

NIVELES DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA EN ÚTEROS DE OVINOS CON FASE LUTEAL SUBNORMAL.

C. Tasende^{1,2}, M. Rodríguez-Piñón¹, S. Acuña¹, M. Forsberg² 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.
ctasende@adinet.com.uy

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue investigar la expresión de los receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) uterinos en ovejas con fases lúteas normales (FLN) y subnormales (FLSN). Ovejas en anestro estacional fueron tratadas con P (10 días) seguido por inyecciones i/v de GnRH cada 2 h durante 16 h y a las 18 h un bolo para inducir FLN (grupos FLNd1, n=6; FLNd5, n=5 y FLNc, n=5). Se realizó el mismo tratamiento con GnRH sin P para inducir FLSN (grupos FLSNd1, n=6; FLSNd5, n=5 y FLSNc, n=5). Se consideró FLN cuando los niveles de P superaron 4 nmol/L por 12 días. En cada grupo control 4 de 5 animales ($p=0.058$) desarrollaron FLN o FLSN esperadas. El resto de las ovejas fueron sacrificadas los días 1 o 5 del bolo de GnRH. Se midieron P y estradiol (E2) séricos por RIA. Se determinaron los RE y RP uterinos (fmol/mg proteínas) por ensayos de unión con hormonas marcadas. Los resultados se compararon por ANOVA ($X \pm SEM$). Las concentraciones de E2 y P fueron mayores en el grupo FLNd5 (E2: FLNd5 17.2 ± 3.1 vs FLSNd5 7.6 ± 1.4 pmol/L; P: FLNd5 5.7 ± 1.0 vs FLSNd5 2.5 ± 0.6 nmol/L) que el grupo FLSNd5, $p < 0.05$. Al día 5 las concentraciones de RE tendieron a ser mayores en el grupo FLSN que en el FLN ($p=0.07$). Los mayores niveles de RP fueron encontrados en el grupo FLSNd5 ($p < 0.05$). Las diferencias encontradas en la expresión de los receptores esteroideos en la FLSN, sugieren que estos receptores están involucrados en los mecanismos moleculares uterinos responsables del desencadenamiento de esta disfunción reproductiva.

SUMMARY

The objective of this work was to investigate the concentrations of uterine estrogen (E) and progesterone (P) receptors (ER and PR) in ewes expected to have normal or sub-normal luteal phase (NLP, SNLP). Ewes were treated with P (10 days) and then with GnRH (i/v) for 16 h followed by a bolus injection at 18 h (NLPd1, n=6; NLPd5, n=5 and NLPc, n=5). The SNLP group was treated with the same GnRH treatment without P (SNLPd1, n=6; SNLPd5, n=5 and SNLPc, n=5). The NLP in the controls was considered when P concentration reached 4 nmol/L during 12 days. Four of 5 ewes in each control group had NLP or SNLP ($p=0.058$). The remaining ewes were slaughtered at Day 1 or 5 after GnRH bolus injection. Oestradiol-17 β (E2) and P were measured by RIA. The ER and PR concentrations (fmol/mg proteins) were determined by binding assay. The data were analyzed by

ANOVA ($X \pm SEM$). The E2 and P serum concentrations in group NLPd5 were higher (E2: NLPd5 17.2 ± 3.1 vs SNLPd5 7.6 ± 1.4 pmol/L; P: NLPd5 5.7 ± 1.0 vs SNLPd5 2.5 ± 0.6 nmol/L) than in group SNLPd5, ($p < 0.05$). The ER and PR uterine concentrations were different in the two treated groups; in the SNLPd5 group there were higher ER concentrations than in the NLPd5 group ($p=0.07$). The highest uterine PR contents were found in the SNLPd5 group ($p < 0.05$). The differences in the steroid receptors expression found in the SNLP group, suggest that these receptors may be involved in the molecular mechanisms responsible for the premature luteolysis.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En ovinos, al reinicio de la actividad cíclica después del anestro estacional y el postparto, ocurren naturalmente fases lúteas subnormales (FLSN). Se ha sugerido que es necesaria una exposición previa a la progesterona (P) para una subsiguiente función lútea normal (FLN) (2). La prostaglandina F2a de origen endometrial es responsable de la luteólisis y su producción está indirectamente regulada por los estrógenos (E) y la P (3). Se ha propuesto que en la luteólisis prematura el útero pierde tempranamente la dominancia de la progesterona (8). La capacidad de respuesta del útero a E y P depende de la concentración circulante de estas hormonas y de los niveles de sus receptores uterinos (RE y RP). En el útero durante el ciclo estral los E estimulan la síntesis de RE y RP mientras que P la inhibe (1). Hasta el presente no se conocen los mecanismos moleculares que están en la base de las FLSN, en particular, no se ha estudiado la expresión de RE y RP uterinos en ovejas con FLSN en la fase lútea temprana. El objetivo de este trabajo fue investigar la expresión de RE y RP uterinos en ovejas con fases lúteas normales y subnormales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 32 ovejas Corriedale adultas ($X \pm SEM$, 43.7 ± 1.1 Kg) en anestro estacional comprobado por retarjo. Para inducir FLN (n=16) las ovejas se trataron con 0.33 g de P (CIDR, por 10 días) seguido por inyecciones i/v de GnRH (Receptal) cada 2 h (6.7 ng) durante 16 h y a las 18 h un bolo de GnRH (4 mg). Para inducir FLSN (n=16) se realizó el mismo tratamiento con GnRH sin P previa (4, 5). En 5 animales de cada grupo, se midieron los niveles de P durante 18 días (controles de fase lútea, FLNc y FLSNc), considerando FLN cuando los niveles de P superaron 4 nmol/L por 12 días. El resto de los animales fueron sacrificados al día 1 (grupos FLNd1, n=6 y FLSNd1, n=6) o 5 (FLNd5, n=5 y FLSNd5, n=5) del bolo de GnRH. Se determinaron los niveles de RE y RP (fmol/mg proteínas) uterinos por ensayos de unión con las hormonas marcadas correspondientes (6, 7). El número de receptores y las constantes de disociación (Kd) se analizaron por el modelo de Scatchard inverso. Las concentraciones de P y estradiol (E2) séricas se midieron por RIA. Los niveles de RE, RP, E2, P se compa-



raron por ANOVA ($X \pm SEM$).

RESULTADOS

En la figura 1 se detallan los niveles de P séricos encontrados en todos los animales, demostrando que el pretratamiento con P seguido de la administración de GnRH indujo FLN y por el contrario la falta de P previa provocó FLSN.

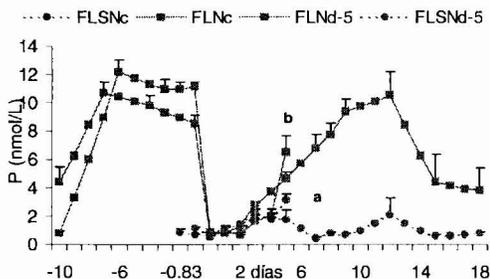


Figura 1 Niveles ($X \pm SEM$) de progesterona séricos (P), de ovejas en anestro tratadas con GnRH con/sin P previa sacrificadas al día 1 (grupos FLNd1, n=6 y FLSNd1, n=6) o 5 (FLNd5, n=5 y FLSNd5, n=5) del bolo de GnRH y controles (FLNc, n=5 y FLSNc, n=5). Valores acompañados por diferente letra difieren, $p < 0.05$.

En cada grupo control 4 de 5 animales ($p=0.058$) desarrollaron FLN o FLSN esperadas. Al día 5 el grupo FLN tuvo mayor concentración (pmol/L) de E2 (17.2 ± 3.1) que el grupo FLSN (7.6 ± 1.4) y de P (nmol/L, 5.7 ± 1.0 y 2.5 ± 0.6 respectivamente), $p < 0.05$. En el útero de todos los animales se demostró la especificidad, saturabilidad y el desplazamiento de la unión por la hormona no marcada correspondiente. Las Kd (nM) fueron similares en los grupos FLN y FLSN (1.1 ± 0.1 , n=22 para RE y 1.6 ± 0.1 n=22 para RP). Los niveles de RE y RP al día 1 fueron similares en ambos grupos estudiados. Al día 5 las concentraciones de RE tendieron a ser mayores en el grupo FLSN que en el FLN ($p=0.07$). Los mayores niveles de RP fueron encontrados en el grupo FLSN al día 5 ($p < 0.05$), figura 2.

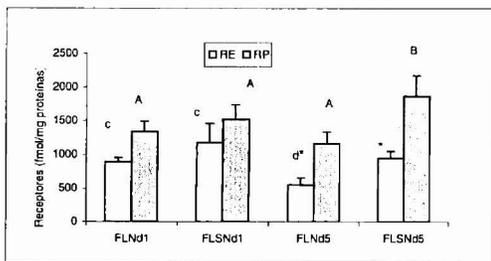


Figura 2 Concentraciones (fmol/mg proteínas, $X \pm SEM$) de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) uterinos de ovejas en anestro tratadas con GnRH con/sin P previa sacrificadas al día 1 (grupos FLNd1, n=6 y FLSNd1, n=6) o 5 (FLNd5, n=5 y FLSNd5, n=5) del bolo de GnRH. Para el mismo receptor barras con diferente letra difieren, $p < 0.05$; *, $p=0.07$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las Kd encontradas en el útero son similares a las reportadas para ovinos en anestro tratados con GnRH y en otras situaciones fisiológicas (6,7), indicando que se midió el mismo tipo de proteína receptora para E y P. Los mayores niveles de RP en el grupo FLSN al día 5, concuerdan con los encontrados previamente en ovejas al momento de la ovulación (7) y están en desacuerdo con los menores niveles de RP encontrados en vacas por Zollers et al.(8). Estos mayores niveles de receptores en el grupo FLSN podrían explicarse por la menor concentración de P circulante, la cual no sería suficiente para ejercer la regulación negativa de los receptores. Las diferencias encontradas en la expresión de los receptores esteroideos en la fase lutea subnormal, sugieren que estos receptores están en parte involucrados en los mecanismos moleculares uterinos responsables del desencadenamiento de esta disfunción reproductiva.

AGRADECIMIENTOS

P. Rubianes e I. Sartore por su asistencia técnica y participación en el diseño experimental. A los Dres. F. Perdigón y L. Sosa por los animales. Financiación: CIDEA, CSIC, de la Fac. de Veterinaria, Universidad de la Republica, PEDECIBA, Uruguay, y la Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Clark JI, Mani SK. Actions of ovarian steroid hormones. In: Knobil E, Neill JD (Eds), The Physiology of Reproduction. Raven Press Ltd, New York, NY, 1994, pp. 1011-1059.
- 2) Hunter MG. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. J Reprod Fert 1991, 43:91-99.
- 3) McCracken JA, Kuster EE and Lamsa JC. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. Physiol. Rev. 1999, 79:263-323.
- 4) 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 Fert 1982, 65:223-230.
- 5) Southee JA, Hunter MG, Haresign W. Function of abnormal corpora lutea in vivo after GnRH-induced ovulation in the anoestrous ewe. J Reprod Fert 1988, 84:131-137.
- 6) Tasende C, Meikle A, Rubianes E, Garófalo EG. Restoration of estrogen and progesterone uterine receptors during the ovine postpartum period. Theriogenology 1996, 45:1545-1551.
- 7) 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.
- 8) Zollers WG, Garverick HA, Smith MF, Moffatt RJ, Salfen BE, Youngquist RS. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short normal oestrous cycle. J Reprod Fert 1993, 97:329-337.