

Evaluación del perfil proteico en el fluido luminal uterino de la oveja durante el ciclo estral

Evaluation of the protein profile of the uterine luminal fluid of the sheep during estrous cycle

Rodríguez-Márquez, J.¹ Hernández, A.² Morales-Piñero, R.³ Hidalgo, G.¹

¹ Unidad de Investigaciones de Ciencias Morfológicas (UNICIM). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Apartado 15252. Maracaibo 4005-A. Estado Zulia. Venezuela. jrodriguez@luz.edu.ve; jmrodrim@cantv.net.

² Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

³ Médico Veterinario. Estudiante de Maestría. Ejercicio Libre. Venezuela.

Resumen

Para conocer las proteínas involucradas en la implantación del embrión ovino, se debe tener clara influencia de los E₂ y la P₄ en la síntesis y secreción de ellas. Así se consideró necesaria la evaluación de las proteínas del fluido luminal uterino (FLU) durante el ciclo estral (CE) ovino y entender las funciones regionales del útero. Para esto se seleccionaron 8 ovejas criollas, sexualmente maduras y cíclicamente sanas (se siguieron dos CE), divididas en 2 grupos (G1: Día 0= predominio estrogénico; G2: Día 12= predominio progestacional). Al tercer ciclo se sacrificaron al día 0 (G1) y al día 12 (G2) y se tomaron muestras del FLU por lavados locales (NaCl 0.15M estéril), se le adicionó inhibidores de proteasas, se centrifugó y se congeló a -20°C. Antes del análisis se centrifugaron y el pellet sembrado en medios de cultivo para hongos y bacterias a fin de verificar que las muestras no se contaminaron. La concentración proteica se determinó por Bradford, separadas por electroforesis (1D-SDS-PAGE y 2D-SDS-PAGE) y, coloreadas con Comassie, Plata y Zacharius. Se realizaron análisis de correlación, pruebas de t-Student y estadística descriptiva. El análisis de las electroforéticos se hizo mediante el empleo de análisis multivariado determinando el coeficiente de distancia entre pares de variables. Durante el CE hubo mayor concentración e individual de proteínas en la región posterior del cuerno y en el cuerno ipsilateral al ovario con folículo ovulatorio o CL, al día 0 dos de estas proteínas de bajo pH y PM corresponden al IGF-I y al EGF cuya secreción es favorecida por los E₂. En la región posterior Vs la anterior se encontraron 8 proteínas predominantes (de ≠ PM y PI), que serían responsables de acondicionar y favorecer la implantación en esta zona. En conclusión: Se observó mayor número de proteínas al día 0 Vs 12, por lo que los E₂ tendrían mayor influencia en la secreción de proteínas endometriales posiblemente por que estimulan la maduración del aparato secretor.

Palabras clave: Oveja, ciclo estral, proteínas endometriales.

Introducción

Se ha reportado que existen varias proteínas cuya secreción esta condicionada al estatus de esteroides (E₂ y la P₄) [revisado por Findlay et al., 1981], en tal sentido la tasa de secreción de proteínas debe cambiar entre los diferentes estadios del CE. Los E₂ desempeñan un papel esencial en la secreción de proteínas uterinas en la oveja in Vitro. Se demostró que tejido uterino de ovejas tratadas con estrógenos tuvo un incremento general en la capacidad sintética de proteínas, efecto no encontrado en animales tratados con P₄; sin embargo, ésta también interfiere en la secreción de algunas proteínas [Findlay et al., 1981]. En otros estudios también se demuestra que la influencia de los E₂ es indispensable en la secreción de proteínas uterinas, principalmente en combinación con la P₄, ya que el endometrio de ovejas ovariectomizadas sufre alteraciones en el patrón de secreción de proteínas lo cual depende de la presencia de E₂ y P₄ [Murray y Sower, 1992]. Por otro lado, se sabe que la progesterona también tiene influencia sobre la secreción de proteínas, ya que las proteínas de la leche uterina son sintetizadas y liberadas desde el epitelio endometrial en cantidades copiosas cuando los animales ovariectomizados son tratados con P₄, pero este incremento solo fue visto luego del día 14 de iniciada la terapia de progesterona [Ing et al., 1989].

La P₄ regula la síntesis del factor de crecimiento epidérmico [Harvey et al., 1995], el cual aumenta el número de receptores para P₄ favoreciendo su acción [Taga, 1992]. En la vaca, la proporción de proteínas liberadas fue afectada por el día del CE, cuerno uterino y proximidad del cuerno al sitio de la ovulación y concentración de progesterona, donde el endometrio al día 0 liberó mas proteínas que los otros días del CE, y mayor en el cuerno contralateral que en el ipsilateral [Williams et al., 1992].

Para conocer las proteínas involucradas en la implantación embrionaria, se debe tener clara la influencia de los E_2 y la P_4 en la síntesis y secreción de ellas. Así se consideró necesaria la evaluación de las proteínas del FLU durante el CE ovino y entender las funciones regionales del útero. De igual manera, este estudio se considera de particular importancia para entender las funciones regionales del útero, así como la inducción de proteínas secretorias por acción de esteroides, lo cual ayudaría a determinar la secuencia de eventos en el medio ambiente intrauterino necesario para regular el establecimiento y mantenimiento de la gestación.

El objetivo del trabajo fue caracterizar y diferenciar los perfiles electroforéticos de proteínas secretorias en el fluido luminal uterino durante el CE ovino (días: 0 y 12).

Materiales y Métodos

Se emplearon 8 ovejas criollas, sexualmente maduras y cíclicamente sanas (se siguieron dos CE), divididas en 2 grupos (G1: Día 0= predominio estrogénico; G2: Día 12= predominio progestacional). Al tercer ciclo se sacrificaron al día 0 (G1) y al día 12 (G2) y se tomaron muestras del FLU por lavados locales (NaCl 0.15M estéril), se le adicionó inhibidores de proteasas, se centrifugó y se congeló a -20°C . Antes del análisis se centrifugaron y el pellet sembrado en medios de cultivo para hongos y bacterias a fin de verificar que las muestras no se contaminaron. La concentración proteica se determinó por Bradford, separadas por electroforesis (1D-SDS-PAGE y 2D-SDS-PAGE) y, coloreadas con Comassie, Plata y Zacharius. Se realizaron análisis de correlación, pruebas de t-Student y estadística descriptiva. Para el análisis de los perfiles electroforéticos, se determinó el comportamiento de la variabilidad mediante el empleo de análisis multivariado determinando el coeficiente de similaridad y la distancia entre pares de variables.

Se eligió esta medida de similaridad, que excluye el número de bandas ausentes simultáneamente en las dos variables, ya que esta ausencia no constituye necesariamente una semejanza entre variables, aunado a que cuando la similaridad es alta el coeficiente tiene un valor de sesgo menor [Martínez, 1995].

Con la finalidad de resumir las distancias para realizar las inducciones y deducciones, se utilizó el manejo de una matriz de distancias y con ella se hizo la inferencia estadística mediante la representación de diagramas o figura bidimensional conocida como dendograma [Martínez, 1995].

Los datos fueron procesados mediante el uso de un paquete estadístico computarizado. Minitab, Inc. Ver. 7.2.

Resultados y Discusión

Contenido de proteínas totales del FLU

La mayor concentración de proteínas totales se encontró en la región posterior de los cuernos, tanto al día 0 (0.492 ± 0.084 mg/ml anterior Vs. 0.782 ± 0.14 mg/ml posterior) como al día 12 (0.161 ± 0.045 mg/ml anterior Vs. 0.304 ± 0.052 mg/ml posterior). No se encontraron diferencias entre el cuerno ipsilateral al ovario que contenía bien el folículo ovulatorio o el cuerpo lúteo y el contralateral, lo anterior indicaría que hay una influencia regional de los esteroides ováricos sobre la secreción de proteínas uterinas en la oveja. La mayor concentración de proteínas en la parte posterior del cuerno uterino podría favorecer la implantación embrionaria ya que la oveja es una especie donde el 100% de los embriones se ubican de la mitad del cuerno uterino hacia atrás [Rodríguez, 1996].

Perfil de proteínas del FLU ovino por electroforesis de SDS-PAGE

Bajo esta técnica no se encontraron diferencias en el perfil entre las diferentes regiones del útero aunque algunas proteínas se encontraron en mayor concentración en unas zonas respecto otras (Figura 1). Entre las dos condiciones del CE (días 0 y 12), se encontró una diferencia de un 18%, representada en la presencia de dos proteínas de alto peso molecular ~ 159 y 117 kDa al día 0 y no al día 12 del CE. Otra diferencia es la mayor concentración de proteínas individuales al día 0 respecto al día 12, notado en las proteínas de 66 kDa. y de 55 kDa y principalmente en las menores de 50 kDa; contrariamente, al día 12 se encontró una proteína de alto PM ~ 140 kDa (Figura 1). Resultados similares fueron encontrados en ovejas sincronizadas con progestágenos con una disminución en la expresión de receptores de estrógenos y de progesterona, así como en la expresión de proteínas por parte de las células uterinas [García-Palencia et al., 2007].

Perfil proteico del flu ovino por electroforesis 2d-sds-page

El día 0 del CE se identificaron en promedio 140 proteínas a partir de los cuales se encontraron diferencias desde un 3.5% a un 6.9% entre las regiones uterinas (Figura 2) donde hubo un predominio en la secreción de proteínas del cuerno ipsilateral y mayor en la porción posterior del cuerno, de manera que existe una influencia regional de los E_2 . En el cuerno ipsilateral se encontraron varias proteínas (~ 24) (Figura 3) las cuales no se encontraron en el cuerno contralateral. Dentro estas proteínas se encontraron dos de pH bajo,

una de ~7.7 kDa que coincide con el PM del IGF-I, y otra de ~6.5 kDa con el del EGF, los cuales actúan como potentes mitógenos. El IGF-I por sí solo es débilmente estimulador de la proliferación celular pero potencia la actividad de otros mitógenos, tales como el EGF [Corp y Brown, 1988], lo que explica la expresión conjunta de ambos factores de crecimiento. Su secreción en el cuerno ipsilateral se ve favorecida posiblemente por una acción local de los E₂ que inducen la secreción del IGF-I por las células uterinas y que a su vez actúa localmente para estimular la síntesis del EGF en el útero.



Figura 1. Electroforésis 1D-SDS-PAGE. Proteínas presentes en fluido uterino separadas en geles al 11% (A), coloreadas con nitrato de plata. Carril 1= pesos moleculares estándares; carriles 2 a 5= día 0 del CE y, carriles 6 a 9= día 12 del CE. Flechas indican presencia de una proteína en esa condición y ausente en la otra. Carril 1 proteínas de ~159 y 117 kDa y en el carril 6 proteína de ~140. Note la menor concentración de proteínas individuales en los carriles 6 a 9.

Las diferencias encontradas entre la región anterior y posterior fue del 3.5% en el cuerno ipsilateral y de 6% en el contralateral (Figura 2) radicada principalmente en el predominio de 8 proteínas secretadas en la parte posterior del cuerno uterino. Dentro de estas proteínas se encontraron 2 proteínas ácidas (PI= 5.0) de alto PM 168 kDa y 129 kDa. Las otras proteínas son de ~39 kDa (PI ~6.33); ~31 kDa (5.7); ~36 kDa (7.2) y dos básicas de ~37-38 kDa (PI ~7.78). Dichas proteínas podrían ser responsables de acondicionar y favorecer la implantación en dicha zona.

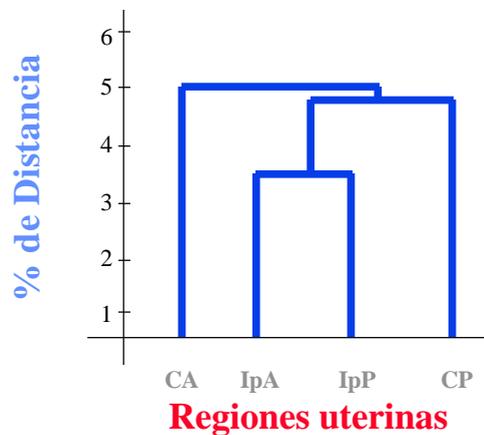


Figura 2. Representación gráfica (Dendograma), de las distancias (diferencias) entre las regiones uterinas al día 0 del CE. CA= región contralateral anterior; CP= región contralateral posterior; IpA= región ipsilateral anterior; IpP= región ipsilateral posterior.

El día 12 de CE se encontraron diferencias entre cuernos y entre regiones. A diferencia del día 0, el menor porcentaje de distancia fue entre las regiones posteriores de los cuernos ipsilateral y contralateral, diferencia que varió desde un 2.0 a un 10.1% (Figura 4) con predominio de las proteínas secretadas en el cuerno ipsilateral y en la región posterior.

Al analizar las proteínas liberadas en el FLU ovino por 2D-SDS-PAGE en ambos cuernos uterinos bajo dominio progestacional (Figura 5), se observó que las proteínas predominantes en el cuerno ipsilateral fueron una de pH alto (PI ~7.87) de ~25.7 kDa y un complejo de 3 proteínas del FLU con similar PM ~60

kDa con un rango de PI de ~4.16 a 4.44. No se encontraron proteínas en el cuerno contralateral y ausentes en el ipsilateral bajo dominio prostestacional.

Las diferencias entre regiones del mismo cuerno al día 12 del CE estuvieron representadas por dos proteínas presentes en la región anterior y no en la posterior (~14.9 kDa ; PI ~7.4 y <6.5 kDa ; PI ~6.73) y un complejo de dos proteínas en la región posterior con similar rango de punto isoelectrico (5.07- 5.21) y peso molecular (94-96 kDa).

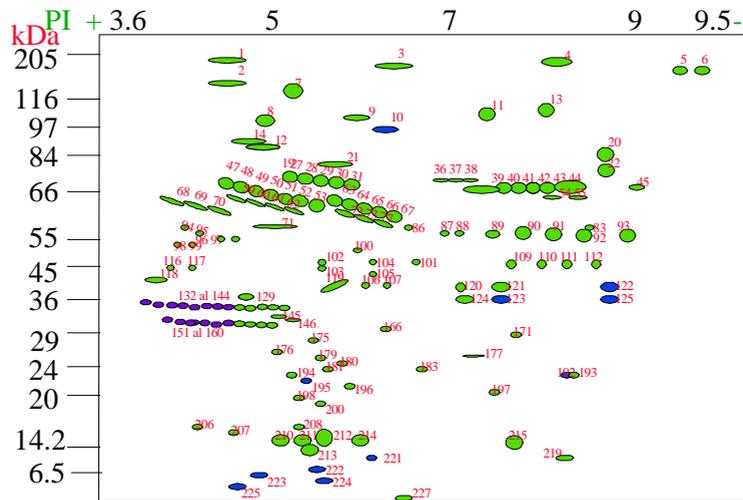


Figura 3. Representación esquemática del número total de proteínas del FLU al día 0 del CE. Proteínas comunes son mostradas como (●). Diferencias cualitativas presentes en el cuerno ipsilateral y ausentes en el contralateral son mostradas como (●). Pesos moleculares son indicados en el lado izquierdo y la carga de separación producida por isoelectroenfoco en el lado superior.

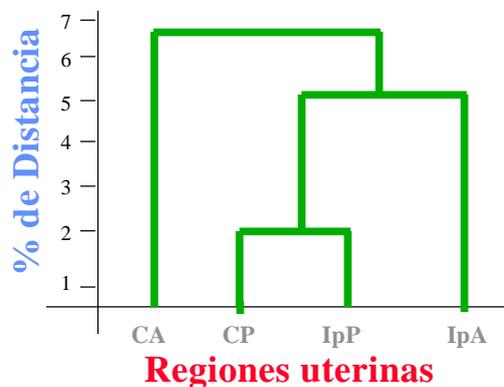


Figura 4. Representación gráfica (Dendrograma), de las distancias (diferencias) entre las regiones uterinas al día 12 del ciclo estral. CA= región contralateral anterior; CP= región contralateral posterior; IpA= región ipsilateral anterior; IpP= región ipsilateral posterior.

Conclusiones

Se observó mayor número de proteínas al día 0 Vs 12, por lo que los E₂ tendrían mayor influencia en la secreción de proteínas endometriales.

Existen diferentes perfiles proteicos entre las regiones uterinas tanto bajo dominio estrogenito como prostestacional.

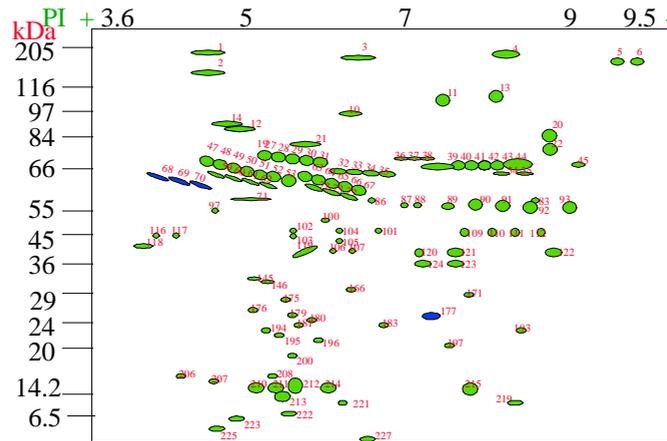


Figura 5. Representación esquemática del número total de proteínas del FLU al día 12 del CE. Proteínas comunes son mostradas como (●). Diferencias cualitativas presentes en el cuerno ipsilateral y ausentes en el contralateral son mostradas como (●). Pesos moleculares son indicados en el lado izquierdo y la carga de separación producida por isoelectroenfoco en el lado superior.

Literatura Citada

- Corp, A.N. and K. D. Brown. 1988. Ligand-receptor interactions involved in the stimulation of swiss 3T3 fibroblasts by insulin-like growth factors and insulin. *Biochem. J.* 252: 119-125.
- Findlay, J. K., N. Ackland, R. D. Burton, A. J. Davis, F. M. M. Walker, D. E. Walters, and R. B. Heap. 1981. Protein, prostaglandin and steroid synthesis in caruncular and intercaruncular endometrium of sheep before implantation. *J. Reprod. Fertil.* 62: 361-377.
- García-Palencia P., M.A. Sánchez, A. Nieto, M.P. Vilar, M. González, A. Veiga-Lopez, A. González-Bulnes and J.M. Flores. 2007. Sex steroid receptor expression in the oviduct and uterus of sheep with estrus synchronized with progestagen or prostaglandin analogues. *Anim. Reprod. Sci.* 97: 25-35.
- Harvey, M. B., K. J. Leco, M. Y. Arcellana, X. Zhang, D. R. Edwards, and G. A. Schultz. 1995. Roles of growth factors during peri-implantation development. *Moll. Human Reprod.* 10: 712-718.
- Ing, N. H., H. Francis, J. Mc Donnell, J. F. Amann, and R. M. Roberts, 1989. Progesterone induction of the uterine milk proteins: major secretory proteins of sheep endometrium. *Biol. Reprod.* 41: 643-654.
- Liu, W. J. and P. J. Hansen, 1993. Effect of the progesterone-induced serpin-like proteins of the sheep endometrium on natural-killer cell activity in sheep and mice. *Biol. Reprod.* 49: 1008-1114.
- Martínez, O. 1995. Análisis estadístico en biología molecular: uso y aplicación en poblaciones vegetales. "Simposio internacional de estadística en agricultura y medio ambiente". CIAT, Palmira, 153-171.
- Murray, M. K. and S. A. Sower, 1992. Estrogen- and progesterone-dependent secretory changes in the uterus of the sheep. *Biol. Reprod.* 47: 917-924.
- Rodríguez, J. M. 1996. Mortalidad embrionaria y morfofisiología de la implantación en ovejas en condiciones de competencia intrauterina. Tesis, M.Sc. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá 107p.
- Taga, M. 1992. Role of growth factors in the regulation of embryo development and implantation. *Nippon - Sanka - Fujinka-Gakkai-Zasshi.* 44: 939 - 948.
- Williams, B. L., F. C. Gwazdauskas, and R. E. Pearson. 1992. The effect of day of the estrous cycle, location of ovulatory structure, and progesterone on in vitro bovine endometrial secretions. *J. Dairy Sci.* 75: 2112-2118.