



RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE PROGESTERONA EN CERVIX CRANEAL Y CAUDAL DE OVEJAS EN ANESTRO ESTACIONAL: (II) EN LA OVULACIÓN INDUCIDA Y EL DIESTRO TEMPRANO

M. Rodríguez-Piñón, C. Tasende, P.

Puime y E.G. Garófalo

Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay. marodri@adinet.com.uy

RESUMEN

El objetivo fue determinar los niveles de expresión de receptores de Estrógenos (RE) y de Progesterona (PR) en cervix craneal y caudal de ovejas al día 1 o 5 de la inducción hormonal a la ovulación durante el anestro estacional. Durante el mes de setiembre y a 34° de latitud Sur, ovejas en anestro estacional comprobado por retarjo, fueron tratadas con Progesterona (P) (CIDR) durante 10 días, seguido de 9 microdosis (6,7 ng) de un análogo de GnRH (Receptal) *i/v* cada 2 horas y posteriormente un bolo *i/v* (4 mg). Los animales fueron sacrificados al día 1 (D1, n=5) o 5 (D5, n=5) del bolo de GnRH. En cervix craneal y caudal se midieron las concentraciones de RE ARNm por hibridización en solución y las de RE y RP por ensayos de unión. Los niveles de RE ARNm y RE del cervix craneal fueron mayores al día 1 que al día 5, $p < 0,0001$. Los niveles de RP no mostraron diferencias entre días en ninguna de las dos zonas del cervix. El cervix caudal tuvo concentraciones del transcrito de RE (RE ARNm), RE y RP menores que el cervix craneal, $p < 0,0005$. Los resultados demuestran diferentes niveles de expresión de los receptores esteroideos en cervix craneal en la ovulación inducida y en la fase luteal temprana inducida. Además, las diferencias entre las zonas cervicales sugieren que la caudal puede ser menos sensible a los Estrógenos (E) y a la P durante el ciclo estral inducido. Estas diferencias podrían deberse a diferencias morfológicas y funcionales entre cervix craneal y caudal.

SUMMARY

The aim of this work was to determine the Estrogens (ER) and Progesterone (PR) receptors levels in cranial and caudal cervix of anoestrous ewes at day 1 or 5 of the hormonal induction to the ovulation. In September and in 34° of South latitude, seasonal anoestrous ewes confirmed by vasectomized rams were treated with Progesterone (P) (CIDR) during 10 days, followed by 9 *i/v* injections of GnRH synthetic analogue (Receptal) every 2 hours (6,7 ng) and a *i/v* bolus injection later (4 mg). The animals were sacrificed at day 1 (D1, n=5) or 5 (D5, n=5) after GnRH bolus injection. In cranial and caudal cervix the ER RNA messenger (RE mRNA) concentration was measured by solution hibridización and the ER and PR levels by binding assay. ER mRNA and ER levels in the cranial cervix were higher on the day 1 than on the day 5, $p < 0,0001$. PR concentrations did not demonstrate differences between days or cervical region. The ER mRNA, ER and PR levels in the caudal cervix were lower than in the cranial cervix, $p < 0,0005$. The results demonstrate different patterns of ER and PR expression in cranial cervix during the induced estrous cycle in ewes. Besides, the differences between the cranial and caudal

cervix suggest that the caudal zone could have lower sensibility to the Estrogens (E) and P during the induced estrous cycle. These findings could be due to morphological and/or functional differences between cranial and caudal cervix.

INTRODUCCIÓN

Es conocido que las principales acciones de los Estrógenos (E) y la Progesterona (P) se ejercen a través de receptores intracelulares específicos (RE y RP). Los niveles de las hormonas ováricas circulantes regulan la concentración de sus propios receptores uterinos: los E las aumentan mientras la P las reduce (1). Esta regulación también fue reportada para sus respectivos transcritos (RE ARNm y RP ARNm) (4). Ovejas en anestro estacional y 24 h luego de la inducción de la ovulación con P y GnRH tuvieron niveles de RE similares en el cervix craneal (3) y caudal (Póster I). El objetivo de éste trabajo fue investigar la respuesta del cervix caudal y craneal de ovejas en anestro estacional al tratamiento con P y GnRH, midiendo la concentración de RE ARNm, RE y RP en los días 1 (ovulación inducida) y 5 luego de la inducción (diestro temprano).

MATERIALES Y METODOS

Durante el mes de setiembre y a 34° de latitud Sur, ovejas Corriedale adultas ($43,7 \pm 1,1$ Kg) en anestro estacional confirmado por retarjo fueron tratadas con 0,33 g de P (Easi Breed-CIDR-G, Universal Lab) durante 10 días seguido de 6,7 ng de un análogo de GnRH *i/v* (Acetato de Buserelina, Receptal, Hoechst Roussel) cada 2 h y a las 18 h un bolo *i/v* de 4 µg de GnRH, con la finalidad de inducir la ovulación. A las 24 h (D1, n=5) o 5 días (D5, n=5) del bolo de GnRH fueron sacrificadas por exanguinación yugular para extraer el cervix. Todas las ovejas tuvieron aumento de los niveles de E2 circulantes durante el tratamiento con GnRH (30 a 40 pmol/L) y al día 5 del bolo de GnRH los niveles séricos de P fueron mayores que al día 1 (5 vs 0,8 nmol/L) (6). Todas las ovejas sacrificadas el día 1 presentaron un folículo ovulado o protruyente preovulatorio, mientras que las sacrificadas el día 5 presentaron un cuerpo pre-luteal cada una. En los tercios caudal y craneal del cervix se midieron la concentración de RE ARNm por hibridización en solución con una sonda específica marcada y la de los RE y RP por ensayos de unión con las correspondientes hormonas radiactivas (2). Las concentraciones de RE ARNm, RE y RP fueron analizadas mediante el procedimiento de Modelo Lineal General para el Análisis de Varianza (S.A.S. Institute Inc., 1994) incluyendo los efectos de día (días 1 y 5), región del cervix (craneal y caudal) y la interacción entre ambos.

RESULTADOS

Se observó un efecto global significativo sobre las concentraciones de RE ARNm ($p < 0,0001$). El cervix caudal tuvo concentraciones de RE ARNm menores (50%)



respecto al craneal ($p < 0,0003$). Los niveles de RE ARNm del cervix craneal fueron mayores al día 1 respecto al día 5 ($p < 0,0001$) (Figura 1, panel izquierdo), mientras

que en el caudal no se detectaron diferencias entre los días 1 y 5 (Figura 1, panel derecho).

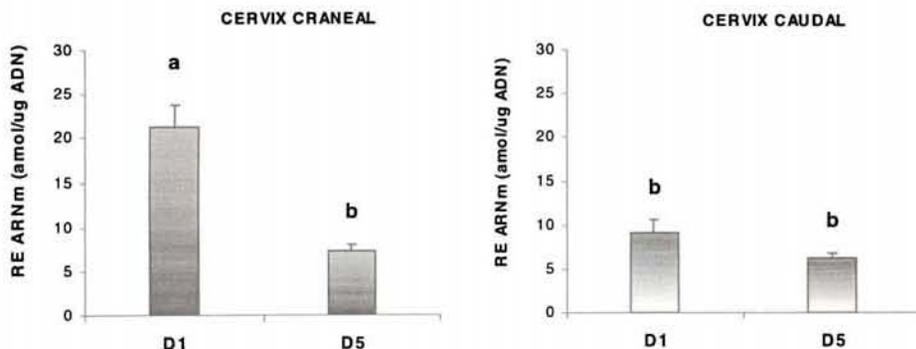


Figura 1 Niveles de RE ARNm (amol/ug de ADN, $X \pm sem$) en cervix craneal (panel izquierdo) y caudal (panel derecho) de ovejas en anestro estacional tratadas con P y GnRH, sacrificadas al día 1 (D1, $n=5$) o 5 (D5, $n=5$) del bolo de GnRH. Barras con diferentes letras indican diferencias $p < 0,0001$.

Las constantes de disociación (K_d , nM) de las proteínas receptoras de E y P no mostraron diferencias de día ni de región del cervix, y sus valores fueron ($X \pm sem$) $0,73 \pm 0,08$ ($n=20$) para RE y $0,95 \pm 0,06$ ($n=20$) para RP. Estos valores fueron similares a los publicados para cervix, útero e hipófisis de ovejas (2, 3, 5). Se observó un efecto global significativo sobre las concentraciones de RE y de RP ($p < 0,0001$ y $p < 0,005$, respectivamente). El cervix caudal tuvo concentraciones menores de RE y

de RP (38 y 53%, respectivamente) respecto al craneal ($p < 0,0005$). En el cervix craneal las concentraciones de RE fueron mayores al día 1 que al día 5 ($p < 0,0001$) (Figura 2, panel izquierdo), mientras que en el cervix caudal no se detectaron diferencias entre los días 1 y 5 (Figura 2, panel derecho). Las concentraciones de RP, fueron similares los días 1 y 5 tanto en la zona alta como en la baja (Figura 2, panel izquierdo y derecho).

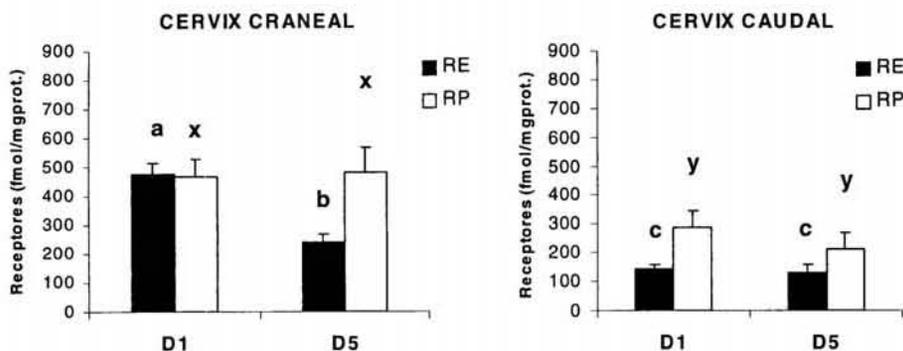


Figura 2. Concentraciones de RE y RP (fmol/mg de proteínas, $X \pm sem$) en cervix craneal (panel izquierdo) y caudal (panel derecho) de ovejas en anestro estacional tratadas con P y GnRH, sacrificadas 1 día (D1, $n=5$) o 5 días (D5, $n=5$) después del bolo de GnRH. Para cada receptor, barras con diferentes letras indican diferencias, $p < 0,0001$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Al día 1 la zona craneal del cervix tuvo mayores niveles de expresión de RE, (RE ARNm y RE), que al día 5 en concordancia con el aumento de los niveles circulantes pre-ovulatorios de E y basales de P (6), sugiriendo el predominio de la regulación positiva de E sobre su propio receptor (1). Durante el diestro temprano, cuando los niveles de P aumentaron (6), se observaron decrementos de las concentraciones de RE ARNm y RE. Esto sugiere el predominio de la acción inhibitoria de P sobre la expresión de RE (1). Por el contrario, en la zona caudal del cervix, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de RE y RP. Los resultados de-

muestran diferentes niveles de expresión de los receptores esteroideos en cervix craneal en la ovulación inducida y en la fase luteal temprana inducida. Además, las diferencias entre las zonas cervicales sugieren que la caudal puede ser menos sensible a los E y a la P durante el ciclo estral inducido. Estas diferencias podrían deberse a diferencias morfológicas y funcionales entre cervix craneal y caudal.

Agradecimientos: A la Dra. Meikle por la asistencia técnica en las determinaciones de transcritos. Al Dr. Perdígón por los trabajos a campo y a P. Rubianes e I. Sartore por la instrumentación del trabajo experimental. Financiación: CIDEF-Facultad de Veterinaria, CSIC-Universidad de la República y PEDECIBA-Ministerio de Educación y Cultura; IFS: B/3025-2.



REFERENCIAS

1. Clark JH, Mani SK. Actions of ovarian steroid hormones. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds: Knobil E., Neill J.D., Raven Press Ltd. New York, 1011-1046, 1994.
2. Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Meikle A, Garófalo EG. Sex steroid receptors in ovine cervix during the postpartum period. *Theriogenology* 53: 745 -750, 2000.
3. Rodríguez-Piñón M., Tasende C., Meikle A., Puime P., Acuña S. y Garófalo E.G., Sensibilidad del cervix ovino a las hormonas esteroideas en anestro estacional y en la ovulación inducida. XII Congreso Nacional de Veterinaria. Póster 125, Montevideo Uruguay, Noviembre de 2001.
4. 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. *Biol Reprod*, 53: 1527-1543, 1995.
5. Tasende C, Meikle A, Rodríguez-Piñón M, Forsberg M and Garófalo EG. Estrogen and progesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin releasing hormone treated anestrous ewes. *Theriogenology*, 57: 1719-1731, 2002.
6. Tasende C, Rodríguez-Piñón M, Acuña S, Puime P, Forsberg M y Garófalo EG, Mecanismos moleculares que involucran al útero ovino en la fase lutea subnormal. XII Congreso Nacional de Veterinaria. Póster 126, Montevideo Uruguay, Noviembre de 2001.