



EFFECTO DE LA PREÑEZ SOBRE LA SENSIBILIDAD UTERINA A LA PROGESTERONA

*Cecilia Sosa¹, Ana Meikle¹, A. Guzeloglu²,
 T.R. Bilby², S. Kamimura² y W.W. Thatcher²*

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay

²Department of Animal Sciences, University of Florida, Gainesville, FL, USA.

RESUMEN

El efecto de la presencia del embrión sobre la expresión y localización del receptor de progesterona (RP) fue estudiado en vacas preñadas y no preñadas. Las vacas fueron sacrificadas al Día 17 postovulación y el endometrio del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo fue disecado para la determinación de receptor de progesterona por inmunohistoquímica. Un sistema avidina-biotina-peroxidasa fue utilizado para la inmunomarcación de RP. Se estudiaron 8 compartimientos celulares del endometrio por 2 observadores independientes. Se observó una mayor cantidad total de células negativas a RP en animales vacíos que preñados. El epitelio luminal de la carúncula y el epitelio glandular superficial de los animales preñados tenía más células positivas a RP. El estroma caruncular (superficial y profundo) e intercaruncular profundo en vacas preñadas no tenían más células positivas, pero estaban marcados más intensamente. Esto demuestra que el embrión aumenta la expresión de los RP en el endometrio bovino, modificando así la sensibilidad potencial del endometrio a la progesterona.

INTRODUCCIÓN

Se ha reportado que aproximadamente el 25 % de los embriones en ganado bovino muere durante las primeras 3 semanas de gestación (Peters, 1996). Se desconocen los mecanismos responsables de esta mortalidad embrionaria, pero se han sugerido fallas en el reconocimiento materno de la gestación (Thatcher y col., 1997). Un correcto conocimiento del mecanismo luteolítico y la comprensión del diálogo entre el concepto y la madre pueden propiciar el desarrollo y aplicación de técnicas de manejo de rodeos que optimicen la eficiencia productiva y la fertilidad.

La característica clave del reconocimiento materno de la preñez que se establece el Día 17 postovulación, es la prevención de la regresión del cuerpo lúteo y el mantenimiento de la secreción de progesterona (P4, hormona de la preñez). La luteólisis es provocada por pulsos de alta frecuencia y amplitud de PGF2a endometrial, que por medio de la anastomosis vena uterina-arteria ovárica, llega al ovario y provoca la regresión del cuerpo lúteo desencadenando un nuevo ciclo estral (Parkinson y col., 1990; Flint y col., 1992). En este mecanismo luteolítico está implícita la retroalimentación positiva entre la PGF2a endometrial y la oxitocina ovárica

(Lamming y Mann, 1995). Se ha propuesto que la capacidad de respuesta endometrial a la oxitocina luteal (es decir, las proteínas receptoras a la Oxitocina: RO), sería el evento que permitiría el inicio de la luteólisis (Flint, 1992). La P4 ejerce una regulación negativa sobre la expresión de RO, así como también de sus propios receptores (RP) (Wathes y Hamon, 1993). Es así, que durante el diestro las concentraciones de RP son más bajas que alrededor del estro (Meyer et al., 1988).

Durante la preñez temprana, la secreción de PGF2a y expresión de los RO en el epitelio luminal están disminuidas (Parkinson y col., 1990; Jenner y col., 1991). Se ha demostrado que el interferón-tau, desempeñando ambas acciones, es la señal embrionaria que permite el reconocimiento materno (Flint y col., 1992; Lamming y col., 1995). Robinson y col. (2001), no pudieron estudiar el efecto del embrión sobre la expresión de RP ya que los niveles eran prácticamente indetectables entre los días 12 y 18 del ciclo estral.

Teniendo en cuenta el rol central de la progesterona en el crecimiento del embrión y el establecimiento de la gestación, el objetivo de éste trabajo fue estudiar el efecto del embrión sobre la expresión y localización endometrial de los receptores de progesterona en la preñez temprana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se sincronizaron 17 vacas Holando con el método Ovsynch: GnRH-Prostaglandina-GnRH, Días 0-7-9. Los animales fueron inseminados (n=12) o no inseminados (Grupo C, n=5) a tiempo fijo (Día 0 = Día de la ovulación). El día 17, las vacas fueron sacrificadas y los úteros fueron retirados y lavados 2 veces para recoger secreciones y embriones. Las vacas inseminadas fueron clasificadas como preñadas si se constató la presencia de un embrión (Grupo P, n=6). Se disecó el endometrio del cuerno lateral al cuerpo lúteo para la determinación de receptor de progesterona (RP). Los tejidos se fijaron inmediatamente por inmersión en Paraformaldehído al 4% por 24 horas y luego fueron almacenados en 70 % etanol a 4 °C hasta ser embebidos en parafina.

Inmunohistoquímica

Todas las muestras (5µm) estudiadas fueron corridas en el mismo ensayo inmunohistoquímico. Después de desparafinadas y rehidratadas, las secciones se pretrataron con Buffer Citrato de Sodio 0.01M (pH 6.0) por 10 min. Luego de lavar con buffer (PBS 0.01M, pH 7.5), la actividad inespecífica de la peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 10 min. Se enfrentó el tejido a un suero normal de caballo (NHS, Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido en PBS, dentro de una cámara húmeda por 60 min. Luego, se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal de ratón contra RP (Zymed Cat no: 18-0172, South San Francisco, CA; USA) diluido 1:100 en PBS por 60 min. Los controles negativos se obtuvieron reemplazando el anticuerpo primario por un suero



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

inespecífico a una concentración equivalente. Se utilizó un anticuerpo equino antiIgG de ratón biotinilado (Vectastain, Vector) diluido en NHS por 60 min. Luego, las secciones de tejido fueron incubadas por 60 min con un complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (Vectastain Elite; Vector). El sitio de unión enzimática fue visualizado por la aplicación de 3,3'-diaminobencidina en H₂O₂ (DAB kit; Vector), un cromógeno que produce un precipitado marrón e insoluble al incubarlo con la enzima (30 sec). Las secciones fueron contracoloradas con hematoxilina y deshidratadas antes de ser montadas.

Análisis de imagen

Previa inspección general de cada preparado, se realizó un análisis de imagen subjetivo para evaluar la expresión de RP en los diferentes tipos celulares. La expresión de RP fue estudiada en 8 compartimientos uterinos definidos por tipo celular y ubicación. El epitelio luminal se dividió en caruncular e intercaruncular. El epitelio glandular fue arbitrariamente dividido en superficial (debajo de la luz uterina) y profundo (por encima del miometrio). Las células del estroma fueron clasificadas de la siguiente manera: estroma caruncular superficial y profundo, y estroma intercaruncular superficial y profundo. El inmunomarcado de los 8 tipos celulares fue clasificado según la intensidad de la tinción en una escala de: 0 (ausente), + (leve), ++ (moderado), +++ (intenso). Se evaluó subjetivamente la proporción de área del campo al que correspondían los diferentes grados de intensidad. Para cada tipo celular se evaluaron 10 campos a X1000. Dos observadores evaluaron los preparados independientemente y desconociendo los grupos de animales.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron por un modelo estadístico (procedimiento mixto, SAS) que incluyó el efecto del estatus reproductivo (preñada vs vacía), del tipo celular (8 compartimientos celulares) y una interacción entre ambos. Se analizaron los datos registrados por los observadores por separado, y en éste trabajo se presentan las observaciones promedio de ambos.

RESULTADOS

El inmunomarcado del RP (color marrón) en las secciones de útero fue predominantemente nuclear. Cuando el anticuerpo monoclonal específico fue sustituido por IgG de ratón, la ausencia de marcado demostró la alta especificidad de la marcación del RP. Se observó una menor cantidad total de células negativas a RP en las vacas preñadas que en las no preñadas, $P=0.051$. El epitelio luminal (caruncular e intercaruncular) fue predominantemente negativo en ambos estatus (preñadas y no preñadas). El epitelio luminal de la carúncula tenía menor número de células negativas a RP en animales preñados que en vacíos ($p = 0.1$), pero no se encontraron diferencias en el intercaruncular. En la Figura 1 se muestra el porcentaje de núcleos positivos en el epitelio glandular de ambos estados fisiológicos.

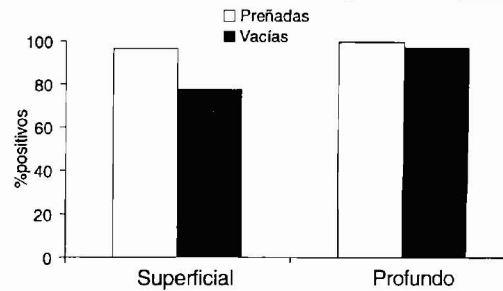


Figura 1. Porcentaje de núcleos positivos del epitelio glandular en vacas vacías y preñadas al Día 17.

El epitelio glandular superficial de los animales preñados presentó mayor número de células positivas ($P=0.08$), pero no se encontraron diferencias en el epitelio glandular profundo. En ambos epitelios glandulares de las vacas preñadas se observó mayor número de células teñidas intensamente (+++), $P<0.02$ para ambos. Las vacas vacías presentaron menor cantidad de células negativas en el epitelio glandular profundo que en el epitelio glandular superficial ($p = 0.1$).

No se observaron diferencias en el porcentaje de núcleos positivos en estroma caruncular e intercaruncular según el estatus fisiológico (Figura 2). Se encontró mayor cantidad de células del estroma con grado de tinción intenso (+++) en vacas preñadas que en vacas no preñadas: caruncular superficial y profundo ($p < 0.03$), e

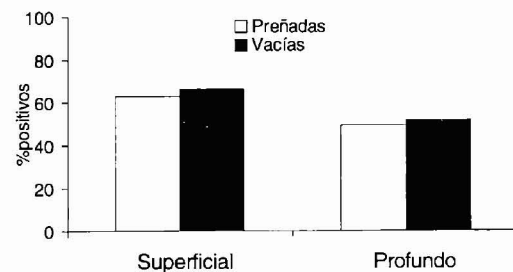
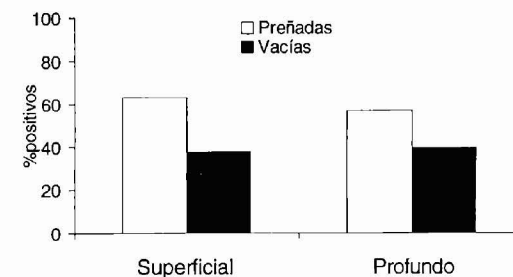


Figura 2. Porcentaje de núcleos positivos en estroma caruncular (panel superior) e intercaruncular (panel inferior) en vacas preñadas y vacías al Día 17 postovulación.



intercaruncular profundo ($p = 0.07$). En las vacas vacías, se encontró mayor número de células negativas en estroma intercaruncular profundo que en el superficial ($p = 0.09$).

DISCUSIÓN

En este estudio, se encontró un efecto del tipo y localización celular sobre la inmunomarcación del receptor de progesterona. La especificidad del tipo celular en cuanto a la positividad al RP ha sido demostrada anteriormente durante el ciclo estral (Boos y col. 1996). Esto implicaría que en un mismo órgano los diferentes tipos celulares pueden responder de forma distinta a los mismos niveles de progesterona circulante.

La falta de marcado positivo en el epitelio luminal al día 17 del ciclo estral coincide con lo reportado por otros autores (vacas: Robinson y col, 2001; Boos y col, 1996; ovejas: Wathes y Hamon, 1993; Spencer y Bazer, 1995) y apoya el rol inhibitorio de la P4 sobre su propio receptor el cual se evidencia hacia el final del ciclo. De forma contraria a estudios realizados en vaca (Boos y col. 1996) y cerda (Geisert y col. 1994), se pudo observar que la mayoría de los núcleos en el epitelio glandular son positivos hacia el final del diestro. No encontramos explicación obvia para esto, pero podría deberse a que los distintos anticuerpos están dirigidos contra diferentes epítopes. Es más, en la puesta a punto de la técnica de inmunohistoquímica para este experimento, hemos probado un anticuerpo dirigido contra otra secuencia de aminoácidos del RP, que era muy poco sensible (MA1-40 Affinity Bioreagents Inc, datos no publicados) respecto al utilizado en este trabajo (Zymed Cat no: 18-0172), sugiriendo que estas diferencias son metodológicas. Este estudio es el primero en demostrar diferencias en la expresión de RP en vacas preñadas y vacías. Tanto el epitelio luminal caruncular como glandular superficial de vacas preñadas contienen más RP que vacas vacías. El día 17 de gestación se ha establecido como el día en el que el ambiente materno reconoce la señal embrionaria (interferon-tau) y se ha demostrado efectos del mismo inhibiendo la expresión génica de los receptores de estrógenos y oxitocina (Robinson y col. 2001). El hecho de que la sensibilidad de los epitelios a la P4 sea mayor en hembras preñadas, podría explicar la acción sostenida de esta hormona sobre la secreción epitelial necesaria para la supervivencia del concepto previo a la implantación.

Apoyando esta hipótesis, encontramos que el estroma en las vacas preñadas es más inmunopositivo a RP que en las vacas vacías. Boos y col (1996) plantearon que existe una cooperación de las células positivas a PR del estroma adyacente al epitelio, a través de una acción parácrina, por la cual traducen las señales de la P4 mediante la secreción de factores de crecimiento. Son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.

En resumen, se ha demostrado que la presencia del embrión aumenta la sensibilidad potencial del útero (número de receptores) a la progesterona y que esta depende del tipo y localización celular.

SUMMARY

The effect of the presence of the embryo on the expression and localization of progesterone receptor (PR) was studied in pregnant and non-pregnant cows. The cows were slaughtered on Day 17 postovulation and the endometrium from the ipsilateral horn of the corpus luteum was dissected for PR determination by immunohistochemistry. The avidin-biotin-peroxidase system was used for PR immunolocalization. Eight different compartments were studied in the endometrium by 2 independent observers. Considering all cell compartments, there were more total negative cells to PR in non-pregnant animals. The luminal epithelium in the caruncle and the superficial glandular epithelium in pregnant cows had more positive cells to PR. Caruncular stroma (superficial and deep) and deep intercaruncular stroma of pregnant cows did not have more positive cells, but they were more intensively stained. This study demonstrated that the presence of the embryo increase PR expression in bovine endometrium, modifying in this manner, the potential sensitivity to progesterone.

BIBLIOGRAFIA

- Boos A, Meyer W, Schwartz R, Grunert E. *Animal Reproduction Science*, 1996, 44: 11-21.
Flint APF, Stewart HJ, Lamming PE, Payne JH. *J Reprod Fert* 1992, 45:53-58.
- Geisert RD, Pratt TN, Bazer FW, Mayes JS, Watson GH. *Reproduction, Fertility and Development*, 1994, 6: 749-760.
Jenner LJ, Parkinson TJ, Lamming GE. *J Reprod Fert* 1991, 91:49-58.
- Lamming GE, Mann GE. *J Reprod Fert* 1995, 103:69-75.
Meyer HH, Mittermeier T, Schams D. *Acta Endocrinologica* 1988, 118: 96-104.
Parkinson TJ, Lamming GE. *J Reprod Fert* 1990; 90:221-223.
- Perrot-Applanat M, Logeat F, Groyer-Picard MT, Milgrom E. *Endocrinology*, 1985, 116: 1473-1484.
Peters AR. *Animal Breeding Abstr* 1996, 64:8:587-598.
- Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. *Reproduction* 2001, 122: 965-979.
- Spencer TE, Bazer FW. *Biology of Reproduction*, 1995, 53: 1527-1543.
- Thatcher WW, Schmitt EJP, de la Sota RL, Burle J, Risco C, Staples CR, Drost M. Conferencia, Minisimposio sobre Fisiología y Manejo reproductivo postparto. Atlántida, Uruguay 1997:109.
- Wathes DC, Hamon M. *Journal of Endocrinology* 1993, 138: 479-491