

EFECTO DE LA PREÑEZ SOBRE LA EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DE RECEPTORES ESTEROIDEOS Y SOBRE LA LIBERACIÓN DE PROSTAGLANDINA F2A POST-BIOPSIAS UTERINAS EN VAQUILLONAS

*A Meikle¹, D Cavestany¹, EG Garófalo¹,
L Sahlin², WW Thatcher³,
A Ferraris¹, JE Blanc¹, H Kindahl⁴,
M Forsberg⁴*

¹ Facultad de Veterinaria - Uruguay; ² Karolinska Institutet - Sweden, ³ Animal Sciences - University of Florida - USA, ⁴ Veterinary Faculty, Swedish University of Agricultural Sciences - Sweden

SUMMARY

It was investigated the effects of the presence of the conceptus on estrogen and progesterone receptor expression in uterus of pregnant and cyclic heifers. It was also tested if uterine biopsy at Day 17 induces luteolysis by Prostaglandin (PG) F2a release or if allows pregnancy to be maintained. Heifers that were in heat (Day 0) were inseminated (n=21) or not inseminated (n=8). On Day 17 endometrial samples (CL) were taken by transcervical biopsies. In 12 heifers an hourly bleeding was performed from 5 h before till 12 h after the biopsy to determine PGF2a, metabolite (PGFM). The uterine biopsy increased PGFM levels which remained high 2 to 4 h after biopsy performance. Pregnant cows had lower levels of PGFM. Progesterone levels decreased after the biopsy but they were soon recovered. The biopsies did not provoke luteolysis, but only 6 of the 21 inseminated heifers were pregnant. Pregnant cows tend to present less ERa mRNA, but similar amounts of mRNA PR.

RESUMEN

Se investigaron los efectos de la presencia del embrión sobre la expresión de receptores de estrógenos y progesterona (ER, PR) en útero de vaquillonas vacías y preñadas. Además se chequeó si la biopsia uterina al Día 17 induce la luteólisis o si permite el mantenimiento de la preñez. Se utilizaron 29 vaquillonas en celo (Día 0) inseminadas (n=21) o no inseminadas (controles, n=8). El Día 17 se tomaron muestras endometriales por medio de biopsias transcervicales. En 12 vaquillonas se tomaron muestras de sangre cada hora 5 h antes a 12 horas después de la biopsia para determinar el metabolito de la PGF2a, PGFM. Las biopsias uterinas aumentaron los niveles de PGFM que se mantuvieron altos 2 a 4 h luego de la biopsia. Las vacas preñadas mostraron niveles de PGFM menores que las no preñadas. Los niveles de progesterona luego de la biopsia disminuyeron transitoriamente, pero retornaron rápidamente a los niveles previos. Las biopsias no provocaron luteólisis, pero solo 6 de las 21 vaquillonas inseminadas quedaron preñadas. Las vacas preñadas tendieron a presentar menores niveles de ERa mRNA pero similares de PR mRNA.

INTRODUCCIÓN

Con el aumento de la producción de leche durante

las últimas décadas ha disminuido la eficiencia reproductiva en el ganado lechero; tanto en la ocurrencia e intensidad de celos como en la supervivencia embrionaria. Las fallas reproductivas son comunes y cerca del 40 % de las preñeces fallan alrededor del momento del reconocimiento materno de la gestación (Días 8 a 17 postovulación). Se ha propuesto que estas fallas se deben a alteraciones fisiológicas que resultan en un "diálogo" ineficiente entre el ambiente materno y el concepto. El desarrollo de estrategias para mejorar la fertilidad en el ganado lechero debe estar basado en la comprensión de las señales bioquímicas entre el concepto y la madre. Los mecanismos por los cuales el embrión mantiene la preñez no están totalmente esclarecidos, pero se acepta que es a través de un cambio en la secreción de prostaglandina (PG) F2a endometrial que permite la vida del cuerpo luteo (inhibición de la luteolisis). El control de la secreción de PGF2a esta además regulado por las hormonas ováricas - los estrógenos y la progesterona que son a su vez los moduladores uterinos más importantes. El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de la preñez sobre la expresión de las proteínas que reciben a las hormonas ováricas, los receptores de estrógenos y progesterona (ERa, PR), en muestras endometriales obtenidas por medio de biopsias transcervicales. Además se evaluó si la biopsia uterina provoca la liberación de PGF2a e induce la luteolisis o permite la preñez.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veintinueve vaquillonas Holando en celo (Día 0) fueron inseminadas (n=21) o no inseminadas (control, n=8). Se tomaron muestras de sangre para la determinación de progesterona (P4) diariamente desde los días -1 a 25. En el Día 17 se tomaron muestras de endometrio del cuerno ipsilateral al cuerpo luteo por medio de biopsias transcervicales para la determinación de ERa y PR mRNA por ensayos de hibridización en solución. En 12 vaquillonas (4 controles y 8 inseminadas) se tomaron muestras de sangre cada hora desde 5 horas antes a 12 horas después de la biopsia para determinar los patrones del metabolito de la PGF2a, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2a (PGFM), P4, y cortisol por RIA. La preñez fue determinada por ultrasonografía 35 días luego del estro. Los datos fueron analizados por el procedimiento mixto (Statistical Analyses System), y el modelo incluido día, grupo y la interacción entre ambos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al Día 35, 6 de las 21 vaquillonas inseminadas fueron diagnosticadas preñadas por ultrasonografía. Las vaquillonas inseminadas que no preñaron (n=15) fueron clasificadas en dos grupos de acuerdo a las concentraciones P4 en los días 21-25: luteal (P4 > 18 nmol/L, AI - A, n=2) or basal (P4 < 3 nmol/L, AI - B, n=13), Figura 1.

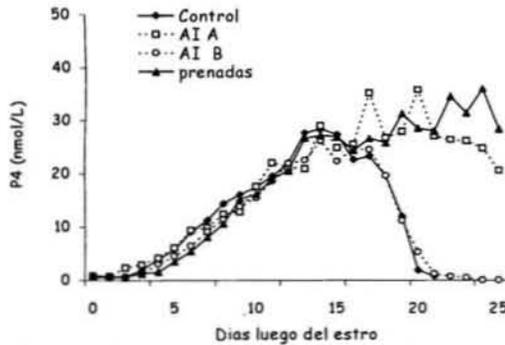


Figura 1. Concentraciones de Progesterona de animales controles, preñados e inseminados no preñados con concentraciones luteales (AI - A) o basales (AI - B) al Día 25.

Las vaquillonas con concentraciones luteales de P4 al Día 25 (AI - A) pudieron haber sufrido mortalidad embrionaria temprana y estaban posiblemente preñadas al Día 17, por lo tanto se consideraron preñadas al Día 17 para el análisis de mRNA de ER y PR (preñadas, n=8).

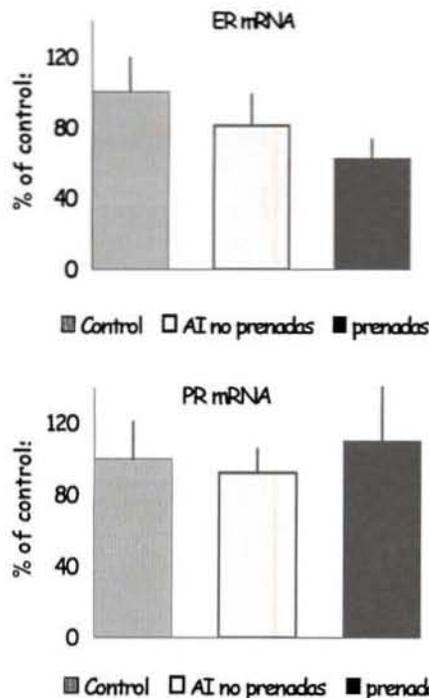


Figura 2: Concentraciones de mRNA de A) receptor de estrógenos a (ER mRNA) y B) de progesterona (PR mRNA) en biopsias endometriales al Día 17 en vacas control (n=8), preñadas (n=8), inseminadas no preñadas (AI no preñadas, n=13). Los resultados se presentan como porcentajes de las vaquillonas control.

Las concentraciones de ERa mRNA en vaquillonas preñadas tendieron a ser menores que los controles, $P=0.10$. Estos resultados son consistentes con el aumento de la proteína correspondiente (ER) en el epitelio luminal alrededor de los días 14-16 del ciclo estral en vacas vacías, mientras que se mantienen bajas en vacas preñadas al mismo momento [1,2,3]. Estos resultados sugieren que la inhibición de la expresión de ER ejercida por la presencia del embrión estaría involucrada en la inhibición de la luteólisis. No pudimos encontrar diferencias en las concentraciones de PR mRNA. Sin embargo

en estudios anteriores [4] encontramos que la presencia del embrión aumenta la presencia de PR en el epitelio glandular, a diferencia de estudios realizados por otros autores que no detectaron PR [2,3]. Esto sugiere que la señal embrionaria -interferon- regula la expresión de PR luego de la transcripción.

Las concentraciones de PGFM antes y después de la biopsia uterina en el día 17 en vacas controles, no preñadas y preñadas se muestran en la Figura 3 (panel izquierdo). Una de las vaquillonas inseminadas presentó niveles de P4 basales ya al día 17 y fue excluida del estudio. Las concentraciones de PGFM aumentaron luego de la biopsia y se mantuvieron altas en las siguientes 2 a 4 horas. Las vaquillonas preñadas presentaron concentraciones de PGFM más bajas ($P<0.05$). Esto confirma que la presencia del embrión inhibe la cascada luteolítica y mantiene el cuerpo luteo permitiendo así que la preñez se establezca.

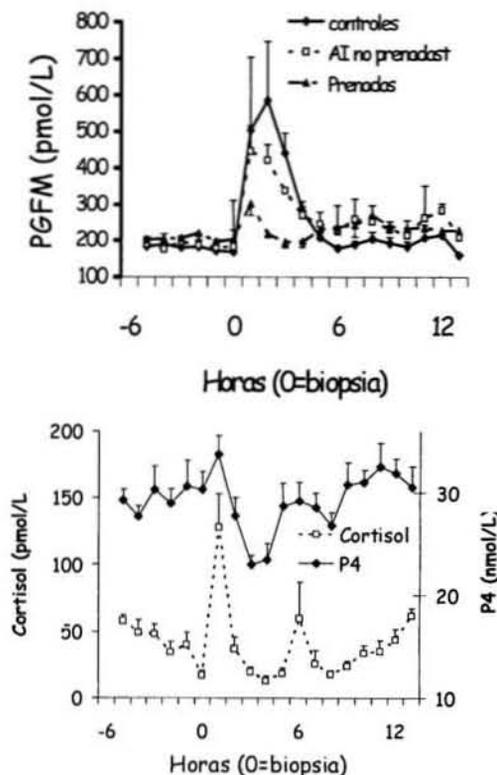


Figura 3 Concentraciones de PGFM (Mean \pm SEM) en vacas controles (n=4), inseminadas no preñadas (n=4) y preñadas (n=3) y progesterona y cortisol en todos los animales (n=11) antes y después de la biopsia uterina.

Las concentraciones de progesterona aumentaron en la primera muestra post biopsia, y disminuyeron 2 a 4 h después, temporalmente asociadas con el pico de PGFM, ambas retornaron a niveles normales unas horas después. No se encontraron diferencias estadísticas en las concentraciones de P4 o cortisol entre grupos. El aumento de P4 en el primer sangrado luego de la biopsia coincidió con el pico de cortisol a ese momento (Figura 3), mostrando que el procedimiento provoca una respuesta de estrés. La Progesterona y el cortisol se correlacionaron ($r=0.21$, $P<0.01$), y como ha sido reportado previamente [5] puede ser debido al estrés de la



biopsia uterina ya que ambos P4, -un precursor del cortisol-, y el cortisol responden a la estimulación con ACTH. Las biopsias uterinas en bovinos pueden ser utilizadas para el diagnóstico de endometritis y se ha sugerido que la medida de PGFM plasmática puede ayudar en el diagnóstico de endometritis [6].

En este estudio hemos demostrado que la preñez afecta la expresión endometrial de ERα mRNA y las concentraciones plasmáticas de PGFM. La biopsia uterina provoca una liberación temporal de PGF2α, que es seguida de una disminución transitoria en las concentraciones de P4 pero este procedimiento no provoca la luteolisis, por lo tanto puede ser usado para el muestreo en estudios de la expresión génica endometrial en vacas preñadas.

SUMMARY

It was investigated the effects of the presence of the conceptus on estrogen and progesterone receptor expression in uterus of pregnant and cyclic heifers. It was also tested if uterine biopsy at Day 17 induces luteolysis by Prostaglandin (PG) F2α release or if allows pregnancy to be maintained. Heifers that were in heat (Day 0) were inseminated (n=21) or not inseminated (n=8). On Day 17 endometrial samples (CL) were taken by transcervical biopsies. In 12 heifers an hourly bleeding was performed from 5 h before till 12 h after the biopsy to determine PGF2α, metabolite (PGFM). The uterine biopsy increased PGFM levels which remained high 2 to 4 h after biopsy performance. Pregnant cows had lower levels of PGFM. Progesterone levels decreased after the biopsy but they

were soon recovered. The biopsies did not provoke luteolysis, but only 6 of the 21 inseminated heifers were pregnant. Pregnant cows tend to present less ERα mRNA, but similar amounts of mRNA PR.

REFERENCIAS

- [1] Thatcher WW, Guzeloglu A, Meikle A, Kamimura S, Bilby T, Kowalski AA, Badinga L, Pershing R, Bartolome J, Santos JEP. Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction*, in press, 2003.
- [2] Kimmins S, MacLaren LA. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*; 22: 742-748, 2001.
- [3] Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 122: 965-979, 2001.
- [4] Sosa C, Meikle A, Guzeloglu A, Bilby TR, Kamimura S, Thatcher WW. Efecto de la preñez sobre la sensibilidad uterina a la progesterona. *Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú Junio 2002*.
- [5] Bolaños JM, Molina JR, Forsberg M. Effect of blood sampling and administration of ACTH on cortisol and progesterone levels in ovariectomized Zebu cows. *Acta Vet Scand* 38:1, 1997.
- [6] Seals RC, Matamoros I, Lewis GS. Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-PGF2α concentrations in Holstein cows and their susceptibility to endometritis. *J Anim Sci* Apr;80(4):1068, 2002.