

INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS α (ER α) EN CERVIX CRANEAL OVINO DURANTE EL CICLO ESTRAL

M. Rodríguez-Piñón¹, P. Puime¹, P. Genovese²,
A. Bielli²

Área de Bioquímica¹, Área de Histología y Embriología², Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1550, C.P. 11.600, Montevideo-Uruguay.

RESUMEN

Se estudió la distribución del (ER α) en diferentes compartimentos histológicos (HC) del cérvix ovino durante el ciclo estral. Ovejas Corriedale adultas se sacrificaron en los días 1 (n=4), 6 (n=6) o 13 (n=6) del estro sincronizado. En el tercio craneal del cérvix, se detectó el ER α por inmunohistoquímica (anticuerpo 1ario contra el ER α (humano). Se evaluaron 9 HC: epitelios luminal (apical y basal) y glandular (superficial y profundo); estromas del pliegue y de la pared (superficiales y profundos) y músculo superficial longitudinal. En todos los HC se estimó el porcentaje de núcleos positivos (%+) y el número de núcleos positivos/mm² (+/mm²) en los HC estromales y muscular. Los datos fueron analizados por ANOVA. En todos los HC se encontró positividad al ER α . El HC, día e interacción HC*día afectaron el %+ y sólo el HC afectó el +/mm². La distinta distribución del ER α entre los HC del cérvix craneal ovino durante el ciclo estral, sugiere que poseen diferente capacidad de respuesta a los estrógenos (E).

SUMMARY

The ER α distribution in different histological compartments (HC) of the ovine cervix during the estrous cycle was

studied. Mature Corriedale ewes were slaughtered at days 1 (n=4), 6 (n=6) or 13 (n=6) after the synchronized estrus. The ER α was detected by immunohistochemistry (primary antibody against the human ER α in the cervical cranial third. Nine HC were evaluated: luminal (apical and basal) and gland (superficial and deep) epithelia; fold and wall stromata (superficial and deep) and superficial longitudinal muscle. All nine HC showed immunoreactivity to ER α . The percentage of positive nucleus (%+) was estimated in every HC and the number of positive nucleus/mm² (+/mm²) was estimated in stromata and muscle. Data were analyzed by ANOVA. The %+ was affected by HC, day and interaction HC*day but the +/mm² was affected only by HC. The different ER(distribution found between cranial ovine cervix HCs during the estrous cycle, suggests differences in HCs capacity to respond to estrogens (E).

INTRODUCCIÓN

La anatomía del cérvix de la oveja dificulta la canulación transcervical (2). Se han utilizado hormonas para inducir su dilatación, pero con resultados poco consistentes (5). Los estrógenos (E) regulan los procesos de maduración cervical a través de su receptor nuclear (ER α) (1). En cérvix ovino, demostramos que las concentraciones de ER y de su ARNm son mayores en el estro que en la fase lútea, utilizando ensayos de "binding" e hibridización en solución, respectivamente (6). A su vez, la regulación de ER en útero ovino es específica del tipo celular (3) y el cérvix ovino presenta zonas diferenciadas histológicamente (4). El objetivo de este trabajo fue estudiar la distribución del ER(en diferentes compartimentos histológicos (HC) del cérvix craneal de ovejas durante el

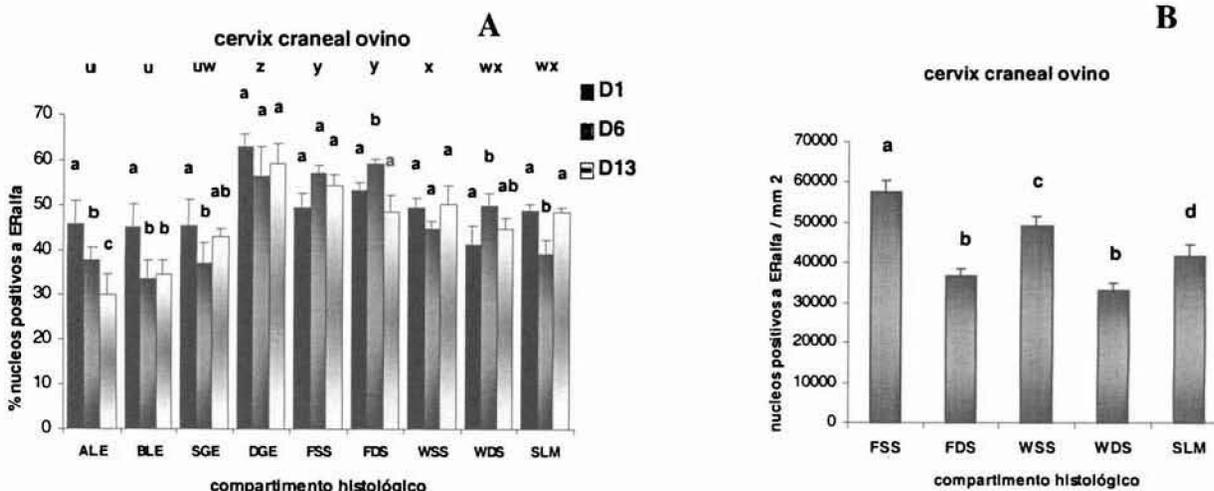


Figura - Porcentaje de núcleos positivos (A) y número de núcleos positivos/mm² (B) a ER α (mean±SEM) en cervix craneal de ovejas al día 1 (D1), 6 (D6) o 13 (D13) del estro sincronizado. Compartimento histológico: ver texto. Columnas con diferentes letras difieren significativamente por día ("a" hasta "c" en A) o por compartimento histológico ("u" hasta "z" en A y "a" hasta "d" en B) (P<0.04).

Solo el HC afectó el +/mm² (P<0.0001) (Figura B). Los estromas superficiales (FSS y WSS) tuvieron mayor +/mm² que los estromas profundos (FDS y WDS) y el SLM tuvo valores intermedios.



ciclo estral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se sincronizaron los estros de ovejas Corriedale adultas (39 ± 1 kg) con dos dosis (150 g c/u, i.m.) de un análogo de Prostaglandina-F2 (Delprostenate, Glandinex, Universal Lab, Uruguay) separadas 6 días. Las ovejas fueron sacrificadas en los días 1 (D1, n(4)), 6 (D6, n(6)) o 13 (D13, n(6)) del estro detectado con retajos. El tercio craneal del cervix fue fijado en paraformaldehído (pH=7.4, 48h), incluido en parafina, seccionado longitudinalmente (5mm) y procesado por inmunohistoquímica con un kit comercial (Dako Corporation) con un anticuerpo policlonal primario contra el ER (humano y el sistema estreptavidina-biotina-peroxidasa. Los controles negativos se realizaron por ausencia del anticuerpo primario. Se observaron 9 HC: epitelios luminales apical (ALE) y basal (BLE), glandulares superficial (SGE) y profundo (DGE); estromas del pliegue superficial (FSS) y profundo (FDS), de la pared superficial (WSS) y profundo (WDS) y músculo superficial longitudinal (SLM). Los %+ y +/mm² fueron estimados a ciegas por dos operadores diferentes en 1000 núcleos de todos los HC o en los HC estromales y muscular, respectivamente. Los datos fueron analizados por ANOVA (GLM procedure, S.A.S. Institute Inc., 1994) incluyendo los efectos de operador, HC, día y las interacciones entre ellos, tomando como significativo $P < 0.05$.

RESULTADOS

No existieron efectos significativos de operador en ninguna de las dos variables medidas. En ninguno de los controles negativos se obtuvo inmunoseñal específica. El HC, día e interacción HC por día afectaron el %+ ($p < 0.04$) (Figura A). El DGE tuvo mayor %+ que los otros epitelios. Los estromas del pliegue (FSS y FDS) tuvieron mayor %+ que los de la pared (WSS y WDS). Los epitelios luminales (ALE y BLE) tuvieron mayor %+ en el día 1 que en los otros días y el SGE tuvo mayor %+ en el día 1 que en el día 6. Los estromas profundos (FDS y WDS) tuvieron mayor %+ al día 6 que al día 1. El SLM tuvo similar %+ que los estromas de la pared (WSS y WDS) y menos al día 6 que a los otros días.

DISCUSIÓN

Se detectaron núcleos + a ER α en todos los HC cervicales y días del ciclo estral evaluados, en desacuerdo con Zhao et al. (7) que sólo los detectó, utilizando un anti-

cuerpo policlonal contra el ER de conejo, en epitelio luminal y al día del estro. El %+ en los epitelios luminales mostró una regulación clásica, siendo mayor en el estro, pero diferente a los epitelios glandulares, estromas y músculo. Cuando se analiza el número de núcleos + (+/mm²), las diferencias de día del ciclo estral desaparecen, sugiriendo modificaciones temporales en la proporción de células - y + en cada HC. En conclusión, se informa por primera vez de la presencia de ER α en todos los compartimientos histológicos de la mucosa cervical y en el miometrio superficial y, además, la distinta distribución y regulación del ER α entre los HC del cervix craneal ovino sugiere una capacidad diferencial de respuesta a los E, que podría estar relacionada a las funciones que cumple cada HC durante el ciclo estral.

AGRADECIMIENTOS:

Dr. E. Perdomo, en la preparación de las muestras. Dr. Perdígón por facilitar los trabajos a campo. Financiación: DINACYT, MEC-Uruguay; IFS-Suecia, Grant B/2718-12.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gorodeski GI: The cervical cycle. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z (Eds), Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 301-324, 1996.
2. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. The structure of the cervical canal of the ewe. Theriogenology 33:978-993, 1990a
3. Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M and Sahlin L. An immunohistochemical study on estradiol regulation of estrogen receptor in the endometrium of the immature ewe. Rep Nut Dev, 40: 293-298, 2000 .
4. Moré J. Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. Acta Anat (Basel), 120:156-159, 1984.
5. Rodríguez Piñón M. Importancia del cervix ovino como barrera para la Inseminación Artificial, En: Reproducción de los Animales Domésticos, Ungerfeld R., MELIBEA Ediciones, Montevideo Tomo II, 353-364, 2003.
6. Rodríguez-Piñón M, Puime P, Tasende C, Acuña S y Garófalo EG. El cervix de la oveja y su sensibilidad a las hormonas esteroideas: (III) durante el ciclo estral. XXXI Jornadas de Buiatría, Paysandú-Uruguay, 2003.
7. Zhao Y, Williams LM, Hannah LT, Ross AW, Mc Kelvey WAC, Robinson JJ. Oestrogen and progesterone receptor immunoreactivity and c-fos expression in the ovine cervix. J Rep Fert, 115: 287-292, 1999.