

RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ E IMPLANTACIÓN DEL EMBRIÓN: MODELO BOVINO

López AP¹, Gómez LF², Ruiz Cortés ZT¹, Olivera M¹, Giraldo CA¹

¹ Grupo Fisiología y Biotecnología de la Reproducción

² Grupo de Investigación Centauro

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia

Resumen: El reconocimiento materno de la preñez es el proceso fisiológico en el cual el embrión, mediante señales moleculares como la secreción de interferón tau (IFN-t), anuncia su presencia en el tracto reproductivo materno, con el fin de evitar que se desencadene el mecanismo luteolítico ejercido por la prostaglandina F2a (PGF2a) sobre el cuerpo lúteo, prolongando la vida de éste y garantizando la producción de progesterona para el mantenimiento de la preñez. Los eventos que influyen en este proceso fisiológico son una interacción de diferentes órganos como ovario, útero y embrión. Aunque se considera al IFN-t como la señal primordial para que se dé el reconocimiento materno de la preñez, es importante tener en cuenta el papel que cumplen los estrógenos, progesterona, y prostaglandinas en los procesos de señalización molecular que ocurren durante la ventana de implantación.

Palabras clave: Reconocimiento materno de la preñez - Embrión bovino - IFN-t.

MATERNAL RECOGNITION OF THE PREGNANCY AND EMBRYO IMPLANTATION: BOVINE MODEL

Abstract: The maternal recognition of pregnancy is a physiological process in which the embryo announces his presence in the maternal reproductive tract by molecular signs interferon tau (IFN-t) secretion. Luteolitic mechanism trigger by the prostaglandin F2a (PGF2a) on the corpus luteum (CL) blockage, and lifespan and CL-progesterone production prolongation pregnancy. The events that influence this phenomenon imply the interaction of different structures as ovary, uterus and embryo. Although the IFN-t is considered to be the basic signal to the maternal recognition of the pregnancy, it is important to keep in mind the role that estrogens, progesterone, and prostaglandin have in the processes of molecular pathways signalling that happen during the implantation window.

Key word: Maternal recognition of pregnancy – Bovine embryo – IFN-t.

Fecha de recepción: 24/04/07

Fecha de aprobación: 26/10/07

Dirección para correspondencia: Carrera 75 # 65-87 Ciudadela Robledo Universidad de Antioquia Medellín-Colombia Apartado Aéreo 1226

E-mail: angeladir7@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Reconocer los procesos fisiológicos que ocurren alrededor de la implantación es importante para tratar de explicar algunos problemas que disminuyen la eficiencia reproductiva en los hatos. Uno de los problemas reproductivos más frecuentes en ganadería es el de las “vacas repetidoras”, al cual se le atribuyen diferentes causas como: desbalance nutricional y hormonal, enfermedades infecciosas y muerte embrionaria. Esta última representa del 25% al 35% del problema en general y esta asociada al día 16 posestro[7], día en que ocurre el reconocimiento materno de la preñez.

Se conoce como reconocimiento materno de la preñez o reconocimiento materno embrionario, el proceso fisiológico en el cual el embrión mediante señales moleculares como la secreción de interferón *tau* (IFN-*t*) anuncia su presencia en el tracto reproductivo materno, con el fin de evitar que se desencadene el mecanismo lúteolítico ejercido por la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) sobre el cuerpo lúteo, prolongando la vida de éste y garantizando la producción de progesterona[20].

La interacción del embrión, el tracto reproductivo materno, y las diferentes hormonas que actúan en este proceso, se tratan en el presente artículo. Inicialmente se describe la función de las diferentes hormonas implicadas en el reconocimiento y cuál es su acción en el tracto reproductivo dependiendo de si hay o no gestación. Seguidamente se describe como se forma el embrión y como este interactúa con el tracto reproductivo para señalar su presencia mediante el IFN-*t*. Finalmente se presenta un modelo de este conjunto de interacciones que llamamos “reconocimiento materno de la preñez”

PRODUCCIÓN DE HORMONAS Y FUNCIÓN

ESTRÓGENOS (E_2)

Los niveles de estrógenos varían durante todo el ciclo dependiendo de la actividad ovárica, son basales después de la ovulación y comienzan a aumentar con la emergencia de una nueva onda folicular, alcanzando altos niveles séricos durante la dominancia folicular[9]. (Figura 1-A y 1-B, E_2). El endometrio presenta un receptor para estrógenos a nivel de núcleo el cual se conoce como receptor alfa de estrógenos ($RE_2\alpha$)[21]

Los E_2 producidos en los folículos ováricos ejercen diferentes funciones dentro del reconocimiento materno de la preñez, una de ellas es regular cuando se puede dar o no la implantación. En el epitelio endometrial, compuesto de *células epiteliales luminales* con microvellosidades y algunas con cilios y *células epiteliales glandulares* con microvellosidades[17], los estrógenos regulan la expresión y producción de una proteína conocida como el MUC-1 o mucina[12]. Esta glicoproteína

de 120-220 KDa que se encuentra en la superficie apical, especialmente en microvellosidades y cilios de ambos tipos celulares (Figura 1-C, endometrio) posee un dominio extracelular de gran tamaño que con la glicosilación puede aumentar su peso a 400 KDa [22]. El gran tamaño y peso de esta glicoproteína, sumado a la presencia de azúcares dentro de su estructura, la hacen una molécula de antiadhesión que impide el contacto entre el embrión y el endometrio materno evitando que se de una implantación en el momento inadecuado[12]

Otra función importante que cumplen los estrógenos es servir como estímulo para la liberación de hormonas gonadotrópicas.

GONADOTROPINAS

La GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropinas) es una hormona proteica producida por el hipotálamo y cuya función es inducir la liberación de FSH (hormona foliculo estimulante) y LH (hormona luteinizante) en la adenohipófisis [2]. La liberación de estas hormonas depende de dos centros que se encuentran en el hipotálamo controlando la liberación de GnRH, uno es el centro de pulsos que funciona tanto para LH como FSH, y responde a concentraciones bajas de E_2 séricos aumentando la liberación de FSH para estimular el crecimiento folicular en las etapas de reclutamiento y divergencia (Figura 1-A y 1-B, FSH) [14]. El otro es el centro de pico que permite la liberación de LH que actúa en la etapa de divergencia a dominancia con la maduración del folículo dominante permitiendo que se de la ovulación y posteriormente en la formación del cuerpo lúteo, este centro se ve estimulado por gran cantidad de E_2 provenientes del folículo dominante y esta inhibido por la progesterona proveniente del cuerpo lúteo funcional (Figura 1-B, LH y P_4)[14]. Con la estimulación de este último centro, se da el pico preovulatorio de LH previo al estro (día 0), que desencadena la ovulación del folículo dominante 8-12 horas posestro ó 24 horas presentado el pico, liberando un ovocito maduro listo para ser fecundado [15] (Figura 1-A). La secreción de LH continúa para permitir la formación del cuerpo lúteo y asegurar la producción de progesterona importante para la gestación (Figura 1-A y 1-B, LH)

PROGESTERONA (P_4)

Con el proceso de luteinización se inhibe la vía de aromatización y se comienza a producir P_4 desde niveles no detectables, hasta el día 2 posestro donde se registran niveles séricos mayores a 1ng/mL, y en el día 5 posestro se registra niveles mayores a 5ng/mL, considerando al cuerpo lúteo como funcional [18]. La producción se mantiene en el tiempo si un embrión logra el reconocimiento por parte de la madre o puede

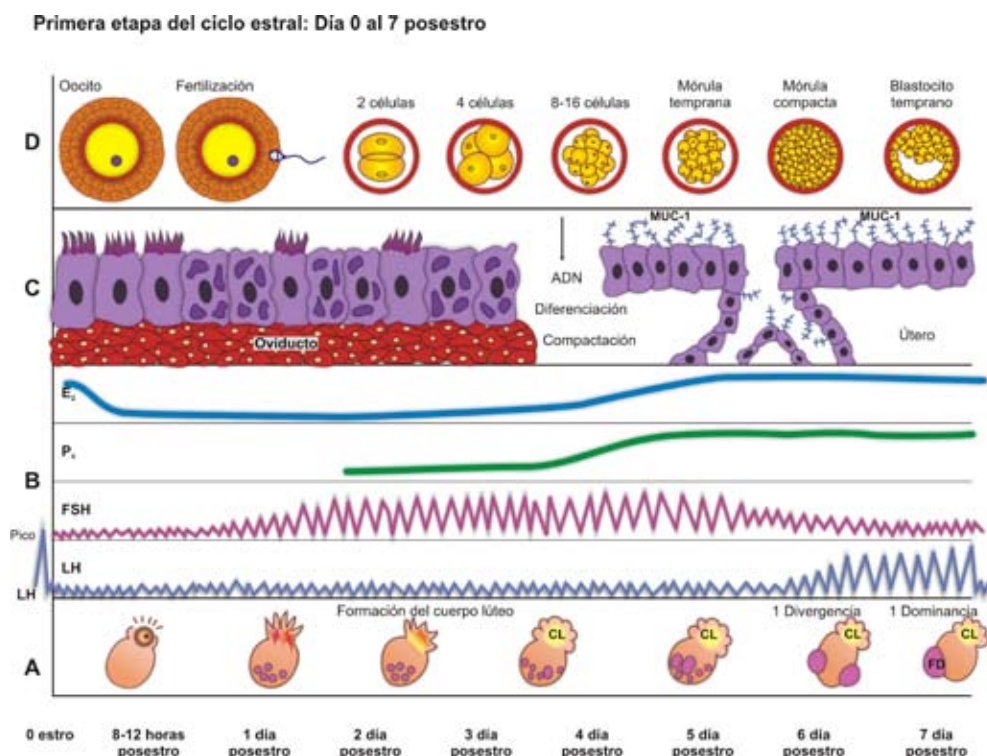


Figura 1: Primera etapa del ciclo estral día 0 al 7 pos-estro, A; ovario, B; hormonas C; tracto reproductivo y D; desarrollo embrionario.
 Figure 1: First stage of the cycle estral day 0 to 7 pos-estrus, A; ovary, B; hormones C; reproductive tract and D; embryonic development.

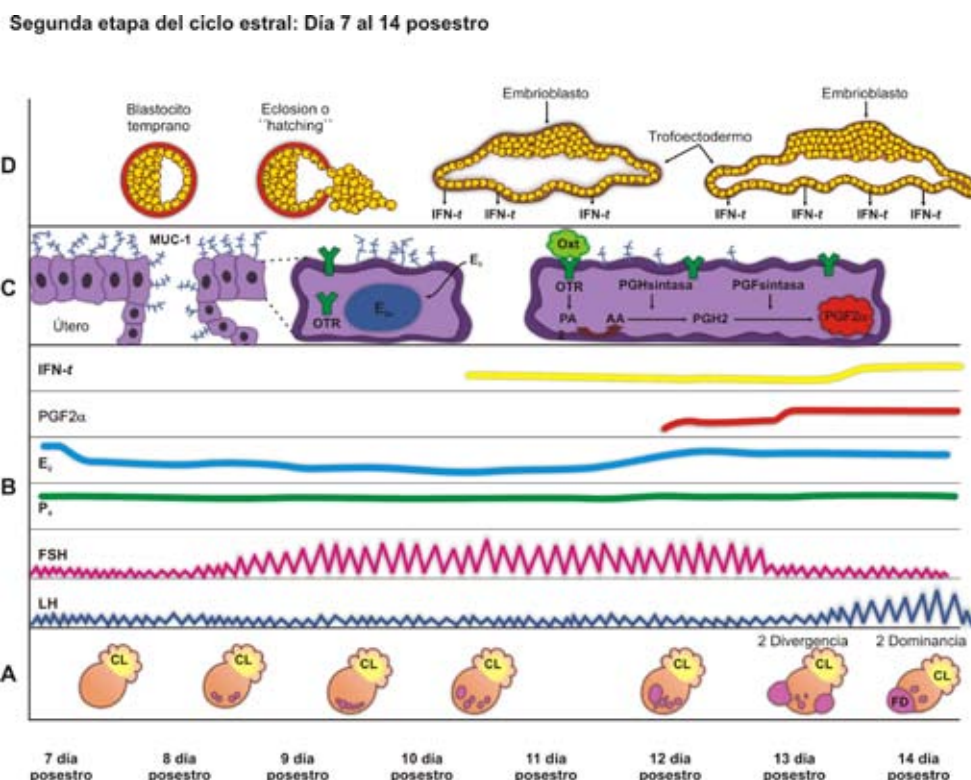


Figura 2: Segunda etapa del ciclo estral día 7 al 14 pos-estro, A; ovario, B; hormonas C; tracto reproductivo y D; desarrollo embrionario.
 Figure 2: Second stage of the cycle estral day 7 to 14 pos-estrus, A; ovary, B; hormones C; reproductive tract and D; embryonic development.

finalizar con el mecanismo de luteólisis si no hay preñez. (Figura 1-B, P₄).

La P₄ mantiene en óptimas condiciones el micro-ambiente en el cual se desarrollará el em-

brión, ya que, su presencia en el tracto materno tiene acción sobre las secreciones uterinas que mejoran el desarrollo embrionario temprano y por tanto favorece la producción de IFN- τ , molécula

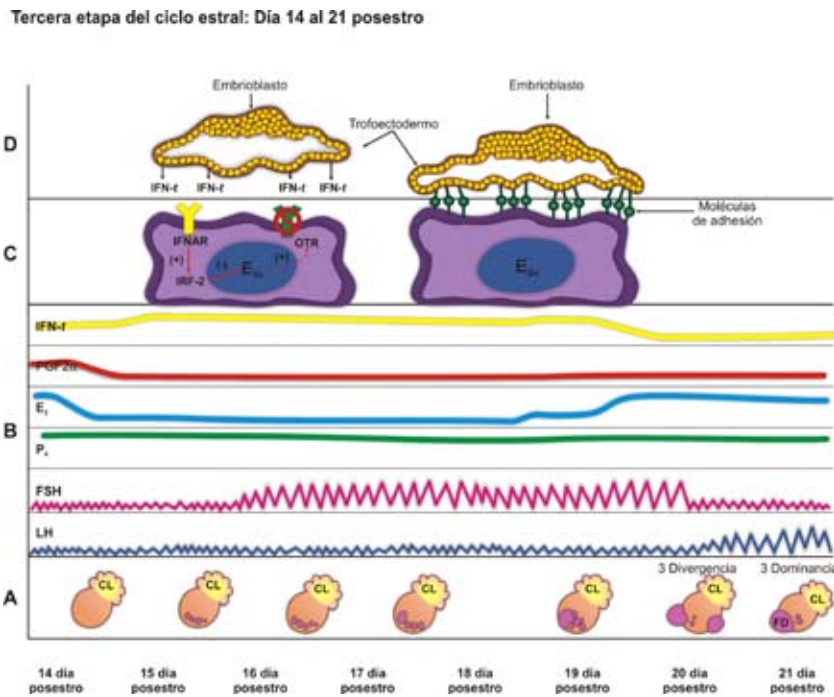


Figura 3: Tercera etapa del ciclo estral día 14 al 21 pos-estro, A; ovario, B; hormonas C; tracto reproductivo y D; desarrollo embrionario.

Figure 3: Third stage of the cycle estral day 14 to 21 pos-estrus, A; ovary, B; hormones C; reproductive tract and D; embryonic development.

importante en el reconocimiento materno embrionario [11].

La P₄ producida durante los primeros 10 días pos-estro inhibe el mecanismo luteolítico, debido a la comodulación existente entre el receptor RE₂ α y el receptor de P₄ (RP) en el núcleo de las células endometriales [21]. La unión de la P₄ a su receptor, inhibe a RE₂ α impidiendo que la unión de E₂ a su receptor sirva como factor de transcripción para la síntesis de receptores de oxitocina (OTR) [4], necesarios en el mecanismo de producción de PGF_{2 α} ; pero una exposición continua de P₄ sobre el endometrio resulta en una saturación de los receptores RP entre los días 11-12 pos-estro deprimiendo su función [21]

LUTEÓLISIS

CÉLULA ENDOMETRIAL, EXPRESIÓN DE OTR Y PRODUCCIÓN DE PROSTAGLANDINA (PGF_{2A})

La expresión de OTR en la célula endometrial es el paso previo para que se de el mecanismo luteolítico. Los estrógenos provenientes de los folículos en crecimiento actúan sobre el RE₂ α ; el complejo hormona-receptor se comporta como un factor de transcripción a nivel de núcleo [21], para la síntesis de OTR que se instalan en membrana citoplasmática basal a espera del estímulo de oxitocina [23], (Figura 2-C).

La oxitocina es producida por el hipotálamo ó en las células grandes luteales [19], es liberada

al torrente sanguíneo y llega hasta útero, donde se acopla al OTR en la célula endometrial, activando la fosfolipasa A2 cuya función es clivar el ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana. Sobre el ácido araquidónico actúa un complejo bifuncional compuesto por la COX-2 y una peroxidasa que lo convierten en PGH2, precursor de prostaglandina. Sobre el PGH2 ejerce su acción la enzima PGF-sintasa, convirtiéndolo en PGF_{2 α} . (Figura 2-C). La PGF_{2 α} llega hasta el cuerpo lúteo mediante un mecanismo de contracorriente entre la vena uterina y la arteria ovárica, causando pérdida de función y apoptosis de las células luteales. La luteólisis permite la continuidad de la ciclicidad ovárica del animal, ya que, sin la presencia de P₄ se retira el bloqueo a nivel hipotalámico y el pico preovulatorio de LH puede darse de nuevo.

La producción de PGF_{2 α} en forma pulsátil comienza a ser de importancia desde el día 12 pos-estro (Figura 2-B, PGF_{2 α}) cuando existen receptores membranales en las células luteales que permitan realizar su función [3].

FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

El oocito liberado en la ovulación es captado por el infundíbulo del oviducto, desciende hasta la unión istmo-ampular en donde aproximadamente 250.000 espermatozoides capacitados, rodean la zona pelúcida y uno de ellos fecunda [13] (Figura 1-D); posterior a la formación de los pronúcleos femenino y masculino ocurre la

singamia dando origen al comienzo del clivaje. El oocito, y posteriormente el embrión, tienen contacto con dos tipos de células en el oviducto: *células ciliadas* las cuales se encargarán del transporte hacia el útero y *células secretoras* dotadas de gránulos productores de sustancias que ayudan a la maduración de los gametos, capacitación de los espermatozoides y al desarrollo embrionario temprano [10]. Existe un tercer tipo de células, las basales que sirven de sostén tanto a ciliadas como secretoras [10].

Luego de la fecundación, comienza el desarrollo embrionario con el clivaje o serie de divisiones mitóticas; el día 2 postestro el embrión es de 2 células, al día 3 se encuentra en estadio de 4 células y el día 4 en estadio de 8-16 células, durante este estadio se da la activación del genoma embrionario [6] y el comienzo de la diferenciación celular (Figura 1-D) en dos poblaciones, el embrioblasto (células que darán origen al embrión) y el trofoectodermo, (células encargadas del reconocimiento materno y de la placentación). En esta etapa, se da la mayor pérdida embrionaria [5], ya que, una falla en la expresión del genoma podría afectar la diferenciación y eventos subsiguientes como: reconocimiento, implantación, placentación y desarrollo fetal [16]. El embrión permanece en el oviducto hasta el día 4 postestro, día en el que pasa al útero para continuar su desarrollo (Figura 1-C, oviducto).

Después de superar el estadio de 8-16 células el embrión se instala en la parte apical del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo, y continúa con su desarrollo a mórula temprana (MT) en el día 5, mórula compacta (MC) en el día 6 y el día 7, con la formación del blastocelo se le denomina blastocito temprano (BT) (Figura 1-D), el día 8 postestro continúa su desarrollo a blastocito expandido (BEx) (Figura 2-D).

ETAPAS PREIMPLANTATORIAS Y RECONOCIMIENTO DE LA PREÑEZ

En el día 9 postestro el embrión abandona la zona pelúcida, evento conocido como *eclosión* o "*hatching*", (Figura 2-D, eclosión). Comienza entonces la etapa de *elongación*, en donde se alarga y aumenta de tamaño durante los días 10 a 13 postestro. En este periodo se da la secreción de interferón *tau* (IFN-*t*) [8] (Figura 2-D, elongación).

El IFN-*t* es una proteína perteneciente a la familia de los interferones tipo 1 [13], producida en embriones rumiantes por las células mononucleares del trofoectodermo, se ha determinado su secreción hacia el lumen uterino entre los días 10 y 21 del ciclo (Figura 2-B, IFN-*t*) con una producción máxima entre los días 14 y 16 postestro [21]. En los días de mayor producción de IFN-*t* el embrión se encuentra en la fase de *precontacto*, caracterizada por la diferenciación

de las células del trofoectodermo en columnares y sincitiales [22], en esta etapa no hay contacto entre el embrión y la madre en espera que el IFN-*t* realice su función antiluteolítica.

MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN POR INTERFERÓN-TAU EN LA CÉLULA ENDOMETRIAL.

¿Como actúa el IFN-*t* como factor antiluteolítico? Inicialmente se creía que el efecto del IFN-*t* se daba sobre la expresión de la COX-2, enzima importante en la vía de producción de la PGF_{2α}, sin embargo estudios posteriores han demostrado que la inhibición se da en otra parte de la vía propiamente en la síntesis de receptores para oxitocina (OTR).

Las células endometriales poseen un receptor membranal para los interferones tipo 1 llamado IFNAR; el IFN-*t* se acopla a este receptor para inducir una señal intracelular que genera la producción de proteínas tales como como el IRF-1 (Factor Regulador de Interferón 1), el IRF-2 (Factor Regulador de Interferón 2), proteína Mx, β2 microglobulina entre otras [13]. El IRF-2 actúa como un inhibidor del receptor de estrógenos (RE_{2α}) en la célula endometrial, evitando la unión hormona-receptor necesaria para la síntesis de OTR, así no habrá receptor que reciba el estímulo para la producción de PGF_{2α} [4], (Figura 3-C).

Mediante este mecanismo de señalización por IFN-*t* se mantiene la producción de P₄ por el cuerpo lúteo, mientras el embrión continúa con la fase de *aposisión* en los días 18 a 19 postestro, donde existe contacto célula a célula. El embrión se inmoviliza en el útero por medio de la interdigitación de las células diferenciadas del trofoectodermo embrionario con las microvellosidades del epitelio endometrial [22] (Figura 2-D, precontacto y aposición). Finalmente se da la fase de *adhesión* caracterizada por la fusión de membranas trofoblásticas con membranas de las células endometriales. La adhesión se da gracias a un número de moléculas de adhesión expresadas tanto por las células del trofoectodermo como por las células endometriales, que permite la unión célula a célula [1].

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión presentes en membrana celular permiten la unión entre células y median procesos como la embriogénesis, la remodelación de tejidos, la cicatrización y la migración de células. Estas moléculas se clasifican dependiendo del tipo de unión si es célula a célula como las caderinas e inmunoglobulinas o célula a matriz extracelular como integrinas [1].

La producción de moléculas de adhesión en la implantación de embriones bovinos se da tanto en las células del trofoectodermo como en las cé-

lulas endometriales, (Figura 3-C). Las integrinas α y β y L-selectina, son algunas de las moléculas implicadas en el proceso de implantación, se unen a componentes de matriz extracelular como el GlyCAM-1 (Molécula de adhesión celular glicosilada 1), galactin-15 y osteopontina que son secretadas por las células del endometrio [22]. Las moléculas de adhesión se activan dependiendo de diferentes factores como la P_4 y el IFN- t , también pueden ser activadas por otras moléculas como la unión de L-selectinas a GlyCAM-1 que activan las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ [22].

El entendimiento de los mecanismos involucrados en el reconocimiento materno embrionario en los bovinos, permite comprender desde la fisiología, fenómenos que comprometen la eficiencia reproductiva del ganado, como las reabsorciones embrionarias tempranas. El estudio de este tema debe hacerse desde la comprensión de un todo ya que en el proceso se da la interacción entre hormonas, el aparato reproductivo materno y el embrión que se regulan y modulan entre sí. También se hace necesario el estudio desde la biología molecular que permite identificar grandes funciones realizadas por moléculas pequeñas como el IFN- τ y que son de vital importancia para dar continuidad a un proceso de gestación. De la misma manera, a partir de este conocimiento se pueden plantear estrategias de manejo hormonal, control del ciclo estral, o la motivación a nuevas investigaciones desde la biología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod* 1997; 2: p. 84-93.
2. Clarke IJ and Pompolo S. Synthesis and secretion of GnRH. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: p. 29-55.
3. Davis JS, May JV, and Keel BA. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996; 45: p. 1351-1380.
4. Demmers KJ, Derecka K, and Flint A. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 2001; 121: p. 41-9.
5. Fabian D, Koppel J, and Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 2005; 64: p. 221-31.
6. Gjørret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larson LI, and Maddox-Hyttel P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 2003; 69: p. 1193-200.
7. Grajales L H OHM, *Aspectos relacionados con la problemática "hembra repetidora de celo"*. Congreso internacional de Reproducción Bovina INTERVET. 2005, Bogotá. 64-66.
8. Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, and Spencer TE. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 2002; 124: p. 289-300.
9. Inskeep EK. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 2004; 82 E-Suppl: p. E24-39.
10. Joshi MS. Isolation, cell culture, and characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *Microsc Res Tech* 1995; 31: p. 507-18.
11. Mann GE and Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001; 121: p. 175-80.
12. Meseguer M, Pellicer A, and Simon C. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: p. 1089-98.
13. Olivera Martha, Ruiz Tatiana, Tarazona Ariel, Giraldo Carlos. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec Vol.* 19:4, 2006
14. Ott TL, *Interferones*. Encyclopedia of Reproduction. Vol. Volumen 2. 1998. Pawson AJ and McNeilly AS. The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: p. 75-94.
15. Peters AR. Veterinary clinical application of GnRH-questions of efficacy. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: p. 155-67.
16. Roberts RM, Cross JC, and Leaman DW. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr Rev* 1992; 13: p. 432-52.
17. Russe I, *Weiblicher Sexualzyklus*. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, ed. I.R.F. Sinowatz. 93-96.
18. Serrano Cesar OAM. Caracterización de la función luteal durante el primer ciclo posparto inducido por medio de un progestágeno en vacas cebú brahman en amamantamiento. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 1997; v.10, n.1.; p. p.29 - 37.
19. Sherwood DO FP, *Corpus Luteum Peptides*. Encyclopedia of Reproduction. Vol. Volumen 2. 1998.
20. Spencer TE, *Pregnancy, Maternal Recognition of*. Encyclopedia of Reproduction, ed. K. Ernst. Vol. Volumen 3. 1998. 1006-1015.
21. Spencer TE and Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: p. 49.
22. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, and Burghardt RC. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 2004; 128: p. 657-68.
23. Telgmann R, Bathgate RA, Jaeger S, Tillmann G, and Ivell R. Transcriptional regulation of the bovine oxytocin receptor gene. *Biol Reprod* 2003; 68: p. 1015-1026.