

## RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA EN HIPÓFISIS DE OVEJAS EN EL CICLO ESTRAL Y EN ANESTRO TRATADAS CON GNRH CON O SIN PROGESTERONA PREVIA

C. Tasende<sup>1,2</sup>, M. Rodríguez-Piñón<sup>1</sup>, M. Forsberg<sup>2</sup>, S. Acuña<sup>1</sup> y E.G. Garófalo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay y Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.  
ctasende@adinet.com.uy

### RESUMEN

El objetivo fue estudiar las concentraciones de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) en hipófisis de ovejas ciclando y en ovejas en anestro estacional tratadas con GnRH con o sin progesterona (P) previa. Ovejas ciclando fueron sacrificadas al día 1 (n=8) o 6 (n=6) del celo. Ovejas en anestro estacional fueron tratadas con P más GnRH (grupos P+GnRHd1, n=6 y P+GnRHd5, n=5) para la inducción de fases lúteas normales o tratadas solo con GnRH (grupos GnRHd1, n=6 y GnRHd5, n=5) para inducir la formación de fases lúteas subnormales. Las ovejas fueron sacrificadas los días 1 o 5 del bolo de GnRH. Se determinaron los RE y RP hipofisarios (fmol/mg proteínas) por ensayos de unión. Las ovejas sacrificadas los días 6 (ciclando) y 5 (tratadas con P+GnRH) tuvieron niveles de P circulantes similares a los de fase lútea normal y mayores que las tratadas solo con GnRH. Las concentraciones de receptores (X±SEM.) fueron comparadas por ANOVA. En las ovejas ciclando al día 6 las concentraciones de RE y RP hipofisarias fueron menores que al día 1. En el grupo GnRH los RE fueron mayores que en el grupo P+GnRH. En el grupo P+GnRHd5 los niveles de RP fueron menores que en el P+GnRHd1 mientras que en el grupo GnRHd5 fueron similares al GnRHd1. La disminución de receptores encontrada en las hipófisis al día 6 del ciclo estral y al día 5 en las ovejas tratadas con P+GnRH demuestra un efecto inhibitorio de la P sobre la expresión de los receptores.

### SUMMARY

The objective of this study was to investigate estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) concentrations in pituitary gland of ewes during estrous cycle and in seasonal anestrus treated with GnRH with or without progesterone (P) pretreatment. Ewes were slaughtered on days 1 (n=8) or 6 (n=6) after estrus. Eleven ewes during seasonal anestrus were treated with P + GnRH (groups P+GnRHd1, n=6 and P+GnRHd5, n=5) for induction of normal luteal phases and 11 ewes treated only with GnRH (groups GnRHd1, n=6 and GnRHd5, n=5) to induce subnormal luteal phases. The ewes were slaughtered on days 1 or 5 of the GnRH bolus injection. ER and PR were determined by binding assays (fmol/mg protein). The ewes slaughtered on days 5 (treated with P+GnRH) and 6 (during estrous cycle) had higher P levels than the ewes treated with GnRH without P. Receptors concentration were compared by ANOVA. ER and PR levels at day 6 of the estrous cycle were lower than at day 1. In the GnRH group, ER levels were higher than in

the P+GnRH group. In the P+GnRHd5 group, the PR levels were lower than in the P+GnRHd1 group, while in the GnRHd5 group the levels were similar to GnRHd1 group. The diminished concentrations of receptor in the pituitary gland found at day 6 of the estrous cycle and on day 5 of the P+GnRH group show an inhibitory effect of P on receptor expression.

### ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

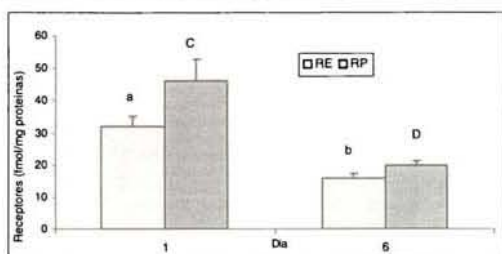
En la hipófisis de ovejas en anestro estacional se han encontrado bajos niveles de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) y el tratamiento con GnRH aumentó la concentración de ambos receptores 10 veces (1). Durante el ciclo estral los estrógenos (E) estimulan la síntesis de RE y RP uterinos mientras que la P la inhibe (2). El objetivo de este trabajo fue estudiar la concentración de RE y RP en hipófisis de ovejas ciclando en estación reproductiva y en anestro estacional tratadas con GnRH con o sin progesterona previa.

### MATERIALES Y MÉTODOS

En estación reproductiva, catorce ovejas Corriedale (39±1.0 Kg) sincronizadas con 2 dosis de Prostaglandina F2 a separadas por 6 días fueron sacrificadas los días 1 (n=8) o 6 (n=6) de la manifestación de celo comprobado por retarjo. Veintidós ovejas en anestro estacional (42.0±1.2 kg) se dividieron en 2 grupos: GnRH (n=11) y P+GnRH (n=11). El grupo P+GnRH fue tratado con P (CIDR X10 días), los animales fueron canulados en la vena yugular y tratados con 9 inyecciones i/v de GnRH cada 2 h (6.7 ng) y a las 2 h un bolo de GnRH (4mg). Con este tratamiento se indujo la formación de fases lúteas normales (3). El grupo GnRH recibió el mismo tratamiento de GnRH pero sin P previa y se indujo la formación de fases lúteas subnormales (3). Las ovejas fueron sacrificadas los días 1 (grupos GnRHd1, n=6 y P+GnRHd1, n=6) o día 5 (grupos GnRHd5, n=5 y P+GnRHd5, n=5) después del bolo de GnRH. Se diseccionaron y pesaron las hipófisis y se determinaron los niveles de RE y RP (fmol/mg proteínas) por ensayos de unión (4,5). Las concentraciones de receptores fueron comparadas por ANOVA y expresadas como X±SEM. Las ovejas sacrificadas los días 6 (ciclando) y 5 (tratadas con P+GnRH) tuvieron niveles de P circulantes similares a los de fase lútea normal y mayores que las tratadas solo con GnRH (6)

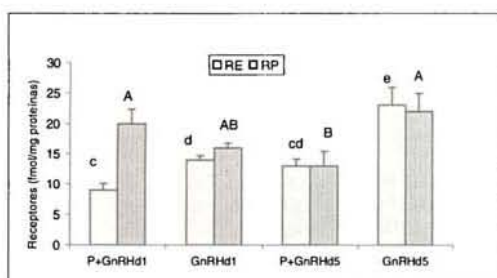
### RESULTADOS

En las hipófisis de todos los animales se encontraron proteínas receptoras saturables y de alta afinidad para E y P. Las constantes de disociación (Kd, nM) fueron similares en los diferentes grupos de animales, para RE y RP respectivamente: 0.94±0.17 n=14 y 0.28±0.05 n=14 en las ovejas ciclando y 0.79±0.1 n=22 y 1.00±0.1 n=22 en anestro tratadas con GnRH con o sin P previa. Las concentraciones de RE y RP hipofisarios en las ovejas ciclando al día 6 fueron menores que al día 1; p<0.05. (figura 1).



**Figura 1** Concentraciones (fmol/mg proteínas,  $X \pm SEM$ ) de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) en la hipófisis de ovejas en estación reproductiva al día 1 ( $n=8$ ) o 6 ( $n=6$ ) del celo. Para RE a vs b  $p<0.05$  y para RP C vs D  $p<0.05$ .

El perfil de RE y RP en la hipófisis de las ovejas en anestro tratadas con GnRH con o sin P previa se muestra en la figura 2. Los niveles de RE en el grupo tratado solo con GnRH fueron mayores que en el tratado previamente con P tanto al día 1 como al día 5,  $p<0.05$ . En el grupo tratado solo con GnRH, al día 5 la concentración de RE fue mayor que al día 1  $p<0.05$ , mientras que en el grupo tratado previamente con P no se encontró diferencia entre días 1 y 5 (figura 2). Los niveles de RP al día 1 fueron similares en ambos grupos tratados (GnRHd1 y P+GnRHd1). Al día 5 en el grupo tratado previamente con P (grupo P+GnRHd5) los niveles de RP disminuyeron en relación al día 1 ( $p<0.05$ ), mientras que en el grupo tratado solo con GnRH los niveles de RP fueron similares a los del día 1 (figura 2).



**Figura 2** Concentraciones (fmol/mg proteínas,  $X \pm SEM$ ) de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) en la hipófisis de ovejas en anestro estacional tratadas con GnRH sacrificadas al día 1 (Grupo GnRHd1,  $n=6$ ) o día 5 (Grupo GnRHd5,  $n=5$ ) del bolo de GnRH; tratadas con progesterona más GnRH sacrificadas al día 1 (Grupo P+GnRHd1,  $n=6$ ) o día 5 (Grupo P+GnRHd5,  $n=5$ ) del bolo de GnRH. Para RP A vs B  $p<0.05$  y para RE c vs d vs e,  $p<0.05$ .

## CONCLUSIONES

La disminución de RE y RP encontrada al día 6 en las hipófisis de las ovejas ciclando y la del RP al día 5 en las tratadas con P+GnRH demuestra un efecto inhibitorio de la P sobre la expresión de los receptores similar al descrito en el útero durante la fase lutea. Los perfiles de RE y RP hipofisarios sugieren que el control reproductivo por las hormonas esteroideas a nivel hipofisario es similar en ovinos ciclando (estación reproductiva) y en ovejas en anestro inducidas a ovular con P más GnRH. Sin embargo, cuando no se administra P previamente a la inducción con GnRH, aumenta la sensibilidad de la hipófisis a E y P sugiriendo alteraciones en el desarrollo normal del ciclo inducido.

## AGRADECIMIENTOS

P. Rubianes e I. Sartore por su asistencia técnica y participación en el diseño experimental. A los Dres. F. Perdígón y L. Sosa por proveernos parte de los animales. Este trabajo fue financiado por CIDEA, Facultad de Veterinaria y CSIC de la Universidad de la República, PEDECIBA, Uruguay, y la Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

## BIBLIOGRAFÍA

- Tasende C, Meikle A, Rodríguez-Piñón 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* (2002) 57: 1719-1731.
- Clark JH, Mani SK. Actions of ovarian steroid hormones. In: Knobil E, Neill JD (eds): *The Physiology of Reproduction*. New York, NY: Raven Press Ltd, (1994) 1011-1059.
- McLeod BJ, Haresign W, Lamming GE. Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injections of GnRH with and without progesterone pretreatment. *J Reprod Fertil* (1982) 65:223-230.
- Garófalo EG, Tasende C. Uterine estrogen and progesterone receptors in prepubertal ewes: distribution in myometrium, endometrium and caruncles. *Veterinary Research*. (1996) 26: 177-183.
- Tasende C, Meikle A, Rubianes E and Garófalo EG. Restoration of estrogen and progesterone uterine receptors during the ovine postpartum period *Theriogenology* (1996) 45: 1545-1551.
- Celia Tasende, Marcelo Rodríguez-Piñón, Sebastián Acuña, Pablo Puime, Mats Forsberg y Elsa G Garófalo. Niveles de las hormonas ováricas y sus receptores uterinos en fase lutea subnormal en ovinos. VII Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, (2001) Montevideo, Uruguay.