



EL PLANO NUTRICIONAL AFECTA LA EXPRESION ENDOMETRIAL DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN OVINOS

C. Sosa¹, C. Viñales², J.M. Lozano³, M. Forsberg², F. Forcada³, J.A. Abecia³ y A. Meikle¹

¹Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. ²Clinical Chemistry, SLU, Uppsala, Sweden, ³Dpto de Producción Animal, Universidad de Zaragoza, España.
E-mail: cecis@adinet.com.uy

RESUMEN

La subnutrición afecta la supervivencia embrionaria a través de cambios en el ambiente uterino. Ovejas en un plano nutricional bajo (Grupo B) tienen menor contenido de progesterona en el endometrio que ovejas controles (Grupo C). En este estudio se investigó el efecto de la subnutrición sobre la expresión endometrial de receptores de progesterona (RP) los días 5 y 10 postestro. Se determinaron los RP por inmunohistoquímica en 8 tipos celulares. El Grupo B presentó menos inmunopositividad que el Grupo C al día 5, pero no al día 10. Los receptores son capaces de concentrar hormonas específicas en los tejidos blanco: los niveles bajos de RP en el Grupo B concuerdan con las menores concentraciones de progesterona endometrial. No hemos encontrado reportes que vinculen la nutrición con la expresión de RP uterina, pero el IGF-I circulante disminuye en ovejas subnutridas; IGF-I estimula la función del receptor de estrógenos α , quien a su vez es el principal inductor de RP. Por lo tanto un nivel nutricional más bajo puede resultar en menores cantidades de RP. Todos los tipos celulares del Grupo C tuvieron mayor tinción el día 5 que el día 10 de acuerdo con la conocida regulación en menos de la progesterona. Solo tres tipos celulares en el Grupo B mostraron un patrón similar. Una posible explicación para este hallazgo es que en este grupo los niveles de RP ya eran bajos al día 5 y por lo tanto la inhibición no fue observada.

INTRODUCCIÓN

El establecimiento de la preñez depende del sistema de señales entre el embrión y el ambiente uterino. La alteración de este sistema resulta en fallas en la implantación, pérdidas embrionarias tempranas y crecimiento retardado o acelerado (Barnes, 2000). El incremento de las concentraciones plasmáticas de progesterona (P4) a lo largo del ciclo, juega un rol preponderante en el estado de desarrollo del útero (Wilmut y Sales, 1981). En vacas, se ha descrito que al aumentar la concentración de P4, aumenta la secreción del interferón tau (IFN τ): la señal de reconocimiento de la preñez producido por el trofoblasto) (Mann y col., 1998). La progesterona tiene la habilidad de estimular cambios en el estado fisiológico del útero, lo suficiente para determinar la supervivencia embrionaria (Lawson y col., 1983). La acción de la P4 en el útero está mediada por interacciones con su receptor intracelular (RP) (Clark y col., 1992). En ovejas, la regulación de la expresión del receptor de P4 en útero durante el ciclo estral y la preñez temprana depende del tipo celular (Spencer y col., 1995). La nutrición es uno de los

factores que tiene más impacto sobre la eficiencia reproductiva (revisión: O'Callaghan y col., 1999). Se ha observado que un bajo plano nutricional aumenta (Parr y col., 1987; Lozano y col., 1998), disminuye (Butler y col., 2000) o no afecta (Abecia y col., 1995) los niveles circulantes de P4. En un trabajo previo, (Lozano y col., 1998) hemos demostrado que las ovejas subnutridas presentaron mayores concentraciones de P4 circulantes, pero las concentraciones en las venas ovárica y uterina no fueron afectadas por el plano nutricional. Sin embargo, las ovejas subnutridas tuvieron menores contenidos endometriales de P4 que ovejas en nivel de mantenimiento, lo que sugiere que la expresión endometrial del receptor de progesterona podría ser afectada por la nutrición (Lozano y col., 1998). El objetivo de este trabajo fue estudiar si el plano nutricional afecta la expresión del receptor de progesterona en el endometrio de la oveja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veintiséis ovejas raza Rasa Aragonesa con un peso vivo promedio (\pm SEM) de $56,7 \pm 1,9$ kg y una condición corporal promedio de $2,9 \pm 0,1$ (escala de 1 a 5) fueron sincronizadas usando esponjas intravaginales (Acetato de fluorogestona, 40 mg, Intervet S.A., Salamanca, España). Al retirar las esponjas las ovejas fueron divididas en dos grupos: 1- Grupo Control (C; n=13) alimentado con una dieta calculada para proveer 1,5 veces los requerimientos de mantenimiento, y 2- Grupo Bajo (B, n=13) alimentado con una dieta para proveer 0,5 veces los requerimientos de mantenimiento. La dieta estaba compuesta por 0,55 kg de pellet y 0,80 kg de paja de cebada (Grupo C, 12,4 MJ de energía metabolizable) o 0,10 kg de pellet y 0,50 kg de paja de cebada (Grupo B, 4,1 MJ). La ración estaba compuesta por cebada (79%), poroto de soja (15%) y suplementos minerales (6%). Estas dietas se mantuvieron a lo largo de todo el experimento. El estro (Día 0) fue detectado diariamente utilizando carneros vasectomizados desde el día -4. Al día 5 ± 1 del segundo ciclo siguiendo al retiro de las esponjas, 6 ovejas del grupo C y 8 del B fueron sacrificadas (Euta-Lender, Normon, España). De la parte alta de cada cuerno uterino se disecaron trozos de endometrio, que se fijaron por inmersión en formol al 4% y mantenidos en etanol al 70% hasta ser incluidos en parafina. Este procedimiento fue repetido en las ovejas restantes al día 10 ± 1 (Grupo C=7 y Grupo B=5). Para visualizar la inmunopositividad de RP, se utilizó una técnica de inmunohistoquímica (avidin-biotin-peroxidasa) previamente descrita (Meikle y col., 2000), usando un anticuerpo primario monoclonal desarrollado en ratón (Zymed Cat no: 18-0172, South San Francisco, CA; USA). La expresión endometrial de RP fue evaluada por dos observadores independientes utilizando una técnica subjetiva. Se evaluaron 8 compartimentos uterinos definidos según el tipo celular y la ubicación: epitelio caruncular e intercaruncular, epitelio glandular superficial y profundo, estroma caruncular superficial y profundo, y estroma intercaruncular superficial y profundo. Dependiendo de la intensidad de tinción, las células fueron clasificadas utilizando la siguiente escala: (-) ausente, (+) leve, (++) moderada, (+++) intensa; y expresado como promedio, según

$1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3$, donde n = proporción de células por campo que exhiben tinción leve (1), moderada (2) e intensa (3) (Boos y col. 1996). La variable estu-



diada fue la tinción promedio y fue analizada por el procedimiento mixto del programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 1989). El modelo estadístico incluyó los efectos del tratamiento, día del ciclo y tipo celular y las interacciones entre ellos. El nivel de significancia fue $p < 0,05$.

RESULTADOS

El grupo B presentó menor intensidad de tinción que el grupo C al día 5 del ciclo ($p < 0,05$), en todos los tipos celulares excepto en el estroma intercaruncular profundo. Al día 10 no hubieron diferencias entre tratamientos o día del ciclo. Todos los tipos celulares del Grupo C presentaron tinción más intensa al día 5 que al día 10 ($p < 0,05$). En el Grupo B, solo 3 compartimentos presentaron mayores cantidades de RP al día 5 que al día 10 ($p < 0,05$). Las células epiteliales presentaron una mayor tinción promedio que las células del estroma ($p < 0,05$), aunque presentaron un patrón similar.

DISCUSIÓN

El grupo B presentó menor intensidad de tinción que el grupo C al día 5 del ciclo. Dado que las proteínas receptoras retienen y concentran las hormonas específicas en los tejidos blanco, el menor contenido de RP en el Grupo B explicaría la menor concentración endometrial de P4 previamente observada en ovejas subnutridas (Lozano y col., 1998). Sin embargo, esta diferencia no se observó al día 10 en ningún tipo celular. Si bien no existe bibliografía referente a la relación entre la expresión endometrial de RP y el plano nutricional, el factor similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) podría estar involucrado. En ovejas subnutridas, los niveles circulantes de IGF-1 disminuyen (Thissen y col, 1994). El IGF-1 estimula la función del receptor de estrógeno a (RE a), quien es el principal inductor de la expresión de RP. Por lo tanto un bajo nivel nutricional resultaría en menores niveles de RP endometriales por la vía del IGF-1/RE a. Todos los tipos celulares del Grupo C presentaron tinción más intensa al día 5 que al día 10, concordando con la conocida regulación en menos de la P4 sobre su propio receptor, descrita en varias especies (Clark y col, 1992). Sin embargo, en el Grupo B, sólo 3 compartimentos presentaron mayores cantidades de RP al día 5 que al día 10. Una posible explicación para este hallazgo es que al día 5 el endometrio es menos sensible a la P4 en ovejas subnutridas y por lo tanto la inhibición no fue observada. Las células epiteliales y del estroma presentaron un patrón de tinción similar, pero las primeras presentaron una mayor tinción promedio y una regulación en menos más marcada que las células del estroma. Meikle y col (2000) describieron el mismo fenómeno para el REa, lo que sugiere que el mecanismo que regula el número de receptores en las células del estroma es menos estricto que en las células del epitelio. Concluimos que la expresión endometrial de RP está afectada por el plano nutricional en una manera dependiente del tipo celular.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, McMillen SR. Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes

- given high and low levels of food intake before and after mating. *Anim Sci* 1995; 61:57-62.
- 2 Barnes FL. The effects if the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology* 2000; 53: 649-658.
- 3 Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 1996; 44:11-21.
- 4 Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61: 449-457.
- 5 Clark JH, Schrader WT, O'Malley BW. Mechanisms of steroid hormones action. In: Wilson JD and Foster DW (Eds), *Textbook of Endocrinology*, WB Saunders, Philadelphia 1992, 35-90.
- 6 Lawson RAS, Cahill LP. Modification of the embryo-maternal relationship in ewes by progesterone treatment early in the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1983; 67: 473-475.
- 7 Lozano JM, Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Alfaro B. Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology* 1998; 49: 539-546.
- 8 Mann GE, Lammie GE, Fisher PA. Progesterone control of embryonic interferon tau production during early pregnancy in the cow. *J Reprod Fertil Abstract Series 21 Abstract 37, 1998.*
- 9 Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Shalin L. An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor a by the estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nutr Dev* 2000;40: 587-596.
- 10 O'Callaghan, Boland MP. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim Sci* 1999;68:299-314.
- 11 Parr RA, Davis IF, Fairclough RJ, Miles MA. Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J Reprod Fertil* 1987; 80: 317-320.
- 12 Spencer TE, Bazer FW. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biology of Reproduction* 1995;53:1527-1543.
- 13 Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine reviews* 1994;15-1:80-101.
- 14 Wilmut I, Sales DL. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *J Reprod Fertil* 1981; 61: 179-184.

ABSTRACT

Subnutrition affects embryo survival through changes in the uterine environment. In this study, the effect of plane of nutrition on progesterone receptor (PR) expression in stroma and epithelial cells of endometrium of the ewe was investigated. Twenty-six Rasa Aragonesa ewes were fed diets to provide either 1.5 (Group C) or 0.5 (Group L) times the daily maintenance requirement and slaughtered at days 5 and 10 of the estrous cycle. PR immunostaining of 8 cell types was visualized by immunohistochemistry. Group L presented lower PR immunostaining than Group C on day 5 but not on day 10. Receptor proteins retain and concentrate the specific hormones in the target tissues; thus, lower contents of PR in Group L are consistent with the lower endometrial content of progesterone found in previous studies. All cell types of Group C showed more intense staining on day 5 than on day 10 in agreement with the known progesterone downregulation of its own receptor. In group L, only three cell compartments presented downregulation. The lower PR contents found already at day 5 - lower sensitivity of the endometrium to progesterone- may explain the lack of inhibition of PR expression. Our results indicate that endometrial PR expression is affected in a cell type specific manner by plane of nutrition.