

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN UTERINA DE CICLOOXIGENASA-2 EN OVEJAS  
CON FUNCIÓN LUTEAL SUBNORMAL**

**Por**

**Gonzalo D'ANATRO**

**TESIS DE GRADO** presentada  
como uno de los requisitos para  
obtener el título de Doctor en  
Ciencias Veterinarias

**Orientación: Medicina Veterinaria**

**MODALIDAD: Ensayo experimental**

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2013

PAGINA DE APROBACIÓN

AGRADECIMIENTOS

TESIS DE GRADO aprobada por:

A mi padre, Celia Tasende, por todo su apoyo y cariño

A mis compañeros de facultad, en especial a los que me ayudaron en este momento de mi vida. Para Rubiana, Gerardo López

Presidente de Mesa:

Dr. Danilo Fila



Firma

Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Celia Tasende



Firma

Tercer Miembro:

Dr. Sergio Fierro

Firma

Fecha:

26/12/2013

Autor:

**Gonzalo D'Anatro Martínez**



Firma

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, Celia Tasende por todo su apoyo y cariño.

A mis compañeros de Bioquímica, en especial a los que fueron parte en algún momento de este trabajo, Perla Rubianes, Cecilia López y Sebastián Acuña.

A la CIDEDEC por la financiación del proyecto.

A mis padres, inspiración y motor de todos mis logros.

A mis hermanos, los mejores compañeros de vida que me pudieron tocar.

A Daniela, gran parte de esto es gracias a vos.

A todos mis amigos que me acompañaron en esta hermosa carrera.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	5
1. <u>RESUMEN</u> .....	6
2. <u>SUMMARY</u> .....	7
3. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	8
3.1. EL OVINO, DISTRIBUCIÓN MUNDIAL Y PRODUCCIÓN OVINA.....	8
3.1.1 PRODUCCIÓN OVINA EN URUGUAY.....	8
3.2. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LOS OVINOS.....	9
3.3 ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DEL ENDOMETRIO.....	9
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	11
4.1. CICLO ESTRAL.....	11
4.2. FASE FOLICULAR.....	11
4.3. FASE LUTEAL.....	12
4.4 FUNCIÓN LUTEAL SUBNORMAL.....	13
4.5. ESTEROIDES OVARICOS.....	13
4.6 PROSTAGLANDINAS Y CICLOOXIGENASAS.....	14
4.6.1 CICLOOXIGENASA 1.....	15
4.6.2 CICLOOXIGENASA 2.....	15
4.6.3 EXPRESIÓN DE COX-2 EN EL TRACTO REPRODUCTIVO DE LA HEMBRA.....	15
5. <u>OBJETIVOS</u> .....	18
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
6. <u>HIPÓTESIS</u> .....	19
7. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	20
7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
7.1.1 DISEÑO EN OVEJAS CICLANDO EN ESTACIÓN REPRODUCTIVA.....	20
7.1.2 DISEÑO EN OVEJAS TRATADAS PARA INDUCIR FLN y FLSN.....	20
7.2. ENSAYOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	21
7.3. ANÁLISIS DE IMAGEN.....	21
7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
7.5. CONCENTRACIONES HORMONALES SÉRICAS.....	22
8. <u>RESULTADOS</u> .....	23
8.1. OVEJAS CICLANDO EN ESTACIÓN REPRODUCTIVA.....	24
8.2. OVEJAS TRATADAS PARA INDUCIR FLN Y FLSN.....	26
9. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u> .....	28
10. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	31

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Imagen de la región caruncular e intercaruncular del endometrio de ovejas ciclando.....	23
Figura 2	Inmunomarcado a COX2 en epitelio luminal caruncular de tejido endometrial ovino.....	24
Figura 3	Inmunomarcado a COX-2 en epitelio luminal caruncular de tejido endometrial de ovejas ciclando.....	25
Figura 4	Promedios de intensidad de inmunomarcado a COX-2 en endometrio ovino durante el ciclo estral.....	25
Figura 5	Inmunomarcado a COX-2 en epitelio luminal intercaruncular de tejido endometrial de ovejas tratadas con GnRH con o sin progesterona previa.....	26
Figura 6	Intensidad de inmunomarcado a COX-2 en endometrio de ovejas tratadas con GnRH con o sin progesterona previa.....	27

## **1-RESUMEN**

Las ovejas son animales poliéstricos estacionales de día corto, ciclando entre el fin del verano y otoño. Cuando la actividad reproductiva se restablece después del anestro o al inicio de la pubertad, naturalmente ocurren fases luteales subnormales (FLSN). Similares FLSN se inducen tratando ovejas en anestro con microdosis de GnRH, sin embargo el tratamiento con progesterona previa más GnRH produce fases luteales normales (FLN). Las FLSN presentan una duración más corta y/o una concentración de progesterona (P) circulante subnormal. La producción de P por parte del cuerpo lúteo es fundamental para el mantenimiento de la preñez. El cuerpo lúteo es un órgano endocrino transitorio y su formación y destrucción están influenciadas por la acción de la prostaglandina F<sub>2</sub>α, en cuya síntesis está involucrada la ciclooxigenasa 2 (COX-2). La expresión de COX-2 es regulada entre otros por la acción de las hormonas esteroides ováricas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión y localización de COX-2 en útero de ovejas ciclando y ovejas tratadas para inducir FLSN y FLN. Se utilizaron 19 ovejas ciclando en estación reproductiva sacrificadas a los días 1, 6 y 13 de detectado el estro y 32 ovejas en anestro estacional tratadas solo con GnRH para inducir FLSN y con P previa y el mismo tratamiento de GnRH para inducir FLN, sacrificadas a los días 1 y 5 de la última dosis de GnRH y controles no sacrificados para controlar la concentración de P hasta el día 18 del ciclo. Se estudió la intensidad de inmunomarcado y el porcentaje de células positivas a COX-2 por inmunohistoquímica en epitelio luminal intercaruncular y caruncular, estroma y epitelio glandular uterino. Los resultados se analizaron por ANOVA. En ambos diseños solo se detectó inmunomarcado en el epitelio luminal intercaruncular y caruncular. En las ovejas ciclando la intensidad de inmunomarcado fue mayor al día 13 del estro que a los días 1 y 6 entre los que no hubo diferencias. No se hallaron diferencias entre el epitelio luminal intercaruncular y caruncular. Al día 1, el grupo FLN presentó un mayor inmunomarcado en el epitelio caruncular que el grupo FLSN. Mientras que al día 5 en el grupo FLN la intensidad de inmunomarcado fue menor en ambos epitelios en comparación al grupo FLSN. Del día 1 al 5 en el grupo FLN la intensidad de inmunomarcado a COX-2 disminuyó en el epitelio caruncular, contrariamente en el grupo FLSN aumentó en ambos epitelios. La luteólisis al final del ciclo estral, es inducida por la secreción pulsátil de PGF<sub>2</sub>α endometrial que ocurre alrededor del día 15-16 del ciclo. El aumento en la expresión de COX-2 al día 13 es consistente con su participación en el proceso de luteólisis normal. La intensidad de inmunomarcado a COX-2 en el grupo FLN tuvo un comportamiento similar a las ovejas ciclando, a diferencia del grupo FLSN, lo que sugiere diferencias en la sensibilidad endometrial a COX-2 entre ambos grupos tratados. El tratamiento previo con P tiene un rol importante en la expresión de COX-2 tanto alrededor de la ovulación (día 1) como en la fase luteal temprana (día 5). El aumento prematuro de la expresión de COX-2 al día 5 en los animales con función luteal subnormal, sugiere un aumento temprano en la síntesis de PGF<sub>2</sub>α desencadenando la luteólisis prematura que estaría involucrada en la función luteal subnormal.

## **2- SUMMARY**

Sheep are seasonal breeders, cycling between the end of the summer and the fall. Subnormal luteal phases (SNLP) occur in ewes at the onset of puberty, or when reproductive activity is being re-established after post-partum of seasonal anoestrus. Similarly, SNLP are seen following induction of ovulation after treatment with multiple small doses of GnRH in anoestrus ewes. However, combined treatment with progesterone and GnRH ensures normal luteal phases (NLP). The SNLP have a shorter duration and/or a subnormal progesterone circulating levels. Progesterone production by the corpus luteum is essential for the maintenance of pregnancy. The corpus luteum is a transitional endocrine organ and its development and destruction are influenced by the action of prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α). The cyclooxygenase-2 (COX-2) is involved in synthesis of PGF<sub>2</sub>α. COX-2 expression is regulated by the action of ovarian steroid hormones. The aim of the present research was to study the expression and localization of COX-2 in uterus of cycling ewes and ewes treated to induce SNLP and NLP. Nineteen cycling ewes in breeding season were killed on day 1, 6 or 13 after oestrus detection. Thirty six ewes in seasonal anoestrus were treated with GnRH to induce SNLP or treated with progesterone and then same treatment of GnRH to induce NLP. Ewes were killed on day 1 and day 5 after the last doses of GnRH. Immunostaining intensity and percentage of positive cells to COX-2 were studied by immunohistochemistry in intercaruncular and caruncular luminal epithelium, stroma and glandular uterine epithelium. The results were analyzed by ANOVA. In all animals immunostaining to COX-2, was found only in the intercaruncular and caruncular luminal epithelium. In cycling ewes immunostaining intensity was higher at day 13 of estrus than the days 1 and 6, when there were no differences. No differences were found between the intercaruncular and caruncular luminal epithelium. On day 1, the NLP ewes had a higher immunostaining in the caruncular epithelium than in the SNLP. On day 5 the immunostaining intensity in both epithelia was lower in NLP ewes than FSLN. From day 1 to 5 in the NLP ewes the immunostaining intensity decreased in the caruncular epithelium, while in the SNLP increase in both intercaruncular and caruncular epithelium. Luteolysis at the end of the estrous cycle is induced by pulsatile secretion of endometrial PGF<sub>2</sub>α that occurs around day 15-16 of the cycle. The increase in the COX-2 expression at day 13 is consistent with their participation in the process of normal luteolysis. The intensity of immunostaining in the NLP ewe had a similar pattern to the cycling ewes, unlike the SNLP group, which suggest differences in COX-2 endometrial sensitivity among treated groups. Progesterone pretreatment plays an important role in the expression of COX-2 around the ovulation (day1) and in the early luteal phase (day 5). The premature increase of the expression of COX-2 in the 5 day in ewes with subnormal luteal function, suggests an early increase in the synthesis of PGF<sub>2</sub>α triggering premature luteolysis, which would be involved in the sub-normal luteal function.

### **3-INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 El ovino, distribución mundial y producción ovina**

El ovino doméstico (*Ovis aries*) es una especie distribuida a nivel mundial, actualmente existen alrededor de 1.113 millones de ovinos en el mundo, cuya distribución es 43% en Asia, 24% en África, 12% en Oceanía, 12% en Europa y 9% en América (FAOSTAT). Las características propias de la especie como buena rusticidad, fecundidad, precocidad, adaptación a un nuevo medio, hábito de pastoreo e instinto gregario han facilitado y permitido su difusión mundial. Estas características contribuyen a su supervivencia bajo distintos climas, desde los más fríos hasta los más calurosos. (Douglas y col., 2006; Malpaux., 2006).

Los Ovinos a lo largo del tiempo han sido seleccionados con diferentes propósitos productivos. Los sistemas de producción ovina pueden ser clasificados teniendo en cuenta el objetivo de producción: Sistema productor de Lana, Carne, Leche, o mixto (Oficialdegui, 2002). Dentro de las razas laneras, se encuentra por ejemplo el Merino. Las razas cárnicas incluyen al Hampshire Down, Texel, Southdown, Ile de France, Suffolk y Poll Dorset y los ovinos dobles propósitos (para obtención de carne y lana) incluyen al Corriedale, Romney Marsh, Lincoln e Ideal. La producción de lana se lleva a cabo en alrededor de 100 países, en donde Australia, China y Nueva Zelanda representan el 50 % de la producción mundial. Se generan aproximadamente 2.2 millones de toneladas anuales de lana y representa 1.6 % del total mundial de fibras textiles (International Wool Textile Organization 2004). La producción de carne ovina es de aproximadamente 8 mil toneladas, siendo los principales productores Australia y Nueva Zelanda, comercializando el 72% total del mercado. En lo referente a la producción láctea, se producen 9.147 millones de litros de leche ovina, que representan un 1.4% del total de leche producida. La producción de leche ovina se encuentra concentrada en Asia, Europa y África, 50%, 31% y 19% respectivamente (FAOSTAT).

##### **3.1.1 Producción ovina en Uruguay**

En nuestro país la población ovina es aproximadamente 8.2 millones de cabezas y ocupan una superficie de explotación de 2 millones de hectáreas, lo que corresponde al 15% del total de superficie explotable (Cardelino y col., 1994; Tamber, 2006). En general se desarrollan tres sistemas básicos de producción ovina: lanero, con el Merino como raza predominante; mixto con razas doble propósito como Corriedale e Ideal, y cárnico donde la Texel es la raza principal. Actualmente la raza Corriedale representa el 65% del stock nacional seguida por el Merino con el 14% e Ideal con el 8%. La producción nacional es de 95.000 toneladas de carne y 40 millones de kg de lana por año. Además, se producen 14 millones de dólares en distintos rubros por el proceso de esquila. En general la producción ovina genera un ingreso de 320 millones de dólares por año en conceptos de exportación (Tamber, 2006; Secretariado Uruguayo de la

Lana 2013).

### **3.2 Características reproductivas de los ovinos**

Las hembras ovinas son poliéstricas estacionales de día corto, donde los ciclos estrales ocurren entre fines de verano y otoño. Si se produce la gestación las pariciones ocurren en primavera y luego se produce un anestro post gestacional. Por otro lado, si no hay gestación entran en anestro estacional el resto del año hasta la siguiente estación reproductiva. Un factor importante que regula la duración del periodo de reproducción es la variación estacional de la longitud del día, y su efecto puede ser modulado por otros factores tales como el manejo nutricional o los aspectos sociales (Malpaux., 2006).

Los ovinos están sometidos a variaciones estacionales relacionadas a las horas de luz del día, de manera que durante el otoño donde hay menos horas de luz solar la actividad reproductiva está estimulada, por el contrario cuando los días son largos la actividad reproductiva cesa. La melatonina, hormona sintetizada en la glándula pineal a partir de la serotonina y el triptófano, es el mensajero químico que señala la duración de la iluminación diaria. Los niveles plasmáticos de melatonina en la oveja son basales durante el día, y se elevan rápidamente (10 minutos) al inicio de la noche hasta alcanzar concentraciones entre 100-500 pg./mL. Debido a que dicha hormona se metaboliza rápidamente los niveles vuelven a ser basales al alba. Estas características de secreción determinan que el perfil de secreción de melatonina en las 24 horas del día sea largo en invierno y corto en verano. De este modo, la melatonina traduce la información fotoperiódica en un mensaje endocrino (Malpaux, 2006; Goodman e Inskeep., 2006)

La melatonina actúa a nivel hipotalámico modificando la frecuencia de liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) lo que regula la frecuencia de los pulsos de la hormona luteinizante (LH) hipofisaria. En el otoño durante la estación reproductiva la pulsatilidad de la LH es alta en relación a la estación no reproductiva. El aumento de pulsatilidad de LH durante la estación reproductiva estimula el crecimiento de los folículos ováricos, la ovulación y la consecuente síntesis y liberación de hormonas esteroides ováricos, estrógenos y progesterona. Durante el anestro (estacional o post parto) la baja frecuencia en la pulsatilidad de LH induce el crecimiento folicular continuo, pero no se produce la ovulación por lo tanto las concentraciones de estrógenos y progesterona son basales. Esto se debe al feed back negativo de los estrógenos sobre el eje Hipotálamo-hipofisario (Karsch y col., 1980).

### **3.3 Estructura histológica del Endometrio**

El endometrio presenta dos zonas que difieren en su estructura y función:

Presenta una zona superficial la cual se degenera parcialmente durante un ciclo estral, regenerándose a partir de la zona basal. Está revestida por un epitelio que en rumiantes puede ser simple cilíndrico y/o pseudoestratificado. La altura de las células epiteliales está relacionada con el estado hormonal de la hembra a lo largo del ciclo estral. Bajo el epitelio, aparece un tejido conectivo altamente vascularizado con macrófagos y mastocitos, un número variable de neutrófilos y linfocitos según la fase del ciclo estral y además en la oveja presenta melanocitos. En los rumiantes, en esta zona y especialmente en el estro, hay un aumento del fluido intercelular constituyendo un edema endometrial. Y una zona profunda que se presenta durante todo el ciclo estral y está constituida por un tejido conectivo laxo menos celular (Salazar y col., 2013).

En ambas zonas aparecen glándulas tubulares ramificadas arrolladas revestidas por un epitelio simple cilíndrico con células ciliadas y no ciliadas. En los rumiantes se observa la presencia de carúnculas, que son engrosamientos circunscritos del endometrio, ricos en fibroblastos, con una gran irrigación sanguínea y donde no aparecen glándulas. En oveja tienen forma de taza (depresión central) y constituyen la unión de la placenta materna (endometrio) con la placenta fetal (cotiledones) (Salazar y col., 2013).

Durante el ciclo estral se observan diferencias en la estructura endometrial, las que pueden clasificarse en tres grandes fases: Fase proliferativa: coincide con el crecimiento de los folículos ováricos y el aumento de estrógenos circulantes; hay un aumento del grosor del endometrio debido a la hipertrofia e hiperplasia de las glándulas. Fase secretora: coincide con el periodo en el que el cuerpo lúteo es funcional y el aumento de la concentración de progesterona circulante y se caracteriza porque el endometrio alcanza su máximo grosor y hay un desarrollo máximo de las glándulas y un alargamiento máximo de las arterias. En esta fase el útero está en condiciones óptimas recibir al óvulo fecundado. Si eso no ocurre, se pasa a la siguiente fase. Fase de involución: coincide con la desaparición de los estímulos hormonales y se caracteriza porque hay una disminución en el grosor del endometrio por una involución de glándulas y arterias, volviendo a la fase de reposo si se produce el anestro o a reiniciarse el ciclo en la estación reproductiva (Salazar y col., 2013).

## **4- REVISIÓN BILIOGRÁFICA**

### **4.1 Ciclo estral**

El ciclo estral comprende a una serie de eventos que se repiten en el tiempo durante la estación reproductiva si no se produce la gestación. La duración del mismo en la oveja es de 16-17 días. El ciclo estral se encuentra coordinado por la interacción del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Este sistema es regulado por la GnRH, hormona sintetizada por el hipotálamo que estimula la síntesis de LH y de la hormona folículo estimulante (FSH) en la hipófisis. Estas dos hormonas ejercen su acción sobre las gónadas, produciendo entre sus efectos el desarrollo y crecimiento folicular, estimulan la producción y liberación de estrógenos por los folículos ováricos y el desarrollo del cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo es responsable de la síntesis de Progesterona y Oxitocina. En el endometrio uterino se produce la prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ), involucrada en la formación y destrucción del cuerpo lúteo (Goodman e Inskeep., 2006; Stouffer., 2006).

El ciclo estral de la oveja puede dividirse en dos fases, una fase folicular corta de 2 a 3 días de duración caracterizada por el crecimiento y desarrollo folicular hasta la ovulación y una fase luteal prolongada de 12 a 14 días caracterizada por la formación del cuerpo lúteo y la destrucción del mismo si no se produce la gestación (Goodman e Inskeep., 2006).

### **4.2 Fase folicular**

La fase folicular abarca desde la regresión del cuerpo lúteo hasta la ovulación en el siguiente ciclo. Durante la fase folicular se produce el desarrollo folicular y la ovulación. El desarrollo de los folículos en los ovarios es en ondas y en cada ciclo se produce de 2 a 5 ondas de crecimiento folicular. Se denomina onda folicular a un grupo de folículos que emergen de forma conjunta llegando al menos uno de ellos al tamaño suficiente para producir y secretar estrógenos (4-5 mm) (Ginter y col., 1995, Bartlewsky y col., 1999). El aumento de los niveles circulantes de estrógenos sumado a la caída del efecto inhibitorio de la progesterona produce un aumento en la pulsatilidad de GnRH. Ante cada pulso de GnRH la hipófisis responde con un pulso de LH. Se establece un feed back positivo entre los estrógenos, la GnRH y la LH, de forma que al final de la fase folicular se produce un aumento en los niveles de estrógenos circulantes y un aumento abrupto en la frecuencia de pulsos de LH, lo que se denomina pico preovulatorio de LH (Goodman., 1994). Previamente al pico de LH las células de la granulosa comienzan a perder su capacidad de secretar estrógenos y comienzan a producir y liberar progesterona, aunque las concentraciones de progesterona circulantes continúan siendo basales. La ruptura final de folículo se origina por la desintegración del tejido conectivo del mismo, producto de la acción de enzimas proteolíticas capaces de romper las uniones de las fibras del colágeno del tejido conectivo que han sido detectadas en los fibroblastos tecales que cubren la pared del

folículo (Espey y Richards., 2006). Por lo tanto, el propio folículo participa en el desencadenamiento de los mecanismos que lo destruirán, o sea, la ovulación (Smith y col., 1994; Goodman e Inskeep., 2006; Bartlewsky y col., 2011)

### **4.3 Fase luteal**

Luego de la ovulación se produce la formación del cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo es un órgano endócrino transitorio cuya función es producir y segregar progesterona, hormona que cumple un importante rol regulador del ciclo estral y es esencial para el mantenimiento de la preñez (Niswender y col., 2000; Webb y col., 2002). El desarrollo del cuerpo lúteo se produce a partir del folículo ovulatorio proceso denominado luteinización. La luteinización es un proceso que incluye eventos de proliferación celular, diferenciación celular y remodelación tisular (Smith y col., 1994, McCracken y col., 1999). El desarrollo del cuerpo lúteo comprende dos grandes procesos, una rápida proliferación e hipertrofia de las células esteroideogénicas del folículo transformándose en células luteales y un gran desarrollo de los vasos sanguíneos. En la ovulación se produce el colapso e invaginación de la pared del folículo, con ruptura de la membrana basal separando las capas de la granulosa y de la teca del folículo. Esto es seguido por la invasión de las células microvasculares en la capa granulosa avascular. La invaginación folicular y la invasión vascular también transportan células de la teca hacia el centro de la cavidad del folículo. Antes de la ovulación, la capa folicular primaria destinada a formar el cuerpo lúteo es avascular, mientras que después del desarrollo luteal las células asociadas con la microvascularización comprenden aproximadamente el 50% del total de células (Stouffer., 2006).

En la oveja el cuerpo lúteo se forma rápidamente y dura alrededor de 2 semanas, dándole tiempo al embrión de llegar al oviducto y realizar la implantación en el útero. En caso de no producirse la preñez el cuerpo lúteo regresa. La regresión del cuerpo lúteo produce la disminución de la producción de progesterona, lo que se evidencia claramente al medir los niveles circulantes de la misma. La destrucción del cuerpo lúteo normal en la oveja, al final del ciclo estral, es inducida por la secreción pulsátil de la  $\text{PGF2}\alpha$  endometrial (Stouffer., 2006). El inicio de la liberación de pequeños pulsos subluteolíticos de  $\text{PGF2}\alpha$  es estimulado por la oxitocina hipofisaria, que aumenta cuando caen los niveles circulantes de progesterona. A su vez estos pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  del útero provocan la liberación de oxitocina ovárica que amplifica la liberación de  $\text{PGF2}\alpha$  estableciéndose un feed back positivo oxitocina-  $\text{PGF2}\alpha$  que resulta en grandes pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  causando la regresión del cuerpo lúteo normal (McCracken y col., 1999; Stouffer., 2006). Sin embargo es importante señalar que en ovejas cuando la actividad reproductiva se restablece, después del anestro (posparto o estacional) o al inicio de la pubertad, naturalmente ocurren fases luteales subnormales que se caracterizan por presentar una duración más corta que la normal y/o una concentración de progesterona circulante subnormal (Keisler y col., 1983, Hunter., 1991; Ravindra y Rawlings., 1997).

#### **4.4 Función luteal subnormal (FLSN)**

Similares FLSN a las observadas cuando se restablece la actividad ovárica después del anestro estacional o postparto, se producen en ovejas en anestro luego del tratamiento con múltiples micro-dosis de GnRH (Hunter., 1991, Garverick y col., 1992, Tasende y col., 2005b). Sin embargo, el tratamiento combinado de progesterona + GnRH induce la formación de fases luteales normales (FLN) (McLeod., 1982, Southee., 1988; Tasende y col., 2005b), sugiriendo que la exposición previa a la progesterona es necesaria para el desarrollo de la función luteal normal (Hunter., 1991; Goodman e Inskeep., 2006). La inducción experimental de FLSN permite estudiar los mecanismos involucrados en la misma y contribuir al desarrollo de tratamientos para prevenir o superar esta disfunción reproductiva.

Similarmente a lo que ocurre en ovejas con cuerpo lúteo normal, el cuerpo lúteo subnormal inducido en la estación reproductiva no regresa en ovejas histerectomizadas (Moor y col., 1966). La histerectomía también previene la regresión del cuerpo lúteo destinado a tener vida corta en ovejas prepúberes (Keisler y col., 1983), en ovejas en anestro y en vacas posparto (Hunter., 1991, Garverick., 1992). Estos experimentos clásicos indican que en rumiantes, el útero influye en la duración del cuerpo lúteo tanto normal como subnormal.

La formación del cuerpo lúteo es controlada por hormonas que juegan un papel crucial en la señalización de los factores luteotrópicos durante el ciclo estral y la preñez. Así como en la inducción de la luteólisis al final del ciclo estral. Entre las principales hormonas que participan en este proceso están los esteroides ováricos (Milvae y col., 1996).

#### **4.5 Esteroides ováricos**

Los estrógenos y la progesterona participan en prácticamente todos los aspectos de la función reproductiva (Ing y col., 1993; Clark y Mani., 1994). Son sintetizados principalmente en los ovarios, se vuelcan a la sangre y son transportados a sus órganos blancos donde ejercen sus acciones a través de receptores específicos (RE y RP respectivamente). La capacidad de respuesta de cada tejido a la acción de una hormona depende de la disponibilidad de estos receptores específicos (Clark y col., 1992).

En el útero los estrógenos y la progesterona regulan el crecimiento de este órgano a través del estímulo de la hipertrofia e hiperplasia celular (Clark y Mani., 1994). Se establece una comunicación entre el ovario y el útero de manera que se requiere un aumento preovulatorio de estradiol circulante para preparar la respuesta del tejido uterino para la acción de la progesterona que comienza a aumentar luego de la ovulación y es fundamental para la implantación del embrión (Couse y col., 2006). Los

estrógenos y la progesterona son importantes moduladores de sus propios receptores. Los estrógenos aumentan la concentración de RE y RP, mientras que la progesterona disminuye la concentración de ambos receptores (Ing y col., 1993; Clark y Mani, 1994; Meikle y col., 2004). Estos mecanismos de regulación concuerdan con lo reportado durante el ciclo estral en diferentes especies. En general, se reportaron altos niveles de RE y RP en la fase folicular cuando predominan los estrógenos, mientras que en la fase luteal cuando predomina la progesterona los niveles de ambos receptores son bajos. Esto fue demostrado en útero (Miller y col., 1977; Rexroad., 1981), hipófisis (Tasende y col., 2005a) y cérvix (Rodríguez-Piñón y col., 2008) de oveja.

En ovejas tratadas solamente con GnRH para inducir FLSN se encontraron diferencias en la concentración de estrógenos y progesterona circulantes y de RE y RP en útero e hipófisis en relación a las tratadas para inducir FLN (Tasende y col., 2005b). En el útero de las ovejas con FLSN la concentración de RP aumentó al día 5 en relación al día uno, mientras que la concentración de RE fue similar en ambos días. Contrariamente en las ovejas con FLN la concentración de RE fue menor al día 5 que al día uno y la concentración de RP fue similar en ambos días. Estos resultados sugieren que diferencias en los niveles de estrógenos y progesterona circulantes y diferencias en la concentración de sus receptores endometriales están involucradas en el desarrollo anormal del cuerpo lúteo y/o la luteólisis prematura (Tasende y col., 2005b).

Además de las acciones que las hormonas ováricas ejercen sobre sus propios receptores se ha demostrado que los esteroides ováricos modifican la expresión de factores de crecimiento y diferenciación celular y de enzimas como la ciclooxigenasas involucradas en la formación y destrucción del cuerpo lúteo (Clark y Mani., 1994; Zhang y col., 2007).

#### **4.6 Prostaglandinas y Ciclooxigenasas**

Las prostaglandinas son mediadores en muchas funciones reproductivas en la hembra participando en la luteólisis, ovulación, fertilización, implantación del embrión, mantenimiento de la preñez y en el parto (Kim y col., 2003; Skarzynsky y col., 2008; Lee y col., 2010). La PGF<sub>2</sub>α endometrial es el principal factor luteolítico en rumiantes, la importancia del útero en el control de la regresión luteal ha sido comprobado en diversos experimentos donde luego de realizarse la histerectomía no se produce la regresión del cuerpo lúteo (Niswender y Nett., 1994). La PGF<sub>2</sub>α endometrial se secreta hacia la vena uterina, que se une a la vena ovárica para formar la vena útero-ovárica y es transportada a la arteria ovárica a través del plexo útero-ovárico. El transporte local de la PGF<sub>2</sub>α a través de este plexo es imprescindible para la regresión del cuerpo lúteo en la oveja ya que el 99% de la PGF<sub>2</sub>α es catabolizada en un solo pasaje por los pulmones a un metabolito inactivo (metabolito de la PGF<sub>2</sub>α) por la prostaglandin deshidrogenasa (Lee y col., 2013). El transporte a través del plexo útero-ovárico se realiza por la acción de una proteína transportadora, la cual recientemente se demostró que su máxima expresión se produce alrededor del momento de la luteólisis (Lee y col.,

2013).

La prostaglandina H<sub>2</sub> es un intermediario común para la síntesis de todas las prostaglandinas, sintetizada a partir del ácido araquidónico, por acción de las ciclooxigenasas tipos 1 (COX-1) y 2 (COX-2), enzimas que catalizan la etapa limitante de la vía de síntesis de prostaglandinas (McCracken y col., 1999). La COX1 se expresa constitutivamente mientras que la COX-2 está regulada por los estrógenos y la progesterona (Charpigny y col., 1997; McCracken y col., 1999). Ambas ciclooxigenasas son homólogas en un 90% pero se encuentran en distintos lugares dentro de la célula y son codificadas por diferentes genes. Si bien estructuralmente la COX-1 y la COX-2 son parecidas, el sitio de unión para el ácido araquidónico es diferente (Vane y col., 1998; García Meijide y col., 2000)

#### **4.6.1 Ciclooxigenasa-1**

La COX-1 desempeña un papel importante en la síntesis de los prostanoïdes y regula funciones como la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal y la función plaquetaria. El gen de la COX-1 mide aproximadamente 22 kb, tiene 11 exones y se encuentra en el cromosoma 9. En la célula, generalmente la COX-1 se encuentra en el citoplasma, cerca del retículo endoplásmico. Aunque la COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos, su expresión cambia durante el desarrollo. (Vane y col., 1998; García Meijide y col., 2000)

#### **4.6.2 Ciclooxigenasa-2**

La COX-2 no se encuentra presente normalmente en la célula pero aparece tras la exposición de las células a agentes como citoquinas proinflamatorias o frente al estímulo hormonal (Vane y col., 1998; García Meijide y col., 2000; Hunzicker-Dunn y Kelly., 2006) Por este motivo se denominó a la COX-2 forma inducible, y a la COX-1 forma constitutiva. La COX-2 también regula la producción de prostanoïdes que participan en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios como la regulación de la actividad reproductiva en mamíferos. Se expresa en el aparato genital femenino durante los procesos relacionados con la ovulación, la luteólisis, la implantación y la inducción del parto. (Vane y col., 1998) En la célula, la COX-2 se encuentra fundamentalmente en la región perinuclear y en la membrana nuclear. Presenta dos dominios, el que se une a las membranas está constituido por cuatro hélices que forman un canal que permite la entrada del ácido araquidónico de la membrana al lugar con actividad enzimática. En esta región hay dos lugares activos, uno que cataliza la ciclooxigenación y otro la peroxidación (Vane y col., 1998; García Meijide y col., 2000)

#### **4.6.3 Expresión y distribución de COX-2 en el tracto reproductivo de la hembra**

Como ya se mencionó las ciclooxigenasas cumplen un rol fundamental en las diferentes

etapas reproductivas de las hembras. Se expresan en el epitelio uterino durante la etapa inicial de la preñez siendo ambas importantes para la implantación del embrión, aunque los procesos por los cuales favorecen la implantación no son bien conocidos. Participan en la génesis y desarrollo de la placenta (Sudhansu y Hyunjung., 2006). En la ovulación se expresan en las células de la granulosa del ovario luego del pico de LH, este aumento de COX-2 en el ovario convierte el ácido araquidónico en varias prostaglandinas hasta 3 horas luego de la expresión del mRNA de COX-2. Se ha postulado que existe una correlación entre el tiempo de expresión de COX-2 y la duración específica de la ovulación para cada especie (Sudhansu y Hyunjung., 2006). Se demostró que, la expresión endometrial de COX-2 varía a lo largo del ciclo estral en la oveja, siendo los valores más altos en los días 12-14 (Charpigny y col., 1997) o días 10-12 (Kim y col., 2003) de la fase luteal, cuando existe predominio de la progesterona sobre los estrógenos y al final del ciclo disminuyen hasta niveles no detectables (Charpigny y col., 1997; Kim y col., 2003). Esta expresión de COX2 en el útero durante el ciclo estral concuerda con la regulación de la expresión demostrada en cérvix por Zhang y col. (2007). Además el tratamiento con estradiol aumentó la expresión de COX2 y de mRNA-COX2 en el cérvix de ovejas ovariectomizadas en relación a los controles, pero el tratamiento con progesterona produjo un efecto estimulador mayor (Zhang y col., 2007) al igual que en el cérvix de ovejas preñadas (Wu y col., 2005)

En cuanto a la distribución de las ciclooxigenasas en el útero, COX-1 se expresa en el endometrio y en el miometrio encontrándose las mayores concentraciones en este último. Por el contrario COX-2 se expresa solo en el endometrio (Charpigny y col., 1997). En el endometrio COX-2 se localiza casi exclusivamente en el epitelio, en mayor proporción en el epitelio luminal y en menor proporción en el epitelio glandular superficial (Charpigny y col., 1997; Kim y col., 2003). Al día 12 del ciclo estral se demostró la presencia de COX-2 en el epitelio caruncular, pero no en el intercaruncular. En el día 15 del ciclo estral se detectó la expresión de COX-2 en ambos epitelios luminales (Charpigny y col., 1997).

El aumento de expresión de COX-2 al final de la fase luteal en ovejas ciclando concuerda con el aumento de PGF2 $\alpha$  y la destrucción del cuerpo lúteo normal.

Una de las causas de la FLSN es la luteólisis prematura y se ha postulado que ésta es provocada por la liberación anticipada de PGF2 $\alpha$  (McLeod. y Haresign., 1984). Sin embargo, no hemos encontrado trabajos sobre la expresión y localización de COX-2 en rumiantes en la fase luteal temprana (día 5-6) cuando podría desencadenarse la luteólisis prematura. Teniendo en cuenta que en ovejas con FLSN inducidas se han encontrado diferencias en los niveles de estrógenos y progesterona circulantes con relación a la FLSN y que estas hormonas están implicadas en la expresión de COX2 se plantea la interrogante sobre la expresión y localización de la COX2 en los diferentes tipos celulares que conforman el útero ovino y su vinculación con el desarrollo de FLSN en rumiantes. Como ya se mencionó la función primordial del CL es la producción de progesterona para el mantenimiento de la preñez, una adecuada secreción de la misma en cantidad y duración es determinante para lograr el éxito reproductivo.

Además ya que el 25-55 % de los embriones de mamíferos se pierden en la gestación temprana y muchas de estas pérdidas parecen ser causadas por fases luteales subnormales (Niswender y col., 1994), el tema es relevante desde el punto de vista reproductivo y productivo.

## **5-OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Contribuir al conocimiento de los mecanismos involucrados en la función luteal subnormal.

### **5.2 Objetivos Específicos**

- Estudiar la expresión y localización de COX-2 por inmunohistoquímica en los diferentes tipos celulares del endometrio de ovejas con función luteal subnormal inducida.
- Estudiar la expresión y localización de COX-2 por inmunohistoquímica en los diferentes tipos celulares del endometrio de ovejas con función luteal normal inducida.
- Estudiar la expresión y localización de COX-2 por inmunohistoquímica en los diferentes tipos celulares del endometrio de ovejas durante el ciclo estral en estación reproductiva.

## **6- HIPÓTESIS**

Teniendo en cuenta que la expresión de COX-2 es modulada por la acción de los estrógenos y la progesterona y considerando que existen diferencias en los niveles circulantes de estas hormonas entre los animales con función luteal subnormal y normal, la hipótesis de este trabajo es que la expresión de COX-2 en ovejas con función luteal subnormal está alterada en relación a ovejas con función luteal normal y ciclando.

## **7-MATERIALES Y MÉTODOS**

En estudios previos se realizaron dos diseños experimentales en ovejas Corriedale siguiendo las normas éticas y de bienestar animal aprobadas por la CHEA previo a su realización. Estos diseños se realizaron en el campo n°1 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica de Uruguay.

### **7.1 Diseño Experimental**

#### **7.1.1 Diseño en ovejas ciclando en estación reproductiva**

Se utilizaron 19 ovejas ciclando en la estación reproductiva desde fines de febrero a marzo, las cuales estuvieron bajo condiciones naturales a campo con alimento y agua *ad libitum*. El día del estro (detectado con carneros vasectomizados) fue considerado el día 0 y las ovejas fueron sacrificadas a los días 1 (n = 7), 6 (n = 6) o 13 (n = 6) después de detectado el estro (Tasende y col., 2005a). El sacrificio de los animales se realizo en el campo por personal técnico del mismo.

#### **7.1.2 Diseño en ovejas tratadas para inducir FLN y FLSN**

Se utilizaron 32 ovejas Corriedale con un peso (media  $\pm$  s.e.m) de  $43.0 \pm 1$  kg, las cuales estuvieron bajo condiciones naturales a campo con alimento y agua *ad libitum*. El experimento se realizo en setiembre durante el anestro estacional. Las ovejas fueron tratadas solo con microdosis (6.7 ng. Receptal ®) de GnRH cada 2 horas por 18 horas para inducir FLSN (n=16) y con un CIDER (0.33g) de progesterona y el mismo tratamiento de GnRH para inducir FLN (n=16). Se consideró día 0 del experimento el momento de la última inyección de GnRH, la cual se administro en forma de bolo (4  $\mu$ g) a las 20 horas de comenzado el tratamiento. Ambos grupos de animales fueron divididos al azar en 3 subgrupos: 1) animales sacrificados al día 1 (n=12), tratados con GnRH (n=6) y con P+ GnRH (n=6). 2) animales sacrificados al día 5 (n=10), tratados con GnRH (n=5) y con P+ GnRH (n=5). 3) controles de la duración de la fase luteal que no fueron sacrificados (n=10), tratados con GnRH (n=5) y con P+ GnRH (n=5), se demostró la duración de FLSN o FLN por medio de los niveles séricos de P que se estudiaron hasta el día 18 (Tasende y col., 2005b). El sacrificio de los animales se realizo en el campo por personal técnico del mismo.

En ambos diseños se tomaron muestras de útero inmediatamente luego del sacrificio, para realizar estudios del status endócrino en los órganos blanco de la acción de las hormonas reproductivas.

Se utilizaron muestras de úteros almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  de todos los animales tratados para inducir la formación de FLSN y FLN ambos grupos fueron sacrificados a los días 1 y 5. También se utilizaron muestras de las ovejas ciclando en estación reproductiva sacrificadas a los días 1, 6 o 13 de detectado el estro. Las muestras de todos los animales se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 3 días y fueron incluidas en

bloques de parafina. Los bloques obtenidos se cortaron a 5  $\mu\text{m}$  de espesor para realizar los estudios de la expresión y distribución de COX-2 por ensayos de Inmunohistoquímica

## **7.2 Ensayos de inmunohistoquímica para COX-2**

Los ensayos de COX-2 se realizaron por la técnica de inmunohistoquímica de la avidina-biotina-peroxidasa (Meikle y col., 2000; Sosa y col., 2004), en secciones de tejido uterino. Se utilizó anticuerpo policlonal de ratón como anticuerpo primario: Anti-COX-2 (Nº Catálogo 160106, Cayman, Chemical Company) diluido 1/25 en PBS. En paralelo se realizaron controles negativos mediante la sustitución del anticuerpo primario con IgG de ratón no inmune a una concentración equivalente (SC2489, Santa Cruz, Biotecnology). Posteriormente se incubaron los tejidos con anticuerpo secundario (IgG biotinilado, cabra anti-conejo, Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) diluido en suero normal de cabra. A continuación los tejidos se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite; Vector). La localización de COX-2 se visualizó por coloración con 3,3'-diaminobenzidine en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (DAB kit, Vector) y los tejidos fueron contra coloreados con hematoxilina.

## **7.3 Análisis de Imagen**

El inmunomarcado a COX-2 fue estimado por dos observadores independientes quienes no conocían a qué grupo de animales pertenecían las muestras. Las muestras se analizaron con lente de inmersión (1000 X) en diez campos para cada tipo celular en las muestras de todas las ovejas tratadas para inducir FLSN y FLN a los días 1 y 5 y en todas las ovejas durante el ciclo estral a los días 1,6, y 13. El inmunomarcado a COX-2 fue evaluado en epitelio luminal, epitelio glandular y estroma caruncular e intercaruncular. Los epitelios fueron divididos en epitelio luminal caruncular, epitelio luminal intercaruncular, epitelio glandular superficial (adyacente al epitelio luminal) y epitelio glandular profundo (adyacente al miometrio).

El inmunomarcado a COX-2 se evaluó de acuerdo a la siguiente escala: negativo (-), leve (+), moderado (++) o intenso (+++), y fue expresado para cada tipo celular en una escala de 0-10 (Thatcher y col., 2003). El promedio de intensidad de inmunomarcado se calculó como:  $1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3$ , donde n es la proporción de células por campo que exhiben tinción: leve ( $n_1$ ), moderado ( $n_2$ ) e intenso ( $n_3$ ) (Boos y col., 1996). El porcentaje total de células positivas por campo también fue estudiado.

## **7.4 Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos en la evaluación respecto a la intensidad de inmunomarcado a COX-2 y el porcentaje de células positivas por campo se analizaron por análisis de varianza. En ambos diseños se incluyó el efecto de observador, de día y de localización. En las ovejas tratadas para inducir FLSN y FLN se considero además el efecto del tratamiento. La intensidad de inmunomarcado a COX-2 y el porcentaje de

células positivas por campo se expresó como la media±pooled s.e.

### **7.5 Concentración Hormonales Séricas**

Los niveles circulantes de hormonas esteroideas fueron reportados en trabajos anteriores que se realizaron con muestras de estos mismos animales (Tasende y col., 2005b). Por lo que al no ser un resultado obtenido en este trabajo se mencionan a continuación en materiales y métodos.

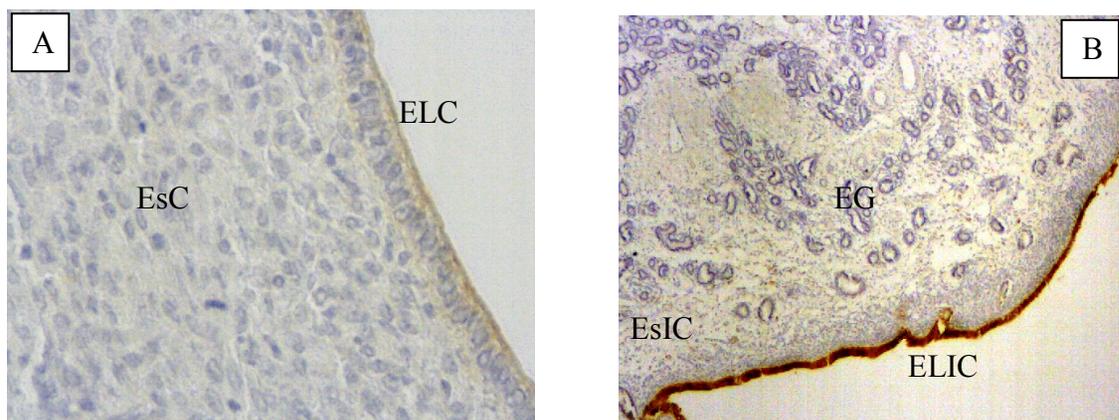
Las concentraciones de progesterona sérica en nmol/L, (media±pooled s.e) de las ovejas ciclando fueron:  $0.70\pm 0.6$ ,  $7.1\pm 0.9$  y  $10.3\pm 0.9$  para los días 1, 6 y 13 respectivamente (Tasende y col., 2005a). Para las ovejas tratadas los valores fueron basales al día 1 en ambos grupos y  $6.5 \pm 0.54$  (grupo tratado con P+GnRH para inducir FLN) y  $3.1 \pm 0.61$  (grupo tratado solo con GnRH para inducir FLSN) al día 5 (Tasende y col., 2005b). En los controles (que se siguieron hasta el día 18) la concentración de progesterona circulante en los que se esperaba tuvieran ciclo normal fueron similares a los valores de las ovejas ciclando a diferencia de las ovejas tratadas para inducir función luteal subnormal.

La concentración de estradiol circulante (pmol/L, media±pooled s.e) en las ovejas ciclando fue:  $10.3\pm 9$ ,  $8.3 \pm 9$  y  $8.1\pm 9$ , día 1, 6 y 13 respectivamente (Tasende y col., 2005a).

En las ovejas tratadas los valores fueron, para el grupo P+GnRH:  $15.0\pm 2.0$  Y  $17.2\pm 3.1$  (día 1 y 5 respectivamente) y para el grupo GnRH:  $7.6\pm 2.1$  y  $7.6\pm 3$  (día 1 y 5 respectivamente) (Tasende y col., 2005b)

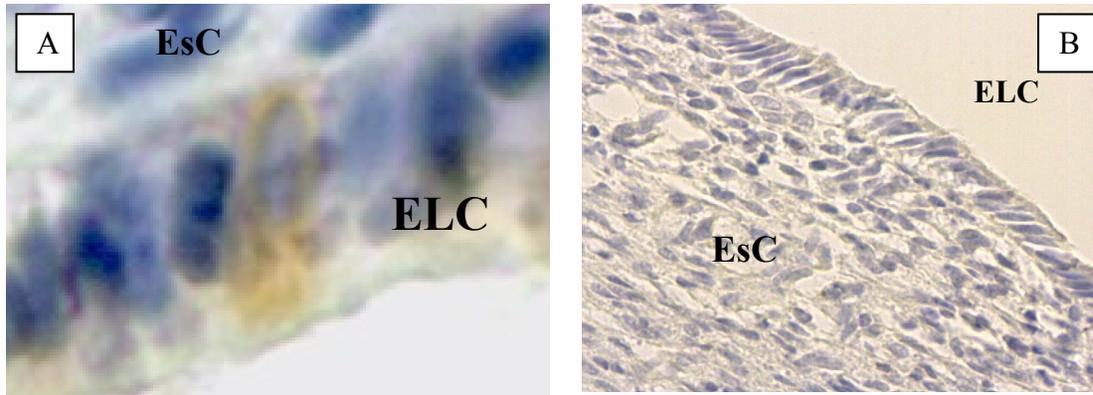
## **8-RESULTADOS**

En ambos diseños experimentales no se detectó inmunomarcado a COX-2 en las células del estroma, ni en el epitelio glandular, tanto superficial como profundo. Se detectó inmunomarcado a COX-2 en el epitelio luminal caruncular e intercaruncular en el endometrio de todos los animales en todos los días estudiados. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de la distribución del inmunomarcado a COX-2 de una de las ovejas ciclando. Se puede evidenciar diferencias en el inmunomarcado a COX-2 en el epitelio luminal caruncular y el estroma caruncular; y en el epitelio intercaruncular y las glándulas adyacentes al mismo.



**Figura 1.** **A.** Imagen de la región caruncular (100X), **B:** Imagen de la región intercaruncular de endometrio de ovejas ciclando (40X). ELC: Epitelio luminal caruncular. EsC: Estroma caruncular. ELIC: Epitelio luminal intercaruncular. EsIC: Estroma intercaruncular. EG: Epitelio Glandular

El inmunomarcado a COX-2 en la célula se visualiza de color marrón y su distribución en la misma se observó en el citoplasma, no se halló inmunomarcado a COX-2 en el núcleo de ningún tipo celular en ninguna de las muestras. En la Figura 2 se muestra como ejemplo el inmunomarcado a COX-2 en el citoplasma de la célula y un ejemplo de un control negativo. En el control negativo no se observa inmunomarcado a COX-2, las células negativas muestran una coloración azul correspondiente a la coloración con hematoxilina.

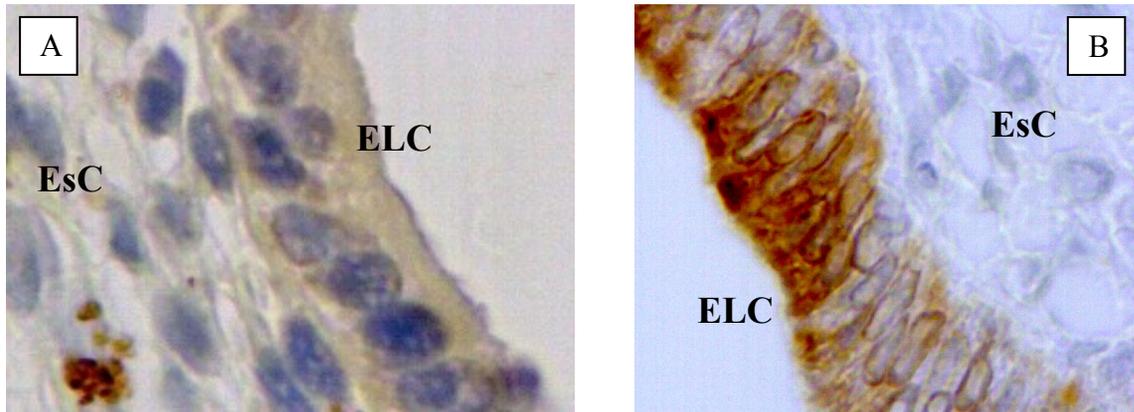


**Figura 2. A.** *Inmunomarcado a COX2 en epitelio luminal caruncular de tejido endometrial de oveja (ELC) a 1000X. B:* *control negativo de tejido endometrial de oveja (100X).Esc: Estroma caruncular*

El análisis de los resultados obtenidos en términos de intensidad de inmunomarcado y porcentaje de células con inmunomarcado a COX-2 dio igual significación y lleva a las mismas conclusiones. Por lo tanto los resultados se presentan en términos de intensidad de inmunomarcado, porque reflejan la presencia de COX-2 y diferencias en los niveles de expresión.

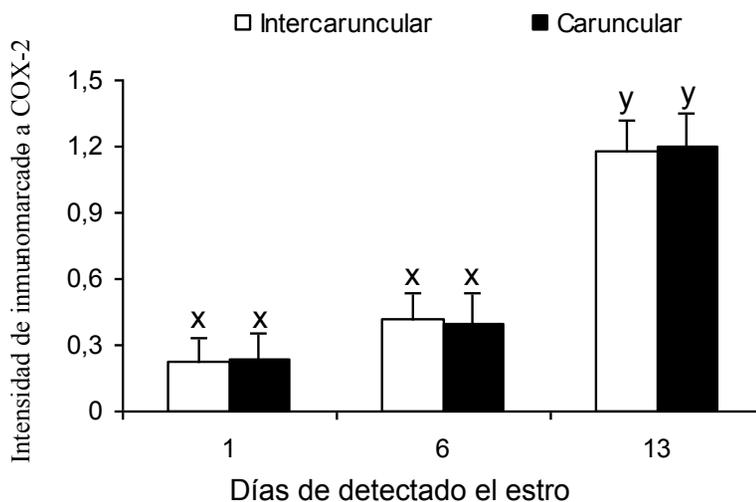
### 8.1 Ovejas ciclando en estación reproductiva

En las ovejas ciclando se encontró efecto de día ( $p < 0.0001$ ) sobre la intensidad y el porcentaje de inmunomarcado a COX-2. No se encontró efecto de localización, ni de observador. La intensidad de inmunomarcado a COX2 en las ovejas ciclando se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** **A.** Inmunomarcado a COX-2 en epitelio luminal caruncular de tejido endometrial de ovejas ciclando al día 6 de detectado el estro (1000X). **B:** Inmunomarcado a COX2 en epitelio luminal caruncular de tejido endometrial de ovejas ciclando al día 13 de detectado el estro (400X).

La intensidad de inmunomarcado fue mayor al día 13 de detectado el estro ( $p < 0.0001$ ) que a los días 1 y 6 entre los que no hubo diferencias. No se hallaron diferencias en el inmunomarcado a COX-2 entre el epitelio luminal intercaruncular y el caruncular en ninguno de los 3 días del ciclo estudiados (Figura 4).

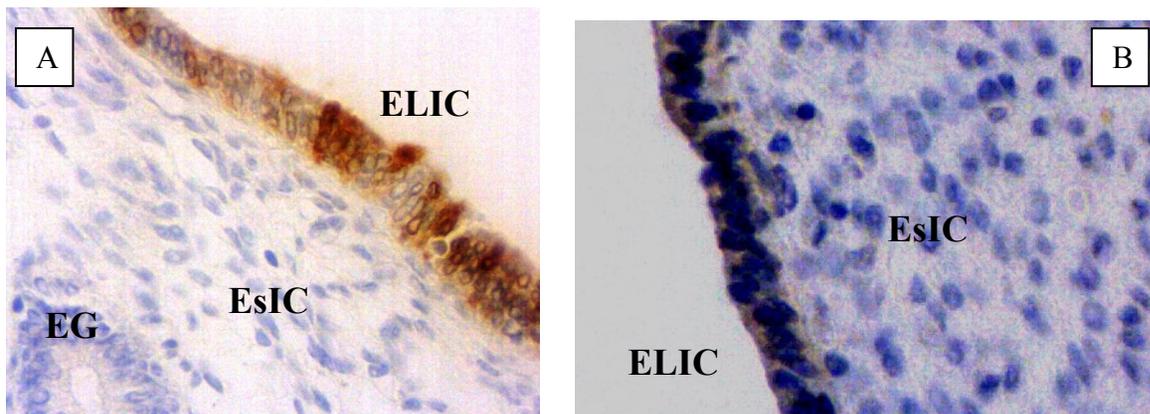


**Figura 4.** Promedios de intensidad de inmunomarcado a COX-2 (media  $\pm$  pooled s.e) en endometrio ovino durante el ciclo estral a los días 1 ( $n=7$ ), 6 ( $n=6$ ) y 13 ( $n=6$ ) de la detección de celo (día 0). x vs. y indica diferencias entre días para la misma localización ( $p < 0,05$ ).

## 8.2 Ovejas tratadas para inducir FLN y FLSN

En los animales tratados se encontró efecto de día ( $p=0.01$ ) y de tratamiento ( $p=0.002$ ) sobre la intensidad de inmunomarcado a COX-2. No se encontró efecto de observador, ni de localización, pero se encontró interacción entre tratamiento, día y localización ( $p<0.0001$ ).

La intensidad de inmunomarcado a COX2 en las ovejas tratadas con GnRH y con progesterona más GnRH se muestran en las figura 5 y 6.

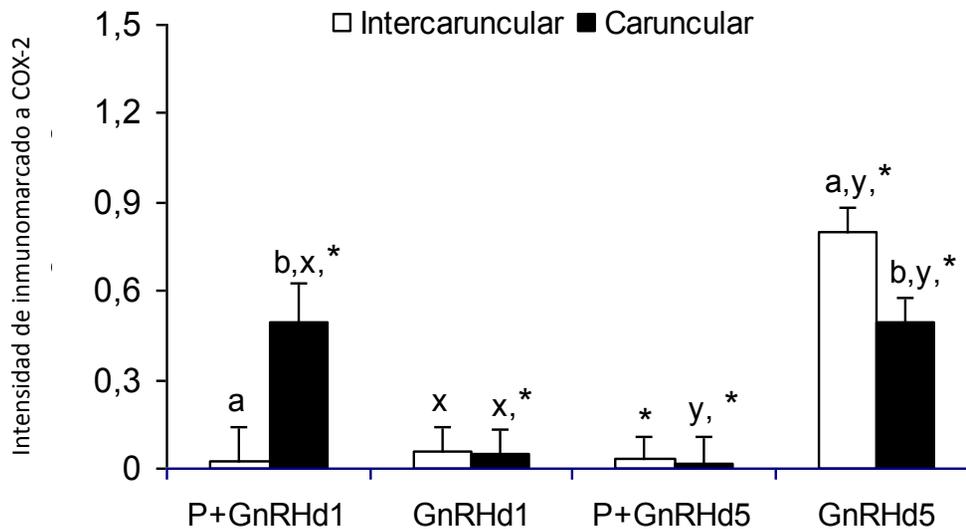


**Figura 5. A** Inmunomarcado a COX-2 en epitelio luminal intercaruncular de tejido endometrial de ovejas tratadas para inducir fase luteal subnormal al día 5 (100X). **B:** Inmunomarcado a COX-2 en epitelio luminal intercaruncular de tejido endometrial de ovejas tratadas para inducir fase luteal normal al día 5 (100X).

Hubo diferencias en el inmunomarcado a COX-2 entre el epitelio intercaruncular y caruncular para un mismo día y para el mismo tratamiento. En el grupo tratado para inducir FLN el inmunomarcado a COX-2 al día 1 fue mayor en el epitelio caruncular que en el epitelio intercaruncular, mientras en el grupo tratado para inducir FLSN no hubo diferencias. Por el contrario al día 5 no hubo diferencias en el inmunomarcado a COX-2 en el grupo tratado para inducir FLN, pero en el grupo tratado para inducir FLSN el epitelio luminal intercaruncular tuvo mayor intensidad de inmunomarcado que el epitelio luminal caruncular (Figura 6).

Al día 1 el grupo tratado para inducir FLN presentó un mayor inmunomarcado a COX-2 en el epitelio caruncular que el grupo tratado para inducir FLSN. Mientras que al día 5 en el grupo tratado para inducir la formación de FLN la intensidad de inmunomarcado a COX-2 fue menor en el epitelio caruncular y en el epitelio intercaruncular en comparación al grupo tratado para inducir la formación de FLSN (Figura 6).

Del día 1 al día 5 en el grupo FLN la intensidad de inmunomarcado a COX-2 disminuyó en el epitelio caruncular. Contrariamente en el grupo FLSN la intensidad de inmunomarcado a COX-2 aumentó del día 1 al día 5 en ambos epitelios, caruncular e intercaruncular (Figura 6).



**Figura 6.** Intensidad de inmunomarcado a COX-2 (media  $\pm$  pooled s.e) en endometrio de ovejas tratadas con P+GnRH para inducir la formación de FLN, o solamente con GnRH para inducir la formación de FLSN a los días 1 (n= 12) y 5 (n= 10) de administrado el bolo de GnRH. Para cada tratamiento en un mismo día a vs. b indica diferencias entre localizaciones. x vs. y indican diferencias entre días para una misma localización e igual tratamiento. \* indica diferencias entre tratamientos para igual localización e igual día ( $p < 0,05$ ).

## **9-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:**

En nuestro trabajo, para ambos diseños, no se detectó inmunomarcado a COX-2 en estroma, ni en epitelio glandular, sólo se detectó inmunomarcado en el epitelio luminal caruncular e intercaruncular del endometrio. Estos resultados concuerdan con lo descrito para ovejas ciclando, en endometrio (Charpingy y col., 1997; Charpingy y col. 1999) y en cérvix donde se localizó en las células epiteliales cervicales (Zhang y col., 2007). Sin embargo la COX-2 por inmunohistoquímica y el mensajero por hibridización in situ fueron reportados en el epitelio luminal pero además en epitelio glandular del endometrio ovino (Kim y col., 2003) y en epitelio luminal, glandular y estroma del endometrio de ratas por inmunofluorecencia (St-Louis y col., 2010). Las diferencias en la localización pueden ser debidas a la utilización de diferentes metodologías las cuales pueden presentar diferente sensibilidad. La localización específica de la COX-2 en el epitelio luminal podría deberse a que en este compartimento celular se producen y liberan los pulsos luteolíticos de PGF2 $\alpha$ . En apoyo a esta idea se reportó que la mayor producción de prostaglandinas en el endometrio al momento de la luteólisis son producidas por el epitelio luminal (Charpingy y col., 1999)

Como se mencionó anteriormente se ha documentado la localización de inmunomarcado a COX-2 en el epitelio luminal y glandular del endometrio ovino pero no encontramos trabajos que reporten como se distribuye la intensidad de inmunomarcado en los diferentes compartimentos histológicos donde se localizó. En nuestro trabajo la distribución de inmunomarcado a COX-2 en epitelio luminal intercaruncular y caruncular fue similar en ambos compartimentos en todos los días del ciclo estudiados, sugiriendo similar sensibilidad en ambos epitelios durante el ciclo estral normal. Nosotros encontramos similar intensidad de inmunomarcado a COX-2 a los días 1 y 6 de detectado el estro. Sin embargo Charpingy y col. (1997) no encontraron inmunomarcado antes del día 12, donde solo lo observaron en el epitelio luminal caruncular. Estas diferencias podrían deberse a que los autores antes mencionados utilizaron para realizar la técnica de inmunohistoquímica un anticuerpo primario monoclonal a diferencia de nuestro trabajo donde utilizamos un anticuerpo primario policlonal.

La destrucción del cuerpo lúteo al final del ciclo estral, es inducida por la secreción pulsátil de PGF2 $\alpha$  endometrial. La luteólisis normal en los ovinos ocurre alrededor del día 15-16 del ciclo. En nuestro trabajo encontramos un aumento en la expresión de COX-2 endometrial al día 13 del ciclo consistente con su participación normal en este proceso de luteólisis. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros investigadores, quienes describen la máxima expresión de COX-2 entre los días 12 (Kim y col., 2003) y 15 del ciclo (Charpingy y col., 1997). Estos mayores valores de

inmunomarcado a COX-2 ocurren durante la fase luteal, cuando existe predominio de la progesterona sobre los estrógenos. Esto concuerda con lo reportado en cérvix ovino, donde el tratamiento con estradiol aumentó la expresión de COX-2 y de mRNA-COX2 en ovejas ovariectomizadas en relación a los controles, pero el tratamiento con progesterona produjo un efecto estimulador mayor (Wu y col., 2005; Zhang y col., 2007).

En las ovejas tratadas para inducir FLN y FLSN encontramos diferencias en la intensidad de inmunomarcado a COX-2 entre el epitelio luminal caruncular e intercaruncular, mientras que en las ovejas ciclando en la estación reproductiva la intensidad de inmunomarcado fue similar en ambos epitelios. Estas diferencias pueden ser debidas a que las ovejas tratadas, con GnRH con o sin progesterona previa, estaban en anestro y sus niveles de hormonas esteroides ováricas eran basales.

En las ovejas tratadas con progesterona previa puede haber un efecto estimulador de esta hormona sobre la expresión de COX-2 (Wu y col., 2005; Zhang y col., 2007) que explique una mayor intensidad de inmunomarcado en el epitelio luminal caruncular al día 1, que en las tratadas solo con GnRH. La mayor expresión de la COX-2 en las ovejas tratadas para inducir la FLN alrededor de la ovulación (día 1) en relación a las tratadas para inducir la FLSN promovería en esos animales un estímulo en la síntesis de PGF2 $\alpha$ , mediador clave en el normal desarrollo de la luteogénesis, participando activamente en los procesos de angiogénesis y vascularización del cuerpo lúteo (Shirazuna y col., 2010).

En las ovejas tratadas para inducir FLSN la intensidad de inmunomarcado a COX-2 aumentó en ambos epitelios del día 1 al día 5, sin embargo este aumento en la intensidad de inmunomarcado no fue observado en las ovejas tratadas para inducir FLN (día 5) ni en las ovejas ciclando en la estación reproductiva (día 6). Además, en las ovejas tratadas solamente con GnRH para inducir función luteal subnormal, se observó un aumento en la expresión del RP al día 5 del bolo de GnRH en comparación al día 1 lo que no se observó en las tratadas para inducir función luteal normal (Tasende y col., 2005b), ni en los animales ciclando en estación reproductiva donde la expresión de RE y RP disminuyen desde el día 1 al 6 (Tasende y col., 2005a). Al comparar la expresión de los receptores esteroideos y la intensidad de inmunomarcado a COX-2, los animales del grupo tratado para inducir FLN tienen un comportamiento similar a las ovejas ciclando en estación reproductiva, a diferencia de los tratados para inducir FLSN. Estos resultados en su conjunto sugieren diferencias en la sensibilidad endometrial a la progesterona entre ambos grupos tratados, lo que podría explicar el aumento temprano de la expresión de COX-2 en los animales con FLSN. Por lo tanto el tratamiento previo con progesterona tiene un rol importante en la expresión de COX-2 tanto alrededor de la ovulación (día 1) como en la fase luteal temprana (día 5).

En conclusión la liberación anticipada de PGF2 $\alpha$  se ha postulado como una de las principales causas de la función luteal subnormal (Zollers y col., 1993). En acuerdo con esta teoría nuestros resultados demuestran que existe una mayor expresión de COX-2

al día 5 en el epitelio luminal caruncular e intercaruncular de todos los animales tratados para inducir FLSN en comparación con el grupo tratado para inducir FLN. Este aumento prematuro en la expresión de la COX-2 desde el día 1 al 5 en los animales con función luteal subnormal, sugiere que se produce un aumento temprano en la síntesis de PGF2 $\alpha$  desencadenando la luteólisis prematura, mecanismo que causaría la función luteal sub-normal.

## **11-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Bartlewski, P.M., Beard A.P., Cook S.J., Chandolia R.K., Honaramooz A., Rawlings N.C. (1999). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod Fertil.*;115 (1):111-24.

Bartlewski P.M., Tanya E., Jennifer L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 124 259–268.

Boos, A., Meyer, W., Schwarz, R., Grunert, E. (1996). Immunohistochemical assessment of estrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 44: 11–21.

Cardelino, R.C., Salgado, C., Azzarini, M. (1994). La producción ovina y lanera en Uruguay. *Prod. Ovina (Uruguay)*. 7:7-22.

Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J-P., Crèminon, C., Martal, J., Maclouf, J., Guillomot, M. (1997). Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 138, 2163–2171.

Charpigny, G., Reinaud P., C' minon C., Tamby J-P. (1999). Correlation of increased concentration of ovine endometrial cyclooxygenase 2 with the increase in PGE2 and PGD2 in the late luteal phase. *Journal of Reprod. and Fert.* 117, pp 315-324.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Disponible en :<http://www.fao.org/home/es/> consultado en 25/7/2013

García Mejjide, J.A., Gómez-Reino J., Carnota J. (2000). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2 *Esp Reumatol.*;27:33-5.

Garverick, H.A., Zoller, W.G. Jr., Smith, M.F. (1992). Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Animal Reproduction Science* 28, 111–124.

Ginter, OJ. Kot, K. Wiltblank, M.C. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the oestrus cycle in ewes. *Theriogenology* 43: -703.

Hunter M.G. 1991. Characteristics and causes of inadequate corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility* 43 (suppl):91-99.

Ing, N.H., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. (1993) Progesterone and estrogen. *Genes in mammalian reproduction*. Ed: Gwatkin, R. B. L. Wiley-Liss Inc.: New York, NY. 271-291 pp

International Wool Textile Organization Statistics for the Global Wool Production and Textile Industry (2004). Disponible en <http://www.iwto.org/>, consultado en 14/7/2013

Karsch, F.J., Goodman, R.L., Legan, S.J. (1980). Feedback basis of seasonal breeding: test of an hypothesis. *J Reprod Fertil.* 58(2):521-35.

Keisler, D.H., Inskeep, E.K. y Dailey, R.A. (1983). First luteal tissue in ewe lambs: influence on the subsequent ovarian activity and response to hysterectomy. *Journal Animal Science* 57, 150–156.

Kim S., Youngsok, C., Spencer, T.E., Bazer, F.W. (2003). Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:58

Lee J., McCracken J.A., Sakhila K. Banu, Rodriguez R., Thamizh K. Nithy, and Joe A. Arosh (2010). Transport of Prostaglandin F<sub>2</sub> Pulses from the Uterus to the Ovary at the Time of Luteolysis in Ruminants Is Regulated by Prostaglandin Transporter-Mediated Mechanisms. *Endocrinology*, 151(7):3326–3335.

Lee J, McCracken JA, Banu SK, Arosh JA. (2013). Intrauterine inhibition of prostaglandin transporter protein blocks release of luteolytic PGF<sub>2</sub>α pulses without suppressing endometrial expression of estradiol or oxytocin receptor in ruminants. *Biol Reprod.* 89(2):27-37.

McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological reviews* 79, 263–323.

McLeod, B.J., Haresign, W., Lamming, G.E. (1982). Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injections of GnRH with and without progesterone pretreatment. *Journal of reproduction and fertility* 65, 223–230

McLeod, B.J., Haresign, W. (1984). Evidence that progesterone may influence subsequent luteal function in the ewe by modulating preovulatory follicle development. *Journal of Reproduction and Fertility* 71, 381–386.

Meikle, A., Bielli, A., Masironi, B., Pedrana, G., Wang, H., Forsberg, M., Sahlin, L. (2000). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reproduction Nutrition and Development* 40: 587-596.

Meikle, A., Tasende, C., Sosa, C., Garofalo, E.G. (2004). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (4) 385–394.

Miller, B.G., Murphy, L. Stone, G.M. (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *J Endocrinol.* 73(1):91-98.

Milvae, R.A., Hinckley, S.T., Carlson, J.C. (1996). Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 45: 1327–1349.

Moor, R.M., Booth, W.D., y Rowson, L.E.A. (1966). Effect of hysterectomy on the life-span of corpora lutea induced artificially in progesterone-treated ewes. *Journal of reproduction and fertility* 12, 385–387.

Niswender, G., Juengel, P.J Silva, M. Keith, R, and Mcintush E. (2000). Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum *Physiological reviews* Vol. 80, No. 1

Ravindra, J. P., y Rawlings, N.C. (1997). Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. *Journal of reproduction and fertility* 110, 279–289.

Rexroad C.E. Jr (1981). Estrogen and progesterone binding in the myometrium of the ewe. I. During the estrous cycle. *J Anim Sci.* 53(4):1057-69.

Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Puime P, Garófalo EG. (2008). Oestrogen and progesterone receptor binding capacity and oestrogen receptor alpha expression (ERalpha mRNA) along the cervix of cycling ewes. *Reprod Fertil Dev.* 2008;20 (3):350-356.

Oficialdegui R. (2002). Sheep production systems at pasture. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 10(2): 110-116

St-Louis, I., Singh, M., Brasseur, K., Leblanc ,V. Parent, S., Asselin, E. (2010). Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8:103

Salazar, A.B., Cámara, J.A.N., Martínez, F.J.P. (2013). Citología e histología veterinaria. <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologia-e-histologia-veterinaria>. Consultado 23/12/2013

Secretariado Uruguayo de la lana (SUL) Disponible en <http://www.sul.org.uy/> consultado en 22/11/2013

Shirazuna K., Sasahara K., Matsui M., Shimizu T., Miyamoto A. (2010). Prostaglandin F2 $\alpha$  Differentially Affects mRNA Expression Relating to Angiogenesis, Vasoactivation and Prostaglandins in the Early and Mid Corpus Luteum in the Cow. J. Reprod. Development. Vol 56, n $^{\circ}$ 4.

Skarzynski D.J., Ferreira-Dias, G., Okuda K. (2008). Regulation of Luteal Function and Corpus Luteum Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and Intercellular Communication. Reprod Dom Anim 43 (Suppl. 2), 57–65

Smith, M. F., McIntush, E.W., Smith, G.W. (1994). Mechanisms associated with corpus luteum development. J Anim. Sci., 72:1857-1872.

Sosa, C., Lozano, J.M., Viñoles C., Acuña, S., Abecia, J.A., Forcada, F., Forsberg, M., Meikle, A. (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. Animal Reproductive Science 84: 337–348.

Southee, J.A., Hunter, M.G., Haresign, W. (1988). Function of abnormal corpora lutea in vivo after GnRH-induced ovulation in the anoestrous ewe. Journal of reproduction and fertility 84, 131–137.

Tambler A. (2006 ). Anuario OPYPA disponible en <http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario06/docs/05%20-%20OVINOS%20MU%C3%91OZ.pdf>

Tasende, C., Rodríguez-Piñón, M., Acuña, S., Garófalo, E.G., Forsberg, M. (2005a). Corpus luteum life span and pituitary oestrogen and progesterone receptors in cyclic and gonadotrophin-releasing hormone-treated anoestrous ewes. Reproduction fertility and development, 17, 721–726.

Tasende, C., Forsberg, M., Rodríguez-Piñón, M., Acuña, S., Garófalo, E.G. (2005b). Experimentally induced subnormal or normal luteal phases in sheep: reproductive hormones profiles and uterine sex steroid receptor expression. Reproduction fertility and development 17, 565–571.

Textbook of endocrinology. Chapter 3 (1992). Mechanism of steroid hormones action. Clark JH. Schrader WT. O'Malley BW. Eds. Wilson JD. Foster DW.: WB Saunders.: Philadelphia. pp 35-90.

Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Meikle, A., Kamimura, S., Bilby, T., Kowalski, A.A., Badinga, L., Pershing, R., Bartolome, J., Santos, J.E.P. (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction Suppl* 61, 253–66.

The physiology of reproduction. Chapter 10 (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. Goodman R.L. Eds: Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, New York, NY. 659–709 pp.

The physiology of reproduction. Chapter 12 (1994). Corpus luteum and its control in infraprimate species. Niswender, G.D., Nett, T.M. Eds: Knobil, E., Neill, J.D. Raven Press, New York, NY. 781–816 pp.

The Physiology of Reproduction Chapter 17 (1994). Actions of ovarian steroid hormones. Clark J.H., Mani, S.K. New York. Eds: Knobil E. Neill JD. Raven Press Ltd.: 10111046.

The physiology of reproduction Chapter 4 (2006). Implantation. Sudhansu K., Hyunjung L. 3ra. ed. Eds: Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, New York, NY 147-188 pp

The physiology of reproduction. Chapter 11 (2006). Ovulation. Espey, L., Richards J. New York,. 425-458 pp Eds: Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press.

The physiology of reproduction. Chapter 13 (2006). Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. Stouffer R.L. 3ra. Ed. Eds: Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, New York, NY. Pp 475-526

The physiology of reproduction. Chapter 14 (2006). Gonadotropin Signaling in the Ovary. Hunzicker-Dunn, M., Kelly, M. New York 3ra. ed. Eds: Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, 547-593 pp

The physiology of reproduction Chapter 15 (2006). Steroid Receptors in the Ovary and Uterus. Couse J.F., Hewitt, C., Kenneth S. Korach. New York, NY 3ra. Ed. Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press,.594-657.

The physiology of reproduction. Chapter 39 (2006) Puberty in the Sheep. Douglas L. F., Leslie M. Jackson. New York, 3ra. ed. Eds: Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, 2127-2168 pp.

The physiology of reproduction. Chapter 41 (2006) Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. Malpoux B. New York 3ra. ed. Eds: Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, , 2327-2389 pp

The physiology of reproduction. Chapter 44 (2006). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Sheep. Goodman R.L. and Inskeep E.. New York 3ra. ed. Eds: Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, , 2389-2448 pp

Vane, J.R., Bakhle S., Botting R.M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.. 38:97–120

Webb, R., Woad K.J., Armstrong D.G. (2002). Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. Domestic Animal Endocrinology 23 277–285

Wu, W.X., Coksaygan, T, Chakrabarty, K., Collins, V., Rose, J.C., Nathanielsz, P.W. (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(2):343-50..

Zhan,g Q., Collins, V., Chaakrabaty, K., Roses J., Wu W. (2007). Regulations of prostaglandin enzymatic system by estradiol and progesterone in non pregnant sheep cervix. Reproduction 133:1027-1034

Zollers, W.G., Garverick, H.A., Smith, M.F., Moffatt, R.J., Salfen, B.E., Youngquist, R.S. (1993) . Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. Journal of reproduction and fertility 97, 329–337.