



RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ: RECEPTORES DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA EN UTERO BOVINO

J Medin¹, D Cavestany², D Cesar³, E Perdomo³,
I Sartore⁴, P Rubianes⁴, A Ferraris⁵, A Meikle⁴

¹Ayudante CIDEDEC, ²Reproducción, ³Anatomía Patológica, ⁴Bioquímica, ⁵PLAPIPA, Facultad de Veterinaria, Montevideo y Paysandú, Uruguay

RESUMEN

En el presente trabajo se investigó el efecto del embrión sobre la expresión de los Receptores de Progesterona y Estrógenos (RP, RE) en endometrio de vaquillonas vacías y preñadas. Se realizó un sangrado diario desde el día -1 al 22 (día 0 = ovulación) para la determinación de progesterona. Se tomaron muestras endometriales por biopsias transcervicales al día 17 postovulación para la determinación de los receptores por inmunohistoquímica. Un sistema adivina-biotina-peroxidasa fue utilizado para la inmunomarcación de los receptores, evaluándose la intensidad de tinción en tres tipos celulares (epitelio luminal, glandular y estroma) por dos observadores independientes. Se observó una mayor cantidad de células positivas a RP en el epitelio luminal en animales preñados que vacíos. Las vaquillonas vacías presentaron más células positivas a RE que las preñadas en el epitelio luminal y en el estroma. Esto demuestra que el embrión modifica la expresión endometrial a los receptores esteroideos sexuales, aumentando la expresión de los RP y disminuyendo la de RE.

SUMMARY

In the present study the effect of the conceptus on the expression of estrogen and progesterone receptors (ER and PR) was investigated in uterus of pregnant and non-pregnant heifers. A daily bleeding from day -1 to 22 (day 0= day of ovulation) for P4 determination was performed. Endometrial biopsies were taken at day 17 for ER and PR determinations by immunohistochemistry. The adivin-peroxidase system was used for immunolocalization, and the evaluation of the three cell types (luminal epithelium, glandular epithelium and stroma) by two independent observers. More positive cells to PR were found in luminal epithelium in pregnant heifers. Non-pregnant heifers had more positive cells to RE than pregnant heifers in luminal epithelium and stroma. This study demonstrates that the presence of embryo increases the expression of PR and diminishes of ER in bovine endometrium.

INTRODUCCION

La fertilidad es el resultado de varios factores, pero en bovinos lecheros se acepta que la causa más importante es la mortalidad embrionaria temprana (Mann y col., 1999). Las fallas reproductivas son comunes en la vaca lechera y cerca del 40 % de las preñeces fallan alrededor del momento del reconocimiento materno de la gestación (Días 8 a 17 postovulación), (Thatcher y col., 2003). Se ha sugerido que esto se debe a alteraciones fisiológicas que resultan en un «diálogo» ineficiente entre el ambiente materno y el concepto (blastocisto) (Thatcher y col., 1995). Un correcto conocimiento del mecanismo luteolítico y de ese "diálogo" permitirá el desarrollo y

aplicación de técnicas que optimicen la eficiencia productiva y la fertilidad. Para mantener la preñez el embrión debe inhibir la luteólisis y de ésta manera continuará la secreción de progesterona (P4, hormona de la preñez). El control de la secreción de PGF2 α endometrial está además regulado por los estrógenos y la progesterona que son los moduladores uterinos mas importantes. Estas hormonas actúan a través de sus receptores específicos localizados en las células blanco. Los objetivos de éste trabajo fueron investigar el efecto de la presencia del concepto sobre el contenido de los receptores de estrógenos y progesterona (RE, RP) en muestras endometriales y su relación con los perfiles plasmáticos de P4 al Día 17.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron vaquillonas raza Holando de 13 a 24 meses de edad con una condición corporal de 3.3 \pm 0.1 (escala 1 al 5, Edmonson y col. 1998) Se realizó sincronización de celos con doble dosis de prostaglandinas con un intervalo de 12 días y la ovulación (día 0) se determinó por ultrasonografía. Se realizó un sangrado diario desde el día -1 al 22 para determinación de progesterona. Las vaquillonas (n= 43) se inseminaron a las 12 hs de comenzado el celo, excepto en los animales controles (n= 28). Luego se seleccionaron 15 vaquillonas para realizar el estudio (el n utilizado se debe al costo de los reactivos). Se tomaron muestras endometriales del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo por biopsias transcervicales al día 17. A los 35 días post estro se realizó diagnóstico de preñez por ultrasonografía y los animales se clasificaron en tres grupos: I) Controles (n=5); II) inseminadas no preñadas (n=6) y III) preñadas (n=4). Los tejidos se sumergieron en paraformaldehído al 4% y se almacenaron en 70% etanol a 4°C hasta ser embebidos en parafina.

Inmunohistoquímica

Todas las muestras histológicas fueron corridas en el mismo ensayo inmunohistoquímico. Después de desparafinadas y rehidratadas, las secciones se trataron con Buffer Citrato de Sodio por 10 min. Luego de lavar con Buffer, la actividad inespecífica de peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 10 min. Se enfrentó el tejido a suero normal de caballo (NHS; Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido en PBS (150 μ l/10ml de PBS), dentro de una cámara húmeda por 60 min. Luego, se incubó con el anticuerpo primario monoclonal contra RP (Zymed ZS18-0172; dilución 1:100) y RE (ER C-311 cat # sc-787 Santa Cruz, dilución 1:25) en PBS por 60 min. Los controles negativos se obtuvieron reemplazando el anticuerpo primario por un suero inespecífico de ratón a concentración equivalente. Se utilizó un anticuerpo equino anti-IgG de ratón biotinilado (Vectastain, Vector) diluido en NHS por 60min. Luego se incubaron por 60 min con un complejo Adivina-Biotina-Peroxidasa (Vectastain Elite, Vector). El sitio de unión enzimática fue visualizado por la aplicación de 3.3'-diaminobencidina en H₂O₂ (DAB kit; Vector), un cromógeno que produce un precipitado color marrón e insoluble. Los preparados fueron contracolorados con hematoxilina y deshidratados antes de ser montados.

Análisis de Imagen

Para cada tipo celular se evaluaron 10 campos a X1000 por dos operadores independientes. Se midieron el porcentaje de área positiva (cantidad de células positivas) y la intensidad de tinción (de color marrón positivo). El inmunomarcado fue clasificado según la intensidad de la tinción en una escala de: 0 (ausente), + (leve), ++ (moderado), +++ (intenso).

Análisis Estadístico

Los datos se analizaron por un modelo estadístico (procedimiento mixto, SAS) que incluyó el efecto del status reproductivo (preñada/ vacía), del tipo celular y una interacción entre ambos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los niveles de progesterona plasmática se muestran en la Figura 1. Los animales preñados mantuvieron los niveles de P4 altos hasta el fin del sangrado, mientras que en las vaquillonas vacías los niveles disminuyeron y fueron basales ya al día 18. Las vaquillonas inseminadas no preñadas presentaron un perfil similar a las controles pero los niveles se mantuvieron más altos, $P < 0.05$. Algunos animales del grupo II presentaban niveles de progesterona superiores a 0.5 ng/ml (niveles luteales) al día 22 postestro, lo que concuerda con el inicio de un nuevo ciclo estral como se evidencia en el grupo control.

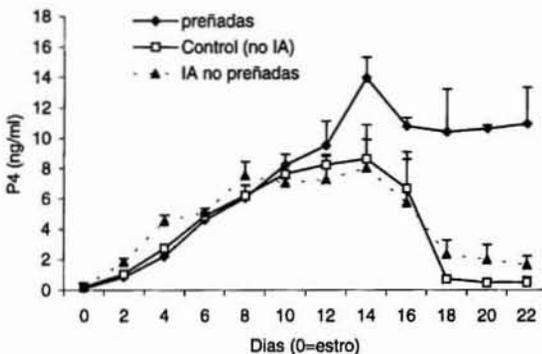


Figura 1. Concentraciones plasmáticas de progesterona para los tres grupos estudiados. (preñadas (n= 4), inseminadas no preñadas (n= 6), controles(n= 5).

Dado que en las vaquillonas inseminadas no preñadas mantuvieron niveles de progesterona luteales al día 22, no es posible saber si fertilizaron y no mantuvieron la preñez ó si son animales que nunca fertilizaron. Tampoco es posible saber que animales del grupo II se encontraban preñados al día 17 y como la presencia del embrión modifica la expresión de los receptores, éste grupo (II) no se considera para estudiar el efecto del embrión sobre la expresión de los receptores. Es decir se analizan aquí el grupo I (vacías) vs el grupo III (preñadas). La tinción (color marrón) de los RE y RP fue exclusivamente nuclear. Cuando el anticuerpo monoclonal se sustituyó por IgG, la ausencia del inmunomarcado demostró la especificidad de la técnica.

Se observó una mayor cantidad total de células positivas a RE en vaquillonas vacías que preñadas en epitelio luminal y estroma ($P < 0.05$), Figura 2. Se encontró mayor intensidad de tinción para RE en los mismos tipos celulares en las vaquillonas vacías.

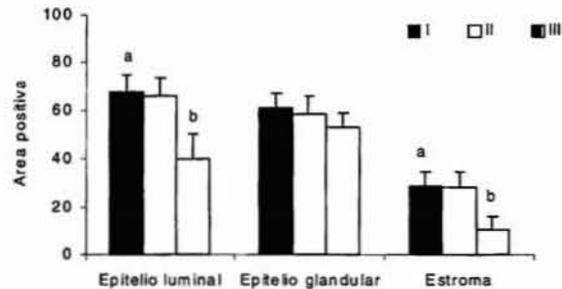


Figura 2. Área positiva al Receptor de Estrógenos en diferentes tipos celulares en vacas ciclando(I, n= 5), inseminadas no preñadas (II; n= 6) y preñadas (III; n=4).

Para los RP se observó una mayor área positiva y mayor tinción en el epitelio luminal de vaquillonas preñadas que vacías ($P < 0.05$).

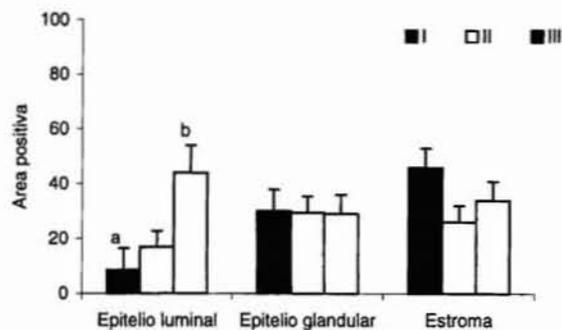


Figura 3. Área positiva al Receptor de Progesterona en diferentes tipos celulares en vacas ciclando (I, n= 5), inseminadas no preñadas (II, n= 6) y preñadas (III; n= 4).

La mayor cantidad de proteína receptora a estrógenos (RE) en el epitelio luminal al día 17 en vaquillonas vacías coincide con lo reportado en ovinos, aunque en ésta especie el reconocimiento materno comienza ya los días 13-14. (Lamming y col, 1995). Estos datos son consistentes con una mayor concentración del transcrito de RE (RNAm de RE) en vacas vacías vs. preñadas (Meikle y col, 2003). Estos resultados sugieren que la menor cantidad de RE en vacas preñadas mantendría la expresión de los receptores de oxitocina baja, y por lo tanto, la secreción de PGF2(inhibiendo así la luteólisis y manteniendo la preñez. Por otro lado, las vaquillonas preñadas presentaron mayores niveles de RP en epitelio luminal, y esto no se evidenció en otros estudios previos ya que los niveles de RP eran bajos o indetectables (Boos y col, 1996; Robinson y col, 2001; Thatcher y col. 2003). Una mayor sensibilidad endometrial a la progesterona en vacas preñadas contribuiría al establecimiento de la gestación. Estos resultados demuestran que la presencia del embrión en bovinos inhibe la expresión de los RE a nivel endometrial así como modifica la expresión de los RP.

REFERENCIAS

1. Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. Animal Reproduction Science 44 (1996) 11-21.
2. Flint A P F, Stewart H J, Lamming G E, Payne H. Journals of Reproduction & Fertility Ltd 45 (1992) 53-58.
3. Lamming G E, Wathes D C, Flint A P F, Payne H, Stevenson K R, Vallet J L. Journal of Reproduction &



Fertility 1995, 105, 165-175

4. Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. J Reprod Fert Suppl 1999, 54:317.

5. Meikle A, Cavestany D, Garófalo E G, Sahlin L, Thatcher WW, Ferraris A, Blanc J E, Kindahl H, Forsberg M. XXXI Jornadas Uruguayas de Buiatría 2003. Pág. 138

6. Robinson R S, Mann G E, Lamming G E, Wathes D C.

Reproduction (2001) 122, 965-979.

7. Thatcher WW, Guzeloglu A, Meikle A, Kamimura S, Bilby T, Kowalski AA, Badinga L, Pershing R, Bartolome J, Santos JEP. Reproduction 2003, Supplement N 61: 253-266.

8. Thatcher WW, Meyer MD, Danet-Desnoyers G. Maternal recognition of pregnancy. J Reprod Fert 1995 Suppl. 49:15.