

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DISTRIBUCIÓN DE LA METALOPROTEINASA DE LA MATRIZ  
EXTRACELULAR-2 (MMP-2) EN CÉRVIX OVINO DURANTE EL CICLO ESTRAL**

**por**

**Br. Daniela CASURIAGA MALLMANN**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2013**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

---

Dr. Danilo Fila

Segundo miembro (Tutor):

---

Dr. Marcelo Rodríguez Piñón

Tercer miembro:

---

Dr. Julio Olivera

Fecha:

23 de diciembre de 2013

Autor:

---

Daniela Casuriaga

## **AGRADECIMIENTOS**

Ésta tesis fue realizada en el Área de Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República. A todo el Área va mi agradecimiento, y particularmente al Dr. Marcelo Rodríguez-Piñón y a la Br. Rocío Gonzalez, tutor y cotutora de ésta tesis, respectivamente, que me guiaron en éste trabajo con mucha paciencia, dedicación y entusiasmo. A la Dra. Celia Tasende, responsable del Área, por su apoyo. A Perla y a todos mis compañeros del Área que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de éste trabajo.

A mi familia, amigos y a Fernando por su incondicional apoyo.

## TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
TABLA DE CONTENIDO .....	4
LISTA DE FIGURAS .....	5
RESUMEN .....	6
SUMMARY .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	10
OBJETIVOS .....	14
Objetivos Generales .....	14
Objetivos específicos .....	14
HIPÓTESIS .....	15
MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
Diseño Experimental .....	16
Localización y distribución de la MMP-2 .....	17
Análisis Estadísticos .....	19
RESULTADOS .....	20
Localización de la MMP-2 .....	20
Densidad celular total y densidad de células positivas a MMP-2 .....	20
%MMP-2 .....	22
Correlaciones entre DT, D+ y % MMP-2 .....	23
DISCUSIÓN .....	24
CONCLUSIONES .....	27
BIBLIOGRAFÍA .....	28

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Molde de silicona del canal cervical de la oveja adulta. . . . .	8
<b>Figura 2:</b> Síntesis y activación de la MMP-2. . . . .	12
<b>Figura 3:</b> Estructura de los dominios de la Gelatinasa MMP-2. . . . .	13
<b>Figura 4:</b> Concentraciones séricas de 17 $\beta$ -estradiol y Progesterona de ovejadas Corriedale adultas sacrificadas a los días 1, 6 o 13 luego del estro no sincronizado. . . . .	17
<b>Figura 5:</b> Síntesis y activación de la MMP-2 indicando los diferentes niveles de detección de la MMP-2 mediante inmunohistoquímica . . . . .	18
<b>Figura 6:</b> Imágenes de inmunohistoquímica de MMP-2. . . . .	20
<b>Figura 7:</b> Densidad celular total y Densidad de células positivas a MMP-2 en cérvix craneal (Cr) y caudal (Ca) de oveja Corriedale adultas ciclando. . . . .	20
<b>Figura 8:</b> Densidad celular total y Densidad de células positivas a MMP-2 en los estromas superficiales y profundos de los pliegues y de la pared de cérvix de ovejadas Corriedale adultas ciclando. . . . .	21
<b>Figura 9:</b> Densidad celular total en cérvix craneal (Cr) y caudal (Ca) de ovejadas Corriedale adultas en los Días 1, 6 y 13 luego del estro. . . . .	21
<b>Figura 10:</b> Porcentaje de células positivas a MMP-2 en los estromas superficiales y y profundos de los pliegues y de la pared de cérvix de ovejadas Corriedale adultas ciclando. . . . .	22
<b>Figura 11:</b> Porcentaje de células positivas a MMP-2 en cérvix craneal (Cr) y caudal (Ca) de ovejadas Corriedale adultas en los Días 1, 6 y 13 luego del estro. . . . .	22
<b>Figura 12:</b> Correlación entre Log de la densidad células positivas a MMP-2 y el Log del inverso de la densidad celular total. . . . .	23
<b>Figura 13:</b> Correlación entre Log del porcentaje de células positivas a MMP-2 y el Log de la densidad células positivas a MMP-2. . . . .	23

## RESUMEN

El objetivo de ésta tesis fue determinar la localización y distribución histológica de la metaloproteinasa de la matriz extracelular-2 (MMP-2) en cérvix ovino durante el ciclo estral. Cérvix de ovejas Corriedale adultas ciclando fueron obtenidos en los días 1 (n=7), 6 (n=6) o 13 (n=7) luego del estro (Día 0). La MMP-2 fue detectada mediante inmunohistoquímica en las zonas craneal (Cr) y caudal (Ca) del cérvix. Se evaluaron cuatro compartimentos histológicos (CH) del estroma: superficiales y profundos de los pliegues y de la pared (SFS, DFS y SWS, DWS, respectivamente). Se contaron las células positivas (tinción marrón) y negativas (núcleos teñidos con hematoxilina) (400x) en un total de 1000 núcleos de cada CH. En cada imagen se midió el área ocupada por cada CH, utilizando la herramienta de medición de área del software (Image-Pro Plus 6.0, Media Cybernetics Inc., WA, USA). Se calculó la densidad de células totales (DT) (células/mm<sup>2</sup>.1000<sup>-1</sup>), la densidad de células positivas (D+) (células positivas a MMP-2/mm<sup>2</sup>.1000<sup>-1</sup>) y el porcentaje de núcleos positivos (%MMP-2) sobre el total de núcleos (positivos más negativos) en cada CH y zona cervical. Los resultados (media±sem) fueron analizados por ANOVA (MixedProc, SAS). La inmunoseñal se observó en el estroma asociada mayoritariamente a fibroblastos activos, minoritariamente a inactivos y esporádicamente a leucocitos. La DT, la D+ y el %MMP-2 fueron mayores en Ca que en Cr (13.4±1.5, 2.92±0.07 y 1.96±0.06 vs 8.8±0.6, 0.57±0.02 y 0.32±0.01, respectivamente), (P<0.0001). Se observó que en la pared del cérvix ovino tanto la DT como la D+ y la proporción de células positivas a MMP-2 (%MMP-2) fueron mayores en el estroma superficial que en el profundo (17.4±1.2, 2.1±0.08 y 1.34±0.05 vs. 8.4±0.5, 0.41±0.02 y 0.24±0.02, respectivamente), (P<0.05). Sin embargo en los pliegues, si bien la DT fue mayor en el estroma superficial en relación al profundo (18.4±1.3 vs. 9.1±1.8, respectivamente) (P<0.05), no hubo diferencias entre dichos CH tanto para la D+ como para el %MMP-2. La DT no varió durante el ciclo estral en cérvix Cr, pero en Ca fue menor al Día 1 respecto a los Días 6 y 13 (10.9±1.9 vs.14.2±2.9 y 14.9±3.1), (P<0.001). El %MMP-2 fue mayor a los días 1 y 6 respecto al día 13 (0.77±0.03 y 0.33±0.03 vs. 0.1±0.009 respectivamente) (P<0.0001) y tendió a ser mayor al día 1 que al día 6 (0.77±0.03 vs. 0.33±0.03) (P=0.0892) en Cr, mientras que fue menor al día 1 que al día 13 en Ca (0.94±0.09 vs. 3.09±0.07, respectivamente), (P<0.0001). Estos resultados sugieren que en cérvix de oveja ciclando, los fibroblastos activos del estroma son la principal fuente de MMP-2. La zona Ca tendría un mayor potencial colagenolítico a cargo de la MMP-2 que la zona Cr, y el SWS respecto al DWS. Además, se registra un incremento diferencial de la MMP-2 a lo largo del eje longitudinal del cérvix en función del tiempo: primero en Ca, previo a la ovulación y luego en Cr alrededor de la misma. En conjunto, los datos muestran que la distribución de la MMP-2 en cérvix ovino difiere en el eje longitudinal cervical, entre los compartimentos histológicos y durante el ciclo estral, probablemente debido a la regulación ejercida por los estrógenos (E) y la progesterona (P) y a la presencia de factores locales reguladores.

## SUMMARY

The aim of this thesis was to determine the histological location and distribution of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) isozyme in the ovine cervix during the oestrous cycle. Cervical samples were obtained from Corriedale adult ewes at Days 1 (n=7), 6 (n=6) or 13 (n=7) after estrus detection (Day 0). MMP-2 was detected by immunohistochemistry in cranial (Cr) and caudal (Ca) cervical zones. Four histological stromal compartments (HC) were evaluated: superficial and deep from the fold stroma and from the wall stroma (SFS, DFS and SWS, DWS, respectively). Positive (brown stained) and negative (haematoxylin stained) MMP-2 nuclei were counted (400X) in 1000 cells in each HC. The area occupied by each HC was measured in each image, using the area measurement tool of the software (Image-Pro Plus 6.0, Media Cybernetics Inc., WA, USA). Total cell density (TD) ( $\text{cells}/\text{mm}^2 \cdot 1000^{-1}$ ), MMP-2 positive cell density (D+) ( $\text{MMP-2 positive cells}/\text{mm}^2 \cdot 1000^{-1}$ ) and positive nuclei percentage (%MMP-2) respect to the total nuclei (positives and negatives) were calculated in each HC and in cervical zones. The results (mean $\pm$ sem) were analyzed by ANOVA (Mixed Proc, SAS). The MMP-2 immunostaining was associated mainly to active fibroblasts, some to inactive fibroblasts and occasionally in leucocytes. The TD, D+ and %MMP-2 were higher in Ca than in Cr ( $13.4\pm 1.5$ ,  $2.92\pm 0.07$  and  $1.96\pm 0.06$  vs.  $8.8\pm 0.6$ ,  $0.57\pm 0.02$  and  $0.32\pm 0.01$ , respectively), ( $P<0.0001$ ). The TD, D+ and %MMP-2 were higher in SWS than in DWS ( $17.4\pm 1.2$ ,  $2.1\pm 0.08$  and  $1.34\pm 0.05$  vs.  $8.4\pm 0.5$ ,  $0.41\pm 0.02$  and  $0.24\pm 0.02$ , respectively), ( $P<0.05$ ). However, while the TD was higher in superficial stroma than in deep stroma in the folds ( $18.4\pm 1.3$  vs.  $9.1\pm 1.8$ , respectively), ( $P<0.05$ ), there were no differences between those for D+ and %MMP-2. The TD did not change during the oestrus cycle in Cr, while was lower on Day 1 than on Day 6 and 13 in Ca ( $10.9\pm 1.9$  vs.  $14.2\pm 2.9$  and  $14.9\pm 3.1$ ) ( $P<0.001$ ). The %MMP-2 was higher on Day 1 and 6 than on Day 13 ( $0.77\pm 0.03$  and  $0.33\pm 0.03$  vs.  $0.1\pm 0.009$ , respectively), ( $P<0.0001$ ), and trend to be higher on Day 1 than on Day 6 ( $0.77\pm 0.03$  vs.  $0.33\pm 0.03$ ) ( $P=0.0892$ ) in Cr, whereas was lower on Day 1 than on Day 13 in Ca ( $0.94\pm 0.09$  vs.  $3.09\pm 0.07$ , respectively), ( $P<0.0001$ ). These results suggest that the active fibroblasts are the main source of MMP-2 in the ovine cervix. The Ca cervical zone has a greater MMP-2 collagenolytic potential than Cr and SWS than DWS. Additionally, there was a time-dependent differential MMP-2 increment along the cervix: first in Ca, before ovulation and then in Cr, around the ovulation. Overall data show that the distribution of MMP-2 in the ovine cervix differs along the cervix, between the histological compartments and during the oestrus cycle, probably due to the estrogen (E) and progesterone (P) regulation and the presence of local regulatory factors.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cérvix ovino es un órgano tubular y fibroso, compuesto predominantemente por tejido conjuntivo (Moré, 1984). Hacia la luz, la mucosa forma pliegues excéntricos en forma de embudo con el vértice hacia caudal, no coincidentes entre sí, que interfieren con la canulación cervical (Halbert y col., 1990a; Kershaw y col., 2005) (Figura 1). Estos pliegues forman de 4-7 anillos cervicales que se proyectan en el lumen cervical determinando su estrechamiento, el que es más acentuado a nivel de los tres primeros anillos cervicales. Además, frecuentemente el segundo y el tercer anillo, contando desde el orificio cervical externo, están desalineados del primero. El grado de tortuosidad del cervix determinado por el número y características de los anillos presentes estuvo relacionado con la profundidad de penetración cervical medido con una cánula de inseminación artificial (IA) (Halbert y col., 1990a; Kershaw y col., 2005). Son éstas características anatómicas particulares del cérvix ovino lo que lo convierten en una de las principales limitantes para la aplicación de procedimientos transcervicales como la IA y la transferencia de embriones (TE).

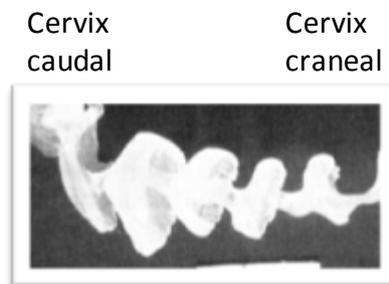


Figura 1: Molde de silicona del canal cervical de la oveja adulta. Naqvi y col., 2005.

Consecuentemente, la utilización de éstas biotecnologías reproductivas no han alcanzado aún, en ovinos, el nivel de desarrollo que tienen en bovinos (Salamon y Maxwell, 2000) limitando el progreso genético y productivo de la especie. La última información que encontramos al respecto reportó que sólo el 2% de las hembras ovinas son inseminadas artificialmente al año en el Uruguay (Fernández- Abella, 1995).

En la gran mayoría de las ovejas solo es posible la IA en el canal cervical caudal, resultando en bajos índices de concepción (Salamon y Maxwell, 2000). Se ha observado que la fertilidad aumenta proporcionalmente a la profundidad en que se realiza la deposición seminal en el canal cervical (IA cervical), a razón de un 7 a 12 % por cm (Eppleston y col., 1994) y es máxima cuando se hace directamente en la luz uterina (IA uterina) (Sayre y Lewis, 1997). El desarrollo de la inseminación por laparotomía o laparoscopia directamente en el cuerno uterino (IA uterina) ha mejorado los índices de concepción (Akinbami y col., 1990; Windsor y col., 1994; Sayre y Lewis, 1996). Además, ambas técnicas quirúrgicas son también utilizadas en la TE en ovinos, ya sea para la recuperación de embriones en la oveja donante, como para la siembra uterina en la oveja receptora. Sin embargo, éstas técnicas son consideradas de alto riesgo y costo, e impracticables a campo en majadas numerosas (Akinbami y col., 1990; Khalifa y col., 1992). Por lo tanto, el acceso al útero en forma transcervical es la alternativa que genera mayor expectativa (Salamon y Maxwell, 2000), para lo cual el cérvix constituye una barrera y un problema que debe ser resuelto.

En las dos últimas décadas se han desarrollado estrategias para dilatar el cérvix ovino y poder acceder a la matriz uterina transcervicalmente. La apertura física del cérvix utilizando fórceps (Halbert y col., 1990b) e instrumental diseñado especialmente para ovinos (Wulster-Radcliffe y Lewis, 2002) ha mejorado los índices de concepción, pero son de manejo engorroso y pueden producir efectos negativos sobre la fertilidad (Campbell y col., 1996; Wulster-Radcliffe y col., 2004) además de ser cuestionados por el “bienestar animal”. Alternativamente, se ha investigado la inducción hormonal de la dilatación cervical, estrategia basada en el conocimiento de la fisiología de la dilatación del cérvix (revisado en: Rodríguez-Piñón, 2003, 2006). Las bases endócrinas y moleculares de este fenómeno todavía no están claras, lo que limita diseñar protocolos racionales de inducción de la dilatación del cérvix ovino, en vías de desarrollar técnicas de IA y TE transcervicales.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El ciclo estral es el resultado de una cadena de eventos coordinados fundamentalmente por cuatro órganos (cerebro, hipófisis, ovarios y útero) que establecen vías neuroendócrinas y endócrinas de comunicación coordinando la función reproductiva (por revisión ver Goodman, 1994). El ciclo ovárico de la oveja, está regulado por la interrelación entre las hormonas producidas por éstos órganos: la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) de la hipófisis, el estradiol y la inhibina de los folículos ováricos, la progesterona (P) y la oxitocina (Ox) del cuerpo lúteo y la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) del útero (por revisión ver Goodman, 1994).

La oveja tiene un ciclo estral con una duración promedio de 17 días que puede dividirse en una fase folicular y una fase luteal. La fase folicular es aquella que se extiende desde la luteólisis (día 14-15 del ciclo) hasta la ovulación (día 1) y se caracteriza por la presencia de un folículo ovulatorio que produce altas concentraciones de E y por el comportamiento estral (estro) que dura entre 24-36 horas (por revisión ver Goodman, 1994). En el día del estro (día 0) se produce el pico preovulatorio de LH y la ovulación ocurre aproximadamente a las 24 h del mismo (Scaramuzzi y col., 1993). La fase luteal se inicia con la ovulación y es caracterizada por el desarrollo del CL, el aumento paulatino de las concentraciones circulantes de P y finaliza con la luteólisis. (por revisión ver Goodman, 1994). Los estrógenos (E) y la P controlan el ritmo del ciclo estral, participando en los mecanismos de retroalimentación negativos y positivos ("feedback loops") entre el eje ovario-hipotálamo-hipofisario (por revisión ver Goodman, 1994, Wathes y Lamming, 1995; MacCracken y col., 1999).

El cérvix se hace permeable en dos situaciones reproductivas particulares: al estro, permitiendo el ascenso de los espermatozoides y al parto, permitiendo el descenso y la expulsión del feto (Heydon y Adams, 1979). Los mecanismos fisiológicos de la dilatación cervical se han estudiado fundamentalmente durante el proceso del parto. El cérvix sufre cambios profundos durante el proceso de gestación y parto, basados especialmente en un activo metabolismo de su matriz extracelular, donde coexisten y se interrelacionan fenómenos moleculares y celulares, mayoritariamente descritos en la mujer y en roedores (Gorodeski 1996; El Maradny y col., 1997). La coordinación de estos fenómenos depende de los E y la P, actuando a través de sus receptores específicos (RE y RP, respectivamente) (Gorodeski, 1996; Stjernholm y col., 1996), directamente o a través de otras hormonas.

Se ha reportado que la penetrabilidad del cérvix ovino, medida con una cánula de IA, es mayor durante la fase folicular que en la fase luteal; sugiriendo que cierto grado de dilatación cervical al estro sería producto de los altos niveles de E y bajos de P (Kershaw y col., 2005). La caracterización de RE y RP en cérvix ovino durante el ciclo estral, mostró mayores concentraciones de ambos receptores al estro (día 1) respecto a la fase luteal (días 6 y 13) y mayores en la zona Ca respecto a la zona Cr del cérvix (Rodríguez-Piñón y col., 2008). Estos resultados demuestran que la sensibilidad cervical (en términos de receptores) a las hormonas esteroideas ováricas es mayor al estro que en la fase luteal, además de variar a lo largo del eje longitudinal del cérvix.

Se han descrito, en diversas especies, varios procesos dependientes de las hormonas esteroideas ováricas, entre éstos se encuentran los fenómenos de reorganización de la matriz extracelular cervical. Las hormonas esteroideas ováricas podrían modular los procesos de remodelación del conectivo cervical directa o indirectamente, a través del sistema Ox / prostaglandinas (PG) (Rajabi y col., 1991a, 1991b; Sayre y Lewis 1996). La Ox actúa a través de sus receptores de membrana específicos (ROx), cuya concentración en los órganos blanco determina la capacidad del órgano para responder al estímulo hormonal (Gimpl y Fahrenholz, 2001). La concentración del ROx en el cérvix ovino durante el ciclo estral fue mayor alrededor del estro que en la fase luteal, indicando una regulación positiva de los E y negativa de la P sobre la expresión del ROx (Matthews y Ayad, 1994). El ROx fue detectado por inmunohistoquímica tanto en el epitelio luminal como el estroma, aunque la inmunoseñal fue menor en éste último. Además, la señal inmunohistoquímica del ROx fue menor en la zona Ca del cérvix respecto a la zona Cr (Rodríguez-Piñón y col., 2013a). Estos hallazgos son sugerentes acerca del rol diferencial de la Ox en los diferentes CH efectores del cérvix ovino.

La Ox puede ejercer su acción estimulando la síntesis cervical de Prostaglandina E2 (PGE2), (Shemesh y col., 1997) como fue demostrado en el bovino (Fuchs y col., 2002). La síntesis de PG está limitada por una enzima clave, la ciclooxigenasa-2 (COX-2). En cérvix ovino la expresión de COX-2 aumentó al término de la gestación, coincidiendo con el pico de E previo al parto, tras una prolongada exposición a la P (Wu y col., 2005). También se encontró que el transcripto de COX-2 aumenta alrededor del estro, aunque solo en el estroma cervical (Kershaw y col., 2007). En ovejas gestadas a término se ha propuesto a la PGE2 como mediadora entre la acción de las hormonas esteroideas ováricas y la remodelación cervical (Ellwood y col., 1980; Ledger y col., 1983, Wu y col., 2005). En cérvix de ovejas ciclando se demostró un aumento en la proporción de colágeno respecto al músculo liso y un aumento de la cantidad de hialuronato al estro, asociados temporalmente con el aumento de los ARNm de la COX-2 y también de los receptores de PGE2 tipo 2 y 4 (Kershaw y col., 2007; Kershaw-Young y col., 2009; Perry y col., 2012). Kershaw-Young y col. (2009), proponen que la PGE2 se uniría a sus receptores y estimularía la síntesis de hialuronato, que causaría la desagregación de las fibras de colágeno de la matriz extracelular (MEC), culminando con la relajación cervical.

Por otro lado, en cérvix de ovejas ciclando se ha reportado que la concentración de colágeno fue menor al estro respecto a la fase lútea (Genovese y col., 2007), sugiriendo que en el cérvix ovino al estro, coexiste la desagregación de las fibras de colágeno con su degradación. La degradación de las fibras de colágeno depende de la actividad de las colagenasas, que integran la familia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) (Hulboy y col., 1997) compuesta por más de 20 miembros (isoenzimas) que degradan los componentes de la matriz extracelular (MEC) y de la membrana basal de manera zinc-dependiente. Las MMPs, como toda proteína, se sintetizan en dos fases conocidas como Transcripción y Traducción, son producidas como pro-enzimas (pro-MMP o forma latente, L) y secretadas a la MEC para ser activadas por proteólisis limitada (forma activada, A) (Figura 2).

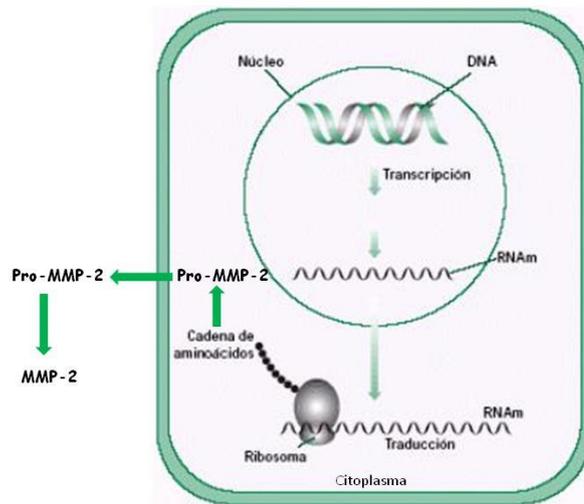


Figura 2: Síntesis y activación de la MMP-2.

Se ha reportado que las hormonas esteroideas afectan la expresión de la MMPs a nivel transcripcional y postranscripcional modificando la tasa de síntesis del ARNm y su vida media, respectivamente. Además, actúan regulando la actividad de las MMPs a nivel de su activación y modificando las concentraciones locales de inhibidores tisulares de las MMPs, llamados TIMP (Matrisian, 1990; Crawford y Matrisian, 1996). La regulación hormonal de las MMPs ha sido estudiada fundamentalmente en endometrio durante el ciclo menstrual o estral. La P es un potente inhibidor de la expresión de las MMPs en útero humano, tanto *in vitro* como *in vivo*, consecuentemente, los niveles de expresión de la mayoría de los miembros de la familia de las MMPs decrecen durante la fase proliferativa o luteal del ciclo menstrual, caracterizada por niveles plasmáticos de P elevados (Hulboy y col., 1997). La excepción a ésta generalidad es la MMP-2, la cual es la única que se expresa de manera significativa durante la fase luteal del ciclo (Rodgers y col., 1994; Brenner y col., 1996). El efecto de los E sobre la expresión de la MMPs no está bien dilucidado. Sin embargo, la remoción de todas las fuentes endógenas de hormonas esteroideas por ovariectomía y adrenalectomía resulta en una completa pérdida de síntesis y actividad colagenasa en útero de rata. Implantes de E en ésas mismas ratas indujeron a la síntesis de la enzima a concentraciones pre- ovariectomía sugiriendo que la actividad colagenasa uterina está bajo regulación de los E (Anuradha y Thampan, 1993).

Las MMPs contienen varios dominios que difieren según la isoenzima. Desde el extremo amino terminal se encuentran: un péptido señal, necesario para su transporte extracelular (SP); un "pro"dominio (forma latente o proMMPs), que es eliminado por clivaje (PRO) llevado a cabo mayoritariamente por otras MMPs y también en forma autocatalítica resultando en la forma activada (A) de la enzima; un dominio catalítico, que tiene un sitio de unión al Zinc y un sitio de unión para el sustrato específico, un dominio de fibronectina tipo II (FN), específico de las gelatinasas (MMP-2 o gelatinasa A) llamadas así por su capacidad de degradar el colágeno parcialmente desnaturalizado, que mejora la eficiencia de la degradación del colágeno y la gelatina (Hulboy y col., 1997; Krizkova y col., 2011), una región

bisagra (HG) y el dominio Hemopexina en extremo carboxi terminal que media las asociaciones con los componentes de la MEC e inhibidores (Figura 3).

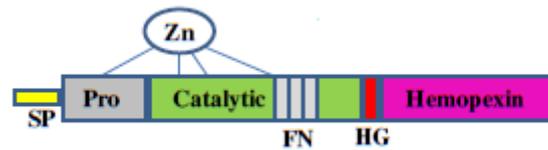


Figura 3: Estructura de los dominios de la MMP-2 (Gelatinasa A). Tomado de Krizkova y col, 2011.

Las MMPs y los TIMPs han sido implicados en la reabsorción y degradación de los tejidos en un amplio rango de procesos normales y anormales. Las MMPs son conocidas por cumplir un rol central en la catálisis de los componentes de la MEC y recientemente se les han adjudicado roles adicionales vinculados a la reproducción (Salamonsen, 1996; Hulboy y col., 1997). En cérvix humano al parto, se ha reportado el aumento de la isoenzima MMP-2 (Stygar y col., 2002). En cérvix ovino, mediante zimografía en SDS-PAGE, también se detectó que la actividad de la MMP-2, tanto en su forma L como en su forma A, fue mayor al día 1 que en los días 6 y 13 del ciclo estral. Además, la relación latente/activa (L/A) mostró una tendencia a ser menor al día 1 que al día 6 (Gonzalez y Rodríguez-Piñón, 2011). La mayor actividad de la MMP-2 y la menor relación L/A al día 1, coinciden con la disminución en la concentración del colágeno reportado previamente (Genovese y col., 2007) sugiriendo la participación de la MMP-2 en la degradación del colágeno cervical. Sin embargo, reportes previos no encontraron evidencias de colagenólisis en cérvix de ovejas durante la gestación y el parto (Raynes y col., 1988). Hasta el momento, no hemos encontrado reportes sobre la localización histológica y distribución de las MMPs en cérvix ovino. El estudio de la localización histológica y distribución de la MMP-2 contribuirá al conocimiento de las bases moleculares de la función cervical como paso fundamental para encarar la manipulación hormonal de la dilatación cervical.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Aportar evidencias científicas que contribuyan al conocimiento de los mecanismos fisiológicos de la remodelación de la matriz extracelular del cérvix ovino, como insumo básico para el desarrollo de las biotecnologías reproductivas transcervicales.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a. Localizar histológicamente la MMP-2 en cérvix Cr y Ca de ovejas Corriedale, en los días 1, 6 y 13 del ciclo estral.
- b. Evaluar la distribución histológica de la MMP-2 en cérvix Cr y Ca de ovejas Corriedale, en los días 1, 6 y 13 del ciclo estral.

#### **4. HIPÓTESIS**

La MMP-2 se expresa en el cérvix ovino y ésta expresión es diferencial en el eje longitudinal del cérvix, según el CH y a lo largo del ciclo estral.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Diseño experimental

El diseño experimental fue llevado a cabo en el campo experimental de Migués de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Canelones, Uruguay (35°S). Fueron utilizadas ovejas de raza Corriedale en estación reproductiva (entre febrero y marzo). Cuarenta ovejas adultas (boca llena), multíparas, de  $39.1 \pm 0.85$  de peso corporal y  $2.4 \pm 0.1$  media  $\pm$  s.e.m de condición corporal (escala de 0 a 5, 0: emaciada, 5: obesa; Rusell y col., 1969), que mostraron tener al menos un ciclo de duración normal en promedio (16 a 17 días, confirmado con retarjos durante 45 días previo al experimento) fueron sincronizadas con dos dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$  (150  $\mu$ g, Glandinex, Universal Lab., Montevideo, Uruguay) separadas por 6 días (modificado de Menchaca y col., 2004). Diez días luego del estro inducido pos segunda PGF2, se detectó nuevamente el estro cada 12h. Se seleccionaron los primeros 20 animales que mostraron celo los que fueron sacrificados al día 1 (D1, n=7), 6 (D6, n=6), o 13 (D13, n=7) luego del estro (día 0). Inmediatamente luego del sacrificio, el cérvix fue disecado y seccionado transversalmente en tercios (zona cervical Cr, contigua al útero; zona media y zona Ca, contigua a la vagina). Las piezas de tejido cervical obtenidas fueron fijadas en paraformaldehído (pH=7.4, 48h), incluidas en parafina y almacenadas a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

El status endócrino se confirmó mediante la determinación de las concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol (E2) y P por radioinmunoanálisis (RIA) (Rodríguez Piñón y col., 2008). Para la determinación de P, la extracción se hizo diariamente desde la segunda dosis de PGF2 $\alpha$  hasta el sacrificio y para la determinación de E<sub>2</sub>, se realizaron ventanas de muestreo con una frecuencia de 8 horas durante las últimas 48 horas previas al sacrificio. Las concentraciones plasmáticas de P (nmol/L) fueron basales en el día 0 y aumentaron paulatinamente desde el día 3, llegando al máximo entre los días 11 y 13. Las concentraciones de E2 (pmol/L) fueron máximas entre los días -1 y 0, manteniéndose en niveles bajos el resto de los días. Los perfiles sanguíneos de las hormonas confirman para cada grupo, la etapa del ciclo estral en que fueron sacrificados. En la últimas 48 hs previo a la obtención del tejido, los cervices del grupo D1 estuvieron expuestos a bajas concentraciones de P y concentraciones preovulatorias de E2 (fase folicular). Los cervices del grupo D6 estuvieron expuestos a concentraciones crecientes de P y bajas de E2 (fase luteal temprana). En el grupo D13, los cervices se obtuvieron luego de la exposición a concentraciones máximas de P y basales de E2 (fase luteal tardía) (Figura 4).

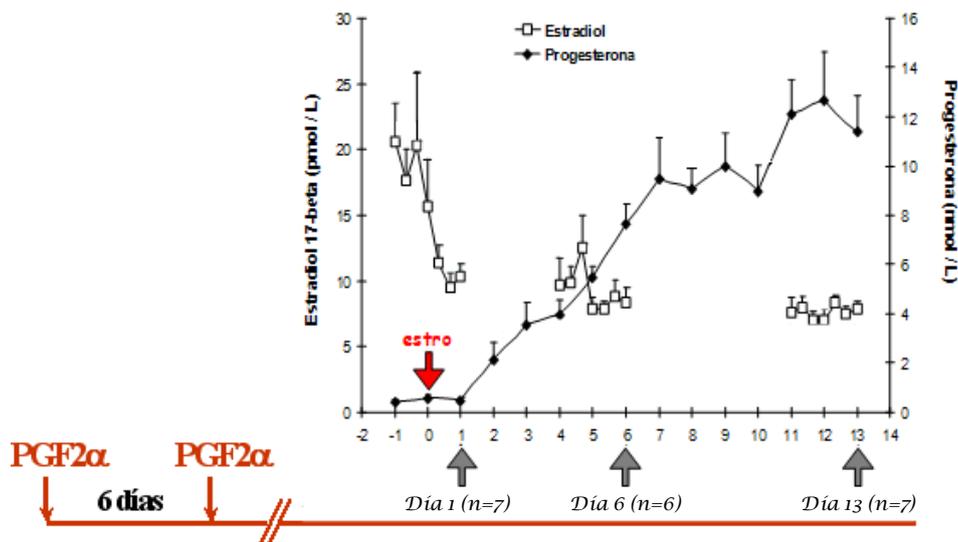


Figura 4: Concentraciones séricas (mean  $\pm$  pooled s.e.m.) de 17 $\beta$ -estradiol (pmol/L) y Progesterona (nmol/L) de ovejas Corriedale adultas sacrificadas (flechas grises) a los días 1, 6 o 13 luego del estro (día 0) espontáneo (no sincronizado). La sincronización de las ovejas fue realizada previamente con 2 dosis de un análogo sintético de PGF2 $\alpha$  (150  $\mu$ g, Glandinex, Universal Lab., Montevideo, Uruguay) separadas por 6 días, se utilizó el celo espontáneo posterior al inducido (Rodríguez Piñón y col., 2008)

## 5.2 Localización y distribución de la MMP-2

La detección de la MMP-2 se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica en las muestras obtenidas de cérvix Cr y Ca. Las muestras fueron seccionadas con micrótopo (5 $\mu$ m) y montadas sobre portaobjetos de alta adherencia (SuperFrost®). Los cortes fueron desparafinados, hidratados y se realizó la recuperación antigénica con buffer citrato de sodio 0.01 M (pH=6.0) en vaporera durante 30 min. Se realizó el bloqueo de las reacciones inespecíficas con suero normal de conejo (non-immunoblocking-Vactastain ABC-kit, Elite, Cat # S-2000) y de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno en metanol (7:3). Las muestras se incubaron durante 16 hs en cámara húmeda y oscura a 4°C con el Anticuerpo primario contra MMP-2. Se utilizó como anticuerpo primario un Anticuerpo policlonal (hMMP-2 policlonal K20, en cabra, Cat N° sc-8835, Santa Cruz Biotechnology, Inc.CA, USA), que actúa contra un péptido ubicado cerca del extremo carboxi terminal, por lo que éste anticuerpo permite detectar el epítipo presente en varios de los pasos en la síntesis de la MMP-2: la pro-MMP-2 en su forma inmadura sintetizándose, la pro-MMP-2 madura tanto intra como extracelular y también la MMP-2 activada (Figura 5).

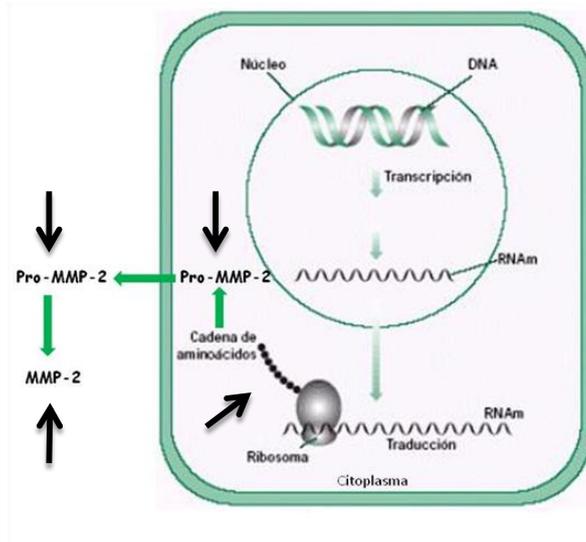


Figura 5: Síntesis y activación de la MMP-2. Las flechas negras indican los diferentes niveles de detección de la MMP-2 mediante inmunohistoquímica.

El reconocimiento y amplificación de la inmunoseñal se realizó mediante el sistema avidina-biotina inmunoperoxidasa, utilizando un anticuerpo secundario biotinilado (IgG equina biotinilada anti-cabra, Cat # PK-6105, Vector Laboratories, CA, USA), el sistema streptavidina-biotina peroxidasa (ABC-kit, Vector Laboratories, CA, USA) y diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidina en H<sub>2</sub>O mQ, DAB kit, Cat N° SK-4100; Vector Laboratories, CA, USA) como sustrato. Los controles negativos se realizaron por ausencia de anticuerpo primario. La contratinción se realizó con Hematoxilina (Mayer).

Para evaluar la distribución de la inmunoseñal primero se realizó un paneo general de todas las muestras. A partir de ésta observación, se determinaron los CH a evaluar. Como los epitelios no manifestaron inmunoseñal, los CH que se evaluaron fueron: estromas de los pliegues (superficial y profundo, SFS y DFS, respectivamente) y estromas de la pared (superficial y profundo, SWS y DWS, respectivamente) de cada zona cervical a los días 1 (n=7), 6 (n=5) y 13 (n=7) del ciclo estral. Se tomaron imágenes de cada CH utilizando un microscopio Olympus (BX41) con cámara incorporada conectado a una computadora ejecutando el software Infinity Capture. Se consideraron positivas aquellas células donde el color marrón, independientemente de su intensidad, se localizó perinuclear y pericelularmente. Se contaron las células positivas y negativas (núcleos teñidos con hematoxilina) en un total de 1000 núcleos de cada CH. En cada imagen se midió el área ocupada por cada CH, utilizando la herramienta de medición de área del software (Image-Pro Plus 6.0, Media Cybernetics Inc., WA, USA). Con éstos datos se calculó la densidad de células totales (DT) (células/mm<sup>2</sup>.1000<sup>-1</sup>), la densidad de células positivas (D+) (células positivas a MMP-2/mm<sup>2</sup>.1000<sup>-1</sup>) y el porcentaje de núcleos positivos (%MMP-2) sobre el total de núcleos (tomando en cuenta los núcleos positivos y los negativos) en cada CH y zona cervical. En total se analizaron 2000 imágenes.

### 5.3 Análisis Estadísticos

Tanto las DT y D+ como el %MMP-2 mostraron distribuciones sesgadas no normales (Kolmogorov-Smirnov tests, D'Agostino y Pearson omnibus normality tests y Shapiro-wilk tests, Prism 5 for Windows, GraphPad Software Inc. 2007). La DT fue normalizada aplicando el Log 1/x, mientras que la D+ y el %MMP-2 se normalizaron mediante la aplicación del Log x. Las tres variables normalizadas fueron analizadas por análisis de varianza (ANOVA) aplicando el modelo general lineal para análisis de varianzas (Mixed Proc, Statistical Analysis Systems SAS, Institute, Cary, NC, USA, 2000). Se incorporaron al análisis el efecto fijo de la zona cervical (Cr y Ca), los diferentes CH (SFS, DFS, SWS y DWS), el día del ciclo estral (1, 6 y 13), y sus interacciones. Para establecer relaciones entre las variables se utilizó el test de correlación de Pearson (Prism 5). Los resultados fueron expresados como las medias  $\pm$  error estándar de la media (sem), tomando como nivel de significación  $P < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Localización de la MMP-2

Se detectó inmunoseñal positiva a MMP-2 en el estroma de todas las muestras evaluadas, no detectándose inmunoseñal en los epitelios. La inmunoseñal estuvo asociada mayoritariamente a fibroblastos activos, en menor medida a inactivos y esporádicamente a leucocitos (Figura 6).

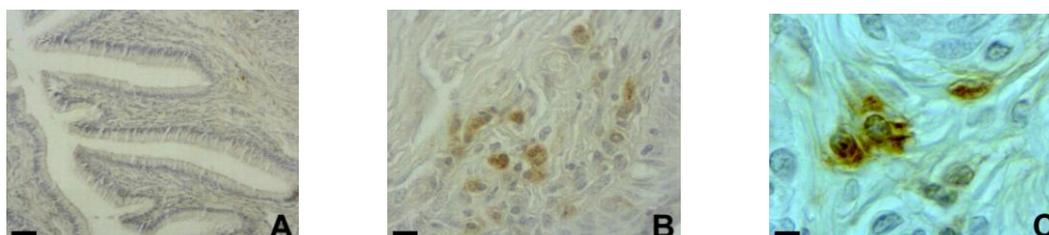


Figura 6: Imágenes de inmunohistoquímica de MMP-2. A) Negativo (barra= 80µ). B) Positivo (barra= 20µ). C) Positivo con lente de inmersión (barra=8µ), se observa la inmunoseñal asociada a fibroblastos morfológicamente activos.

### 6.2 Densidad celular total (DT) y densidad de células positivas a MMP-2 (D+)

Hubo un efecto de día del ciclo estral ( $P < 0.03$ ), zona cervical ( $P < 0.0001$ ) y de CH ( $P < 0.0001$ ), así como una interacción entre día del ciclo estral y zona cervical ( $P < 0.001$ ) para la DT. Para la D+ hubo un efecto significativo de zona cervical ( $P < 0.0001$ ) y de los CH ( $P < 0.0001$ ).

La DT (células/mm<sup>2</sup>.1000<sup>-1</sup>) fue menor al día 1 (10.2±1.8) que al día 13 (11.8±2.6), las que no fueron diferentes del día 6 (10.8±3.0).

Tanto la DT como la D+, fueron menores en craneal que en caudal (Figura 7).

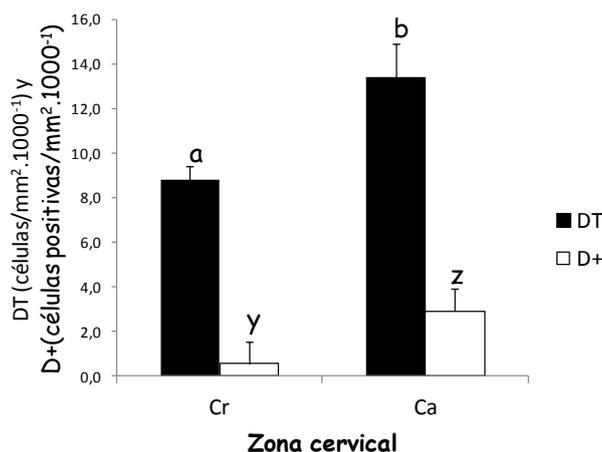


Figura 7: Densidad celular total (DT, células/mm<sup>2</sup>.1000<sup>-1</sup>) y Densidad de células positivas a MMP-2 (D+, células positivas/mm<sup>2</sup>.1000<sup>-1</sup>) en cervix craneal (Cr) y caudal (Ca) de ovejas Corriedale adultas ciclendo (n=14 en cada zona). Valores (mean ± s.e.m.) marcados con diferentes letras difieren significativamente para cada serie ( $P < 0.0001$ ).

La DT fue mayor en los estromas superficiales (SFS y SWS) que en los profundos (DFS y DWS), mientras que la D+ fue mayor en el SFS, DFS y en el SWS que en el DWS y tendió a ser mayor en el SWS que en el DFS (P=0.07) (Figura 8).

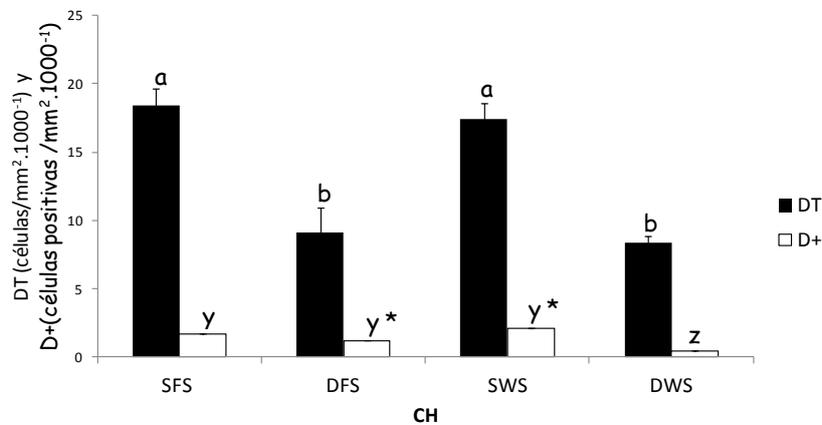


Figura 8: Densidad celular total (DT, células/mm<sup>2</sup> · 1000<sup>-1</sup>) y Densidad de células positivas a MMP-2 (D+, células positivas/mm<sup>2</sup> · 1000<sup>-1</sup>) en los estromas superficiales y profundos de los pliegues (SFS y DFS, respectivamente) y de la pared (SWS y DWS, respectivamente) de cervix de ovejas Corriedale adultas ciclando (n=14 en cada compartimento del estroma). Valores (mean ± s.e.m.) marcados con diferentes letras difieren significativamente para cada serie (P<0.0001).

La DT no varió durante el ciclo estrol en cervix Cr, pero en Ca fue menor al Día 1 respecto a los Días 6 y 13 (Figura 9).

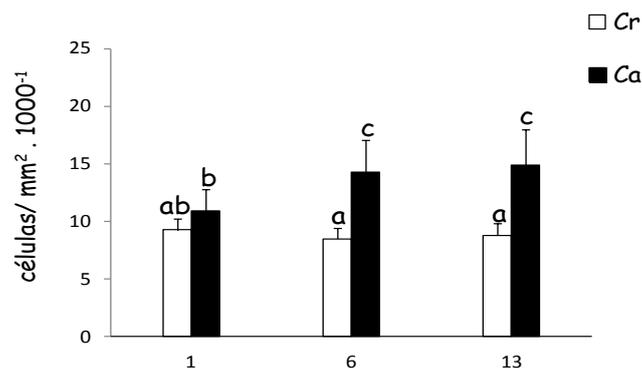


Figura 9: Densidad celular total en cervix craneal (Cr) y caudal (Ca) de ovejas Corriedale adultas en los Días 1 (n=4), 6 (n=3) y 13 (n=7) luego del estro (día 0). Valores (mean ± s.e.m.) marcados con diferentes letras difieren significativamente (P<0.001).

### 6.3 %MMP-2

Hubo un efecto significativo de zona cervical ( $P<0.0001$ ), de los CH ( $P<0.007$ ) y de la interacción de día del ciclo estral y zona cervical ( $P<0.0001$ ) sobre el %MMP-2.

El %MMP-2 fue menor en Cr ( $0.32\pm 0.01$ ) que en Ca ( $1.96\pm 0.06$ ). El %MMP-2 fue mayor en el DFS y en el SWS en relación al DWS. Además tendió a ser mayor en el SWS que en el SFS (Figura 10).

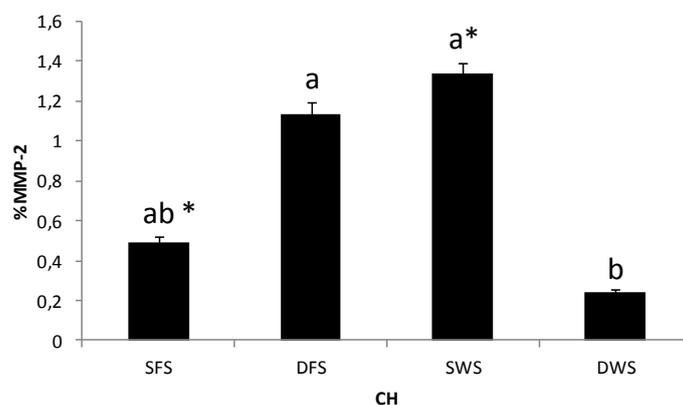


Figura 10: Porcentaje de células positivas a MMP-2 (%MMP-2) en los estromas superficiales y profundos de los pliegues (SFS y DFS, respectivamente) y de la pared (SWS y DWS, respectivamente) de cervix de ovejas Corriedale adultas ciclando ( $n=19$  en cada compartimento) Valores (mean  $\pm$  s.e.m.) marcados con diferentes letras difieren significativamente para cada serie ( $P<0.05$ ) y marcados con un asterisco tienden a ser diferentes ( $P=0.0664$ ).

El %MMP-2 fue mayor a los días 1 y 6 respecto al día 13 y tendió a ser mayor al día 1 que al día 6 ( $P=0.0892$ ) en Cr; mientras que fue menor al día 1 que al día 13 en Ca (Figura 11).

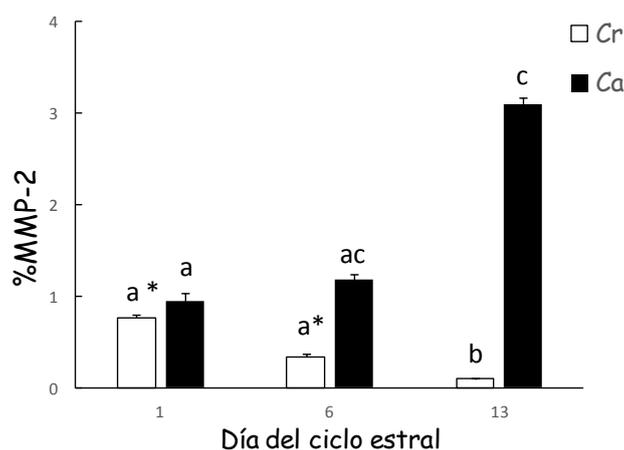


Figura 11: Porcentaje de células positivas a MMP-2 (%MMP-2) en cervix craneal (Cr) y caudal (Ca) de ovejas Corriedale adultas en los Días 1 ( $n=7$ ), 6 ( $n=5$ ) y 13 ( $n=7$ ) luego del estro (día 0). Valores (mean  $\pm$  s.e.m.) marcados con diferentes letras difieren significativamente ( $P<0.0001$ ) y marcados con un asterisco tienden a ser diferentes ( $P=0.0892$ ).

#### 6.4 Correlaciones entre DT, D+ y % MMP-2

Hubo correlación positiva entre la D+ y DT ( $r=0.5591$ ,  $P<0.0001$ ,  $b=125.9\pm 2.5$ ,  $n=69$ ) y entre el %MMP-2 y la D+ ( $r=0.9684$ ,  $P<0.0001$ ,  $b=12.6\pm 1.1$ ,  $n=69$ ) (Figuras 12 y 13).

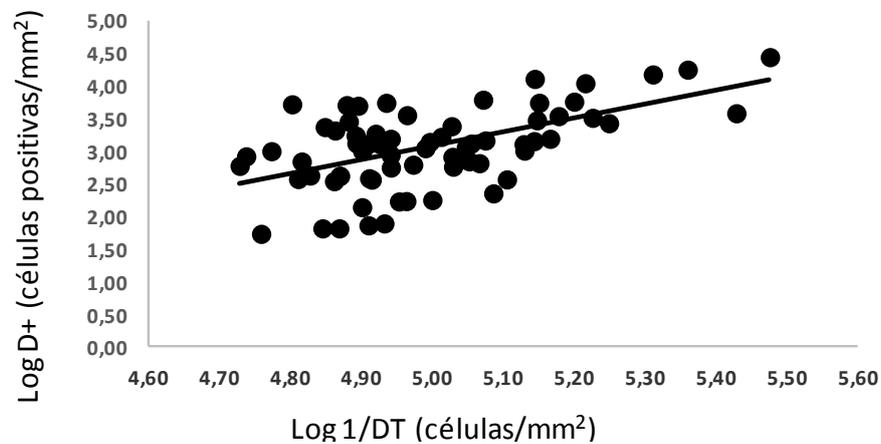


Figura 12: Correlación entre Log de la densidad células positivas a MMP-2 (Log D+, células positivas/mm<sup>2</sup>) y el Log del inverso de la densidad celular total (Log 1/ DT, (células/mm<sup>2</sup>)) ( $r=0.5591$ ,  $P<0.0001$ ,  $b=125.9\pm 2.5$ ,  $n=69$ ).

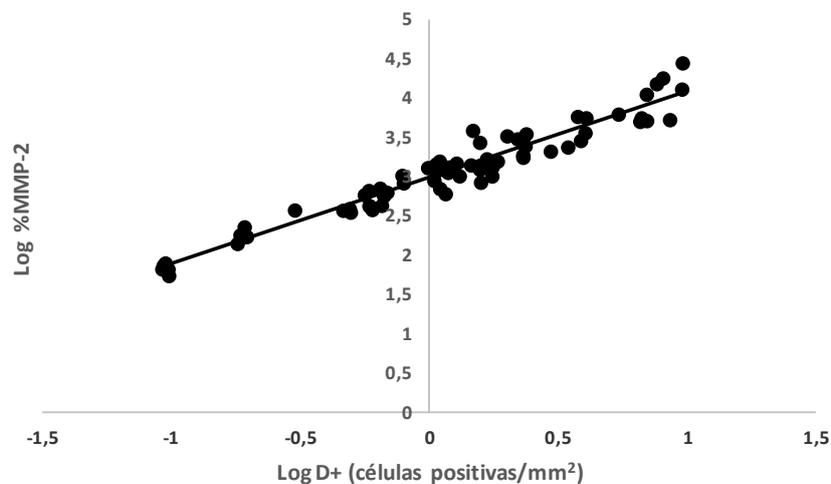


Figura 13: Correlación entre Log del porcentaje de células positivas a MMP-2 (Log %MMP-2) y el Log de la densidad células positivas a MMP-2 (Log D+, células positivas/mm<sup>2</sup>) ( $r=0.9684$ ,  $P<0.0001$ ,  $b=12.6\pm 1.1$ ,  $n=69$ ).

## 7. DISCUSIÓN

Éste trabajo es el primer reporte en donde se localiza y semicuantifica la presencia de MMP-2 en cérvix ovino durante el ciclo estral. La presencia de MMP-2 ha sido previamente reportada en cérvix de vaca, mujer y rata pero siempre asociado a la gestación, parto o procesos tumorales (Davidson B y col., 1998, Stygar y col., 2002, Van Engelen y col., 2008).

La inmunoseñal de la MMP-2 fue específica de ésta proteína dado que el control negativo realizado por ausencia de anticuerpo primario no manifestó dicha señal. La misma se presentó en el estroma, no detectándose en el epitelio, y estuvo asociada mayoritariamente a fibroblastos activos, si bien también resultaron positivos a MMP-2 algunos fibroblastos inactivos y, en menor medida, algunos leucocitos. Esto concuerda con Stygar y col. (2002) quien reportó la presencia de MMP-2 únicamente en el estroma y a los fibroblastos del estroma cervical como la principal fuente de MMP-2, aunque también encontró inmunoseñal en algunos leucocitos y células musculares lisas. Además en cérvix de vaca a término el ARNm de la MMP-2 y su proteína fueron localizados en la matriz extracelular y en las células musculares lisas (van Engelen y col., 2008). Esto nos permite sugerir que la MMP-2 es sintetizada por varios tipos celulares pero que los fibroblastos activos serían la fuente principal de MMP-2 en cérvix ovino.

Reportes previos realizados en cérvix ovino durante el ciclo estral demostraron mediante zimografía en SDS-PAGE la actividad de la MMP-2, y además, mediante zimografía *in situ*, localizaron la actividad gelatinasa en el estroma y en el epitelio cervical de los mismos animales. (Rodríguez- Piñón y col., 2013b). Estos datos indicarían que la proteína detectada por inmunohistoquímica sería biológicamente activa.

Los datos obtenidos en éste estudio muestran que tanto la DT como la D+ fueron mayores en Ca respecto a la zona Cr, lo que podría indicar que la D+ depende de la DT, concordando con la correlación positiva obtenida entre ambas. La proporción de células positivas a MMP-2 (%MMP-2) también fue mayor en la zona Ca, sugiriendo que otros factores además de la DT estarían implicados en la mayor expresión de la MMP-2 en Ca. Reportes previos en donde se caracterizaron los RE y RP en cérvix ovino durante el ciclo estral, determinaron mayores concentraciones de dichos receptores en Ca respecto a la zona Cr (Rodríguez-Piñón y col., 2008) sugiriendo una mayor sensibilidad cervical (en términos de receptores) a las hormonas esteroideas ováricas de la zona Ca en relación a la Cr. Gorodeski (1996) y Stjernholm y col. (1996) plantearon que la coordinación de los fenómenos de reorganización de la MEC, en donde están implicadas las MMPs, dependen de los E y la P, actuando a través de sus receptores específicos (RE y RP, respectivamente). Además, Hulbooy y col. (1997) indica específicamente que la expresión de las MMPs estaría regulada por las hormonas esteroideas ováricas. Esto nos permite sugerir que el mayor %MMP-2 observado en la zona Ca podría deberse también a la existencia de una regulación hormonal diferencial de la MMP-2 dependiente de la zona cervical y que la zona Ca tendría un mayor potencial colagenolítico a cargo de la MMP-2. Esto último puede ser relevante al considerar el diseño de protocolos que incluyan tratamientos localizados de inducción de la dilatación cervical, en vías de desarrollar técnicas de IA y TE transcervicales.

Se observó que en la pared del cérvix ovino tanto la DT como la D+ y la proporción de células positivas a MMP-2 (%MMP-2) fueron mayores en el estroma superficial (SWS) que en el profundo (DWS), indicando que la DT no es el único determinante de la mayor inmunoseñal de la MMP-2 en el SWS. En los pliegues, si bien la DT fue también mayor en el estroma superficial en relación al profundo, no hubo diferencias entre dichos CH tanto para la D+ como para el %MMP-2, sugiriendo que la expresión de la MMP-2 en los pliegues sería independiente de la DT. Esto sugiere la existencia de factores locales como citoquinas y factores de crecimiento (Hulboy y col, 1997) que estimularían la síntesis de la MMP-2 por los fibroblastos del estroma, en forma diferencial según el CH. Se sugiere la existencia de roles biológicos diferenciales entre dichos CH y un mayor potencial colagenolítico del SWS con respecto al DWS.

El %MMP-2 fue mayor a los días 1 y 6 respecto al día 13 y tendió a ser mayor al día 1 que al día 6 en Cr, lo que sugiere que la MMP-2 estaría regulada positivamente por los E y negativamente por la P en la zona Cr. Se ha reportado que las hormonas esteroideas afectan la expresión de la enzima a nivel transcripcional y postranscripcional modificando la tasa de síntesis del ARNm y su vida media respectivamente (Matrisian, 1990; Crawford y Matrisian, 1996). Trabajos previos determinaron que la vida media de los ARNm de las MMPs puede variar entre 12 y 150 hs indicando una gran estabilidad del transcrito (Brinckerhoff y col, 1986; Overall y col, 1991a). Además, en útero de rata prepúber, el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol aumentó la expresión de las MMP-3, -7 y -9 rápidamente (4h post-administración), sin embargo, el aumento de la expresión de la MMP-2 fue más tardío, registrándose a las 48 h (Russo y col., 2009). Es posible que la inmunoseñal observada en la zona Cr al día 1 sea el resultado de una estimulación de la expresión génica que se haya dado unos días antes, entre la luteólisis y el estro, cuando se produce el aumento preovulatorio de estrógenos (Días -1 y -2, ver Figura 4). Esto coincide con reportes previos que determinan una mayor actividad de la MMP-2 al día 1, tanto en su forma latente (pro-enzima) como en su forma activada, que a los días 6 y 13 del ciclo estral ovino y una tendencia de la relación latente/activa (L/A) de la enzima a ser menor al día 1 que al día 6, indicando un incremento de la actividad colagenasa (Rodríguez-Piñón y col., 2013b). Al progresar el ciclo las concentraciones de E disminuyen lo que consecuentemente determina una menor estimulación de la expresión génica traduciéndose en una menor expresión de la enzima observada en los días 6 y 13 del ciclo. El mayor %MMP-2 al día 1, la mayor actividad de la MMP-2 y la menor relación L/A de la enzima al día 1, coinciden con la disminución en la concentración del colágeno reportado previamente (Rodríguez-Piñón y col., 2013b), sugiriendo la participación de la MMP-2 en la degradación del colágeno cervical al estro en la zona Cr.

Sin embargo, el %MMP-2 fue menor al día 1 que al día 13 en Ca, indicando que un aumento de la expresión de la MMP-2 se daría previo a la luteólisis en ésta zona cervical, bajo concentraciones plasmáticas elevadas de progesterona. Esto sugiere que la expresión de la enzima en la zona Ca, a diferencia de la zona Cr, estaría regulada principalmente por la P. En útero humano, la MMP-2 se expresa durante todo el ciclo estral, incluso durante la fase proliferativa o luteal, bajo predominio de la P (Hulboy y col., 1997), a diferencia de la mayoría de los miembros de la familia de

las MMPs que se inhiben a concentraciones elevadas de P. La acción genómica de la P se ejerce a través de su receptor nuclear específico (RP) (Couse y col., 2006). En cérvix humano, se han reportado dos de las tres isoformas conocidas del RP, el RP A y el RP B (Stjernholm-Vladic y col., 2004). Durante el proceso del parto, ambas isoformas disminuyen su concentración, aunque la isoforma RP B lo hace más intensamente, determinando un aumento de la relación RP A/RP B. Considerando que la isoforma RP B cumple una función represora de la RP A, los autores explican el levantamiento de la acción inhibitoria de la P sobre la dilatación cervical a término mediante la alteración en la relación de ambas isoformas. Por otra parte, se ha reportado que en placentas humana con sobreexpresión de la isoforma RP B, la P disminuye la expresión de la MMP-2, mientras que la sobreexpresión de las isoformas RP A y RP C la aumenta (Goldman y col., 2007). En conjunto, estos trabajos podrían estar indicando que, al menos en la zona Ca, la P podría ejercer un efecto inductor de la expresión de la MMP-2, mediante modificaciones en la relación entre las isoformas de sus receptores.

El diferente patrón de distribución de la inmunoseñal de la MMP-2 durante el ciclo estral en función de las zonas cervicales indicaría que la expresión de la enzima está regulada diferencialmente por las hormonas esteroideas ováricas en el eje longitudinal del cérvix ovino. Sin embargo, no se debe descartar que factores locales, como los ya nombrados previamente, puedan estar influyendo en éste patrón diferencial (Hulboy y col., 1997). Considerando que el aumento de la expresión de la MMP-2 ocurrió al día 13 en cérvix Ca y al día 1 en el Cr, se podría especular que existe un incremento diferencial de la MMP-2 a lo largo del eje longitudinal del cérvix en función del tiempo: primero en Ca previo a la ovulación y luego en Cr alrededor de la misma. Esto estaría de acuerdo con el rol diferencial que cumplen ambas regiones cervicales al momento de la monta, la MMP-2 aumentaría su actividad previo al momento de la monta para inducir la relajación cervical y permitir el progreso ascendente de los espermatozoides y posteriormente lo haría en el cérvix Cr. En acuerdo con esto, en estudios sobre el transporte espermático, Hawk y col. (1978) encontraron diferencias en el tiempo de permanencia de los espermatozoides en ambas regiones cervicales.

## **8. CONCLUSIONES**

En cérvix de oveja ciclando, los fibroblastos activos del estroma son la principal fuente de MMP-2. La zona cervical Ca tendría un mayor potencial colagenolítico a cargo de la MMP-2 que la Cr, y el SWS respecto al DWS. Además, se registra un incremento diferencial de la MMP-2 a lo largo del eje longitudinal del cérvix en función del tiempo: en Ca previo a la ovulación y en Cr alrededor de la misma. En conjunto, los datos muestran que la distribución de la MMP-2 en cérvix de oveja difiere en el eje longitudinal cervical, entre los compartimentos histológicos y durante el ciclo estral, probablemente debido a la regulación ejercida por los E y la P y a la presencia de factores locales reguladores.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anuradha P, Thampan RV (1993). Hormonal regulation of rat uterine collagenase. *Arch Biochem Biophys* 303: 81-89.
2. Akinbami M, Meredith S, Warren J, Anthony R, Day B (1990). Cervical dilatation, conception rate and concentration of progesterone and 17 $\beta$ -estradiol, in postpartum ewes treated with porcine relaxin. *Theriogenology* 34: 927-940.
3. Brenner RM, Rudolph LA, Matrisian LM, Slayden OD (1996). Nonhuman primate models: Artificial menstrual cycles, endometrial matrix metalloproteinases and subcutaneous endometrial grafts. *Hum. Reprod.* 11: in press.
4. Brinckerhoff CE, Plucinska IM, Sheldon LA, O Connor GT (1986). Half- Life of Synovial Cell Collagenase mRNA is Modulated by Phorbol Myristate Acetate but No by All- Trans- Retinoic Acid or Dexamethasone. *Biochemistry* 25: 6378-6384.
5. Campbell JW, Harvey TG, McDonald MF, Sparksman RI (1996). Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology* 45: 1535-1544.
6. Couse JF, Hewitt SC, Korach KS (2006). Steroid receptors in the ovary and uterus, En: Couse JF. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. St. Louis. Ed JD Neill, Elsevier Academic Press, , pp.593-678.
7. Crawford HC, Matrisian LM (1996). Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enz. Prot.* 49: 20-37.
8. Davidson B, Goldberg I, Liokumovich P, Kopolovic J, Gotlieb WH, Lerner-Geva L, Reder I, Ben-Baruch G and Reich R (1998). Expression of metalloproteinases and their inhibitors in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Internat. J. Gynecol. Pathol.* 17: 295-301.
9. El Maradny E, Kanayama N, Kobayashi H, Hossain B, Khatun S, Liping S, Kobayashi T, Terao T (1997). The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Hum Reprod* 12: 1080-1088.
10. Ellwood DA, Mitchell MD, Anderson AB, Turnbull AC (1980). Specific changes in the in vitro production of prostanoids by the ovine cervix at parturition. *Prostaglandins* 19: 479-488.
11. Eppleston J, Salamon S, Moore NW, Evans G (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 36: 211-225.
12. Fernández-Abella DH (1995). *Temas de reproducción ovina e inseminación artificial en bovinos y ovinos*. Ed. Universidad de la República, Montevideo.
13. Fuchs AR, Graddy LG, Kowalski AA, Fields MJ (2002). Oxytocin induces PGE2 release from bovine cervical mucosa in vivo. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 70: 119-129.
14. Genovese P, Gonzalez R, Bielli A, Rodríguez-Piñón M (2007). Determinación bioquímica e histoquímica de colágeno en cervix caudal de ovejas durante el ciclo estral. VII Simposio de Reproducción Animal, Córdoba-Argentina, pp.324.
15. Gimpl G, Fahrenholz F (2001). The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. *Physiol Rev* 81:629-683.

16. Goodman RL (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. En: *The Physiology of Reproduction* (1994). Eds. E Knobil, JD Neill 2° ed. Raven Press Ltd, New York, Cap.2, pp.659-709.
17. Goldman S, Shalev E (2007). Progesterone receptor isoforms profile, modulate matrix metalloproteinase 2 expression in the decidua. *Am J Obstet Gynecol.* 197:604.e1-8.
18. Gonzalez R, Rodríguez-Piñón M (2011). Extracellular Matrix metalloproteinases (MMPs) -2 and -9 activity in cervix of ewes during the estrous cycle). I Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal, Viña del Mar, Chile.
19. Gorodeski GI (1996). The cervical cycle. En: Gorodeski GI. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Philadelphia, Eds. Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z Lippincott-Raven Publishers, pp.301-324.
20. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC (1990a). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 33: 977-992.
21. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC (1990b). A technique for transcervical intrauterine insemination of the ewes. *Theriogenology* 33: 993-1010.
22. Hawk HW, Conley HH, Cooper BS (1978). Number of sperm in the oviducts, uterus, and cervix of mated ewe as effected by exogenous estradiol. *J Anim Sci*; 46:1300-1308.
23. Heydon RA, Adams NR (1979). Comparative morphology and mucus histochemistry of the ruminant cervix: differences between crypt and surface epithelium. *Biol Reprod* 21: 557-562.
24. Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 3 (1):27-45.
25. Kershaw CM, Khalid M, Mc Gozan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 64: 1225 – 1235.
26. Kershaw CM, Scaramuzzi RJ, McGowan MR, Wheeler-Jones CP, Khalid M (2007). The expression of prostaglandin endoperoxide synthase 2 messenger RNA and the proportion of smooth muscle and collagen in the sheep cervix during the estrous cycle. *Biol Reprod* 76: 124-129.
27. Kershaw-Young CM, Khalid M, McGowan MR, Pitsillides AA, Scaramuzzi RJ (2009). The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. *Theriogenology* 72: 251-261.
28. Khalifa R, Sayre B, Lewis G (1992). Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *J Anim Sci* 70: 38-42.
29. Krizkova S, Zitka O, Masarik M, Adam V, Stiborova M, Eckschlager T, Chavis G and Kizek R (2011). Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity. *Trends in Analyt. Chem.* 30:1819-1832.
30. Ledger WL, Ellwood DA, Taylor MJ (1983). Cervical softening in late pregnant sheep by infusion of prostaglandin E-2 into a cervical artery. *J Reprod Fertil* 69: 511-515.
31. Matrisian LM (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *TIG*, 6: 121-125.
32. Matthews EL, Ayad VJ (1994). Characterization and localization of a putative oxytocin receptor in the cervix of the Oestrus ewe. *J Endocrinol* 142: 97 -405.

33. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC (1999). Luteolysis: a neuroendocrine mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323.
34. Menchaca A, Miller V, Gil J, Pinczak A, Laca M, Rubianes E (2004). Prostaglandin F<sub>2α</sub> treatment associated with timed artificial insemination in ewes. *Reprod Domest Anim* 39: 352-355.
35. Moré J (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anat (Basel)* 120: 156-159.
36. Naqvi SMK, Pandey GK, Gautam KK, Joshi A, Geethalakshmi V y Mittal JP (2005). Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Anim Reprod Sci* 85: 337-344.
37. Overall CM, Wrana JL and Sodek J (1991a). Transcriptional and Post-
38. transcriptional Regulation of 72- kDa Gelatinase/type IV Collagennase by Transforming Growth Factorβ 1 in Human Fibroblasts. *J Biol Chem* 266: 14064-14071.
39. Perry K, Haresign W, Wathes DC, Pitsillides AA, Khalid M (2012). Cervical expression of hyaluronan synthases varies with the stage of the estrous cycle in the ewe. *Theriogenology* 77:1100-1110.
40. Rajabi M, Solomon S, Poole AR (1991a). Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig. *Endocrinology* 128: 863-871.
41. Rajabi MR, Dodge GR, Solomon S, Poole AR (1991b). Inmunochemical and immunohistochemical evidence of estrogen-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilatation in the guinea pig at parturition. *Endocrinology* 128: 371 – 378.
42. Raynes JG, Anderson JC, Fitzpatrick RJ and Dobson H (1988). Increased collagenase activity is not detectable in cervical softening in the ewe. *Coll Relat Res* 8:461-469.
43. Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC (1994). Patters of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 94: 946-953.
44. Rodríguez-Piñón M (2003). Importancia del cervix ovino como barrera para la Inseminación Artificial. En: Unguerfeld, R. Reproducción de los Animales Domésticos. Montevideo, MELIBEA Ediciones. V2, pp. 353-364.
45. Rodríguez-Piñón M (2006). Receptores de las hormonas esteroideas sexuales en cervix ovino. Estudios en corderas pre-púberes y en ovejas adultas durante el ciclo estral natural e inducido. Tesis de Maestría. Programa de Postgrados, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica. Montevideo-Uruguay, total pp. 49.
46. Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Puime P and Garófalo EG (2008). Oestrogens and progesterone receptor binding proteins and oestrogens receptor alpha expression (ERα mRNA) along the cervix in cycling ewes. *Reprod Fertil Dev* 20: 350-356.
47. Rodríguez-Piñón M, Gonzalez R, Tasende C, Bielli A, Genovese P y Garófalo EG (2013a). Cervical changes in estrogen receptor alpha (ERα), oxytocin receptor (OxR), LH receptor (LHR) and ciclooxigenase-2 (COX-2) depending on histological compartment, longitudinal axis and day of the ovine estrous cycle. *Theriogenology* in press.
48. Rodríguez-Piñón M, Casuriaga D, Gonzalez R (2013b). Actividad colagenasa en cervix ovino durante el ciclo estral. 1er Congreso Internacional de

- Veterinaria- IV Congreso Nacional de Veterinaria- IX Congreso Nacional de SUVEPA. Montevideo. Uruguay.
49. Russell AJF, Doney JM, Gunn RG (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 72: 451-454.
  50. Russo LA, Peano BJ, Trivedi SP, Cavalcanto TD, Olenchock BA, Caruso JA, Smolock AR, Vishnevsky O y Gardner RM (2009). Regulated expression of matrix metalloproteinases, inflammatory mediators, and endometrial matrix remodeling by 17beta- estradiol in the immature rat uterus. *Reprod Biol Endoc* 7:124 .
  51. Salamon S, Maxwell W (2000). Storage of ram semen. *Anim Rep Sci* 62: 77-111.
  52. Salamonsen LA, Woolley DE (1996). Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Hum Reprod* 11:124-33.
  53. Sayre B L, Lewis GS (1996). Cervical dilatation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology* 45: 1523-1533.
  54. Sayre B L, Lewis, GS (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology* 48: 267-275.
  55. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, Mc Neilly AS, Tsoni CG. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil Dev* 5: 459-478.
  56. Shemesh M, Dombrovski L, Gurevich M, Shore LS, Fuchs AR, Fields MJ (1997). Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reprod Fertil Dev* 9: 525-530.
  57. Stjernholm- Vladic Y, Wang H, Stygar D, Ekman G y Sahlin L (2004). Differential regulation of the progesterone receptor A and B in the human uterine cervix at parturition. *Gynecol Endocrinol* 18 (1):41-46.
  58. Stjernholm Y, Sahlin L, Akerberg S, Elinder A, Eriksson HA, Malmstrom A, Ekman G. (1996). Cervical ripening in humans: potential roles of estrogen, progesterone, and insulin-like growth factor-I. *Am J Obstet Gynecol* 174: 1065-1071.
  59. Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L (2002). Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod* 67: 889-894.
  60. Van Engelen E, Breeveld-Dwarkasing VN, Taverne MA, Everts ME, Van der Weijden GC and Rutten VP (2008). MMP-2 expression precedes the final ripening process of the bovine cervix. *Mol. Reprod Develop* 75 : 1669-1677.
  61. Wathes DC, Lamming GE (1995). The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fert* 49: 53-67.
  62. Windsor DP, Széll AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC (1994). Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 42: 147-157.
  63. Wu WX, Coksaygan T, Chakrabarty K, Collins V, Rose JC y Nathanielsz PW (2005). Sufficient progesterone-priming prior to estradiol stimulation is required for optimal induction of the cervical prostaglandin system in pregnant sheep at 0.7 gestations. *Biol Reprod* 73: 343-350.
  64. Wulster-Radcliffe MC; Lewis GS (2002). Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial

- insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology* 58: 1361-1371.
65. Wulster-Radcliffe MC, Wang S, Lewis GS (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology* 62: 990-1002.

