



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

***“Cambios histomorfológicos y del receptor a progesterona
inducidos por gonadotropinas exógenas en el ovario y
útero de cerdas”***

Tesis

**Que para optar por el grado de Maestro en Ciencias de la
Producción y de la Salud Animal**

Presenta:

MVZ OSWALDO CRUZ LEÓN

TUTOR: DR SANTIAGO RENÉ ANZALDÚA ARCE - FMVZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA – FMVZ

DRA ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR – INP



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Resumen.....	1
Antecedentes y Marco teórico.....	2
Anatomía, histología y Fisiología del útero.....	2
Progesterona y sus receptores.....	3
Ciclo Estral de la cerda.....	8
Ovogénesis y foliculogénesis.....	10
Tratamientos con gonadotropinas no hipofisiarias.....	13
Justificación.....	14
Objetivos.....	15
Hipótesis.....	15
Materiales y Métodos.....	16
Resultados.....	21
Discusión y conclusiones.....	35
Referencias.....	39

Resumen

Los tratamientos con gonadotropinas no hipofisiarias se utilizan de manera rutinaria en la producción de cerdos, sin embargo, los efectos que estos tienen sobre la fisiología y morfología histológica de los órganos reproductores de la hembra aún no se han estudiado a profundidad. De tal forma que en este trabajo se realizó un estudio con 13 cerdas de la raza Landrace x Yorkshire. Con la finalidad de evaluar los cambios que diferentes tratamientos con gonadotropinas no hipofisiarias (eCG y hCG) sobre la histomorfología del aparato reproductor de la cerda, así como, determinar los efectos de estos tratamientos sobre el receptor. Se les administraron 3 concentraciones diferentes de gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropina coriónica humana (hCG). Las proporciones fueron las siguientes: PG600 (400 eCG UI/200 hCG UI), 1000 eCG UI/500 hCG UI (M/500) y 1000 eCG UI/1000 hCG UI (M/M). Se obtuvieron los siguientes resultados: El tamaño de los folículos mostró una diferencia estadísticamente significativa, se observó un mayor tamaño folicular en los animales tratados con PG 600 en comparación con el resto de los grupos ($p < 0.05$). El tratamiento de M/M mostró un mayor número de cuerpos lúteos en relación con el grupo control ($p < 0.05$). El tamaño de los cuerpos lúteos se observó mayor en los animales de los grupos tratados en relación con el grupo control ($p < 0.05$). La medición del índice de mitosis en el epitelio uterino mostró un aumento estadísticamente significativo de la mitosis en el grupo tratado con una concentración de M/500. El índice de mitosis en el epitelio glandular no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.05$). El índice de apoptosis en el epitelio uterino resultó con aumento igualmente considerable en los grupos tratados con una concentración de M/500 y M/M ($p < 0.05$). El índice de apoptosis en el epitelio glandular aumentó en los grupos con una concentración de M/M y M/500 ($p < 0.05$). En cuanto a los receptores a progesterona en el útero se encontró que, la expresión disminuyó en el epitelio de revestimiento con el tratamiento de M/500. En la lámina propia (estroma) se observó un aumento de la expresión en todos los grupos. En el epitelio glandular y en miometrio la expresión disminuyó con el tratamiento de M/500. Estos resultados sugieren que existe en efectos sobre la histomorfología del útero y el receptor a progesterona dependiendo de las concentraciones y la proporción de las hormonas exógenas utilizadas en los tratamientos.

Antecedentes y Marco teórico

Actualmente en el área de investigación médico veterinaria, el cerdo ha representado un modelo de estudio con un gran potencial para obtener resultados que, a diferencia de los modelos murinos, puedan traspolarse de manera más confiable a estudios en humanos, sin embargo, a pesar de esto, la fisiología completa de esta especie aun presenta áreas que son desconocidas y principalmente se intuyen o se realizan conjeturas en algunos puntos, sobre todo en la fisiología reproductiva.

El estudio de receptores hormonales en esta especie es un área de oportunidad para la investigación, un ejemplo claro son los receptores a progesterona. En esta especie los estudios se han realizado principalmente a nivel de útero, pero aún falta incluir los cambios histomorfológicos que podrían presentarse por acción de las hormonas naturalmente presentes en el ciclo estral, así como, los producidos por hormonas exógenas análogas de gonadotropinas.

Anatomía, histología y fisiología del útero

El útero es un órgano reproductivo femenino integrado por endometrio, una capa (miometrio) muscular gruesa, y una capa serosa externa, el perimetrio (An, 2013). Las funciones del endometrio son reguladas por las hormonas esteroides de origen ovárico (estrógenos y progesterona) y los péptidos dependiendo de la etapa del ciclo estral (Dawe, 1982). El ciclo estral de mamífero, incluyendo fases foliculares y fase lútea, es regulado por un sistema de retroalimentación positiva y negativa que implican las hormonas reproductivas que son producidas y liberadas por diversos órganos incluyendo hipotálamo, hipófisis y ovarios (Soede, 2011). En la fase folicular (también llamada fase proliferativa), el estradiol (E2) conduce en el útero el desarrollo y la proliferación del endometrio. Después de la maduración del útero, los folículos ováricos secretan una cantidad creciente de E2 iniciando el desarrollo de una nueva capa del endometrio proliferativo además de criptas que provocan en el

cérvix la producción de una secreción rica en moco (Bullivant, 2004). Después de la ovulación, se reduce la producción de E2 mientras que el cuerpo lúteo comienza a formar y a producir progesterona (P4), que tiene un papel importante en la implantación del blastocisto y favorece la gestación temprana en el endometrio. Las altas concentraciones de P4 tienen un efecto negativo en el crecimiento folicular previniendo la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) (Rzucidlo, 1998). A esta fase se le llama secretora y corresponde a la fase lútea del ciclo estral. En las hembras de mamíferos si no hay gestación en la fase lútea, el endometrio libera la prostaglandina F2 α (α PGF2) y provoca la luteólisis o regresión y degradación rápida del cuerpo lúteo. Además, los niveles de P4 declinan rápidamente mientras que FSH y LH aumenta gradualmente para estimular el crecimiento del folículo ovárico, que se conoce como la fase folicular. Mientras que los folículos ováricos crecen, las concentraciones de E2 alcanzan altos niveles y estimulan la ovulación otra vez. El ciclo estral en mamíferos se repite hasta la gestación (Krzymowski, 2004).

Progesterona y sus receptores

La progesterona es una hormona esteroide compuesta de 21 carbonos, es secretada por el cuerpo lúteo que se forma en el ovario después de la ovulación, de la misma forma que el resto de las hormonas esteroides se sintetiza a partir del colesterol (Senger, 2012).

Durante la gestación la progesterona tiene un papel muy importante cuando se da el recibimiento de los embriones en el útero y el posterior mantenimiento de la gestación. Los efectos de la progesterona son mediados por la interacción de la hormona con receptores intracelulares específicos, receptores a progesterona, (PR) (Sukjumlong et. al, 2005).

El receptor nuclear a Progesterona presenta 3 isoformas (A, B y C) con diferentes longitudes y efectos. De las tres isoformas, B es la que presenta mayor actividad transcripcional. El receptor a progesterona A presenta mayormente efectos

inhibitorios debido a un dominio de transcripción inhibitorio, que es bloqueado en el receptor tipo B. La tercera isoforma, receptor a progesterona tipo C, es una versión intermedia de los receptores tipo A y B que no puede unir DNA de manera directa, pero puede unirse a progesterona "secuestrando" el ligando de las otras dos isoformas y así disminuir la señalización de la progesterona (Steinhauser et al. 2016).

Se sabe que la proteína del receptor a progesterona tipo B es expresada en el epitelio luminal del útero, epitelio glandular y el miometrio alrededor del día 7 del ciclo estral y gestación en cerdos (Steinhauser et al. 2016).

Una de las funciones de mayor importancia de la progesterona es estimular la producción y secreción de histotrofo, una mezcla de hormonas, factores de crecimiento, nutrientes y otras sustancias esenciales para el desarrollo y crecimiento del conceptus (embrión/feto y membranas placentarias asociadas) (Steinhauser et al. 2016).

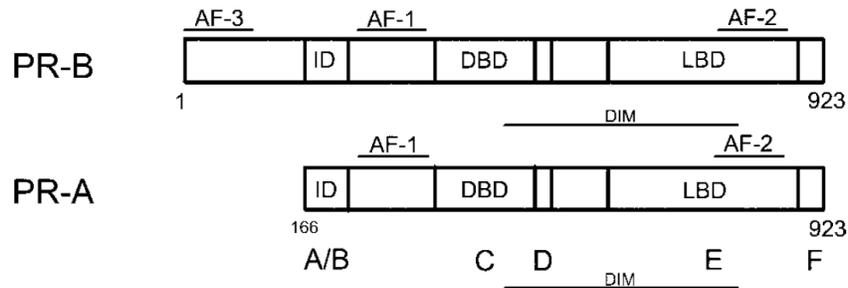


Figura 1. Organización estructural de las isoformas A (PR-A) y B (PR-B) del receptor a progesterona humano. Los números equivalen a la posición de los aminoácidos en cada proteína. AF-1, AF-2 y AF-3 son dominios de activación. DBD es el dominio de unión del DNA, LBD es Dominio de unión del ligando e ID es dominio inhibitorio. DIM son las secuencias de dimerización del receptor. Tomado de Jericevic et. al, 2004.

Hasta hace poco se pensaba que las hormonas esteroides actuaban exclusivamente por medio de receptores nucleares que producen una respuesta en las células blanco. Actualmente las investigaciones han mostrado que además de los receptores nucleares, las hormonas esteroides también actúan a través de receptores membranales específicos (Senger, 2012).

Acciones de hormonas esteroides: receptores de membrana

Una vez que la hormona esteroide se acopla al receptor de membrana se produce la activación de adenilato ciclasa que a su vez ocasiona la activación de protein cinasa. Esto al final produce cambios en la permeabilidad de los canales de calcio, lo que ocasiona contracción (Estrógenos) o relajación (Progesterona) del musculo liso (Senger, 2012).

Acciones de hormonas esteroides: receptores nucleares

Las hormonas esteroides son transportadas en la sangre por un sistema complejo, los esteroides no son solubles en agua por lo que no pueden transportarse como moléculas libres. Se tienen que unir a moléculas que si son solubles en agua. Estas proteínas de transporte conocidas como steroid binding proteins (SBP) llevan a los esteroides desde la sangre y fluido intersticial hacia las membranas celulares.

Cuando la proteína transportadora de esteroides viaja por el intersticio y entra en contacto con las células blanco, el esteroide se disocia de la proteína y penetra en la célula por difusión debido a sus características liposolubles, posteriormente llega hasta el núcleo.

Si penetra en una célula blanco el esteroide se unirá al receptor nuclear específico. El complejo esteroide-receptor actúa como un factor de transcripción e inicia la síntesis de RNAm, (Senger, 2012).

El recientemente sintetizado RNAm sale del núcleo y se une a los ribosomas donde se inicia la síntesis de proteínas que actuarán en los procesos reproductivos, (Senger, 2012).

Una de las principales diferencias funcionales entre la unión a un receptor de membrana y uno nuclear es que, la unión con receptores nucleares ocasiona una respuesta "lenta" (horas o días) que involucra transcripción, seguida de síntesis y secreción por las células blanco, por ejemplo, un tejido blanco para estradiol en las hembras es el cérvix, cuando el estradiol se une a receptores nucleares en las células cervicales esto promueve la síntesis y secreción de moco, este proceso tarda varios días (imagen 1). Cuando la hormona esteroide se une a receptores membranales típicamente ocurre una respuesta "rápida", en el miometrio existen receptores membranales a estradiol. Cuando la hormona se une a estos receptores provoca un cambio en la permeabilidad de los canales de calcio en el miometrio, lo que incrementa los movimientos de contracción en el órgano (Senger, 2012).

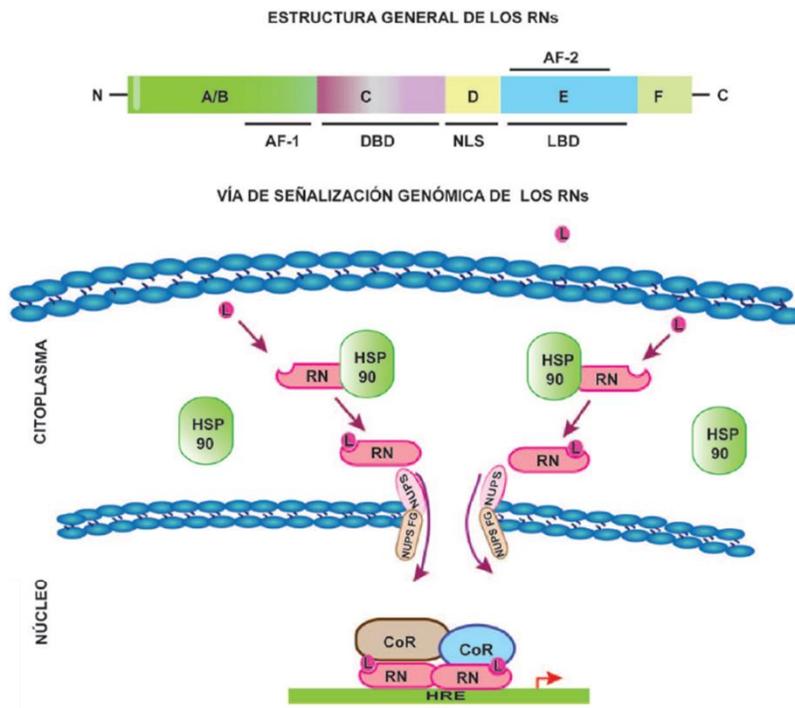


Figura 2.- Receptores nucleares (RN) y su vía de señalización genómica. Los ligandos de los RNs son de diversa naturaleza, algunos ejemplos de ellos son los derivados del colesterol (estrógenos, progesterona, andrógenos, glucocorticoides), aminoácidos modificados (hormonas tiroideas) y el ácido retinoico. Los RNs poseen de cinco a seis dominios funcionales denominados con letras de la A-F. La región N-terminal o A/B contiene el dominio de activación transcripcional AF-1. La región C consiste en el dominio de unión al ADN (DBD) que es altamente conservado entre los RNs. La región D o “bisagra” conecta al DBD con la región E y además contiene la secuencia de localización nuclear (NLS). La región E conforma el dominio de unión al ligando o LBD y el segundo dominio de transactivación AF-2. El dominio F está presente sólo en algunos RNs. C. Vía de señalización genómica de los RNs. Los RNs son activados por su ligando específico en el citoplasma. La activación de los RNs conduce a su cambio conformacional, su disociación de las proteínas chaperonas (HSP90), dimerización y traslocación al núcleo. En este compartimento, los RNs se unen a sus elementos de respuesta a la hormona (HRE) e interactúan con correguladores (CoR) (coactivadores o correpresores) para modular la expresión de sus genes blanco. Tomado de Ortega et al. 2015

Ciclo estral de la cerda

La cerda es poliéstrica de ovulación múltiple y espontánea, con celos a lo largo de todo el año, salvo en preñez y lactancia. Su ciclo estral dura en promedio 21 días y puede repetirse siempre que no exista gestación, lactación o presencia de alguna patología. Comprende cuatro etapas: metaestro, diestro, proestro y estro. El metaestro dura 2 días aproximadamente caracterizándose por la presencia de cuerpos hemorrágicos, a partir de los cuales se forman los cuerpos lúteos. El diestro tiene una duración de 14 días en promedio; durante este lapso, bajo la influencia de la hormona luteinizante (LH), el cuerpo lúteo se reorganiza hasta alcanzar su máximo desarrollo permaneciendo funcional hasta el final de la gestación; al igual, las concentraciones de progesterona llegan a su máximo nivel. Si no existe la concepción, el cuerpo lúteo se destruye al final del diestro por la acción de la prostaglandina F₂α (PGF₂α) de origen uterino. El proestro dura de 2 a 3 días, aquí se lleva a cabo el crecimiento y la maduración folicular. Durante la proliferación folicular, existe un proceso continuo de crecimiento y atresia dentro de un grupo de folículos. Al inicio, existe una gran cantidad de folículos que disminuyen con el paso de los días, pero los que permanecen continúan aumentando de tamaño hasta medir de 8 a 10 mm de diámetro poco antes de la ovulación. Además, los folículos en desarrollo comienzan a producir estrógenos. Esta etapa se caracteriza por enrojecimiento y tumefacción de los labios vulvares, alteración en el comportamiento de la cerda que se observa inquieta y deseosa de montar a otras; además, los estrógenos estimulan al hipotálamo para producir un pico de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), esto provoca una descarga hipofisiaria de LH, hormona responsable del desencadenamiento de la ovulación y de la formación del cuerpo lúteo.

Por último, el estro es la etapa donde la cerda es sexualmente receptiva al macho, dicha etapa dura de 2 a 3 días donde ocurre la maduración final de los folículos que alcanzan su máximo nivel esteroidogénico, produciéndose un pico preovulatorio de estrógenos. Esta oleada de estrógenos desencadena el pico preovulatorio de LH y, consecuentemente, la ovulación (Galina y Valencia, 2008).

En la cerda la ovulación se presenta de forma espontánea, y se produce entre las 36 y 40 horas después del comienzo del estro y se da en forma gradual (Galina y Valencia, 2008). De acuerdo con los estudios de Steinhauser et al. (2016) la dinámica de la expresión de los receptores a progesterona a lo largo del ciclo estral de la cerda está descrita en la figura 3.

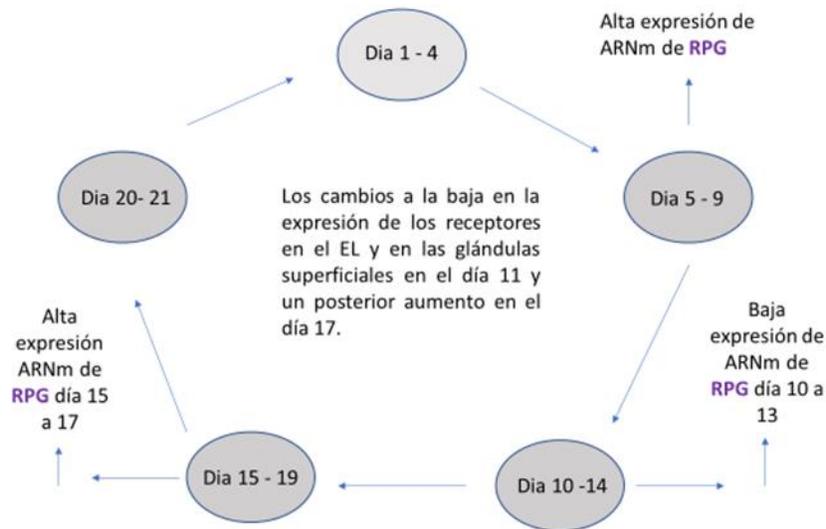


Figura 3. Dinámica de expresión de ARNm de los receptores a progesterona a lo largo del ciclo estral de la cerda, **RPG** (receptores a Progesterona), **EL** (epitelio luminal). Modificado de Steinhauser et al. 2016

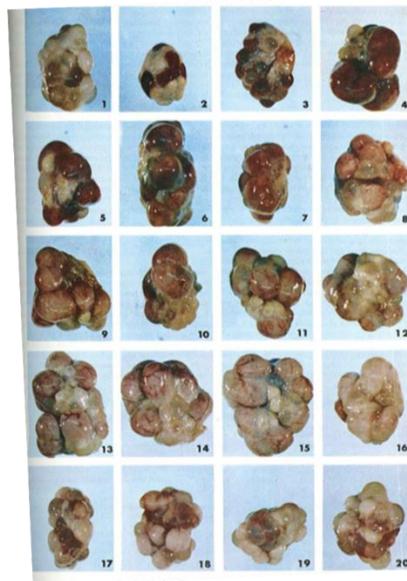


Figura 4.- Cambios cíclicos en el ovario de la cerda durante 20 días del ciclo en orden cronológico desde el día 1 hasta el día 20, tomado de Mcdonald, 1981.

Ovogénesis y Foliculogénesis

La actividad endocrina más relevante del ovario ocurre durante la pubertad y la completa madurez sexual, con la secreción de dos principales esteroides: estrógenos y progestágenos que ayudarán al desarrollo del gameto haploide femenino, el ovocito.

La función ovárica en cerdas adultas difiere de la testicular en el macho principalmente de dos maneras, primero, la cantidad de ovocitos producidos y liberados es considerablemente menor comparada con los millones de espermatozoides que diariamente produce el individuo masculino. Segundo, la liberación de los ovocitos no es continua, corresponde a ciclos o periodos, además, la liberación de estrógenos y progesterona refleja el patrón de producción y la posterior ovulación (Johnson, 2011).

El ovario adulto se organiza en un patrón comparable al del testículo, con un tejido intersticial que contiene a su vez tejido glandular que se encuentra en el estroma. El tejido intersticial rodea a los folículos.

Cada ciclo ovárico está compuesto por una serie de eventos interconectados y simultáneos durante la maduración del folículo (Johnson, 2011).

Para efectos prácticos a continuación se describirán como eventos separados la ovogénesis y la foliculogénesis, pero es importante recordar que ambos eventos ocurren de manera casi simultánea en los procesos fisiológicos normales.

Durante el desarrollo embrionario las ovogonias que se encuentran mitóticamente activas contienen una proteína transmembranal llamada C-kit, estas proteínas interactúan con su ligando, el cual se encuentra en las células del mesonefros adyacentes, esto permite la formación de cordones ovígeros que posteriormente aíslan a las ovogonias del intersticio. Después de que se formaron los cordones ovígeros las ovogonias mitóticamente activas pueden reclutar únicamente células pregranulosas somáticas desde la superficie del epitelio. Las ovogonias forman

uniones estrechas con las células epiteliales superficiales que subsecuentemente se convierten en células pregranulosas. Las ovogonias se enlazan con las células pregranulosas e inician la meiosis, alrededor del 80% de las ovogonias enlazadas entran en apoptosis.

Cuando las células germinales primordiales (ovogonia) dejan de dividirse y entran a la división meiótica y quedan en arresto en la profase 1 de la primera meiosis, entonces se convierten en ovocitos primarios (Senger, 2012).

Las células que rodean a los ovocitos primarios se conocen como células pregranulosas aplanadas, estas células se multiplican gracias a la influencia del factor *Sohlh 1 y 2*. Después por acción del NGF la forma de las granulosas aplanadas cambia y se convierten en células granulosas cuboidales (Scaramuzzi et al. 2011).

En el día 90 de la gestación en bovinos comienza a detectarse la presencia de folículos primarios caracterizados por la presencia de zona pelúcida y una membrana basal bien definida, aun no se detectan células de la teca. Después del nacimiento y cerca de la pubertad se forman los folículos secundarios que presentan una relación de uniones del ovocito, en esta etapa se detecta el desarrollo de la corona radiada y las células de la teca. Estos folículos aun no presentan sensibilidad a gonadotropinas (Scaramuzzi et al. 2011).

Posteriormente el número de células de la gránulosa aumenta y se detecta una diferenciación de células de la teca interna y externa, estos folículos tienen sensibilidad a gonadotropinas y comienza la formación del antro folicular, por lo que estos folículos se denominan como preantrales.

En un folículo antral, que es la fase final del desarrollo folicular, las células de la granulosa se diferencian en dos líneas, unas con rol esteroideogénico (rostrales) y otras son las del *cumulus* que se encuentran en íntima comunicación con el ovocito, este folículo es dependiente de gonadotropinas (Senger, 2012).

Los siguientes factores influyen en la formación de puentes disulfuro que mantienen en contacto las células de la corona radiada y la zona pelúcida: GDF – 9 y BMP - 15.

En un folículo preovulatorio solo existen receptores a LH que son expresados ahora por las células de la granulosa, éste a su vez produce inhibina como consecuencia de un efecto del estradiol. La inhibina tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH (Scaramuzzi et al. 2011).

Durante la fase folicular en un ciclo normal, el proceso de maduración folicular es controlado por diversas hormonas como son la FSH, que cumple un rol importante en el desarrollo temprano del folículo. El estradiol es el esteroide principal producido por las células de la granulosa por influencia de la hormona FSH. Como resultado de la elevación en la concentración de estradiol durante el desarrollo inicial de los folículos, se observa una supresión de las concentraciones de FSH (Messinis, 2011). El incremento en los niveles de estradiol también provoca una estimulación en la liberación de la LH que ayudara en la fase final de la maduración de los folículos.

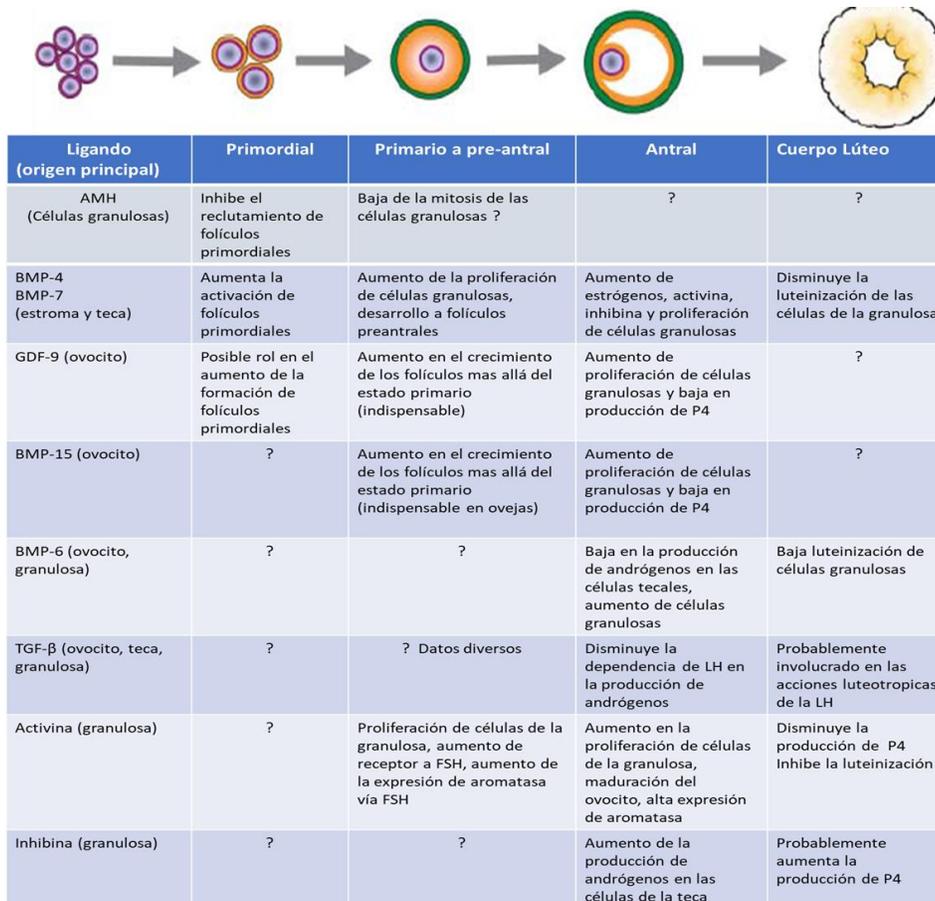


Figura 5. Factores principales involucrados en el desarrollo folicular, origen y efecto (Knight et. al, 2006)

Tratamientos con gonadotropinas no hipofisiarias

Debido a que en las producciones porcícolas se requiere mantener al máximo la eficacia en la obtención de lechones, una de las maneras de garantizar esto es mediante la obtención de una población homogénea y permitir la programación de los partos.

El uso de gonadotropinas es un tratamiento que, realizado de forma correcta, disminuye los días a la presentación de estro, evitando su retraso. La aplicación apropiada de los protocolos para sincronización del ciclo estral, disponibles en la actualidad, representan una oportunidad significativa para incrementar la prolificidad de las empresas porcinas. Aunque las indicaciones e implementación de métodos para la sincronización del estro en el cerdo son variados, están basados en el control de los eventos que conducen a la maduración folicular y ovulación, o alteración de la vida útil del cuerpo lúteo (Martínez et al. 2015).

La utilización de análogos de gonadotropinas como la gonadotropina coriónica equina (eCG) que actúa como FSH y gonadotropina coriónica humana (hCG) que actúa como LH es uno de los métodos más utilizados.

La disponibilidad de cerdas está controlada en gran medida por intervalos destete-estro (IDE) predecibles, los cuales, bien por la edad de la hembra o los efectos estacionales pueden necesitar una intervención hormonal exógena. El manejo de las cerdas de reposición implica la disponibilidad de un número suficiente de hembras cíclicas, que a su vez otorga predictibilidad al programa de reproducción (Kirkwood, 2011).

De manera tradicional es recomendable que la aplicación de estos tratamientos se realice en una etapa en la que el estro no esté presente (día 17) con el fin de no obtener efectos adversos sobre el desarrollo folicular (Martínez et al, 2015).

Justificación

Los tratamientos con gonadotropinas no hipofisiarias (eCG y hCG) son utilizados de manera rutinaria en la producción porcina, con el fin de sincronizar los estros y posteriores partos y de esta manera obtener el máximo beneficio reproductivo (lechones). Sin embargo, los efectos que estos tratamientos pueden tener sobre el tracto reproductor no siempre se contemplan, en especial si la concentración de estas gonadotropinas no hipofisiarias se modifica.

Los cambios producidos en el organismo de los animales tratados con gonadotropinas exógenas pueden ser diferentes a los producidos durante un ciclo llevado a cabo de manera natural, la dinámica de expresión del receptor a progesterona en el útero es otro punto que estudiar en el presente trabajo con el fin de determinar si esta expresión se ve modificada por los tratamientos de sincronización.

Los resultados obtenidos en este estudio sentarán las bases para nuevas investigaciones, no solo de ciencia básica sino también para la ciencia experimental esperando que en algún momento puedan ayudar a estudiar otras especies, tomando en cuenta que las hormonas hipofisiarias pueden presentar efectos similares en diferentes especies.

También podrá contribuir a explicar los procesos fisiopatológicos de diversas afecciones del tracto reproductor de la cerda, sobre todo los relacionados con desequilibrios hormonales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios histomorfológicos del ovario, útero y cérvix y la expresión del receptor a progesterona en el útero de la cerda cuando se administran diferentes concentraciones de gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropina coriónica humana (hCG).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar si la administración de diversas concentraciones de tratamientos con gonadotropinas no hipofisiarias altera:

- El tamaño de los ovarios
- Cantidad de folículos y cuerpos lúteos en el ovario
- Tamaño de folículos y cuerpos lúteos
- Índice de mitosis y apoptosis en el epitelio de revestimiento del útero
- Índice de mitosis y apoptosis en el epitelio glandular del útero
- Tamaño y número de glándulas del útero
- Altura del epitelio de revestimiento de útero y cérvix

HIPÓTESIS

Las variaciones endógenas en las concentraciones de gonadotropinas hipofisiarias de LH y FSH determinan la secreción ovárica de estrógenos y progesterona e inducen cambios histomorfológicos en ovarios, útero y cérvix; así como la expresión de receptores a progesterona en el útero de la cerda, de tal manera que la administración exógena de diferentes concentraciones de gonadotropinas no hipofisiarias (eCG y hCG) modificarán diversos parámetros histomorfológicos y la expresión de los receptores a progesterona en el útero, en relación con los animales no tratados.

MATERIALES Y METODOS

En este estudio se utilizaron 13 cerdas de la raza comercial (Landrace X Yorkshire) y se dividieron en 4 grupos:

- Grupo 1: Hembras en el segundo estro que contaban con las características morfológicas de los genitales externos propios del celo y la aceptación del macho (prueba de cabalque). **Grupo Control, n = 4**
- Grupo 2: Hembras en un segundo ciclo sometidas a una dosis comercial para inducir la sincronización recibiendo una dosis comercial de **PG600®** I.M (400 UI de eCG y 200 UI de hCG), a las 72 hrs. se les aplicó 5 ml de SSF **n=3**
- Grupo 3: Una dosis comercial de Foligon® I.M (1000 UI de eCG), a las 72 hrs. se les aplicó una dosis 500 UI de Chorulon® (M/500) **n=3**
- Grupo 4: Una dosis comercial de Foligon® I.M (1000 UI de eCG), a las 72 hrs. se les aplicó una dosis de 1000 UI de Chorulon®. (M/M) **n=3**

Las cerdas participaron en el experimento cuando presentaron su primer estro natural detectable con la presencia del macho.

Una vez que las cerdas presentaron su primer estro se contaron 17 días, el día 17 se aplicó hormona eCG y 72 hrs después la hormona hCG (día 20).

36 horas después de la última administración del tratamiento o placebo, según fuera el caso, se procedió al sacrificio humanitario de los animales.

Se obtuvieron muestras de útero y de ambos ovarios.

Los tejidos fueron fijados en paraformaldehído al 4% durante 24 hrs para posteriormente ser procesadas para inmunohistoquímica.

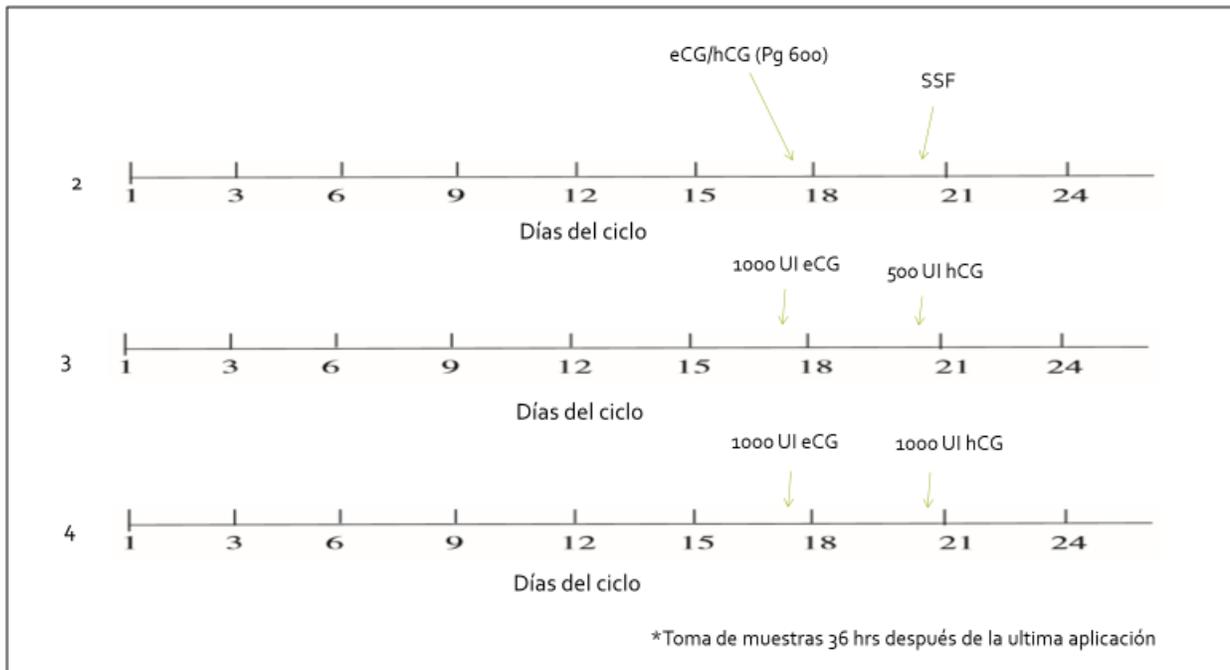


Figura 6.- Esquema de la metodología utilizada, mostrando el día 17 del ciclo estral como inicio de la aplicación de tratamientos. 2, 3 y 4 son los grupos que recibieron tratamiento.

En el caso de las hembras del grupo 1 (control) recibieron un placebo de 5 ml de solución salina fisiológica administrada con una cronología igual a los tratamientos en los demás grupos, esto con la finalidad de igualar las condiciones de manejo en todos los animales.

Las muestras fueron procesadas, una parte para tinción con H.E, a fin de analizar y medir los cambios en el útero y cérvix (altura del epitelio, cantidad y tamaño de las glándulas, índice de mitosis y apoptosis). Los ovarios fueron medidos y se contaron y midieron cuerpos lúteos y folículos. A nivel de útero se realizó, además, inmunohistoquímica del receptor a progesterona.

Determinación del índice mitótico y apoptótico en células del epitelio de revestimiento del útero y en glándulas (cérvix y útero)

Como parte de un análisis indirecto de actividad estrogénica en las células del epitelio uterino, se realizó una medición de índice mitótico

Se empleó un microscopio fotónico (Carl Zeiss) utilizando un aumento total de 400x para la observación de 10 campos microscópicos al azar contando 100 células

epiteliales del lumen y 100 células epiteliales glandulares por cada campo en cada sección. Se contaron 1000 células por animal en cada grupo. Se realizó el análisis de las células glandulares contra las luminales de acuerdo con los trabajos de Nawaz, 1987 y Conti, 1981.

Los conteos se expresaron como porcentajes de células en mitosis (Índice mitótico, I.M) y apoptosis (índice apoptótico, I.A) del total de células epiteliales.

Determinación del tejido glandular endometrial

Se analizaron al azar 10 campos microscópicos de $60,000 \mu\text{m}^2$, provenientes de 3 animales de cada grupo, y se determinó el número de glándulas por campo, el área ocupada por cada glándula y el número total de glándulas en todos los campos. También se determinó la altura promedio del epitelio realizando 100 determinaciones por laminilla, seleccionando las regiones del corte de manera transversal en la que existiera el menor número de capas nucleares y en donde el eje de los núcleos del epitelio de revestimiento fueran lo más perpendicular posible a la membrana basal y el eje que traza el programa fuera paralelo a dichos núcleos. Las mediciones se realizaron utilizando un microscopio fotónico (Carl Zeiss) con el objetivo de 40 x y un software de digitalización de imágenes (Image Proplus 2) y una cámara digital (Moticam 5).

Los datos se sometieron al análisis estadístico que se menciona al final de esta sección.

Procedimiento Inmunohistoquímico del receptor a progesterona

Las muestras se procesaron inicialmente como en cualquier procedimiento histológico mediante un histocinético automático (American Optical p 800) para su inclusión en parafina, posteriormente las muestras se cortaron mediante un micrótopo (Spenser 820) a 4-5 μm de grosor.

Las muestras seccionadas se colocaron en laminillas previamente tratadas con Poly-L-lisina (Sigma).

Las muestras se desparafinaron y rehidrataron a través de concentraciones decrecientes de alcohol a agua destilada, se transfirieron a una solución amortiguada de citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) y se calentaron en un recipiente, tapado 5 min en un esterilizador con temperatura graduada (96°C.), dejando enfriarlas por 5 min a temperatura ambiente. Después de este procedimiento, las laminillas se lavaron con agua destilada 5 min y posteriormente con PBS (pH 7.4) y se incubaron sucesivamente en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS por 10 min a temperatura ambiente. Para inactivar los sitios inespecíficos se les colocaron gotas de solución bloqueadora de suero normal de bovino (BSA) en PB por 10 min.; después para su permeabilización se hicieron tres lavados con una solución PBS-Triton X-100 al 0.05% en PB, una vez realizado estos se aplicó una solución Bloqueadora del kit Zymed®, esto por 10 min. Finalmente se hicieron nuevamente 3 lavados con solución de PBS-Tritón X-100.

Posteriormente las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (diluido 1:200); se empleó como anticuerpo primario monoclonal en ratón: contra el receptor a progesterona (Lab Vision™ Ab8), se colocaron en una cámara húmeda a una temperatura de 2-4°C durante toda la noche.

Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo, mediante el kit del ABC de Vectastain Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, E.U. La actividad de la peroxidasa se reveló usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB) marca **Thermo Fisher Scientific** como substrato, Después del lavado las secciones se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y montaron con medio de montaje

(Permout). Se utilizaron cortes como testigo en los cuales el primer anticuerpo se sustituyó por BSA (García del Moral, 1993; Goulding et al., 1995).

Las observaciones y las imágenes se hicieron usando un microscopio óptico (Carl Zeiss) unidos a una cámara de video unido a una computadora y un software de digitalización de imágenes (Image Proplus) para su análisis y almacenamiento.

La inmunotinción se visualizó en un microscopio Carl Zeiss adaptado con una cámara digital (Leica DMLS). El número de células inmunopositivas en el epitelio y en el estroma se determinó utilizando una retícula micrométrica Carl Zeiss) con el objetivo de 40X, teniendo un aumento total de 400X. La intensidad de la inmunodetección se cuantificó y clasificó por grados de intensidad; la totalidad de las células presentes en el epitelio, estroma y músculo liso se realizó en un total de 24 campos microscópicos, lo que representa un área total de 1mm². Se analizaron todos los núcleos de cada sección. Se determinó la intensidad de la marca de los núcleos y se asignaron los siguientes valores: 0, ausente; 1, ligera; 2, moderada y 3, intensa. Se realizó el cálculo del puntaje histológico (HSCORE) de la siguiente manera: $HSCORE = \sum P_i (i + 1)$, donde $i = 1, 2$ o 3 , P_i corresponde al porcentaje de cada intensidad, determinado en el rango de 0 a 100% (Lessey et al., 1988).

Análisis de los datos

Se realizó un Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA), seguida de una prueba de Tukey para determinar diferencias significativas de los datos. Se utilizó el Programa Prism 6.02 (Graph Pad, CA, USA) para calcular los valores de probabilidad ($p < 0.05$).

En el caso del análisis de correlaciones se utilizó una correlación de Spearman no paramétrica con un intervalo de confianza del 95%.

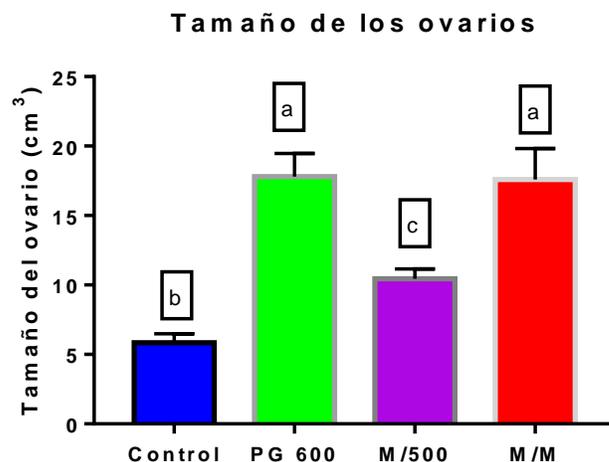
RESULTADOS

Morfología Ovárica



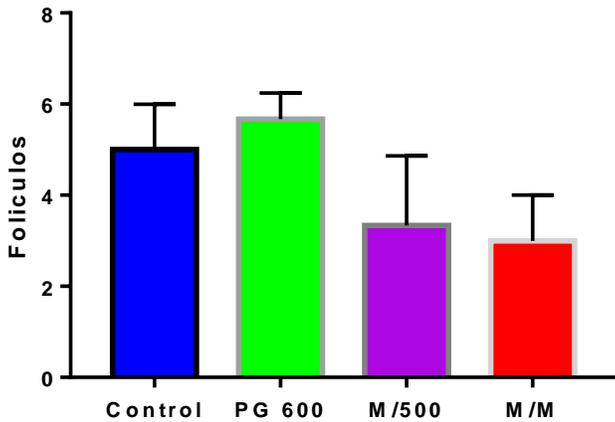
Figura 7. Morfología ovárica de los animales del grupo control (A), tratados con PG 600 (B), tratados con M/500 (C) y tratados con M/M (D).

En cuanto a la morfología ovárica, el tamaño ovárico fue menor en los animales del grupo control en comparación con los animales tratados (Figura 7), mostrando menor efecto en el grupo tratado con una concentración de M/500 (gráfica 1).



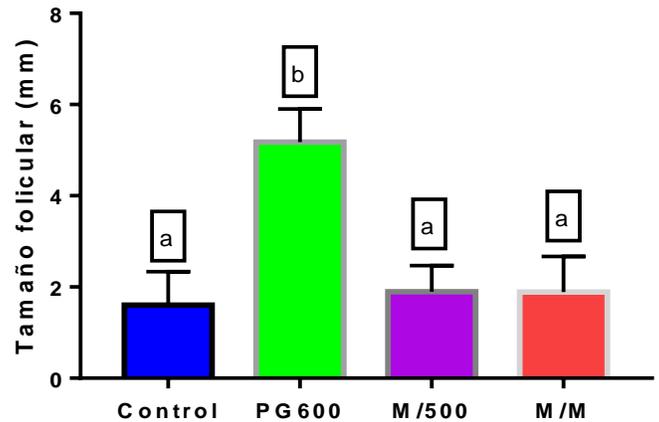
Gráfica 1.- Tamaño de los ovarios en los diferentes grupos, como medida \pm ES o DS ($p < 0.05$)

Número de folículos



Gráfica 2.- Número de folículos cuantificados por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

Tamaño de los folículos

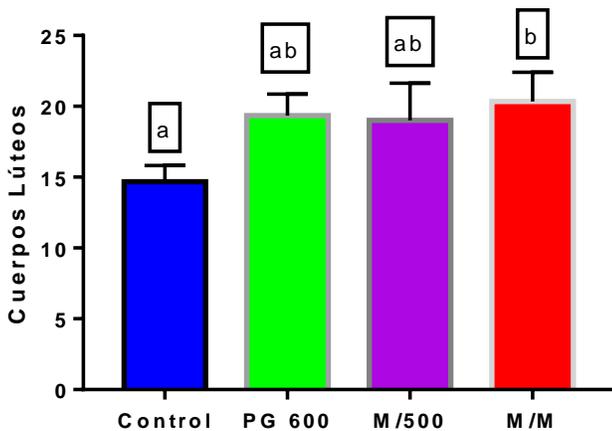


Gráfica 3.- Tamaño de folículos cuantificados por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

El tamaño de los folículos mostro una diferencia estadísticamente significativa, se observó un mayor tamaño folicular en los animales tratados con PG 600 en comparación con el resto de los grupos (gráfica 3). El número de folículos sin diferencia estadística significativa.

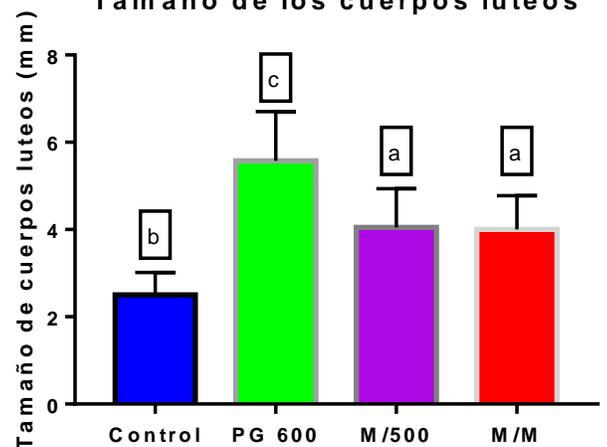
El tratamiento de M/M mostró un mayor número de cuerpos lúteos en relación con el grupo control, sin embargo, los demás tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí y con el grupo control (gráficas 2 y 4).

Número de cuerpos Lúteos



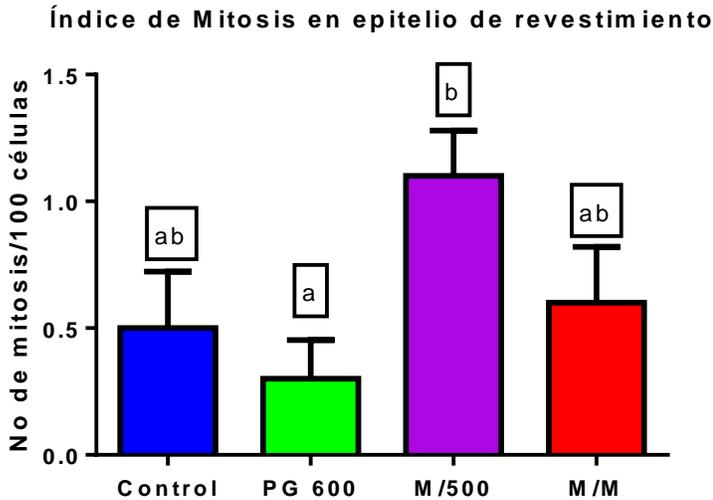
Gráfica 4.- Número de cuerpos lúteos cuantificados por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

Tamaño de los cuerpos lúteos

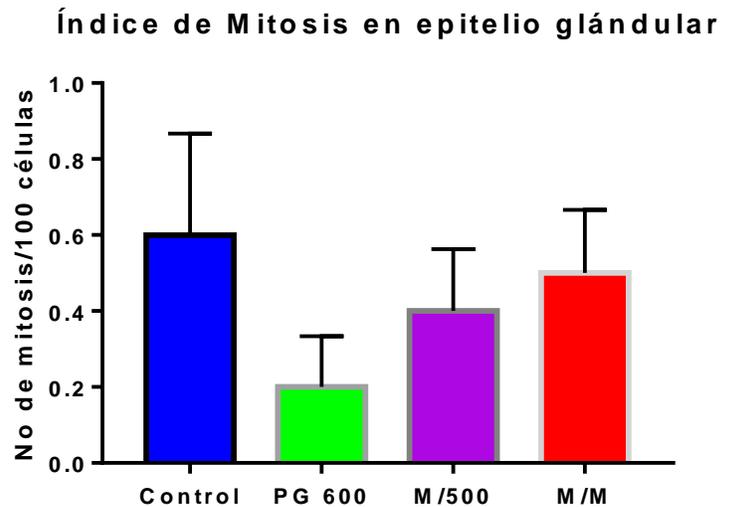


Gráfica 5.- Tamaño de cuerpos lúteos cuantificados por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

En el caso del tamaño de los cuerpos lúteos se observó que los de mayor tamaño fueron los de los animales de los grupos tratados en relación con el grupo control, pero para el caso de PG600 el tamaño fue mayor que M/500 y M/M (gráfica 5).



Gráfica 6.- Índice de mitosis en el epitelio uterino por cada tratamiento. ($p < 0.05$)



Gráfica 7.- Índice de mitosis en el epitelio glandular del útero por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

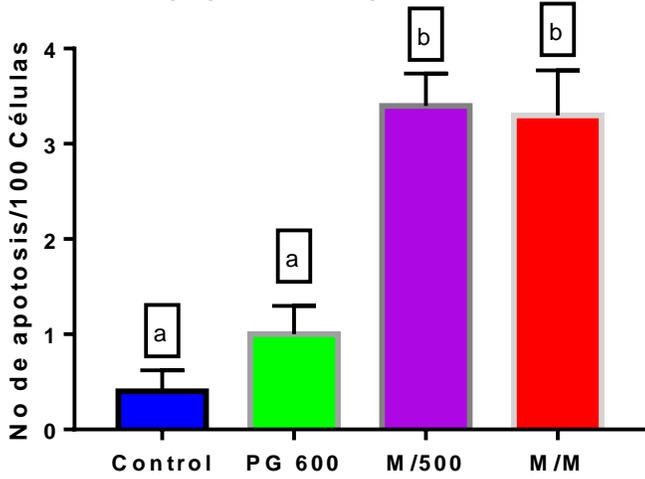
La medición del índice de mitosis en el epitelio uterino (gráfica 6) mostró un aumento estadísticamente significativo de la mitosis en el grupo tratado con una concentración de M/500.

El índice de mitosis en el epitelio glandular (gráfica 7) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

El índice de apoptosis en el epitelio uterino (gráfica 8) mostró aumento igualmente considerable en los grupos tratados con una concentración de M/500 y M/M en comparación con los grupos control y tratados con PG 600.

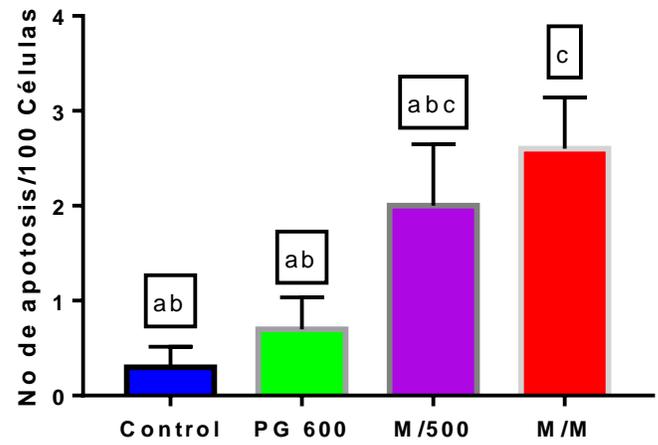
En cuanto al índice de apoptosis en el epitelio glandular (gráfica 9), se observó un aumento de la apoptosis en los grupos con una concentración de M/M y M/500, no existió diferencia entre los demás grupos.

Índice de Apoptosis en epitelio de revestimiento



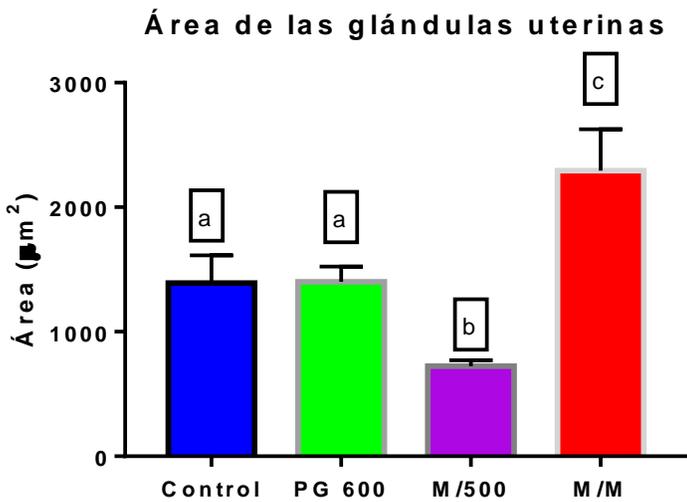
Gráfica 8.- Índice de Apoptosis en el epitelio del útero por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

Índice de Apoptosis en epitelio Glándular

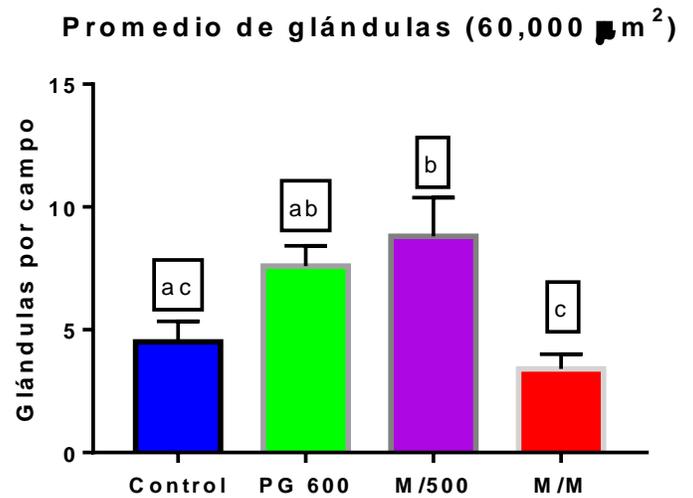


Gráfica 9.- Índice de Apoptosis en el epitelio glandular del útero por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

Las glándulas uterinas se analizaron en dos aspectos, en el área ocupada por las glándulas (gráfica 10) y en el promedio de glándulas en un área de $60,000 \mu\text{m}^2$ (gráfica 11). En el primero se encontró que las glándulas uterinas en los animales tratados con una concentración de M/M, presentaron una mayor área que el resto de los grupos y los tratados con una concentración de M/500 tuvieron un área menor comparada con PG600 y el grupo control (gráfica 10). Respecto al promedio de glándulas cuantificadas se encontró un mayor número en el grupo de M/500 y un menor promedio en los animales tratados con M/M (gráfica 11).

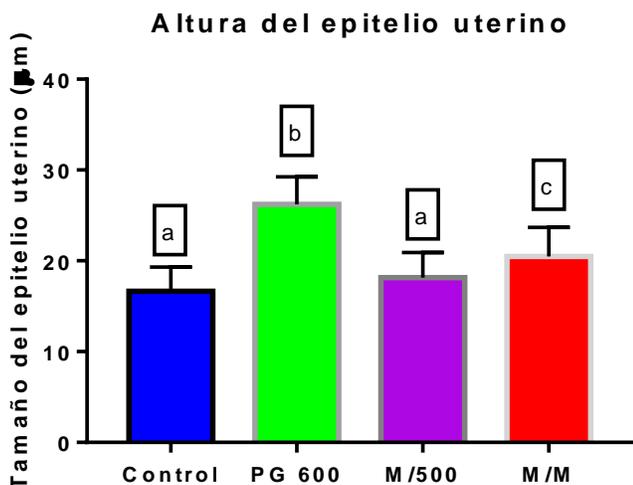


Gráfica 10.- Área ocupada por las glándulas del útero por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

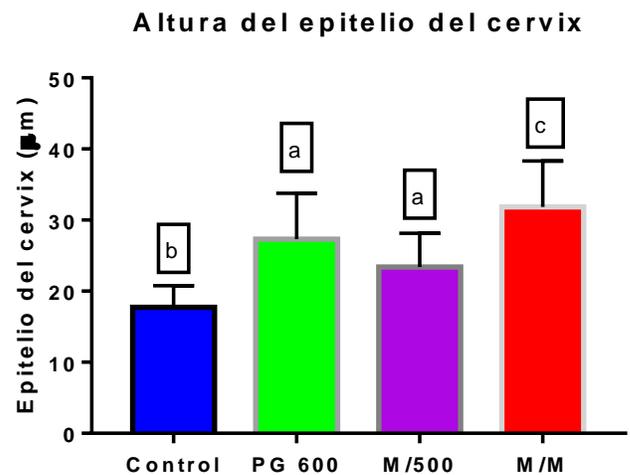


Gráfica 11.- Promedio de glándulas del útero cuantificadas por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

En la altura del epitelio uterino (gráfica 12 y Figura 8) se encontró un aumento en los grupos tratados con PG 600 y M/500 siendo el primero mayor que este último. Con respecto a la altura del epitelio del cérvix (gráfica 13 y Figura 9) se encontró un aumento en el grupo tratado con M/M, a su vez se observó que el grupo control presento una menor altura entre los grupos.



Gráfica 12.- Cambio de altura en el epitelio del útero por cada tratamiento ($p < 0.05$)



Gráfica 13.- Cambio de altura en el epitelio del cérvix por cada tratamiento. ($p < 0.05$)

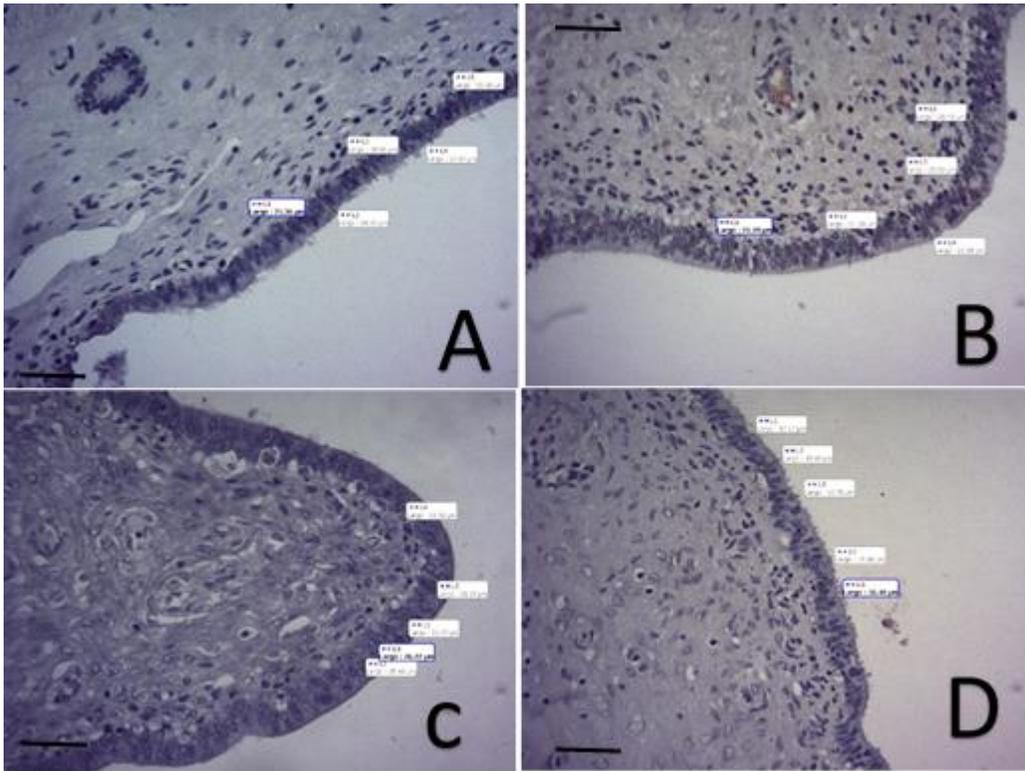


Figura 8.- Se observa el cambio de altura en el epitelio del útero por cada tratamiento **A** (control), **B** (PG 600), **C** (M/M) y **D** (M/500). Medida de la barra 25µm. Mediciones realizados con computadora.

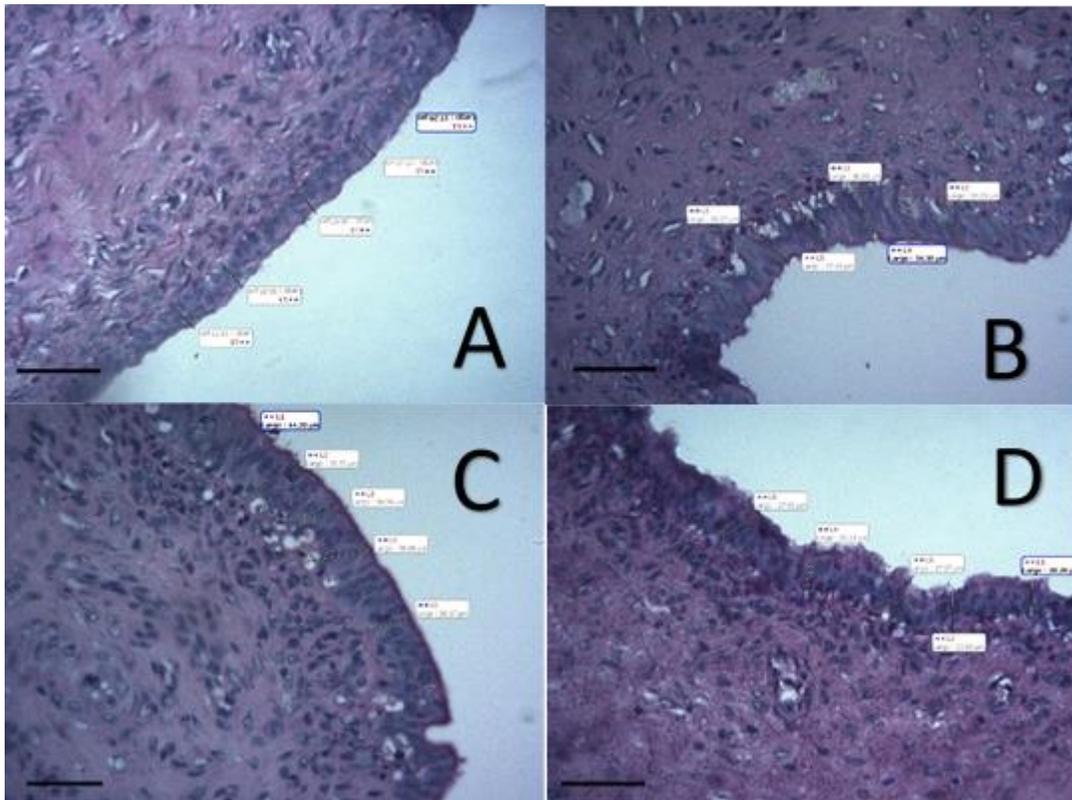
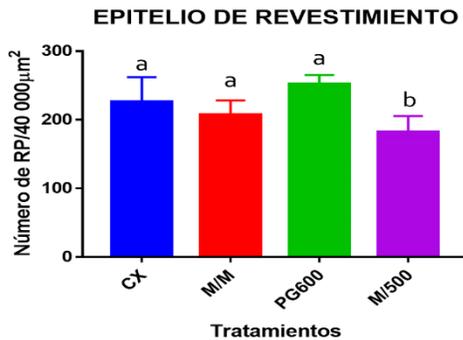
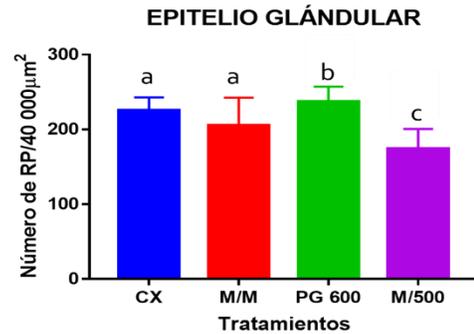


Figura 9.- Se observa el cambio de altura en el epitelio del cérvix por cada tratamiento **A** (control), **B** (PG 600), **C** (M/M) y **D** (M/500). Medida de la barra 25µm. Mediciones realizadas con computadora.

Inmunohistoquímica del receptor a progesterona en útero



Gráfica 14.- Expresión de receptores a progesterona en el epitelio de revestimiento del útero de los animales tratados con diversas concentraciones de tratamiento. ($p < 0.05$)



Gráfica 15.- Expresión de los receptores a progesterona en el epitelio glandular del útero de los animales tratados con diversas concentraciones de tratamiento. ($p < 0.05$)

En el epitelio de revestimiento se observó una disminución significativa en la expresión del RP4 en los animales tratados con M/500 en relación con los demás grupos (gráfica 14). En el epitelio glandular también se observó un aumento de la expresión del receptor, pero únicamente en relación con el grupo tratado con PG600, el grupo M/500 se observó una baja expresión del receptor (gráfica 15). En todas las graficas la letra **a** representa igualdad entre los grupos y la letra **b** diferencia, la letra **c** significa diferencia con la letra **b**.

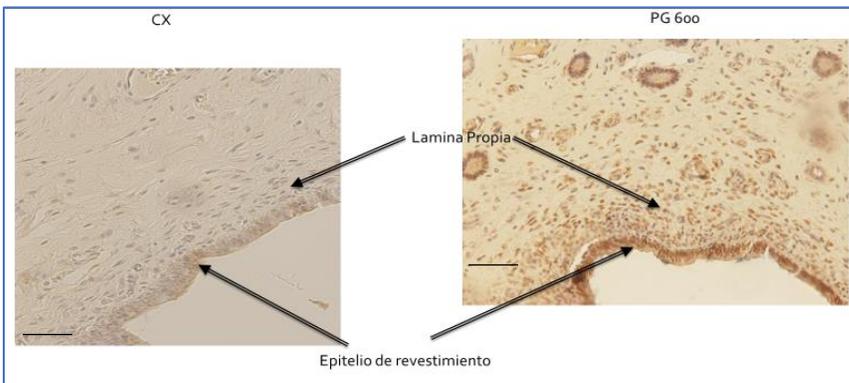


Figura 10.- Expresión de los receptores a progesterona en los animales del grupo control (Cx) y los tratados con PG 600; en el epitelio de revestimiento y la lámina propia del útero. Extensión total de la imagen 500 μm.

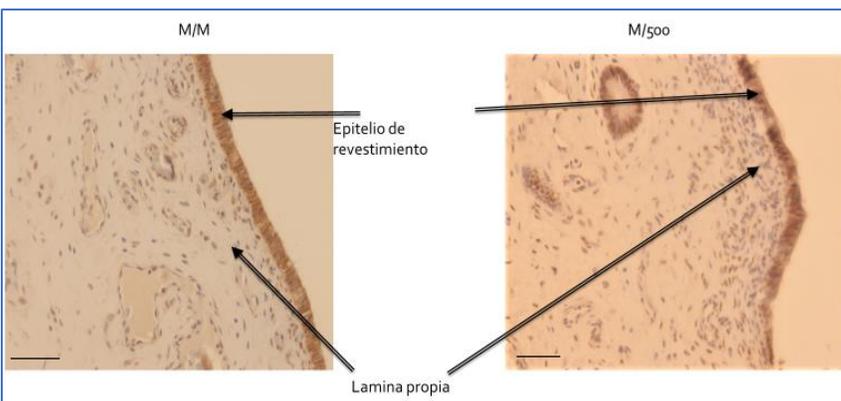
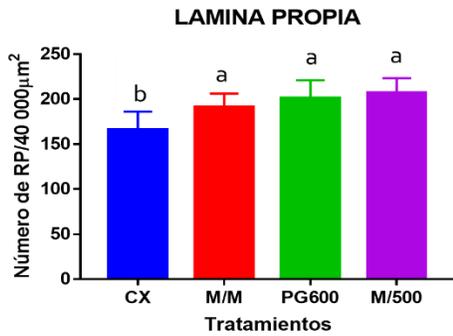


Figura 11.- Expresión del receptor a progesterona en el útero de los animales del grupo M/500, siendo esta disminuida en comparación a los demás grupos; epitelio de revestimiento y lamina propia. Tamaño de la barra 50 μm.

En la lámina propia (estroma) la expresión de los RP4 se incrementó significativamente en todos los tratamientos en relación con el grupo control (gráfica 16).



Gráfica 16.- Expresión del receptor a progesterona en todos los grupos de animales tratados en comparación con el grupo control. ($p < 0.05$)

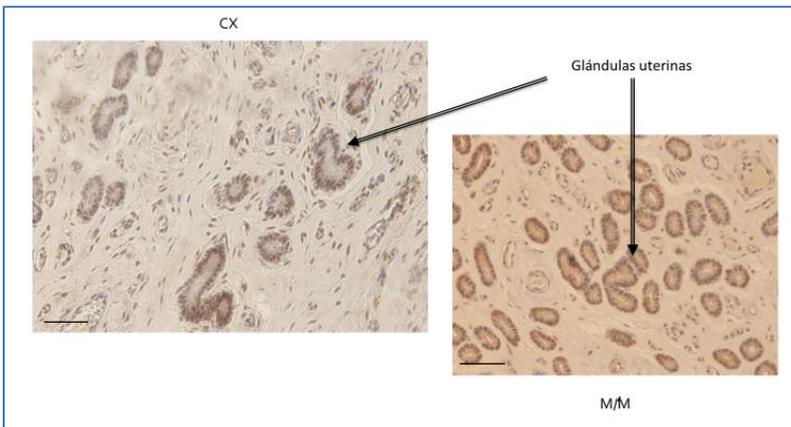


Figura 12.- Expresión de los receptores a progesterona en los animales del grupo control (Cx) y los tratados con una concentración de M/M; en el epitelio glandular del útero. Tamaño de las barras 50µm.

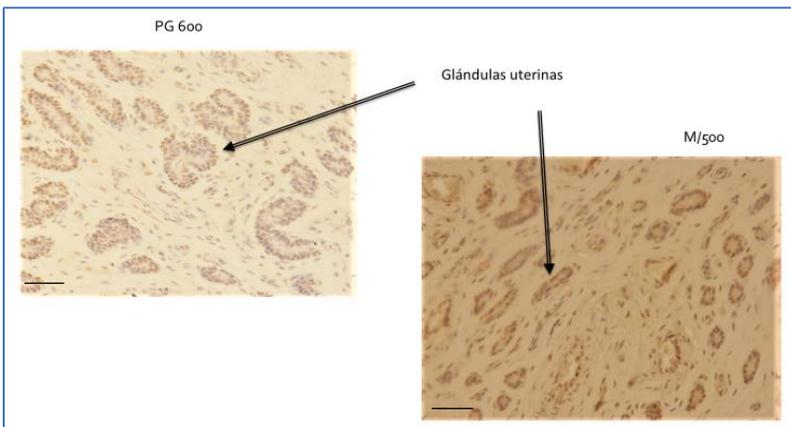
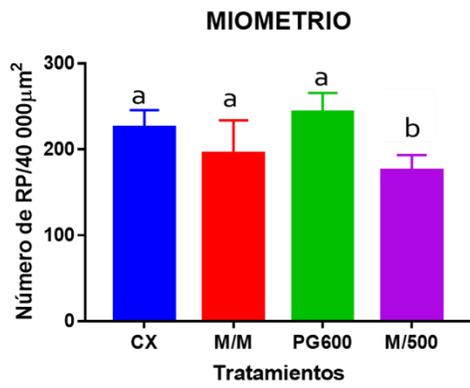
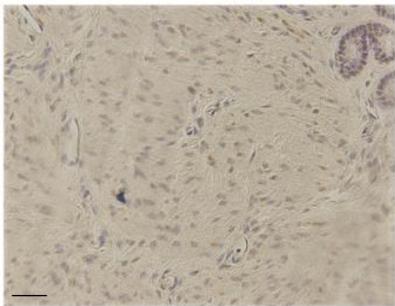


Figura 13.- Expresión de los receptores a progesterona en los animales del grupo tratado con una concentración de M/500 y los tratados con una concentración de PG 600; en el epitelio glandular del útero. Tamaño de las barras 50µm.

En el miometrio se observó una expresión menor del receptor en el grupo M/500, comparado con el resto de los grupos (gráfica 17).



Gráfica 17.- Expresión de los receptores a progesterona en los grupos tratados y el grupo control. ($p < 0.05$)



M/M

CX

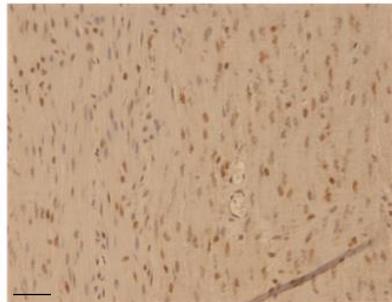


Figura 14.- Expresión de los receptores a progesterona en los animales del grupo tratado con una concentración de M/M y los del grupo control; en el miometrio. Tamaño de las barras 50µm.

No se observaron cambios patológicos en los cortes histológicos analizados.

Efecto sobre las variables histomorfológicas en los diferentes grupos tratados con gonadotropinas no hipofisarias.

	PG600	M/500	M/M
Tamaño ovarios	↑ (+++)	↑ (+)	↑ (+++)
#folículos	=	=	=
Tam. Folículos	↑ (+)	=	=
#Cuerpos lúteos	↑ (+)	↑ (+)	↑ (++)
Tam. Cuerpos Lúteos	↑ (+++)	↑ (+)	↑ (+)
Ind. Mit Epitelio	↓ (+)	↑ (+++)	=
Ind. Mit Ep Glandular	=	=	=
Ind. Apop Epitelio	=	↑ (+++)	↑ (+++)
Ind. Apop Epitelio Glandular	=	↑ (++)	(+++)
# Glándulas uterinas	↑ (+)	↑ (++)	↓ (++)
Área o tam glándulas	=	↓ (++)	↑ (++)
Alt epitelio uterino	↑ (++)	=	↑ (+)
Alt epitelio cérvix	↑ (+)	↑ (+)	↑ (++)

Cuadro 1. Diferencia del efecto producido en los diferentes grupos de tratamiento (PG600, M/500 y M/M) en comparación con el grupo control. Aumento ↑ o disminución ↓. Se utilizaron como marca de intensidad relativa las cruces (+).

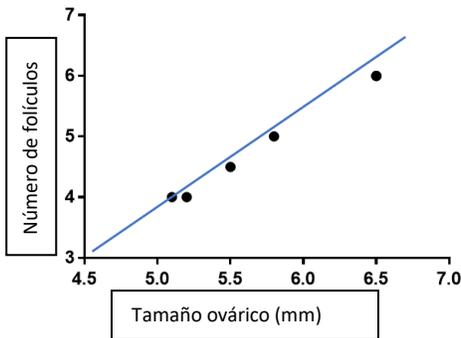
Efecto sobre el HSCORE de la expresión del receptor a progesterona en las diferentes capas histológicas del útero.

Capa histológica	PG600	M/500	M/M
Epitelio de revestimiento	=	↓ (+)	=
Lamina propia	↑ (+)	↑ (+)	↑ (+)
Epitelio glandular	↑ (+)	↓ (++)	=
Miometrio	=	↓ (++)	=

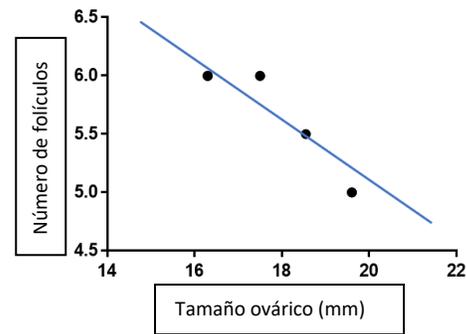
Cuadro 2. Diferencia del efecto producido en los diferentes grupos de tratamiento (PG600, M/500 y M/M) en comparación con el grupo control. Aumento ↑ o disminución ↓. Se utilizaron como marca de intensidad relativa las cruces (+).

Correlación entre las variables estudiadas

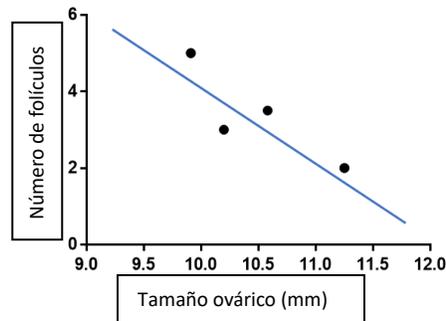
Correlación de Tamaño ovarico vs num fol Cx



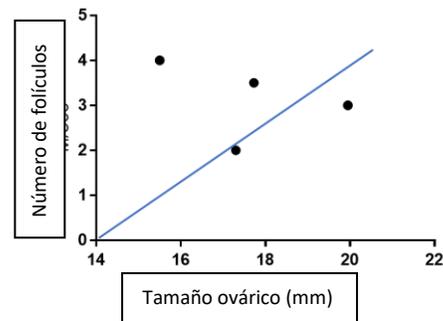
Correlación de Tamaño ovarico vs núm fol PG600



Correlación de Tamaño ovarico vs núm fol M/500



Correlación de Tamaño ovarico vs núm fol M/M



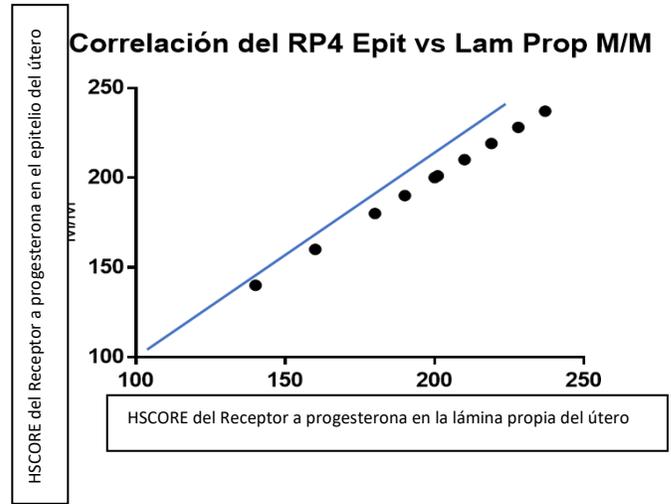
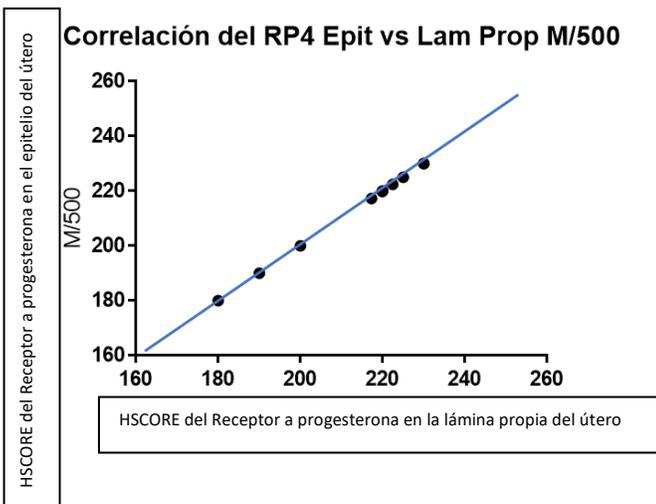
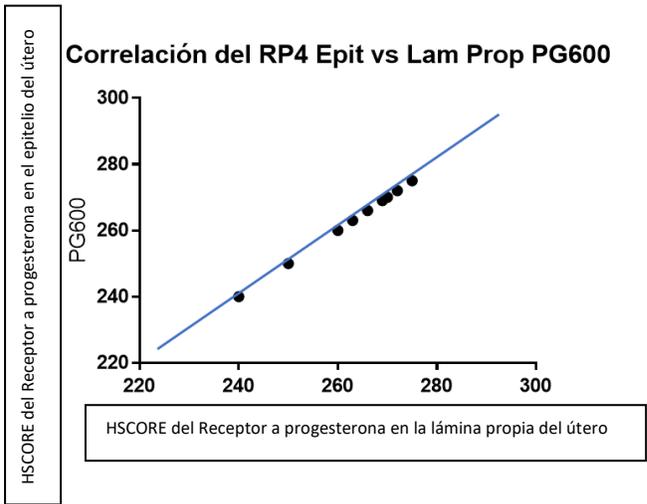
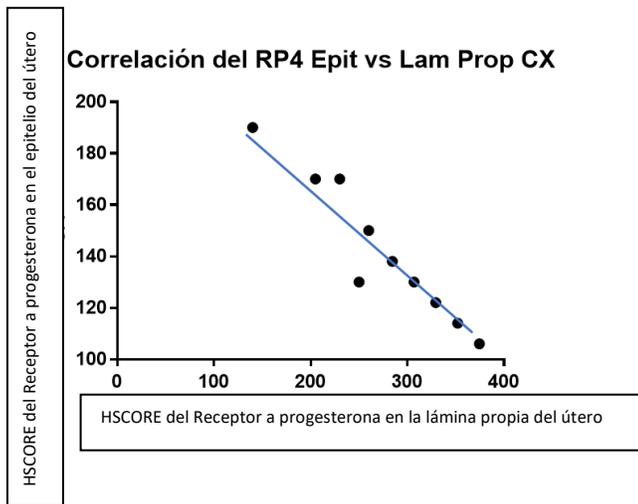
Gráfica 18,- Correlación entre el tamaño de los ovarios y el número de folículos por cada tratamiento. Grupo control (Cx); correlación positiva ($r = 0.9977$). Grupo tratamiento PG600; existe correlación negativa ($r = -0.9315$). Grupo tratamiento M/500; existe correlación negativa ($r = -0.8283$). Grupo tratamiento M/M; no existe correlación ($r = -0.3175$). Intervalo de confianza 95%.

En el grupo control se encontró una correlación positiva entre el tamaño de los ovarios y la cantidad de folículos, en los grupos PG600 y M/500 esta correlación existe, pero es negativa (gráfica 18).

En el caso del análisis entre tamaño ovárico y altura del epitelio uterino, índice de mitosis e índice de apoptosis, tamaño de las glándulas uterinas y altura del epitelio del cérvix, tamaño de las glándulas uterinas y altura del epitelio de recubrimiento uterino, número de glándulas uterinas y área ocupada por estas; no se encontró una correlación.

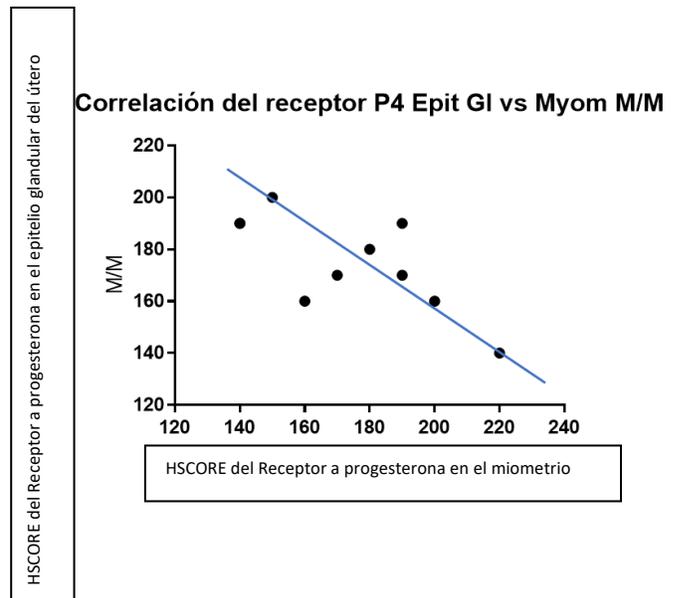
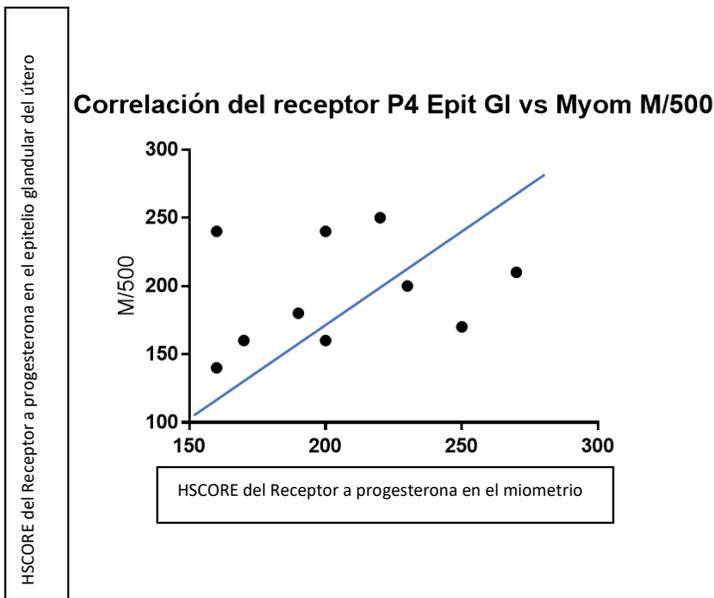
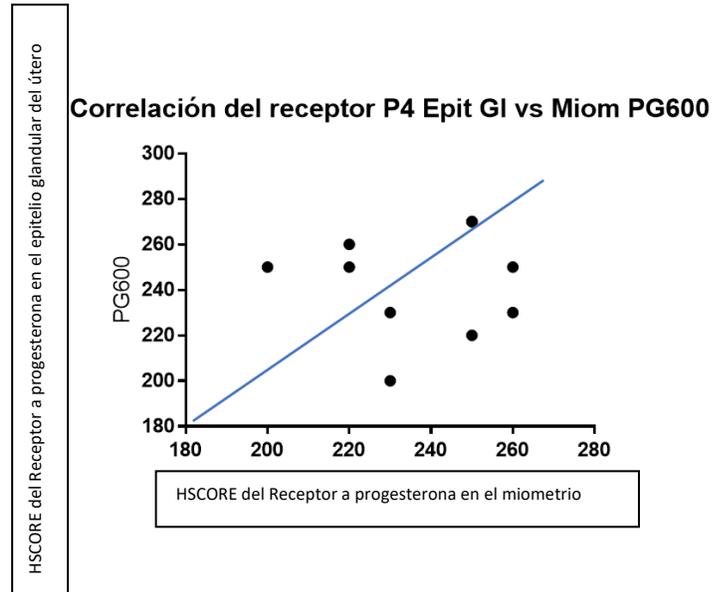
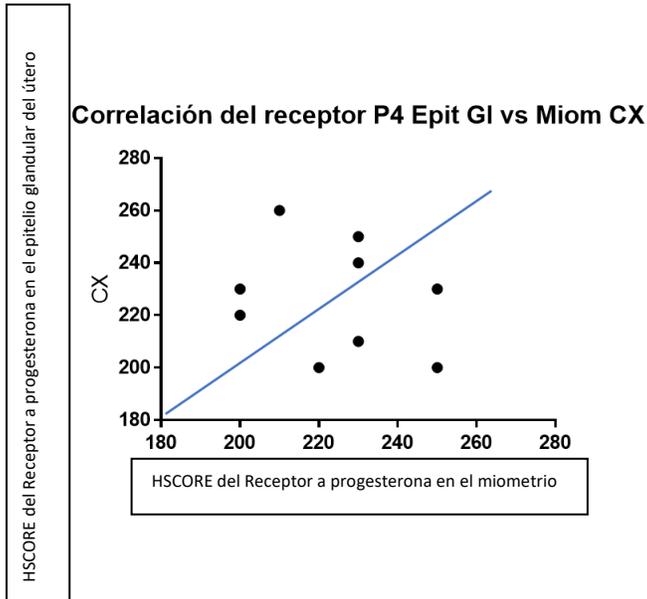
En cuanto a la correlación en la expresión del receptor a progesterona en las diferentes capas histológicas del útero se encontró lo siguiente:

La expresión del receptor en el epitelio de recubrimiento del útero mostró una correlación negativa en el grupo control, sin embargo, en los grupos con tratamiento (PG600, M/500 Y M/M) se encontró que existe una correlación positiva (gráfica 19).



Gráfica 19,- Correlación entre el HSCORE del receptor a progesterona en el epitelio de revestimiento y su correlación con el HSCORE del receptor a progesterona en la lámina propia del útero por cada tratamiento. Grupo control (Cx); existe correlación negativa ($r = -0.9451$). Grupo tratamiento PG600; existe correlación positiva ($r = 1$). Grupo tratamiento M/500; existe correlación positiva ($r = 1$). Grupo tratamiento M/M; existe correlación positiva ($r = 1$). Intervalo de confianza 95%.

La expresión del receptor a progesterona en el epitelio glandular mostró una correlación negativa con la expresión en el miometrio en el grupo M/M. Los demás grupos no mostraron correlación alguna (gráfica 20).



Gráfica 20,- Correlación entre el HSCORE del receptor a progesterona en el epitelio glandular del útero y su correlación con el HSCORE del receptor a progesterona en el miometrio por cada tratamiento. Grupo control (Cx); no existe correlación ($r = -0.2191$). Grupo tratamiento PG600; no existe correlación ($r = -0.0504$). Grupo tratamiento M/500; no existe correlación ($r = 0.2924$). Grupo tratamiento M/M; existe correlación negativa ($r = -0.6678$). Intervalo de confianza 95%.

Al determinar si existe correlación de la expresión del receptor a progesterona en el miometrio con el índice de apoptosis en el epitelio de recubrimiento uterino, se encontró que en ningún grupo existía esta relación. De la misma forma se evaluó el índice de mitosis en el epitelio uterino y su correlación con la expresión del receptor en miometrio, encontrando que no existe relación de estas variables en ninguno de los grupos.

DISCUSIÓN

La administración de hormonas con el fin de sincronizar el estro y los posteriores partos es una herramienta útil para la producción animal. Sin embargo la estimulación exógena del ovario podría ocasionar un decremento en la función reproductiva.

En un estudio realizado por **Szymanska et al. (2014)** en donde se evaluó el efecto de una sincronización de estros, utilizando una combinación de PGF2 α /eCG/hCG, sobre la síntesis de progesterona, determinó que el tratamiento no afectaba los niveles de progesterona producidos por el cuerpo lúteo sin embargo los niveles de progesterona sérica se veían disminuidos. En nuestro estudio no se realizó la medición de progesterona sérica sin embargo, se observó que la cantidad y tamaño de los cuerpos lúteos se incrementaba en comparación con el grupo control. Debido a que nuestro estudio se realizó al inicio del estro se intuye que los cuerpos lúteos observados no han alcanzado su nivel máximo de producción de progesterona.

De acuerdo a los estudios realizados por **Stainhauser et al. (2016)**, la expresión de los receptores a progesterona en el útero de cerdas es influenciada por el ciclo estral y la gestación, la dinámica de expresión de estos receptores depende de los niveles de hormonas principalmente estrógenos y progesterona en donde cerca del día 5 y hacia el día 9 del ciclo estral se incrementa la síntesis de ARNm del RP, para el día 10 y hasta el 14 esta síntesis se ve reducida para finalmente desde el día 15 y hasta el 19 volver a aumentar.

Los tratamientos con gonadotropinas no hipofisiarias pueden provocar en el organismo efectos fisiológicos similares a los que naturalmente sucederían en un ciclo estral pero con el fin de que ocurran de manera "programada" de acuerdo a las necesidades del productor.

En el estudio realizado por **Szymanska et al. (2014)** se encontró que en el día 9 de la gestación los niveles de progesterona sérica eran mayores que en el grupo control sin embargo, en el día 16 los niveles de progesterona en suero eran menores en los animales tratados en comparación con el grupo control.

Este hecho nos sugiere que la expresión de los receptores a progesterona podría verse afectada indirectamente por estos tratamientos, pues la progesterona actúa regulando a la baja sus propios receptores (**Steinhauser et al. 2016**).

En ovario se ha detectado que la progesterona juega un papel relevante durante la ovulación pues se identificó su influencia en la expresión de dos metaloproteasas, ADAMTS-1, y Cathepsin - L, formadas en la parte rostral de las células de la granulosa del ovario maduro, la primera es esencial para que ocurra la ovulación pues tiene un efecto sobre la angiogénesis en el tejido folicular (**Jericevic, 2004**).

Respecto a la acción de las hormonas esteroideas sobre el epitelio uterino, se sabe que en primates el estradiol presenta un efecto proliferativo sobre el útero mientras que la progesterona estimula la diferenciación de las células del epitelio (**Kawa, 2000**). Como resultado obtuvimos un mayor tamaño de folículos en los grupos con tratamiento en comparación con el control lo que afecta el tamaño ovárico, así como, probablemente induce un incremento en la síntesis de estrógenos y, por lo tanto, un aumento en la proliferación del epitelio de revestimiento del útero y del cérvix.

Al evaluar la apoptosis y la mitosis se encontró un aumento en los grupos tratados, esto ocurrió de manera similar en ambos casos, es decir, tanto la mitosis como la apoptosis se vio incrementada, sin embargo, el índice de apoptosis es muy superior al de la mitosis, lo que indica un predominio de este proceso sobre la proliferación celular. El predominio de la apoptosis sobre la mitosis puede indicar un posible efecto progestacional como se ha demostrado en los roedores (**Finn, 1981**), y podría explicarse a través del número de cuerpos lúteos presentes en los animales tratados en comparación con el grupo control. Sin embargo, en el análisis de la correlación de estos dos índices no se encontró una relación directa, esto podría deberse al número de muestras o el número de datos obtenidos por animal. Sería necesario realizar otro estudio aumentando el número de muestras lo que permitiría determinar con más certeza como es la relación entre índice de mitosis e índice de apoptosis celular.

El tratamiento con una concentración de M/500 indujo un aumento en el número de cuerpos lúteos en el ovario (figura 5 C), esto explicaría una menor expresión de receptores a progesterona en comparación con los demás tratamientos pues se comprueba lo obtenido en los estudios de **Steinhauser et al. (2016)**, **Jericevic, (2004)**. En donde se concluyó que existe una acción regulatoria a la baja (down regulation) de la progesterona sobre sus propios receptores. Los mecanismos de estos eventos son complejos y dependen del tipo celular en las capas del útero. De acuerdo con algunos estudios, los receptores en el estroma y el miometrio son menos sensibles a la regulación a la baja comparados con los receptores en el epitelio (**Sayamon, 2011**).

El hecho de que exista diferencia en la expresión del receptor a progesterona en las diferentes capas del útero dentro del mismo tratamiento tiene dos posibles explicaciones:

La primera, la cantidad de receptores a progesterona es diferente en cada estrato histológico del útero, lo que indica un efecto diferencial en las células provenientes de cada capa histológica, lo que implicaría una posible modificación funcional de cada una de ellas, las implicaciones de estas alteraciones funcionales, se desconocen.

La segunda, debido a que existen 3 isoformas conocidas del RP4 (RPA, RPB Y RPAB) estas podrían distribuirse de manera diferente en las capas histológicas del útero de igual forma varía la acción de cada una de estas isoformas (**Jericevic, 2004, Steinhauser et al. 2016**). En nuestro estudio utilizamos un anticuerpo con mayor afinidad a la isoforma B no obstante, el fabricante sugiere que también reacciona a la isoforma A.

El uso de diferentes concentraciones de gonadotropinas no hipofisarias (eCG y hCG) afecta la histomorfología del útero y el ovario tomando en cuenta : tamaño del ovario, tamaño y número de folículos y cuerpos lúteos, índice de mitosis y apoptosis, tamaño y número de glándulas, altura del epitelio de revestimiento del útero y del cérvix, por lo tanto, es importante tener en cuenta que la función reproductiva también puede verse afectada en mayor o menor grado de acuerdo al tipo de producto utilizado y la concentración administrada.

La expresión del receptor a progesterona en útero fue afectada negativamente principalmente por la concentración de M/500, de manera que podemos decir que el aumento de la dosis de eCG y hCG, aún guardando la proporción (2:1) presente en PG600, afecta la expresión del receptor en el útero.

Hace falta que se evalúen a largo plazo los índices reproductivos de hembras tratadas con diferentes concentraciones de gonadotropinas y de esta manera determinar si los cambios histomorfológicos encontrados en este trabajo tienen un efecto sobre la duración del ciclo, la cantidad de hembras que repiten celos y directamente sobre la gestación (número de embriones implantados, pérdidas embrionarias, abortos, lechones nacidos vivos, etc.)

CONCLUSIONES

Los diferentes tratamientos y sus concentraciones tienen efectos directos sobre las estructuras ováricas productoras de estrógenos (folículos) y progesterona (cuerpos lúteos) y en consecuencia las características histomorfológicas de los ovarios, útero y cérvix de la cerda. De la misma manera existe un efecto sobre la cantidad de receptores a progesterona expresados a lo largo del ciclo estral y en las diferentes capas histológicas del útero. Debido a esto las condiciones necesarias para el correcto mantenimiento y desarrollo de los embriones pueden verse afectadas.

REFERENCIAS

AN BS, AHN HJ, KANG HS, JUNG EM, YANG H, HONG EJ AND JEUNG EB: Effects of estrogen and estrogenic compounds, 4-tert-octylphenol, and bisphenol A on the uterine contraction and contraction-associated proteins in rats. *Mol Cell Endocrinol* 375: 27-34, 2013.

BULLIVANT SB, SELLERGRE SA, STERN K, SPENCER NA, JACOB S, MENNELLA JA AND MCCLINTOCK MK: Women's sexual experience during the menstrual cycle: Identification of the sexual phase by noninvasive measurement of luteinizing hormone. *J Sex Res* 41: 82-93, 2004.

CSAPO AL, KNOBIL E, VAN DER MOLEN HJ AND WIEST WG: Peripheral plasma progesterone levels during human pregnancy and labor. *Am J Obstet Gynecol* 110: 630-632, 1971.

GALINA C, VALENCIA J. ed., 2008. Reproducción de los animales domésticos. México: Limusa.

JERICEVIC BM, CONNEELY OM: Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* (2004) 128 139–146.

JOHNSON M H. 7th edition. 2011. *Essential Reproduction*. UK: Wiley - Blackwell.

KAWA KS Apoptosis y hormonas esteroides *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González*; Vol 3, No.3 Julio-Septiembre 2000 Págs. 115-117.

KRZYMOWSKI T AND STEFAŃCZYK-KRZYMOWSKA S: The oestrous cycle and early pregnancy-a new concept of local endocrine regulation. *Vet J* 168: 285-296, 2004.

KNIGHT P, CLISTER C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132, 191-206. 2006.

KIRKWOOD R. 2011. Control Hormonal del estro y la ovulación. Texto basado en un artículo presentado en un taller previo al congreso anual de 2011 de la Asociación Americana de Veterinarios de Porcino (AASV).

LÓPEZ BERNAL A, RIVERA J, EUROPE-FINNER GN, PHANEUF S AND ASBÓTH G: Parturition: Activation of stimulatory pathways or loss of uterine quiescence? *Adv Exp Med Biol* 395: 435-451, 1994.

MARTÍNEZ GAMBA RG, CONTRERAS ORTÍZ AJ, TRUJILLO ORTEGA ME, HERNÁNDEZ TRUJILLO E, MOTA ROJAS D, OROZCO GREGORIO HO. 2015. La cerda reproductora. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

MCDONALD.1981. 2ª ed. Reproducción y endocrinología veterinarias. USA: InterAmericana.

MESIANO S AND WELSH TN: Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition. *Seminars in cell & developmental biology* 18: 321-331, 2007.

MESSINIS, I. E. (2011). The endocrine effects of multiple folliculogenesis. *Middle East Fertility Society Journal*, 16(1), 7-13.

ORTEGA-DOMÍNGUEZ, B., HERRERA-RAMÍREZ, M., & TECALCO-CRUZ, A. C. (2015). Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 18(2), 131-143.

PERUMAMTHADATHIL, C. S., JOHNSON, W. H., LEBLANC, S. J., FOSTER, R. A. & CHENIER, T. S. 2014. Persistence of oxytocin receptors in the bovine uterus during the first 7 d after calving: An immunohistochemical study. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78, 72-77.

RUSH RW, KEIRSE MJ, HOWAT P, BAUM JD, ANDERSON AB AND TURNBULL AC: Contribution of preterm delivery to perinatal mortality. *Br Med J* 2: 965-968, 1976.

RZUCIDLO S, WEIGL R AND TILTON J: MYOMETRIAL LH/hCG receptors during the estrous cycle and pregnancy in pigs. *Anim Reprod Sci* 51: 249-257, 1998.

SAYAMON S. Steroid Receptors and Their Roles in Pig Uterus. Review article. *Thai J Vet Med Suppl.* 41: 43-49. 2011

SCARAMUZZI R. J., BAIRD D. T., CAMPBELL B. K., DRIANCOURT M.-A., DUPONT J., FORTUNE J. E., GILCHRIST R. B., MARTIN G. B., MCNATTY K. P., MCNEILLY A. S., MONGET P., MONNIAUX D., VIÑOLES C., WEBB R. (2011) Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* **23**, 444-467. <https://doi.org/10.1071/RD09161>

- SENGER P L. 3rd edition. 2012. Pathways to pregnancy and parturition. USA: Current conceptions, Inc.
- SOEDE N, LANGENDIJK P AND KEMP B: Reproductive cycles in pigs. Anim Reprod Sci 124: 251-258, 2011.
- STEINHOUSER CB, BAZER FW, BURGHARDT RC, JOHNSON GA. 2016. Expression of progesterone receptor in the porcine uterus and placenta throughout gestation: correlation with expression of uteroferrin and osteopontin, 58, 19-29.
- SUKJUMLONG S, DALIN A, SAHLIN L, PERSSON E. 2005. Immunohistochemical studies on the progesterone receptor (PR) in the sow uterus during the oestrus cycle and in inseminated sows at early pregnancy, 129, 349-359.
- WU WX, MA XH, COKSAYGAN T, CHAKRABARTY K, COLLINS V, ROSE J AND NATHANIELSZ PW: Prostaglandin mediates premature delivery in pregnant sheep induced by estradiol at 121 days of gestational age. Endocrinology 145: 1444-1452, 2004.