



RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE PROGESTERONA EN CERVIX CRANEAL Y CAUDAL OVINO: (III) DURANTE EL CICLO ESTRAL

M. Rodríguez-Piñón, P. Puime, C. Tasende, S. Acuña y E.G. Garófalo
 Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Montevideo-
 Uruguay. marodri@adinet.com.uy

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar la expresión de receptores de Estrógenos (RE) y Progesterona (RP) en cervix ovino durante el ciclo estral. Durante la estación reproductiva (febrero) ovejas con intervalo interestro normal (confirmado por retarjo durante un mes previo al experimento) fueron sincronizadas con dos inyecciones de un análogo sintético de Prostaglandina-F2a separadas 6 días. Los animales se sacrificaron los días 1 (D1, n=7), 6 (D6, n=6) o 13 (D13, n=7) de la detección del estro. La concentración del transcrito RE ARNm se midió por hibridación en solución y la de las proteínas RE y RP por ensayos de unión. Las determinaciones se realizaron en cervix craneal y caudal. Los niveles de RE ARNm en cervix caudal fueron mayores al día 1 que en los días 6 y 13 ($p < 0,0001$), no observándose diferencias en cervix craneal. Las concentraciones de RE y RP tanto en cervix craneal y como caudal fueron mas elevadas al día 1 del estro respecto a los días 6 y 13 ($p < 0,01$). Las concentraciones de RE ARNm y RP fueron mayores en cervix caudal que en craneal ($p < 0,01$). Los resultados demuestran por primera vez que la expresión de receptores esteroides en cervix ovino se modifica durante el ciclo estral, alcanzando mayores niveles en el estro y menores en fase lútea.

SUMMARY

The aim of this work was to determine the Estrogens (ER) and Progesterone (PR) receptors expression in ovine cervix during the estrus cycle. Cycling ewes were synchronized with two injections of a synthetic analogue of Prostaglandina-F2a (Delprostenate, Glandinex, Universal Lab) with 6 days of interval. The animals were sacrificed the days 1 (D1, n=7), 6 (D6, n=6) or 13 (D13, n=7) after the estrus detection. The estrogens receptor messenger concentration (ER mRNA) was measured by solution hybridization and the ER and PR levels by binding assay. The determinations were carried out in cranial and caudal cervix. ER mRNA levels were higher in the day 1 than in the days 6 and 13 in caudal cervix ($p < 0,0001$), but no differences were found in cranial cervix. The ER and PR concentrations were higher in the day 1 than in the days 6 and 13 of the estrous cycle, in both, cranial and caudal cervixes, ($p < 0,01$). The ER mRNA and PR concentrations were higher in the caudal than in cranial cervix ($p < 0,01$). The results show for the first time, that the steroid receptors expression in ovine cervix varies during the estrous cycle, reaching the highest values at estrus and the lowest during the luteal phase.

INTRODUCCIÓN

Las principales acciones de los estrógenos (E) y la Progesterona (P) en los tejidos efectores se ejercen a

través de sus receptores nucleares específicos (RE y RP), con actividad de factores de transcripción capaces de modificar la expresión génica (1). Se ha demostrado en útero ovino durante el ciclo estral que los niveles de las hormonas ováricas circulantes regulan la expresión de sus propios receptores: los E preovulatorios incrementan las concentraciones de transcritos (RE ARNm y PR-ARNm) y de las proteínas RE y RP, mientras que la P las reduce durante la fase lútea (4, 7). En trabajos previos se determinaron RE y RP en el cervix de ovejas en anestro postparto en estación reproductiva (5) y en anestro estacional e inducidas a ovular (6), sugiriendo que los niveles de expresión de RE y RP en cervix ovino pueden ser influenciados por las concentraciones circulantes de E y P en estas diferentes situaciones reproductivas. En el desarrollo de técnicas transcervicales de inseminación artificial y transferencia de embriones en lanares se ha utilizado la administración de E (2, 3) para dilatar el cervix. Sin embargo, no encontramos publicaciones sobre las concentraciones de RE y RP en cervix durante el ciclo estral en ovinos. El objetivo del presente trabajo fue conocer las concentraciones de RE ARNm, RE y RP en cervix craneal y caudal de la oveja durante el ciclo estral natural.

MATERIALES Y METODOS

Ovejas Corriedale adultas (39±1,0 kg) con intervalo interestro normal (confirmado por retarjo durante un mes previo al experimento) y en estación reproductiva (febrero, 34° latitud Sur) fueron sincronizadas con dos inyecciones de un análogo sintético de Prostaglandina-F2a (Delprostenate, Glandinex, Universal Lab) i.m. (80 mg/kg) separadas 6 días. Se detectaron estros con retarjo pintado cada 12 h y se asumió el día de la manifestación estral como día 0 del ciclo. Los animales se sacrificaron por exanguinación yugular a las 24 h (D1, n=7) y a los días 6 (D6, n=6) o 13 (D13, n=7) de la detección del estro, para extraer el cervix. La condición de ovejas ciclando fue confirmada midiendo las concentraciones sanguíneas de estradiol (E2) y P por RIA. En el cervix craneal y caudal se midieron las concentraciones de RE ARNm por hibridación en solución con sondas específicas para ovinos y las de RE y RP por ensayos de unión con las correspondientes hormonas radiactivas. 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, 6 y 13), región del cervix (craneal y caudal) y la interacción entre ambos.

RESULTADOS

En todos los animales, las concentraciones de E2 sérico en el día 1 fueron mayores a 22 pmol/L y se mantuvieron por debajo de 8 pmol/L el resto de los días. Los de P sérica fueron menores a 0,5 nmol/L en el día 1 y superiores a 6,6 nmol/L entre los días 6 y 13. La concentración de RE ARNm fue mayor en el cervix caudal que en el craneal ($p < 0,001$). Los niveles de RE ARNm en el cervix craneal no variaron a lo largo del ciclo estral (Figura 1, panel izquierdo), pero en el cervix caudal fueron mayores el día 1, $p < 0,05$ (Figura 1, panel derecho).

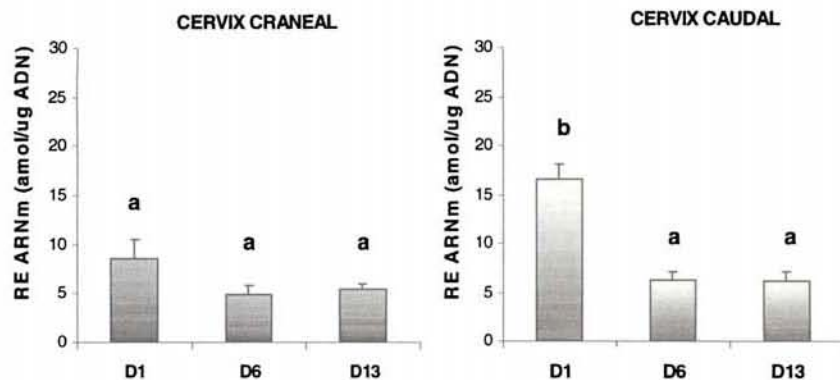


Figura 1 Niveles de RE ARNm (amol/ug de ADN, $X \pm \text{sem}$) en cervix craneal (panel izquierdo) y caudal (panel derecho) de ovejas en los días 1 (D1, $n=7$), 6 (D6, $n=6$) y 13 (D13, $n=7$) luego del estro. Diferentes letras indican diferencias $p < 0,0001$.

Las constantes de disociación (K_d , nM) de las proteínas receptoras no mostraron diferencias de día ni de región del cervix, y sus valores fueron ($X \pm \text{sem}$) $0,57 \pm 0,09$ para RE ($n=40$) y $1,07 \pm 0,12$ para RP ($n=40$). Los niveles de RE y de RP siguieron el mismo patrón tanto en el

cervix craneal como en el caudal: mas altas al día 1 del ciclo respecto a los días 6 y 13, $p < 0,02$ para RE y $p < 0,01$ para RP (Figura 2, panel izquierdo y derecho). Los niveles de RP fueron mayores en el cervix caudal que en el craneal. ($p < 0,01$)

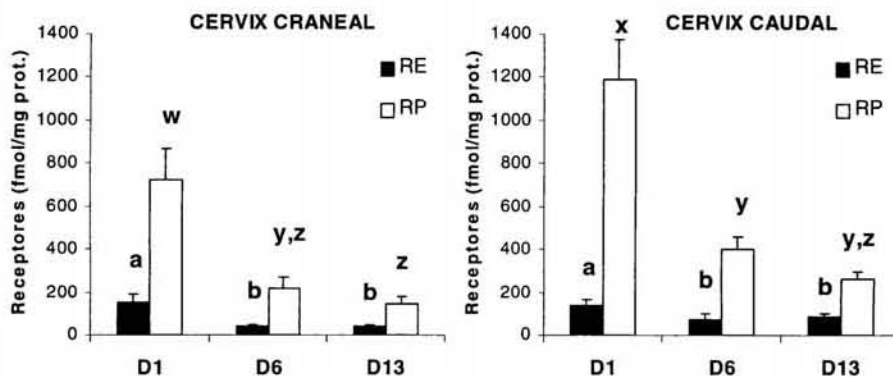


Figura 2. Concentraciones de RE y RP (fmol/mg de proteínas, $X \pm \text{sem}$) en cervix craneal (panel izquierdo) y caudal (panel derecho) de ovejas en los días 1 (D1, $n=7$), 6 (D6, $n=6$) y 13 (D13, $n=7$) luego del estro. Para cada receptor, diferentes letras indican diferencias $p < 0,0001$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cervix ovino durante el ciclo mostró un patrón de expresión de receptores esteroideos similar en las zonas craneal y caudal, y en acuerdo con los niveles circulantes de E y P similar a lo descrito en útero (4, 7). Al día 1 del ciclo, durante el predominio estrogénico, los niveles de RE fueron mayores y se acompañaron de una significativa inducción del RP. Durante la fase luteal se observó un efecto inhibitorio de la P sobre la expresión de RE y RP. Sin embargo, solo en cervix caudal los niveles de RE ARNm fueron afectados por las hormonas esteroideas, sugiriendo una regulación transcripcional y post-transcripcional de la expresión de RE. Por el contrario, en el cervix craneal los efectos de E y P podrían afectar el recambio y procesamiento del RE sin afectar aparentemente la expresión del gen de RE. Estos patrones de regulación de la expresión del RE son diferentes a lo encontrado en cervix craneal de ovejas en anestro

estacional e inducidas a ovular con GnRH (6). A su vez, durante el ciclo estrol, el cervix caudal mostró similares concentraciones de RE y mayores de RE ARNm y RP respecto al craneal, en contradicción con lo encontrado en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular (6, Póster I y II). Los resultados demuestran por primera vez que la expresión de los receptores esteroideos en cervix ovino se modifica durante el ciclo estrol, alcanzando mayores niveles en el estro y menores en fase lútea. Este delicado mecanismo de regulación podría alterarse por tratamientos hormonales de manejo reproductivo, modificando la capacidad de respuesta del cervix a las acciones de E y P.

Agradecimientos: A la Dra. Meikle por la asistencia técnica en las determinaciones de transcritos. Al Dr. Perdigon por los trabajos a campo y a P. Rubianes e I. Sartore por la instrumentación del trabajo experimental. Financiación: DINACYT, Ministerio de Educación y Cultura.



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. Khalifa R, Sayre B and Lewis G, Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *J Anim Sci*, 70:33-42, 1992.
3. Mylne MJA, McKelvey WAC, Fernie K, Matthews K, Use of a transcervical technique for embryo recovery in sheep. *Vet Rec* 130:450-451, 1992.
4. Rexroad CE Jr, Estrogen and progestogen binding in the myometrium of the ewe II Regulation by estradiol and progesterone. *J Anim Sci*, 53: 1070-1076, 1981b.
5. Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Meikle A, Garófalo EG, Sex steroid receptors in ovine cervix during the postpartum period. *Theriogenology* 53: 745 -750, 2000.
6. Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Meikle A, Puime P, Acuña S y Garófalo EG, 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.
7. 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.