durante el anestro estacional y de la capacidad de los tratamientos hormonales en revertir ésta condición.

El tratamiento con P4 de ovejas en anestro estacional aumentó las concentraciones de proteínas solubles, en acuerdo con los máximos niveles encontrados durante la fase luteal tardía en ovejas ciclando (**Estudio III**). Los resultados apoyan el concepto de que la P4 induciría la síntesis proteica necesaria para la proliferación celular (Ramos y col. 2002; Bott y col. 2006; **Estudio II**). Que no hayamos encontrado variación en el contenido de proteínas solubles totales entre los días 1 y 5 luego del tratamiento con P4 y GnRH coincide con que no hubo diferencias en el contenido proteico entre el día 1 y el día 6 del ciclo estral (**Estudio III**), probablemente debido a que la exposición a la P4 en la fase luteal temprana no haya sido suficiente para inducir la proliferación celular.

Concomitante con la tendencia a tener mayor concentración de colágeno luego del tratamiento con P4, en el cérvix craneal se registró una disminución de la actividad de la L MMP-2. Esto sugiere que la P4 ejerce cierto grado de inhibición de la síntesis de la proMMP-2 (forma L) y como consecuencia menor actividad de degradación del colágeno, como fue reportado en cérvix de ovejas gestantes (Regassa y Noakes 2001) y en cérvix de ratas tratadas con un antagonista de la P4 (Mifepristone) (Clark y col. 2006). El tratamiento con GnRH luego de la P4 tendió a disminuir la concentración de colágeno, sugiriendo un aumento de la actividad colagenolítica inducida por los E producto del estímulo gonadotrófico (Tasende y col. 2005a). En tal sentido, la concentración de colágeno fue menor al día 1 que al 5 luego de la administración de GnRH con P4 previa, a la vez que la actividad de la A MMP-2 y la relación A/L fueron mayores, sugiriendo una acción inductora de los E sobre los mecanismos de activación enzimática de la MMP-2 (Russo y col. 2009, Shan y col. 2013). Este último aspecto difiere respecto e lo encontrado en cérvix de ovejas durante el ciclo estral donde el estímulo de E se ejerció tanto sobre la expresión de la MMP-2 como sobre su activación (**Estudio III**). La tendencia al aumento del peso cervical luego del tratamiento con GnRH a ovejas en anestro, sin variaciones concomitantes en el contenido de agua ni en las concentraciones de proteínas solubles y colágeno podrían estar indicando que se debe a la acumulación de compuestos no proteicos inducida por los E preovulatorios (Tasende y col. 2005b), tal como fue sugerido en el **Estudio III**.

El cérvix caudal de las ovejas en anestro estacional tuvo niveles de actividad de la forma L MMP-2 cercanos a la mitad de los niveles registrados en el cérvix craneal. Coincidentemente, la capacidad de respuesta del cérvix a los E y P4, en términos de concentración de receptores, fue menor en cérvix caudal que en craneal y fue afectada por los tratamientos hormonales solo en el cérvix craneal (**Estudio IV**).

Estos datos sugieren que el nivel de expresión de la pro-MMP-2 durante el anestro estacional es menor en el cérvix caudal por su baja capacidad de respuesta a las hormonas esteroideas ováricas.

Al igual que en ovejas ciclando (**Estudio III**), la actividad gelatinasa en el cérvix de la oveja en anestro estacional depende de la MMP-2, ya que la actividad correspondiente a la MMP-9 fue escasa y estuvo en el límite de detección de la técnica. En este Estudio se muestra que las hormonas esteroideas ováricas regulan la capacidad de degradación del colágeno cervical en ovejas durante el anestro estacional fundamentalmente a través de la regulación de la actividad de la MMP-2.

Discusión general

En la presente Tesis se demuestra por primera vez, hasta nuestro conocimiento, que la mayor capacidad de respuesta a los E del cérvix ovino alrededor de la ovulación se asoció con mayor actividad colagenasa y menores niveles de colágeno, tanto en ciclo estral natural como inducido en el anestro, sugiriendo que la degradación del colágeno está involucrada en los mecanismos de dilatación cervical al estro. Un esquema de los hallazgos se muestra en la **Figura 10**.

Durante el ciclo estral, se demuestra que el cérvix ovino tiene mayor capacidad de respuesta a los E alrededor de la ovulación respecto a la fase luteal, dada por el aumento en las concentraciones tisulares de ARNm RE α y RE, luego del pico preovulatorio de E2 y el aumento en la concentración del RP, como marcador de la acción estrogénica (**Estudio I, Figura 10, A**). Esta mayor capacidad de respuesta a los E dependería fundamentalmente de la mayor expresión del RE α localizado en el epitelio luminal (**Estudios I y II**). Mayor expresión de la proteína RE α luego del pico de LH también fue reportada en cérvix ovino (Falchi y Scaramuzzi 2013), concomitante con el aumento de la penetrabilidad cervical (Kershaw y col. 2005). En conjunto los hallazgos sugieren que los E, a través de su RE α epitelial, dirigen la cascada de señales moleculares involucrada en los mecanismos de remodelación de la MEC que llevan a la dilatación cervical.

Sin embargo, los componentes de los sistemas LH/PGE2 y Ox/PGE2 (RLH, ROx y COX-2) localizados predominantemente en los epitelios cervicales, presentaron los mayores niveles de expresión durante la fase luteal tardía (**Estudio II, Figura 10, A**), lo que sugiere que estos sistemas se encuentran estimulados por P4. La asociación temporal entre el aumento en la expresión de COX-2 y de los RLH y ROx durante la fase luteal sugiere que la LH hipofisaria y/o la Ox luteal, también estimulan la expresión de COX-2 y la posterior síntesis de PGE2. La PGE2 durante la fase luteal podría participar en la génesis de las variaciones cíclicas de la composición y de las características reológicas del mucus cervical (Tang y Adams 1978, Lee y col. 1986, Obara y col. 2001, Perry y col. 2012) propuesta por Zhang y col. (2007). Estudios in vitro demostraron que la LH indujo la producción de PGE2 cervical en bovinos (Mizrachi y Shemesh 1999), sin embargo, la COX-2 y la producción de PGE2 no aumentaron con la administración de Ox (Falchi y Scaramuzzi 2015). Son necesarios más estudios para aclarar el rol de los sistemas LH/PGE2 y Ox/PGE2 en la fisiología cervical y en la remodelación de la MEC al estro.

La disminución del área ocupada por las fibras de colágeno alrededor de la ovulación (**Estudio III, Figura 10, A**), apoya la hipótesis de que la relajación cervical al estro es debida en parte a la desagregación fibrilar provocada por el aumento de ácido hialurónico inducido por lo E2 preovulatorios (Kershaw y col. 2007, Kershaw-Young y col. 2009, Perry y col. 2010 y 2012). A su vez, el aumento de la degradación enzimática alrededor de la ovulación se evidenció por incrementos de 10

a 20 veces en la concentración y en la actividad de la MMP-2, concomitantes con menor concentración de colágeno (**Estudio III, Figura 10, A**). Los hallazgos sugieren que los E preovulatorios, a través del RE α , constituyen una señal hormonal directa o indirecta de estímulo de la síntesis y de la activación de MMP-2 en los fibroblastos activos del estroma cervical (**Estudios I y III**). El incremento en la desagregación de fibras y en la degradación enzimática del colágeno al estro, demuestran la coexistencia de estos dos procesos en los mecanismos de remodelación de la MEC. Se puede inferir que dichos procesos promueven la relajación, dilatación y el incremento de la penetrabilidad del cérvix al estro (Kershaw y col. 2005).

Durante el ciclo estral, se demostró que hay diferencias histomorfológicas y en los niveles de expresión de RE α , ROx, RLH, COX-2 y MMP-2 entre las zonas craneal y caudal del cérvix ovino, que podrían estar vinculados a sus distintos roles fisiológicos. (**Estudio II, Figura 10, A**). Reportes previos también mostraron la expresión diferencial a lo largo del eje longitudinal cervical de otros componentes de la cascada de señales vinculadas a la remodelación de la MEC cervical, como los receptores de prostaglandinas (EP2 y EP4) o las hialuronato sintasas (Schmitz y col. 2006, Kershaw y col. 2007, Kershaw-Young y col. 2009, Leethongdee y col. 2010, Perry y col. 2012)

Durante el anestro estacional, encontramos concentraciones de RE, RP y MMP-2 (**Estudios IV y V**) similares a las del ciclo estral en estación reproductiva (**Estudios I y III**). En anestro, con concentraciones circulantes de E2 y P4 basales, el cérvix mostró expresión constitutiva de RE, RP y MMP-2, que se manifiesta en forma diferencial en las zonas craneal y caudal. En la zona craneal las concentraciones de RE, RP y MMP-2 fueron mayores y respondieron a los tratamientos con GnRH con o sin P4 previa (**Estudios IV y V**), mostrando el efecto estimulador de E2 inducido por la GnRH y el efecto inhibitorio de la P4, en acuerdo con estudios previos (**Estudios I y III**). Sin embargo, el cérvix caudal tuvo niveles menores de expresión de RE, RP y MMP-2 que el craneal, los que no fueron afectados por los tratamientos (**Estudios IV y V**) (**Figura 10, B**). Esta expresión y regulación de RE, RP y MMP-2 diferencial entre las zonas craneal y caudal durante el anestro estacional y luego de los tratamientos, no coincide con lo encontrado durante el ciclo estral, donde el ARNm RE α , el RP y la expresión de MMP-2 fueron mayores en la zona caudal que craneal (**Estudios I y III**). En conjunto los resultados indican que el anestro estacional condiciona la capacidad de respuesta del cérvix a E y P4 en términos de RE y RP y potencial colagenolítico de MMP-2, en una forma dependiente de la zona cervical.

En cérvix de ovejas en anestro estacional se obtuvieron evidencias que demuestran mayor degradación del colágeno alrededor de la ovulación inducida, asociada al estímulo de los E preovulatorios (**Estudio V**), que fueron similares a las encontradas en ovejas ciclando alrededor de la ovulación espontánea (**Estudio III**). Luego del

tratamiento con GnRH y P4 previa, la concentración de colágeno fue menor y la actividad de la MMP-2 fue mayor alrededor de la ovulación inducida que en la fase lútea temprana. Estos resultados sugieren que el aumento de los E preovulatorios inducen la degradación del colágeno a través del estímulo de la actividad enzimática de la MMP-2, sin estímulo evidente en la expresión de la proteína MMP-2 (**Estudio V, Figura 10, B**), como fuera registrado durante el ciclo estral (Estudio III). No se descarta que en cérvix de ovejas en anestro estacional durante la ovulación inducida, también coexista junto con la degradación del colágeno, cierto grado de desagregación de las fibras de colágeno, inducido por incrementos de ácidos hialurónicos (Kershaw-Young y col. 2009, Perry y col. 2010), aunque no se encontraron referencias sobre variaciones del ácido hialurónico en cérvix de ovejas en anestro inducidas a ovular.

En síntesis, estos estudios de Tesis aportan evidencias de que la remodelación de la MEC cervical alrededor de la ovulación es consecuencia de la acción estrogénica, sustentada por los altos niveles de E₂ circulantes y por el alto nivel de expresión de RE α cervicales. La remodelación de la MEC involucra la coexistencia de la desagregación de las fibras de colágeno y su degradación por la acción de la MMP-2 producida en los fibroblastos del estroma y estimulada por los E a través del RE α epitelial. Además, en ovejas en anestro estacional, se muestran evidencias de la degradación del colágeno dependiente de la activación de MMP-2 inducida por los E preovulatorios (producto del tratamiento con GnRH con P4 previa), que actúan a través del actuando a través del RE α . Por lo tanto, en el anestro estacional, el tratamiento con GnRH y P4 previa para inducir la ovulación reproduce parcialmente los mecanismos de degradación del colágeno descritos en ovejas ciclando.

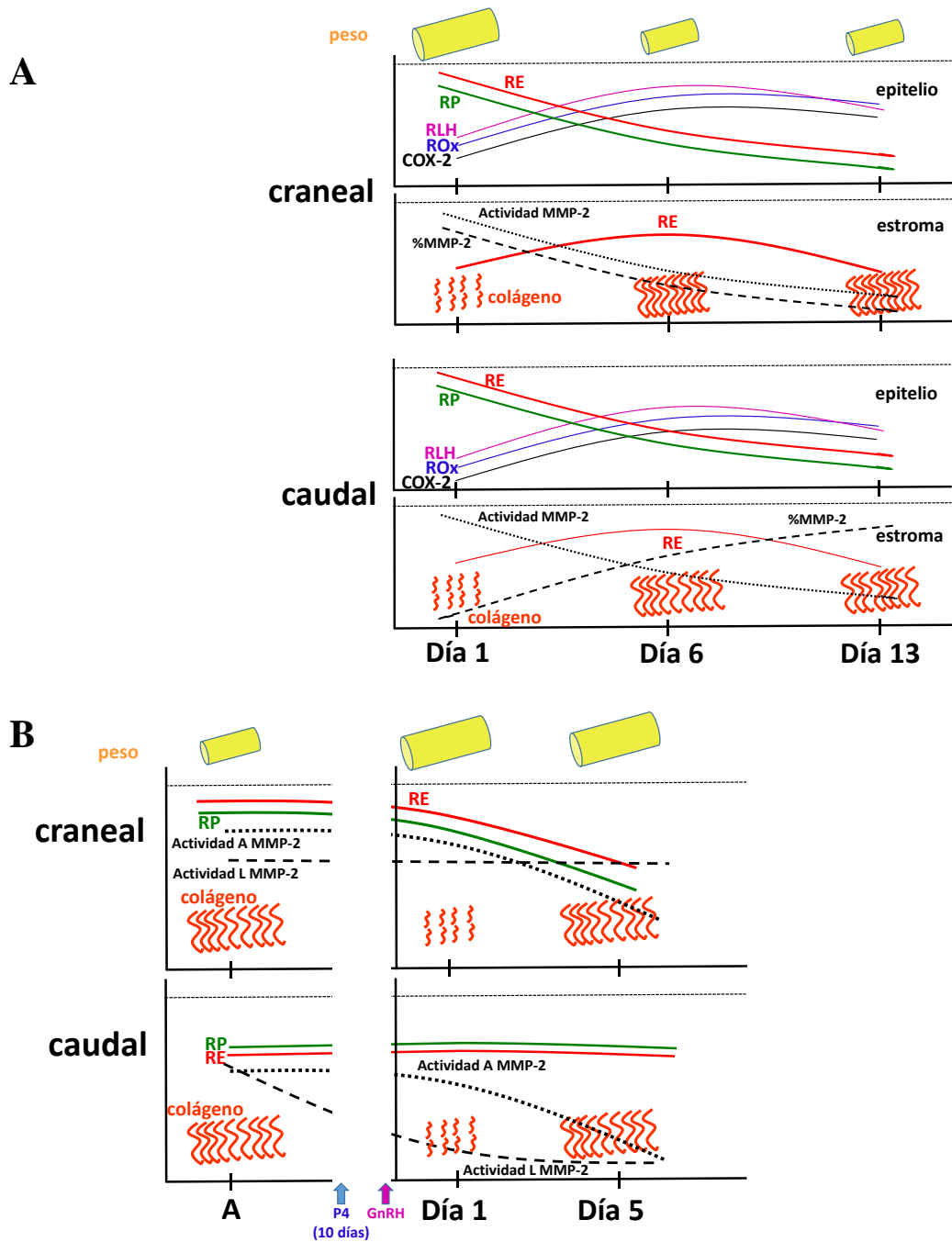


Figura 10. Resumen de los hallazgos más significativos obtenidos en éste trabajo de Tesis en ovejas durante el ciclo estral en los días 1, 6 y 13 luego de detectado el estro (día 0) (A) y en ovejas en anestro estacional sin tratamiento (A) y uno o cinco días luego del bolo de GnRH y pretratamiento con P4 (B).

Conclusiones

1. La capacidad de repuesta del cérvix ovino a los E y a la P4 es máxima tanto alrededor de la ovulación espontánea como inducida durante el anestro y está sometida a la regulación positiva de los E preovulatorios y negativa de la P4 durante la fase lútea. La regulación sobre la expresión de RE se ejerce a nivel transcripcional sobre el ARNm RE α y a nivel post-transcripcional sobre la expresión de la proteína RE y su capacidad de unión (**Estudios I y II**).
2. Alrededor de la ovulación espontánea en la estación reproductiva, los E preovulatorios, actuando a través del RE, inducen directa o indirectamente la desagregación de las fibras y la degradación del colágeno del cérvix, estimulando la expresión y la activación de la colagenasa MMP-2. El RE α se expresa mayormente en los epitelios luminales y la MMP-2 está localizada en los fibroblastos del estroma cervical, lo que plantea la existencia de una comunicación a través de diferentes señales moleculares o "cross talk" entre epitelios y estromas (**Estudios I, II y III**).
3. Los componentes de los sistemas LH/PGE2 y Ox/PGE2 (RLH, ROx y COX-2) se expresan predominantemente en el epitelio luminal, pero adquieren sus máximos niveles durante la fase lútea tardía del ciclo estral (**Estudios II**). No se descarta que estos sistemas que inducen la síntesis de PGE2, estén activados en forma temprana por el ambiente hormonal previo a la ovulación.
4. Durante el ciclo estral en estación reproductiva y el ciclo inducido en anestro estacional, el cérvix presenta marcadas diferencias histomorfológicas y/o en la expresión de RE α , RP, ROx, RLH, COX-2 y MMP-2 entre las zonas craneal y caudal, lo que refleja distintos roles fisiológicos para estas zonas cervicales (**Estudios I, II, III, IV y V**).
5. Alrededor de la ovulación inducida con GnRH y P4 previa durante el anestro estacional, los E preovulatorios actuando a través del RE, inducen la degradación del colágeno cervical por activación de la colagenasa MMP-2 (**Estudios IV y V**), reproduciendo en parte, lo descrito alrededor de la ovulación espontánea durante el ciclo estral (**Estudios I, II y III**).
6. Se demuestra por primera vez, que la mayor capacidad de respuesta a los E del cérvix ovino alrededor de la ovulación se asocia con mayor actividad colagenasa y mayor desagregación de las fibras y degradación de colágeno, tanto en ciclo estral natural como inducido en el anestro. Se infiere que los procesos de desagregación fibrilar y degradación de colágeno constituyen mecanismos de remodelación de la MEC, que contribuyen a la relajación, dilatación y aumento de la penetrabilidad del cérvix al momento de la ovulación.

Referencias

- Adams NR, Sanders MR. (1993). Development of uterus-like redifferentiation in the cervix of the ewe after exposure to estradiol-17 beta. *Biol Reprod* 48:357-362.
- Adams NR. (1979). Seasonal variation in the nature of cervical mucus response to estradiol benzoate in normal and clover-affected ovariectomized ewes. *Biol Reprod* 21: 1203-1207.
- Adams NR. (1986). Morphogenic change in the cervix of the ewe after prolonged exposure to oestradiol-17 beta. *J Reprod Fertil* 76:727-733.
- Allison AJ, Robinson TJ. (1972). The recovery of spermatozoa from the reproductive tract of the spayed ewe treated with progesterone and oestrogen. *J Reprod Fertil* 31: 215-224.
- Anandagoda N, Ezra DG, Cheema U, Bailly M, Brown RA. (2012). Hyaluronan hydration generates three-dimensional meso-scale structure in engineered collagen tissues. *J R Soc Interface* 9: 2680-2687.
- Armstrong DT, Evans G. (1983). Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19: 31-42.
- 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.
- 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.
- Baird DT, McNeilly AS. (1981). Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe. *J Reprod Fertil* 30(Suppl): 119-133.
- Bartlewski P, Baby T, Giffin J. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Anim Reprod Sci* 124: 259-268.
- 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.
- Breeveld-Dwarkasing VNA, de Boer-Brouwer M, Möstl E, Soede NM, van der Weijden GC, Taverne MAM, van Dissel-Emiliani FMF. (2002). Immunohistochemical distribution of oestrogen and progesterone receptors and tissue concentrations of oestrogens in the cervix of non-pregnant cows. *Reprod Fertil Dev* 14: 487-494.
- Breeveld-Dwarkasing VNA, van derWeijden GC, Taverne MAM, van Dissel-Emiliani FMF. (2000). The bovine cervix during the oestrous cycle: regional differences in morphology and density of steroid hormone receptors. *Reprod Domest Anim* 35: 120-124.
- Brown BW, Mattner PE. (1977). Capillary blood flow in the genital tracts of conscious ewes: cyclic changes and the effect of ovarian hormones. *J Endocrinol* 74: 185-191.
- Buhimschi IA, Dussably L, Buhimschi CS, Ahmed A, Weiner CP. (2004). Physical

- and biomechanical characteristics of rat cervical ripening are not consistent with increased collagenase activity. *Am J Obstet Gynecol* 191: 1695-1704.
- Campbell JW, Harvey TG, McDonald MF, Sparksman RI. (1996). Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology* 45: 1535-1544.
- Candappa I and Bartlewski P. (2012). A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *Open Reprod Sci J* 3: 162-175.
- Candappa IB, Bartlewski PM. (2014). Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes. *Reprod Biol Endocrinol* 12: 8.
- Catt K, Dufau ML. (1991). Gonadotropic hormones: biosynthesis secretion, receptors and actions. En: *Reproductive Endocrinology*. Eds. Yen SCC, Jeffe RB, W Saunders, Philadelphia, USA, pp 105–155.
- Challis J, Matthews S, Gibb W, Lye SJ. (2000). Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev* 21: 514-550.
- Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, Créminon C, Martal J, Maclouf J, Guillomot M. (1997). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 138: 2163-2171.
- Clark JH, Schrader WT, O'Malley BW. (1992). Mechanisms of steroid hormones action. En: *Textbook of Endocrinology*. Eds. JD Wilson, DW Foster, WB Saunders, Philadelphia, USA, pp.35-90.
- Clark K, Ji H, Feltovich H, Janowski J, Carroll C, Chien EK. (2006). Mifepristone-induced cervical ripening: structural, biomechanical, and molecular events. *Am J Obstet Gynecol* 194: 1391-1398.
- Cognie Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51: 105-116.
- Couse JF, Hewitt SC, Korach KS. (2006). Steroid receptors in the ovary and uterus, En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Eds. JD Neill, Elsevier Academic Press, St. Louis, USA, pp.593-678.
- Croker KP, Robinson TJ, Shelton JN. (1975). The passage of spermatozoa through the cervix of ovariectomized ewes treated with progesterone and oestrogen. *J Reprod Fertil* 43: 405-410.
- Croy BA, Prudencio J, Minhas K, Ashkar AA, Galligan C, Foster RA, Buckrell B, Coomber BL. (1999). A preliminary study on the usefulness of huIL-8 in cervical relaxation of the ewe for artificial insemination and for embryo transfer. *Theriogenology* 52: 271-287.
- Curry TE Jr, Osteen KG. (2003). The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 24: 428-65.
- Dewitt DL, Smith WL. (1988). Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1412–1416.
- 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.
- 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.
- Falchi L, Scaramuzzi RJ. (2013). The expression of ER α , OTR, cPLA(2), COX-2, and PPAR γ in the cervix of the ewe during the estrous cycle. *Theriogenology* 79: 40-47.
- Falchi L, Scaramuzzi RJ. (2015). An in vitro investigation of the actions of reproductive hormones on the cervix of the ewe in the follicular stage: The effects of 17 β -estradiol, oxytocin, FSH, and arachidonic acid on the cervical pathway for the synthesis of prostaglandin E₂. *Theriogenology* 83: 1007-1014.
- Fields MJ, Shemesh M. (2004). Extragonadal luteinizing hormone receptors in the reproductive tract of domestic animals. *Biol Reprod* 71: 1412-1418.
- Fierro S, Gil J, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology* 79: 399-408.
- Flint M. (1972) Interrelationships of mucopolysaccharide and collagen in connective tissue remodelling. *J Embryol exp Morph* 27: 481-495.
- 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.
- Fosang AJ, Handley CJ. (1988). Connective tissue remodelling in the ovine cervix during pregnancy and at term. *Connect Tissue Res* 17: 277-285.
- Fuchs AR, Fuchs F. (1984). Endocrinology of human parturition: a review. *Br J Obstet Gynaecol* 91: 948-967.
- Fuchs AR, Graddy LG, Kowalski AA, Fields MJ. (2002). Oxytocin induces PGE₂ release from bovine cervical mucosa in vivo. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 70: 119-129.
- Fuchs AR, Ivell R, Fields PA, Chang SM, Fields MJ. (1996). Oxytocin receptors in bovine cervix: distribution and gene expression during the estrous cycle. *Biol Reprod* 54: 700-708.
- Garcia-Villar R, Toutain PL, More J, Ruckebusch Y. (1982). Spontaneous motility of the cervix in cyclic and ovariectomized ewes and changes induced by exogenous hormones. *J Reprod Fertil* 66: 317-326.
- Garófalo EG, Tasende C. (1996). Uterine estrogen and progesterone receptors in prepubertal ewe: distribution in myometrium, endometrium and caruncles. *Vet Res* 27: 177-183.
- Gibb W, Lye SJ, Challis RG. (2006). Parturition. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Ed. J.D. Neill., Elsevier Academic Press, St. Louis, USA. pp. 2925-2974.
- Gimpl G, Fahrenholz F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. *Physiol Rev* 81: 629-683.
- Golichowski AM, King SR, Mascaro K. (1980). Pregnancy-related changes in rat cervical glycosaminoglycans. *Biochem J* 192: 1-8.

- Gonzalez JM, Franzke CW, Yang F, Romero R, Girardi G. (2011). Complement activation triggers metalloproteinases release inducing cervical remodeling and preterm birth in mice. *Am J Pathol* 179: 838-849.
- Goodman RL, Inskeep EK. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Ed. J.D. Neill., Elsevier Academic Press, St. Louis, USA. pp. 2389-2447.
- Gorodeski GI, Pal D. (2000). Involvement of estrogen receptors alpha and beta in the regulation of cervical permeability. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: 689-696.
- Gorodeski GI. (1996). The cervical cycle. En: Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. Eds. Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA., pp.301-324.
- Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 33: 977-992.
- Hawk HW, Conley HH, Cooper BS. (1978). Number of sperm in the oviducts, uterus, and cervix of mated ewe as effected by exogenous estradiol. *J Anim Sci* 46: 1300-1308.
- Hayashi RH. (1993). Spontaneous and induced cervical ripening. Natural dilation and effacement process and current cervical ripening techniques. *J Reprod Med* 38(Suppl): 66-72.
- Hu J, Ludwig TE, Salli U, Stormshak F, Mirando MA. (2001). Autocrine/paracrine action of oxytocin in pig endometrium. *Biol Reprod* 64: 1682-1688.
- Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 3: 27-45.
- Ing NH, Massuto DA, Jaeger LA. (2008). Estradiol up-regulates AUF1p45 binding to stabilizing regions within the 3'-untranslated region of estrogen receptor α mRNA. *J Biol Chem* 283: 1764-1772.
- Ing NH, Spencer TE, Bazer FW. (1996). Estrogen enhances endometrial oestrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. *Biol Reprod* 54: 591-599.
- Ing NH, Tsai SY, Tsai MJ. (1993). Progesterone and estrogen. En: Genes in Mammalian Reproduction. Eds. Gwatkin RBL, Wiley-Liss Inc., New York, USA. pp.271-291.
- Iyer RP, Patterson NL, Fields GB, Lindsey ML. (2012). The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303: H919-H930.
- 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.
- Kershaw CM, Scaramuzzi RJ, McGowan MR, Wheeler-Jones CP, Khalid M. (2007). The expression of prostaglandin endoperoxide synthase 2 messenger RNA and the proportion of smooth muscle and collagen in the sheep cervix during the estrous cycle. *Biol Reprod* 76: 124-129.
- Kershaw-Young CM, Khalid M, McGowan MR, Pitsillides AA, Scaramuzzi RJ.

- (2009). The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. *Theriogenology* 72: 251-261.
- Kershaw-Young CM, Scaramuzzi RJ, McGowan MR, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP, Khalid M. (2010). The effect of estradiol on COX-2, EP2, and EP4 mRNA expression and the extracellular matrix in the cervix of the hypogonadotrophic, ovariectomized ewe. *Theriogenology* 73: 620-628.
- 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.
- Konya V, Marsche G, Schuligoi R, Heinemann A. (2013). E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacol Ther* 138: 485-502.
- Kraemer DC (1989). Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology* 31: 141-148.
- Krizkova S, Zitka O, Masarik M, Adam V, Stiborova M, Eckschlager T, Chavis G and Kizek R (2011). Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity. *Trends Analyt Chem* 30: 1819-1832.
- Kuijper EA, Ket JC, Caanen MR, Lambalk CB. (2013). Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 27: 33-63.
- 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 α and β . *Endocrinology* 138: 863-870.
- Ledger W, Webster MA, Anderson ABM, 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 Endocrinology* 105: 227-233.
- 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.
- Lee CN, Clayton MK, Bushmeyer SM, First NL, Ax RL. (1986). Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *J Anim Sci* 63: 861-867.
- Leethongdee S, Kershaw-Young CM, Scaramuzzi RJ, Khalid M. (2010). Intra-cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. *Theriogenology* 73: 1257-1266.
- Leethongdee S, Khalid M, Bhatti A, Ponglowhapan S, Kershaw CM, Scaramuzzi RJ. (2007). The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology* 67: 767-777.

- Leppert PC. (1995). Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol* 38: 267-279.
- Lightfoot RJ, Adams NR. (1979). Changes in cervical histology in ewes following prolonged grazing on oestrogenic subterranean clover. *J Comp Pathol* 89: 367-73
- Lyons CA, Beharry KD, Nishihara KC, Akmal Y, Ren ZY, Chang E, Nageotte MP. (2002). Regulation of matrix metalloproteinases (type IV collagenases) and their inhibitors in the virgin, timed pregnant, and postpartum rat uterus and cervix by prostaglandin E(2)-cyclic adenosine monophosphate. *Am J Obstet Gynecol* 187: 202-208.
- MacKenzie I Z (2006). Induction of labour at the start of the new millennium. *Reproduction* 131: 989–998.
- Malpau B. (2006). Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Ed. J.D. Neill., Elsevier Academic Press, St. Louis, USA. pp. 2231–2281.
- Matthews EL, Ayad VJ. (1994). Characterization and localization of a putative oxytocin receptor in the cervix of the oestrous ewe. *J Endocrinol* 142: 397-405.
- Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Sahlin L. (2000). An immunohistochemical study on estradiol regulation of estrogen receptor alpha in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nut Dev* 40: 587-596.
- 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 lambs. *Acta Vet Scand* 42: 161-169.
- Meikle A, Tasende C, Sosa C, Garófalo EG. (2004). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* 16: 385-394.
- Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, de Castro T, Rubianes E. (2010). New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 22: 113-118.
- Mishra B, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K. (2010). Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. *Reprod Biol Endocrinol* 8: 60.
- Mitchell SE, Robinson JJ, King ME, McKelvey WA, Williams LM. (2002). Interleukin 8 in the cervix of non-pregnant ewes. *Reproduction* 124: 409-416.
- Mitko K, Ulbrich SE, Wenigerkind H, Sinowatz F, Blum H, Wolf E, Bauersachs S. (2008). Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. *Reproduction* 135: 225-240.
- Mizrachi D, Shemesh M. (1999). Expression of functional luteinizing hormone receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine cervix: luteinizing hormone augmentation of intracellular cAMP, phosphate inositol and cyclooxygenase. *Mol Cell Endocrinol*; 157:191-200.
- Moré J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anat (Basel)* 120: 156-159.

- Morel G, Pechoux C, Raccurt M, Zingg HH. (2001). Intrauterine oxytocin system. Compartmental distribution of oxytocin and oxytocin receptors in rat endometrial epithelium. *Cell Tissue Res* 304: 377-382.
- Morrison AG, Callanan JJ, Evans NP, Aldridge TC, Sweeney T. (2003). Effects 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.
- Myers DA. (2012). The recruitment and activation of leukocytes into the immune cervix: further support that cervical remodeling involves an immune and inflammatory mechanism. *Biol Reprod* 87: 107.
- Myers KM, Paskaleva AP, House M, Socrate S. (2008). Mechanical and biochemical properties of human cervical tissue. *Acta Biomater* 4: 104-116.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562-573.
- Naqvi SMK, 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.
- Obara M, Hirano H, Ogawa M, Tsubaki H, Hosoya N, Yoshida Y, Miyauchi S, Tanaka T. (2001). Changes in molecular weight of hyaluronan and hyaluronidase activity in uterine cervical mucus in cervical ripening. *Acta Obstet Gynecol Scand* 80: 492-506.
- Osmers R, Rath W, Adelman-Grill BC, Fittkow C, Szeverényi 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.
- Perry K, Haresign W, Wathes DC, Khalid M. (2010). Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology* 74: 1685-1690.
- Perry K, Haresign W, Wathes DC, Pitsillides AA, Khalid M. (2012). Cervical expression of hyaluronan synthases varies with the stage of the estrous cycle in the ewe. *Theriogenology* 77: 1100-1110.
- Rajabi MR, Dean DD, Beydoun SN, Woessner JF Jr. (1988). Elevated tissue levels of collagenase during dilation of uterine cervix in human parturition. *Am J Obstet Gynecol* 159: 971-976.
- Rajabi MR, Singh A. (1995). Cell origin and paracrine control of interstitial collagenase in the guinea pig uterine cervix--evidence for a low molecular weight epithelial cell-derived collagenase stimulator. *Biol Reprod* 52: 516-523.
- Ramos JG, Varayoud J, Bosquiazzo VL, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. (2002). Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationship to estrogen and progesterone receptor dynamics. *Biol Reprod.* 67: 735-742.
- 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.
- 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.
- Raynes JG, Anderson JC, Fitzpatrick RJ, Dobson H. (1988a). Increased collagenase activity is not detectable in cervical softening in the ewe. *Coll Relat Res* 8: 461-469.
- Raynes JG, Clarke FA, Anderson JC, Fitzpatrick RJ, Dobson H. (1988b). Collagenase inhibitor concentration in cultured cervical tissue of sheep is increased in late pregnancy. *J Reprod Fertil* 83: 893-900.
- 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.
- Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. (1998). Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 19: 3-17.
- Robinson JJ, McKelvey WAC, King ME, Mitchell SE, Mylne MJA, McEvoy TG, Dingwall WS and Williams LM. (2011). Traversing the ovine cervix – a challenge for cryopreserved semen and creative science. *Animal* 5: 1791-1804
- Rodríguez Iglesias RM, Irazoqui H, Ciccioioli N, Giglioli C. (1993). Seasonality of oestrus and ovulation in Corriedale ewes: repeatabilities and phenotypic correlations. *J Agric Sci (Cambridge)* 120: 115-119.
- Rodríguez-Piñón M, Meikle A, Tasende C, Sahlin L, Garófalo E.G. (2005). Differential estradiol effects on estrogen and progesterone receptors expression in the oviduct and cervix of immature ewes. *Domest Anim Endocrinol* 28: 442-450.
- 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.
- Ruscheinsky M, De la Motte C, Mahendroo M. (2008). Hyaluronan and its binding proteins during cervical ripening and parturition: dynamic changes in size, distribution and temporal sequence. *Matrix Biol* 27: 487-497.
- Russo LA, Peano BJ, Trivedi SP, Cavalcanto TD, Olenchock BA, Caruso JA, Smollock AR, Vishnevsky O y Gardner RM (2009). Regulated expression of matrix metalloproteinases, inflammatory mediators, and endometrial matrix remodeling by 17beta- estradiol in the immature rat uterus. *Reprod Biol Endoc* 7: 124.
- Salamon S, Maxwell W. (2000). Storage of ram semen. *Anim Rep Sci* 62: 77-111.
- Schmitz T, Levine BA and Nathanielsz PW. (2006). Localization and steroid regulation of prostaglandin E2 receptor protein expression in ovine cervix. *Reproduction* 131: 743–750.
- Shan B, Li W, Yang SY, Li ZR. (2013). Estrogen up-regulates MMP2/9 expression in endometrial epithelial cell via VEGF-ERK1/2 pathway. *Asian Pac J Trop Med* 6: 826-830.
- Shemesh M, Dombrovski 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.
- Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. (2009). Prostanoids in health

- and disease. *J Lipid Res* 50:S423–428.
- Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. (1996). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J Reprod Fertil* 108: 101-106.
- Stanchev P, Kunavongkrit A, Edqvist LE, Eriksson H. (1984). Receptors for estrogens and progesterone in the porcine cervix. *Theriogenology* 21: 757–766.
- Stormshak F, Bishop CV. (2008). Board-invited review: Estrogen and progesterone signaling: genomic and nongenomic actions in domestic ruminants. *J Anim Sci* 86: 299-315.
- Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. (2002). Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod* 67: 889-894.
- Tang BY, Adams NR. (1978). Enzyme activities and protein and carbohydrate concentrations in cervical secretions at dioestrus in normal ewes and ewes with permanent phytoestrogenic infertility. *Aust J Biol Sci* 31: 241-246.
- 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.
- Tasende C, Meikle A, Rubianes E, Garófalo EG. (1996). Restoration of estrogen and progesterone uterine receptors during the ovine postpartum period. *Theriogenology* 45: 1545-1551.
- 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 anoestrous ewes. *Reprod Fertil Dev* 17: 721-726.
- 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 anestrous ewes. *Theriogenology* 57: 1719-1731.
- Uldbjerg N. (1989). Cervical connective tissue in relation to pregnancy, labour, and treatment with prostaglandin E2. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 148:1-40.
- van Engelen E, Breeveld-Dwarkasing VN, Taverne MA, Everts ME, van der Weijden GC, Rutten VP. (2008). MMP-2 expression precedes the final ripening process of the bovine cervix. *Mol Reprod Dev* 75: 1669-1677.
- Visse R, Nagase H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839.
- Wallis RM, Hillier K. (1981). Regulation of collagen dissolution in the human cervix by oestradiol-17 beta and progesterone. *J Reprod Fertil* 62: 55-61.
- Wallis RM, Hillier K. (1982). The effect of arachidonic acid and prostanoids on collagen dissolution in human uterine cervix in vitro. *Prostaglandins* 24: 377-385.
- Wang H, Eriksson H, Sahlin L. (2000). Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract of the rat during the oestrous cycle. *Biol Reprod* 63: 1331-

1340.

- Wang H, Stjernholm YV. (2007). Plasma membrane receptor mediated MAPK signaling pathways are activated in human uterine cervix at parturition. *Reprod Biol Endocrinol* 5: 3.
- Weems C, Weems Y, Randel R. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J* 17: 206-228.
- Weems YS, Kim L, Humphreys V, Tsuda V, Weems CW. (2003). Effect of luteinizing hormone (LH), pregnancy specific protein B (PSPB), or arachidonic acid (AA) on ovine endometrium of the estrous cycle or placental secretion of prostaglandins E2 (PGE2) and F2a (PGF2a) and progesterone in vitro. *Prostaglandins* 71: 55-73.
- Wergin WP. (1979). Cyclic changes in the surface structure of the cervix from the ewe as revealed by scanning electron microscopy. *Tissue Cell* 11: 359-370.
- Winkler M, Kemp B, Hauptmann S, Rath W. (1997). Parturition steroids, prostaglandin E2 and expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Obstet Gynecol* 89: 393-402.
- Winkler M, Rath W. (1999). Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition. *J Perinat Med* 27: 45-60.
- Word RA, Li XH, Hnat M, Carrick K. (2007). Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts. *Semin Reprod Med* 25:69-79.
- 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.
- Yang YL, Sun C, Wilhelm ME, Fox LJ, Zhu J, Kaufman LJ. (2011). Influence of chondroitin sulfate and hyaluronic acid on structure, mechanical properties, and glioma invasion of collagen I gels. *Biomaterials* 32: 7932-7940.
- Yoshida K, Tahara R, Nakayama T, Yanaihara T. (1993). Effect of dehydroepiandrosterone sulphate, oestrogens and prostaglandins on collagen metabolism in human cervical tissue in relation to cervical ripening. *J Int Med Res* 21: 26-35.
- Yoshida M, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Takemura M, Wada Y, Sato T, Ito A, Fujii S. (2002). Prostaglandin F(2alpha), cytokines and cyclic mechanical stretch augment matrix metalloproteinase-1 secretion from cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 8: 681-687.
- Zhang Q, Collins V, Chakrabarty K, Rose J. C., Wu W. X. (2007). Regulation of the prostaglandin enzymatic system by estradiol and progesterone in nonpregnant sheep cervix. *Reproduction* 133: 1027–1034.
- 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.
- Ziecik AJ, Bodek G, Blitek A, Kaczmarek M, Waclawik A. (2005). Nongonadal LH receptors, their involvement in female reproductive function and a new

applicable approach. *Vet J* 169: 75-84.

Ziecik AJ, Jedlinska M, Rzucidlo SJ. (1992). Effect of estradiol and progesterone on myometrial LH/hCG receptors in pigs. *Acta Endocrinol (Copenh)* 127: 185-188.

Ziecik AJ, Stanchev PD, Tilton JE. (1986). Evidence for the presence of luteinising hormone/human chorionic gonadotropin-binding sites in the porcine uterus. *Endocrinology* 119: 1159–2116.

Anexos