



CONCENTRACIONES DEL TRANSCRIPTO DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS EN ÚTERO DE OVINOS CON FASE LUTEA SUBNORMAL

S. Acuña¹, C. Tasende^{1,2},

M. Rodríguez-Piñón¹ y E. G. Garófalo¹.

Área Bioquímica¹, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay y Clinical Chemistry², Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
saap22@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de éste trabajo fue determinar las concentraciones uterinas de transcritos del receptor de Estrógenos (ARNm-REa) en ovinos con fases lúteas subnormales (FLSN). Se utilizaron 22 ovejas Corriedale adultas en anestro estacional. Para inducir fases lúteas normales (FLN), se realizó un tratamiento combinado de progesterona (P) y GnRH (grupo control, n=11) y para inducir FLSN un tratamiento solo con GnRH sin P previa (grupo FLSN, n=11). Al día 1 del bolo de GnRH se sacrificaron 6 animales de cada grupo y al día 5 se sacrificaron 5 de cada grupo. La determinación de ARNm-REa uterino se realizó por hibridación en solución con sondas radioactivas específicas para ovinos. Las concentraciones de ARNm-REa (amol/ μ g ADN) fueron comparadas por ANOVA ($X \pm$ S.E.M.). En el grupo FLSN, las concentraciones de ARNm-REa uterinas fueron significativamente mayores al día 5 que al día 1 ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre los días 1 y 5 en el grupo FLN. Al día 5, el grupo FLSN presentó mayores concentraciones de ARNm-REa que el grupo control ($p < 0.05$). La inducción de la transcripción de RE encontrada en FLSN podría estar relacionada con los mecanismos uterinos desencadenantes de esta disfunción reproductiva.

SUMMARY

The aim of this work was to measure the uterine estrogen receptor messenger (ERa-mRNA) in ewes with subnormal luteal phase (SNLP). Twenty-two Corriedale adult ewes in seasonal anestrus were used. A combined treatment with progesterone (P) and GnRH to induce normal luteal phases (NLP) was performed (Control group, n=11). To induced experimental SNLP, anestrus ewes were treated with GnRH without P (SNLP group, n=11). The animals were slaughtered at day 1 (n=6 each group) or day 5 (n=5 each group) after GnRH bolus injection. The ERa-mRNA concentrations were measured by solution hybridization with an specific radiolabeled probe for ovine ERa. The ERa-mRNA concentrations were compared by ANOVA ($X \pm$ S.E.M.). The ERa-mRNA uterine concentrations in the SNLP group were significantly higher at day 5 than at day 1 ($p < 0.05$). Significant differences of ERa-mRNA levels between days 1 and 5 in the NLP group were not found. At day 5, the ERa-mRNA concentrations were higher in the SNLP group than in the NLP group, ($p < 0.05$). These results suggest that the induction of the ER transcription found in SNLP may be related to the uterine molecular mechanisms involved in this reproductive dysfunction.

INTRODUCCIÓN

A la salida del anestro postparto y estacional ocurren fases lúteas subnormales (FLSN) caracterizadas por presentar cuerpos lúteos de menor duración y/o concentraciones circulantes de progesterona (P) menores que en las normales (FLN) (1). El tratamiento con GnRH a ovejas en anestro estacional, induce la formación de FLSN experimentales, mientras que el mismo tratamiento con P previa induce FLN (2), sugiriendo que es necesaria una exposición previa a la P para una subsiguiente FLN. Se ha sugerido que la secreción anticipada de Prostaglandina F2a de origen endometrial, controlada por estrógenos (E) y P está en la base de la formación de FLSN (3). Los E y P regulan la respuesta uterina a través de sus receptores nucleares (RE y RP) que constituyen factores de transcripción que modifican la expresión génica. Los E estimulan la síntesis de RE, RP y de sus transcritos, mientras que la P la inhibe. Esto se ve reflejado en el útero durante el ciclo estral, en donde las concentraciones de RE, RP y sus mensajeros (ARNm-RE, y ARNm-RP), están relacionados con los cambios cíclicos de ambas hormonas (4,5). Las alteraciones en las concentraciones circulantes de E, P y RE y RP uterinas encontradas en trabajos previos en ovejas tratadas con GnRH con o sin P previa, sugieren que podrían existir alteraciones en la síntesis de RE y RP (6). La regulación de RE y RP por sus respectivas hormonas podría ser a nivel transcripcional y/o post transcripcional. Hasta el momento no se conocen con exactitud las bases moleculares responsables de la FLSN ni se han estudiado las concentraciones de ARNm-RE uterinas en dicha disfunción en ovinos. Por lo cual el objetivo del trabajo fue determinar las concentraciones de ARNm-REa uterinas en ovinos con fases lúteas subnormales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 22 ovejas adultas Corriedale en anestro estacional. Para provocar FLN (n=11) se trataron con 0.33 g P (Controlled Internal Drug Release, CIDR, EASI-BREED, New Zealand,) durante 10 días, e inmediatamente después de retirado el CIDR, se administró 6.7 ng de GnRH (Acetato de Buserelina, Receptal; Hoechst, Buenos Aires, Argentina), i/v cada 2 h durante 16 h y a las 18 h un bolo de 4 μ g de GnRH, día 0. (2,6). Para provocar FLSN (n=11) se realizó el mismo tratamiento con GnRH pero sin P previa (2,6). Se consideró FLN cuando los niveles de P superaron 4 nmol/L por 12 días (Tasende et al, Buiatría 2003). Al día 1 del tratamiento, 6 animales de cada grupo fueron sacrificados y el resto fueron sacrificados al día 5 (grupos al día 1: control, n=6 y FLSN, n=6; grupos al día 5: control n=5 y FLSN n=5). La concentración de P séricas al día 5 se midió por RIA. Los úteros se disecaron y las muestras de tejido fueron homogeneizadas y se extrajeron los ácidos nucleicos totales (ANT). La concentración de ANT se midió por espectrofotometría. Los transcritos de RE uterinos se determinaron por ensayos de hibridación en solución con sonda radioactiva específica para ARNm-REa (7). Las concentraciones de ARNm-REa (amol/mg de ADN) fueron comparadas por ANOVA ($X \pm$ S.E.M.).



RESULTADOS

La concentración de P circulante al día 5, fue menor en los animales del grupo FLSN respecto a los controles (FLN), 2.5 ± 0.6 y 5.7 ± 1.0 nmol/L, respectivamente, $p < 0.05$. Los animales tratados con GnRH sin P previa (grupos FLSN), tuvieron al día 5 mayores concentraciones de ARNm-REa que al día 1 ($p < 0.05$). Los animales tratados con GnRH mas P previa (grupos control) tuvieron similares concentraciones de ARNm-REa en ambos días. Al día 5, las ovejas tratadas con GnRH sin P previa (grupo FLSN), tuvieron mayores concentraciones uterinas de ARNm-REa que las tratadas con GnRH mas P previa (grupo control), $p < 0.05$, (gráfico adjunto).

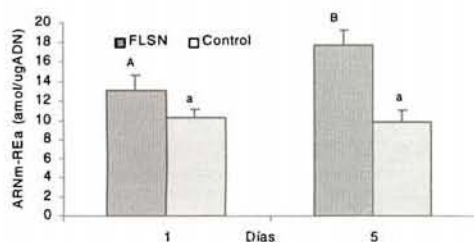


Tabla: Concentraciones de ARNm-REa (amol/mg de ADN, X \pm SEM) uterinos en ovejas sacrificadas al día 1 (FLSN, n=6; Control, n=6) o 5 (FLSN, n=5; Control, n=5). Barras con letras diferentes indican diferencias, $p < 0.05$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las ovejas tratadas con GnRH sin P previa, mostraron una significativa inducción de la transcripción del REa del día 1 al día 5. Este efecto estimulante de la transcripción no fue observado en los controles debido probablemente a que las mayores concentraciones de P que caracterizan a la FLN ejercen un control sobre la transcripción del RE. En estudios previos no se encontró aumento de las proteínas receptoras de estrógenos y si un incremento de RP en el útero de los mismos animales en FLSN (Tasende et al, Buiatría 2003), sugiriendo que la estimulación de la expresión de RE es a nivel transcripcional. Estos hallazgos sugieren que las elevadas concentraciones de transcritos de RE en FLSN, podrían desencadenar mecanismos moleculares uterinos

implicados en una luteólisis anticipada y en parte ser responsables de esta disfunción reproductiva.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la Dra. Ana Meikle por el entrenamiento en la determinación de los ARNm-REa y la financiación de los reactivos y al Br. Juan Pablo Damián quien colaboró con los ensayos. A Isabel Sartore y Perla Rubianes por la asistencia técnica. Este trabajo fue financiado por CIDEDEC, CSIC, de la Fac. de Veterinaria, Universidad de la Republica, PEDECIBA, Uruguay, y la Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, IFS: B/3025-2, Sweden.

BIBLIOGRAFÍA

- Garverick, H.A. and Smith, M.F. Mechanisms associated with subnormal luteal function. *J. Anim. Sci.*, 62 (Suppl. 2): 92-105, 1986.
- McLeod, B.J., Haresign, W. and Lamming, G.E. Response of seasonally anoestrous ewes treated to small-dose multiple injections of GnRH with and without progesterone pretreatment. *J. Reprod. Fert.*, 65: 223-230, 1982.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiol Rev.* 79:263-323, 1999.
- Clark JH, Mani SK. Actions of ovarian steroid hormones. In: Knobil E, Neill JD (Eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd, New York, NY, pp. 1011-1059, 1994.
- Ing N.H., Spencer T.E., Y. Bazer F.W. Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. *Biology of Reproduction*. 54: 591-599, 1996.
- Tasende C., Meikle A., Rodríguez P. M., Forsberg M., Garófalo E. G. Estrogen and progesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin releasing hormone-treated anoestrous ewes. *Theriogenology* 57 1719-1731, 2002.
- Meikle A, Forsberg M, Shalin L, Masironi B, Tasende C, Rodríguez-Piñón M, Garófalo EG. A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor expression in the lamb uterus. *Repr. Nutr Dev*, 40: 283-293, 2000.