

## Tesis de Posgrado

# Participación del factor de crecimiento epidermal en el inicio del parto en la rata

Ribeiro, María Laura

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Ribeiro, María Laura. (2003). Participación del factor de crecimiento epidermal en el inicio del parto en la rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3641\\_Ribeiro.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3641_Ribeiro.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Ribeiro, María Laura. "Participación del factor de crecimiento epidermal en el inicio del parto en la rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3641\\_Ribeiro.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3641_Ribeiro.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

*Universidad*  
de Buenos Aires

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

**Participación del Factor de Crecimiento Epidermal  
en el inicio del parto en la rata.**

**Autor: María Laura Ribeiro**

**Director: Dra. Ana María Franchi**

**Consejera de Estudios: Dra. Graciela Guerrero**

Tesis presentada para optar al título de Doctor  
de la Universidad de Buenos Aires  
Área: Ciencias Biológicas

3641



Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto  
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)  
CONICET  
2003

**“Participación del Factor de Crecimiento Epidermal en el inicio del parto en la rata.”**

**“Participation of the Epidermal Growth Factor in the onset of labor in the rat.”**

A mis papás y Luli

A Ezequiel

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A todo el CEFYBO, por hacer del instituto un lugar placentero donde trabajar

A la Jefa, Ana Franchi, por darme un lugar propio, por enseñarme lo social de la ciencia, por mostrarme que se puede ser una excelente investigadora, una dulce mamá y una gran mujer

A Mari, por tanto laboratorio, por las confesiones mutuas, por apoyarme siempre

A la Babachis, por formar parte de esta tesis desde que era chiquitiiiiita

A Maki, mi compañero en el laboratorio, mi amigo en la vida, por su humor y buena predisposición

A Dieguito, con quien nos bautizamos en esto de escribir una tesis

A Rami, porque yo podría haber preparado los buffers pero nunca esos mates tan ricos. Por su simpleza y contención

A Julis, mi compañera de escritorio, por bancarme en los experimentos de último momento con toda su dulzura

A Silvia, por su meticulosa dedicación en mis western blots. Y por esas macitas espectaculares!!!

A la Dra. Martha Gimeno, por haberme abierto las puertas del CEFYBO hace siete años

A Valeria, por ser un ejemplo de persona y de investigadora, aún en los momentos más difíciles

A Normita y Noemí, por hacer del almuerzo un momento de distensión y placer

A las mejores secretarias, Ani, Patri e Isa por ocuparse y preocuparse con tanto cariño

A Cami, Claudia, Javi y Alejandro, a Moni, a Paulita por hacer del trabajo diario una grata experiencia

A Ale Estévez, una amigaza, ejemplo de entereza y buena persona

A Julito, por facilitarnos los trámites administrativos

A Karpluck, por cuidarme los fines de semana y noches de experimentos

A Dani y Eduardo, por su trabajo en el manejo del bioterio

A Rita y Estela, por su dedicación en el lavado del material

A Alicia Motta, por su ayuda

Al CONICET, por las becas otorgadas que hicieron posible mi trabajo en el laboratorio

A la Universidad de Buenos Aires, muchísimas gracias

A todos los investigadores que dedican tantas horas de trabajo a descubrir los misterios del parto en función de una mejor calidad de vida para las mujeres y los hombres

Al Dr. Roberto Meiss, por guiarnos en los trabajos de histología brindándonos toda su experiencia

Al Dr. Carlos Tellería, quien me enseñó a aislar los cuerpos lúteos por e-mail

A la Lic. Susana Fillipini, por su ayuda con los datos estadísticos

A Ruth y Claudia, por ayudarme a analizar mis resultados con tanta dedicación y paciencia

A los Co-Desayunantes, por escuchar esto del EGF entre cafés y medialunas, por hacer de la discusión científica un momento de placer

Al grupo de Chile,

Al Profe Villalón, por mostrarme otra manera de hacer ciencia y por creer en mí; A Jaqui, por hacerme sentir acompañada; A Ely y Cármen, mis ángeles del RIA, por su ayuda desinteresada e incesante; A Bred por hacer de mi estadía en Chile un tiempo inolvidable; A mis amiguitas, Yaniré y Marisol, por los pisquitos y las horas de charla de mujeres; A Ceci por tenerme tanta paciencia con las inmunos y por brindarme abiertamente su amistad

A las Nicas, Vale y Luramada, por brindarse ellas mismas

A Silvina, por mostrarme cómo se hace al principio, por todo lo que todavía nos queda por compartir

A Magarula, por estar siempre atenta a mis cosas, por festejar con burbujas, por quererme tanto

A todos los Chingas, porque sigamos recorriendo juntos muchos años más

A Caro, por ser incondicional, porque compartimos desde el viaje de egresados hasta la escritura de la tesis, por todos los cafecitos juntas, las conversaciones por teléfono, por secarme las lágrimas y reírse conmigo

A mis tíos Cecilia y Horacio, porque aunque ya soy grande, se siguen ocupando de mí como cuando era chiquita

A mi abuela Delia, Reina, modelo de tenacidad y lucha, por las recetas, los olores de la cocina, por tanto Tigre

A Alejandra, María y Martín por ayudarme en los momentos más difíciles, por dejarme ser parte de su familia, por compartir mis felicidades. Los quiero mucho.

A mis cuñados: Flor y Nes, por su apoyo en las buenas y malas; Mazu y Diego por su dulzura y frescura; Rolito y Lu que desde el viejo continente se preocupan por mí.

A Iván, mi sobri, mi solcito, por hacerme una tía feliz. Y a Martín, el poroto en camino

A Joan y Eduardo, mis suegros tan lindos, por abrirme su casa y apoyarme siempre en todos mis proyectos

A mi mamá, por enseñarme a ver en mi carrera un logro personal invaluable, por su confianza en mi capacidad, por su amor

A mi papá, por sus consejos, por su objetividad, por creer en mí, por ayudarme a lograr siempre mis metas

A Lucila, por ser tan hermana, por estar desde siempre

A Ezequiel, mi amor, el hombre que elegí para compartir mi vida, mis sueños, alguien a quien admiro, respeto, deseo y amo.

**Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente publicados en:**

Effects of in vivo administration of epidermal growth factor (EGF) on uterine contractility, prostaglandin production and timing of parturition in rats.

Ribeiro ML, Farina M, Aisemberg J, Franchi A.

Reproduction 126: 459 (2003)

## RESUMEN

---

El parto es un proceso complejo, resultado de la delicada interconexión espacial y temporal entre los sistemas endocrinos materno y fetal. Los mecanismos precisos a través de los cuales ejercen su efecto las moléculas involucradas en el disparo del parto aún no han sido dilucidados.

En el presente trabajo se investigó la participación de una de estas moléculas, el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) sobre el inicio del parto.

En primer lugar se estudió el efecto del tratamiento intra-uterino (i/u) con EGF sobre el inicio del parto. Se realizó una curva dosis – tiempo – respuesta y se observó que la administración i/u de 500 ng de EGF en el día 21 de gestación retrasó  $19.8 \pm 0.7$  h el inicio del parto con respecto a las hembras sham (hembras tratadas i/u con solución fisiológica). Por lo tanto, las hembras tratadas con EGF parieron el día 23 de gestación en lugar del día 22, como ocurrió en el caso de las hembras sham.

Seguidamente se investigó el mecanismo por el cual el EGF exógeno modulaba el inicio del parto. Los resultados mostraron que 500 ng de EGF i/u administrados en el día 21 de gestación fueron capaces de: disminuir la síntesis de  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  en útero y en líquido amniótico; disminuir la expresión uterina de ambas isoformas de COX; aumentar la concentración de progesterona sérica y disminuir la fuerza de las contracciones miométricas. Los valores obtenidos para estas variables analizadas, fueron similares a los obtenidos en el día 21 de gestación para las hembras controles (día previo al inicio del parto), y recién en el día 23 de gestación (día del parto en las tratadas) alcanzaron el nivel obtenido durante el día 22 por las hembras sham.

En la rata, el cuerpo lúteo es responsable de mantener la síntesis de progesterona indispensable para el éxito de la gestación, durante todo este proceso. Se ha postulado que a término, el aumento uterino de la expresión de COX-I y de la síntesis de  $PGF_{2\alpha}$ , desencadenaría el proceso luteolítico con la consecuente caída de la progesterona y el desencadenamiento del trabajo de parto. Dado que los resultados anteriores sugerían que el EGF podía estar ejerciendo su efecto a través de un mecanismo protector sobre el cuerpo lúteo, prolongando así la preñez, se procedió a analizar la morfología de los cuerpos lúteos de las hembras tratadas con EGF. Se observó que el tratamiento con 500 ng de EGF i/u en el día 21 de gestación, fue capaz de "re-luteinizar" el cuerpo lúteo, es decir que tomaron un aspecto similar al que poseen aquellos cuerpos lúteos con una alta capacidad de síntesis y secreción de progesterona.

Los resultados hasta aquí descritos, indican que el EGF exógeno estaría participando de los mecanismos moleculares involucrados en el inicio del parto, probablemente a través de un efecto inhibitorio sobre la luteólisis.

Por último analizamos si el EGF endógeno participa en el inicio del parto. Se estudió la expresión uterina de los receptores de EGF, observándose una correlación temporal con el transcurso de la gestación. Además, analizamos la concentración de EGF en líquido amniótico y encontramos que este factor se encuentra aumentado en la mañana del día 21, sufriendo una abrupta caída doce horas después, correlacionándose con el aumento en la síntesis de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , esencial para la luteólisis previa al inicio del parto.

---

**Palabras claves:** EGF – prostaglandinas – progesterona – útero – parto – cuerpo lúteo – luteólisis

## Summary

---

Parturition is a complex process that results from the interaction between the maternal and fetal endocrine systems. Despite the remarkable increase in the knowledge of the mechanisms underlying parturition, the way in which the molecules involved in this process exerts their action remains unknown.

In the present work we investigated the participation of one of these molecules, the epidermal growth factor (EGF) in the onset of labor.

First of all we studied the effect of the intra-uterine (i/u) administration of EGF in the onset of labor. A dose – time – response curve was made and we observed that the i/u administration of 500 ng of EGF on day 21 of gestation was capable of delaying  $19.8 \pm 0.7$  h the onset of labor compared to the sham animals (female rats that were treated i/u with saline solution). Thus, rats treated with EGF delivered during day 23 of gestation instead of day 22, as happened with the sham animals.

Then we investigated the mechanism by which EGF was modulating gestation. The results showed that 500 ng of EGF administered i/u on day 21 of gestation was capable of: diminishing  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in the uterus and amniotic fluid; diminishing the expression of both COX isoforms; augmenting serum progesterone level and reducing the amplitude of uterine contractions. The values obtained for the variables examined, were similar to those obtained for control rats during day 21 of gestation (the day before delivery), and only on day 23 (day of delivery for EGF treated rats) they reached the values observed on day 22 for the sham animals.

In the rat, the corpus luteum is responsible for the maintenance of serum progesterone levels indispensable for the exit of pregnancy, during whole gestation. It has been postulated that at term, the rise in uterine COX-I expression and  $\text{PGF}_{2\alpha}$  synthesis, promotes the luteolytic process and in consequence the withdrawal of serum progesterone and the onset of delivery. The results presented above, suggested that EGF might have been exerting its effect on the onset of labor through a protective effect over the corpus luteum. Thus, we analyzed the morphology of the corpus luteum from EGF treated rats. We observed that the i/u administration of 500 ng of EGF on day 21 of gestation was capable of "re-luteinizing" the corpus luteum, as its appearance was similar to that observed for the corpus luteum with a high capacity of synthesizing and secreting progesterone.

These results demonstrates that exogenous EGF might participate in the mechanisms underlying parturition, probably through an inhibitory effect over luteolysis.

At last, we investigated the participation of endogenous EGF in the initiation of labor. When we analysed the expression of uterine EGF receptors, we found a temporal correlation with pregnancy progression. The concentration of EGF in the amniotic fluid was maximum in day 21 of gestation and abruptly decreased 12 h later, correlating with the PGF<sub>2α</sub> augmentation, essential for the mechanism of luteolysis previous to the initiation of labor.

---

**Key words:** EGF – prostaglandins – progesterone – uterus – labor – corpus luteum – luteolysis

## Abreviaturas

---

AA:	Ácido araquidónico
AC:	Adenilato ciclasa
ACTH:	Hormona Adenocorticotrófica
AGEPI:	Ácidos grasos esenciales poliinsaturados
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
ATP:	Adenosín trifosfato
BCIP:	Sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-toluidina fosfato
Ca <sup>2+</sup> :	Anión calcio
CL:	Cuerpo lúteo
COX:	Ciclooxigenasa
DTT:	Ditiotreitol
E <sub>2</sub> :	Estradiol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético
EGF:	Factor de crecimiento epidermal
FSH:	Hormona folículo estimulante
gr:	Gramos
hCG:	Gonadotropina coriónica humana
HEPES:	(N- [2-hydroxyethyl] piperazine-N' - [2-ethane-sulfonic acid])
H(P)ETES:	Ácidos Hidroperoxi-eicosatetraenoico
hs:	Horas
IL:	Interleuquina
INF- $\gamma$ :	Interferón gama
IP3:	Inositol trifosfato
KRB:	Krebs-Ringer-bicarbonato-glucosa
LH:	Hormona luteinizante
LPS:	Lipopolisacáridos
min:	Minutos
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NSAIDS:	Analgésicos anti - inflamatorios no esteroides
NTB:	Azul de p-nitrotetrazolio.
P <sub>4</sub> :	Progesterona
PAF:	Paraformaldehído

PGDH:	15-hidroxi prostaglandina dehidrogenasa
PGE <sub>2</sub> :	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF:	Prostaglandina F
PGH:	Sintasa de Prostaglandina H
PGI <sub>2</sub> :	Prostaciclina
PGs:	Prostaglandinas
PKC:	Proteína quinasa C
PLA <sub>2</sub> :	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC:	Fosfolipasa C
POPOP:	(1,4-bis [5-phenyl-2-oxazolyl] - benzene; 2-2'-p-phenylene-bis [5-phenyloxazole])
PPO:	2,5 - diphenyl - oxazole
PR-A:	Receptor de progesterona isoforma A
PR-B:	Receptor de progesterona isoforma B
R-EGF:	Receptor del Factor de crecimiento epidermal
RIA:	Radioinmunoanálisis
Rojo Ponceau S:	(ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo) fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico)
RU-486:	Mifepristone
seg:	Segundos
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
STY:	Inhibidor de tripsina
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TSH:	Hormona tirotrófica

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

---

1- Importancia del tema de estudio	1
2- Características de los animales y el tejido de estudio	3
2.1- Animales de laboratorio	3
2.1.1- Características generales	3
2.1.2- Características reproductivas de las hembras	3
2.1.3- La cópula	4
2.1.4- La gestación	4
2.2- Características generales de los tejidos utilizados	5
2.2.1- Útero, mitos y leyendas	5
2.2.2- Fisiología del útero	6
2.2.3- Fisiología del ovario	10
3- Las prostaglandinas	14
3.1- Un poco de historia	14
3.2- Biosíntesis	15
3.2.1- Liberación del ácido araquidónico	15
3.2.2- Conversión del AA en prostanoides bioactivos	17
3.2.3- Catabolismo de las prostaglandinas	21
3.3- Mecanismo de acción de las PGs	22
3.4- Acción de las PGs sobre el sistema reproductor femenino	24
3.5- PGs y parto	24
3.5.1- Breve historia del parto	24
3.5.2- Teorías del parto	26
3.5.3- Las prostaglandinas	27
3.6- PGs y el proceso luteolítico	28
4- Progesterona	32
4.1- Descubrimiento	32
4.2- Biosíntesis de progestágenos	32
4.3- Mecanismos de acción	32

4.4- Efectos de la progesterona	34
5- El Factor de Crecimiento Epidermal	36
5.1- Estructura del Factor de Crecimiento Epidermal	36
5.2- Estructura del receptor de EGF	37
5.3- Transducción de la señal	38
5.4- Funciones del EGF y su receptor	40
6- El EGF en la fisiología reproductiva	41
6.1- Localización del EGF y su receptor	41
6.2- EGF y prostaglandinas	42
6.3- EGF, R-EGF y hormonas esteroideas	43
6.4- EGF en la fisiología ovárica	45

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

Hipótesis general	46
Objetivos	46

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

1- Medios y drogas	47
1.1- Drogas	47
1.2- Medios utilizados	48
2- Animales utilizados	50
2.1- Determinación de la dosis efectiva de EGF	50
2.2- Obtención de las muestras	51
2.2.1- Estudio de la expresión del R-EGF durante la preñez	51
2.2.2- Ovarios	51
2.2.3- Cuerpos lúteos	52
2.2.4- Suero	52
2.2.5- Líquido amniótico	52

3- Técnica de radioconversión	53
4- Técnica de radioinmunoensayo	54
4.1- Procesamiento de las muestras	54
4.2- Determinación de PGs	55
4.3- Determinación de progesterona	56
4.4- Determinación de LH	56
4.5- Determinación de EGF	57
4.5.1- Puesta a punto de la curva de unión antígeno anticuerpo vs concentración de EGF	57
4.5.2- Determinación del contenido de EGF en líquido amniótico	59
5- Inmunoelctrotransferencia (Western blot)	59
5.1- Procesamiento de la muestra	59
5.2- Separación electroforética de las proteínas	59
5.3- Electrotransferencia de las proteínas	60
5.4- Detección inmunológica	60
5.5- Identificación de las bandas proteicas	61
6- Medición de la contractilidad uterina	62
7- Técnica de histología	62
8- Análisis estadísticos	63

## RESULTADOS

---

1- Estudio de la administración i/u de EGF sobre el inicio del parto	64
2- Análisis del mecanismo de acción del EGF sobre el inicio del parto	68
2.1- Efecto de la administración i/u de EGF sobre la síntesis uterina de PGs	69

2.2- Detección de las isoformas de la COX en el útero de rata tratada con EGF	71
2.3- Efecto de la administración i/u de EGF sobre las contracciones miométriales	74
2.4- Efecto de la administración i/u de EGF sobre la concentración de PGs en líquido amniótico	76
2.5- Efecto de la administración i/u de EGF sobre el nivel sérico de progesterona	78
2.6- Efecto del EGF sobre la LH sérica	80
2.7- Estudio temporal del efecto del EGF sobre el útero y el ovario	82
2.7.1- Efecto del EGF en el tiempo sobre la síntesis de PGF <sub>2α</sub> uterina	84
2.7.2- Efecto del EGF en el tiempo sobre la expresión de COX-I	86
2.7.3- Efecto del EGF en el tiempo sobre la concentración de progesterona	89
2.7.4- Efecto del EGF en el tiempo sobre la morfología de los CL	91
2.7.5- Efecto del EGF en el tiempo sobre la expresión uterina de PR	96
2.7.6- Estudio de la expresión del receptor de EGF en el cuerpo lúteo	98
3- Estudio de la posible participación del EGF endógeno en el inicio del trabajo de parto	100
3.1- Análisis de la expresión uterina de los receptores de EGF	100
3.2- Análisis del contenido de EGF en el líquido amniótico	103
DISCUSIÓN	105
<hr/>	
CONCLUSIONES	119
<hr/>	
REFERENCIAS	120
<hr/>	

# **introducción**

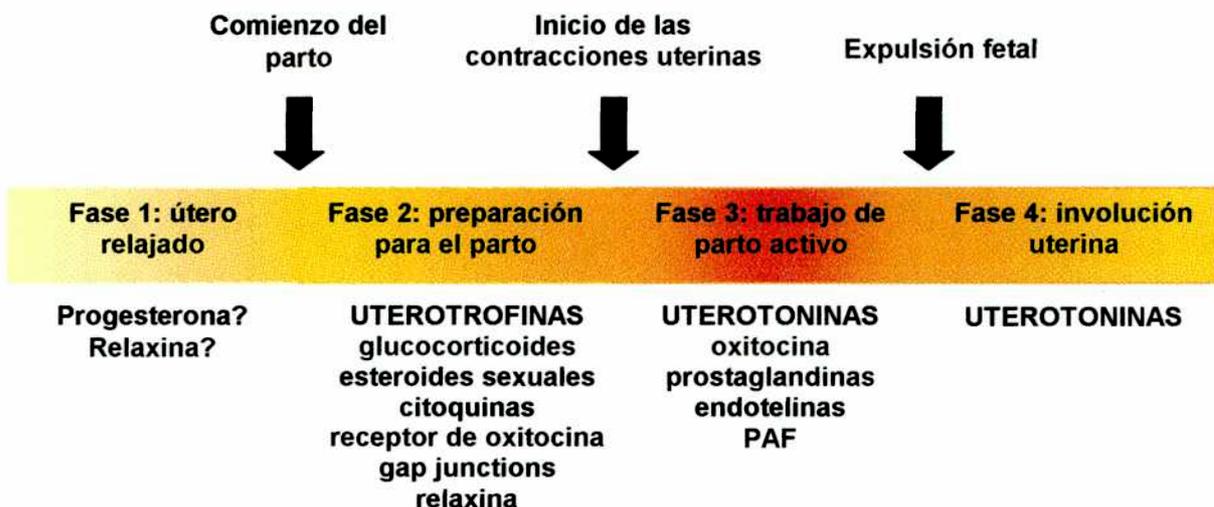
## IMPORTANCIA DEL TEMA DE ESTUDIO

El parto en los mamíferos puede interpretarse como la maduración de una serie de intercomunicaciones entre los sistemas endócrinos materno y fetal. Los factores y el mecanismo por el cual se desencadena el parto no están claros. Durante los últimos años se han realizado enormes progresos en el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el parto, pero la respuesta a cómo se inicia permanece sin resolver.

Según la Organización Mundial de la Salud, el 80 % de los bebés que nacen prematuramente mueren antes de la semana de vida. Solamente en Estados Unidos de América (EE.UU) se invierten U\$S 5.000.000.000/año en la terapéutica de estos bebés. Aún así la mayoría de estos niños no sobrevive, y los que lo logran tienen serios problemas pulmonares, de visión y en el crecimiento de sus huesos y músculos.

Al no conocerse los mecanismos precisos de regulación del disparo del parto, las terapéuticas aplicadas no son lo suficientemente eficaces.

Durante la preñez, la función uterina se puede representar en cuatro fases de acuerdo a su actividad contráctil:



La **fase 1** es el período de gestación en el que el útero se encuentra relajado. En la mayoría de los mamíferos es la fase que ocupa el mayor tiempo de preñez. Durante la

**fase 2** el útero comienza a prepararse para el trabajo de parto. Las últimas horas del embarazo humano se caracterizan por contracciones del útero que determinan la dilatación y borrado del cuello uterino y provocan el descenso del feto por el canal de parto. Este proceso requiere un importante gasto de energía, de ahí la expresión "trabajo de parto". Luego del comienzo del trabajo de parto, el útero presenta contracciones vigorosas y constantes que conducen a la expulsión fetal (**fase 3**). En la fase 3 continúa el borrado del cérvix, que además se dilata para permitir el pasaje del feto por el canal de parto. Finalmente, luego de la expulsión fetal, el útero involuciona hasta volver a tener las dimensiones y las propiedades del no preñado (**fase 4**).

El comienzo del parto se considera como la transición de la fase 1 a la fase 2. Durante este período de transición, el útero está bajo la influencia de las **uterotrofinas** que lo preparan para el trabajo de parto propiamente dicho. El comienzo del trabajo de parto está regulado por las **uterotoninas** que modulan directamente la fuerza y la periodicidad de las contracciones uterinas.

Es importante comprender estos mecanismos así como los factores involucrados en él, no sólo para la prevención del desencadenamiento del parto pre-término, sino también para poder ofrecer una alternativa segura a la inducción del trabajo de parto cuando se presentan complicaciones maternas o fetales.

## **CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES Y EL TEJIDO DE ESTUDIO**

---

### **2.1- Animales de laboratorio.**

#### **2.1.1- Características generales** (Hafez 1987).

Las ratas son los animales de elección para el trabajo experimental. El género *Rattus* abarca 56 especies. Las principales cepas que representan a estos animales son:

- Albinas (Sprague Dawley y Wistar).
- Pintas (blanco y negro).
- Long Evans.

Los adultos poseen cuerpo robusto de 18 a 25 cm de longitud pudiendo pesar entre 250 y 600 gramos. Poseen una vida media de 2 años, siendo sexualmente maduros a partir de los 60-90 días de edad.

#### **2.1.2- Características reproductivas de las hembras.**

Las hembras de esta especie son poliéstricas continuas. El ciclo estral dura de 4-5 días. Las fases del ciclo estral son proestro, estro, metaestro y diestro. Los cambios histológicos ocurren fundamentalmente en el útero pero se ven reflejados en la vagina (Brown 1960). Las células del epitelio vaginal, que sufren modificaciones por los cambios hormonales, son constantemente descamadas hacia el lumen y por las características de ellas es posible clasificar a las distintas fases del ciclo estral.

Los factores ambientales pueden producir variaciones en el desarrollo normal de los ciclos ya que el tiempo de exposición a la luz, la temperatura y la humedad ambiental producen variaciones en las concentraciones de estradiol circulante.

Estos animales poseen 12 glándulas mamarias distribuidas en el tórax y en el abdomen. Nacen con el canal vaginal cerrado que se abre a los 72 días de vida con un rango de 34-109 días determinado por factores nutricionales, genéticos y ambientales.

El primer estro ocurre a los 40-75 días de vida, pero recién se consideran aptas para la reproducción a los 90 días. El cruce temprano o muy tardío produce partos más

espaciados, así como neonatos de menor peso y tamaño. La edad de mayor fertilidad es de los 100 a los 300 días y el último celo ocurre entre los 12 y 18 meses.

Uno de los signos de la maduración sexual de la hembra es el pico de hormona luteinizante (LH). La LH se libera de manera pulsátil cada 30-60 minutos lo que estimula la secreción de  $17\beta$ -estradiol que por retroalimentación positiva provoca el pico preovulatorio de LH y determina el desarrollo final del ovario. La ovulación ocurre 8-11 hs después de la aparición del estro.

### **2.1.3- La cópula.**

La cópula se produce durante el estro y está influida por feromonas (aumentan la secreción de FSH y LH). Los estrógenos circulantes provocan cambios en el útero y aparece la receptividad al apareamiento. El estro se caracteriza por claros cambios conductuales en el animal: se puede observar que la hembra corre más que de costumbre, sacude las orejas y en presencia de otra rata presenta lordosis.

El estímulo de la cópula produce contracciones en el útero y en el oviducto. Al comienzo, las contracciones son fuertes, provocando inactivación de los espermatozoides que llegaron primero a las ampollas (región proximal del oviducto). Luego, las contracciones son suaves permitiendo la llegada de los espermatozoides con capacidad fertilizante al oviducto de manera que se fecunden los óvulos allí presentes. Estas contracciones están reguladas por los estrógenos circulantes en la hembra.

### **2.1.4- La gestación.**

Durante la gestación, el endometrio sufre cambios importantes en la composición celular que se reflejan en cambios pronunciados en la síntesis y secreción de proteínas.

Dependiendo de la cepa utilizada el período gestacional de la rata dura entre 22 y 23 días a partir de la cópula.

Los ovarios son indispensables para mantener la gestación. Si se procede a una ovariectomía en cualquier etapa de la gestación indefectiblemente se producirá un aborto. Si se disminuye la secreción ovárica de progesterona los fetos se reabsorberán, ya que la placenta no produce suficiente progesterona para mantener la gestación.

El crecimiento de los cuernos uterinos se hace visible a los 13 días de gestación (mitad de la preñez). Los embriones se disponen de manera uniforme en ambos cuernos uterinos.

En promedio nacen 9 crías (8-12) por parto. La cantidad de crías, la edad de la madre y sus condiciones físicas determinan la duración del parto.

La distocia se presenta en hembras con bajos niveles séricos de vitamina A; esto también está relacionado con el número de crías que nacerán.

Una vez que las crías han nacido, la hembra devora de inmediato la placenta, ayudando a la salida de la cría de la bolsa. De esta forma, estimulan a las crías eliminando el contenido líquido de las vías respiratorias.

## **2.2- Características generales de los tejidos utilizados.**

### **2.2.1- Útero, mitos y leyendas.**

La sexualidad femenina ha estado rodeada de mitos, a pesar de que las primeras investigaciones sobre el tema datan del siglo XIV.

Sin embargo, el anatomista Galeno ya en el siglo II, planteaba que el útero tenía siete cámaras: tres a la derecha para los fetos masculinos, tres a la izquierda para los femeninos, y la del medio para los hermafroditas. Parte de este error provenía de la prohibición de la iglesia para practicar autopsias, por lo que los estudios se basaban en disecciones de cerdos que sí tienen úteros con múltiples cámaras.

Varios siglos más tarde, Leonardo da Vinci dibujaba un gran útero conectado a los pechos a través de venas de leche y describía con sus increíbles dibujos cómo el feto se ubicaba dentro del vientre materno.

A fines del siglo XIX los científicos insistían en que el útero competía con el cerebro por sangre y energía, por lo que el doctor Edward Clarke, profesor de Harvard y autor del más importante libro sobre la sexualidad de la era victoriana, afirmaba que "la educación causaba la atrofia del útero".

En los inicios del siglo XX, Freud estimaba que la vagina era la versión negativa del pene y que existían dos tipos de orgasmos: el clitoral y el vaginal; siendo el primero el más común, pero menos importante pues no se lograba con la penetración.

Sólo a partir de las investigaciones del doctor Ernst Gräfenberg, en 1950, se comenzaron a romper los mitos. El reconocido fundador de la ginecología descubrió las zonas erógenas de la vagina, que estaban conectadas con la glándula parauretral: el punto G; a la vez que analizó el mecanismo de la eyaculación.

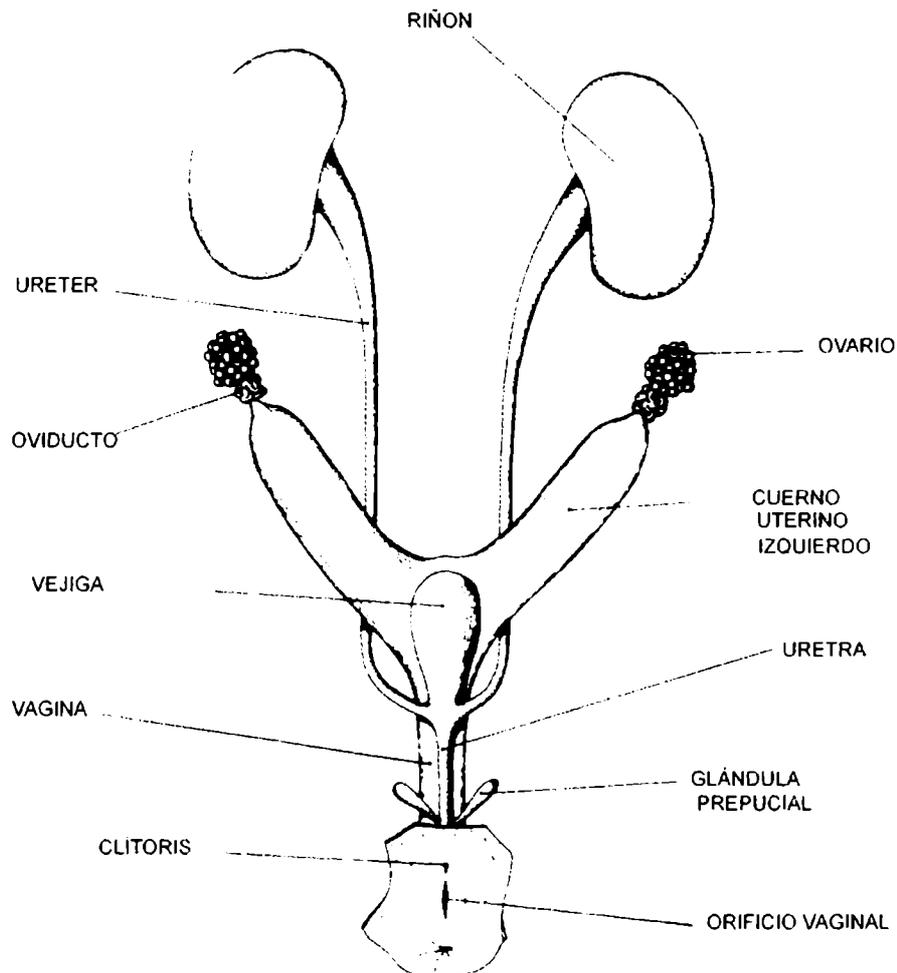
### **2.2.2- Fisiología del útero.**

En la mujer no embarazada, el útero es una estructura casi sólida, que pesa alrededor de 70 gr, con una capacidad de 10 ml o menos. Durante el embarazo, el útero se transforma en un órgano muscular con una pared relativamente delgada y una capacidad suficiente para acomodar el feto, la placenta y el líquido amniótico. El volumen total del contenido a término promedia los 5 litros, pero puede ser de 20 litros o más, por lo que al final de la gestación alcanzará una capacidad entre 500 y 1000 veces mayor que la que tenía cuando no había embarazo. Hay un incremento correspondiente del peso uterino ya que, a término, el órgano pesa alrededor de 1100 gr.

Durante los primeros meses del embarazo las paredes uterinas se vuelven considerablemente más gruesas, pero a medida que la gestación avanza, éstas se adelgazan en forma gradual. A término, las paredes del útero tienen un espesor de sólo unos 1,5 cm.

El útero de rata es de tipo dúplex o también denominado bicorne. Aunque estos cuernos parecen estar unidos, se mantienen separados y cada uno de ellos desemboca por sus respectivos conductos cervicales en el extremo superior de la vagina.

Cada oviducto tiene una de sus terminaciones abierta sobre el ovario y la otra sobre el cuerno uterino correspondiente.




---

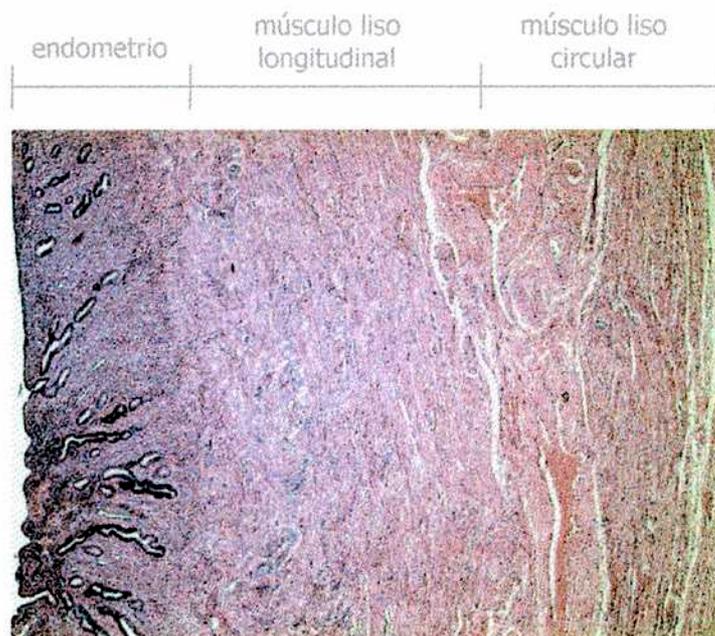
### ***Sistema urogenital de la rata***

Histológicamente, el útero está constituido por tres capas de tejido diferentes (Ham 1970):

- **la externa o serosa:** es la cubierta peritoneal del útero. Está constituida por células mesoteliales sostenidas por tejido conectivo que se continúa con el peritoneo.
- **la media muscular o miometrio:** constituida por músculo liso cuyas células se denominan fibras (son células alargadas, de extremos aguzados y con su citoplasma ocupado principalmente por sarcoplasma y miofibrillas). Estas fibras se disponen en paquetes rodeadas por fibras de colágeno. En el miometrio el músculo liso adopta dos

posiciones: la capa circular (interna) y la capa longitudinal (externa). Entre ambas hay una capa de tejido conectivo bien definido, formado por colágeno y fibroblastos.

- **la interna o mucosa o endometrio:** formada por tejido epitelial cilíndrico simple y una gruesa lámina propia. Entre las células cilíndricas simples se disponen algunos paquetes de células ciliadas. El endometrio es rico en glándulas tubulares simples cuyos conductos se abren a la luz del útero y cuyas porciones basales casi alcanzan el miometrio.



---

### ***Corte transversal de útero***

Morfológicamente, el endometrio puede dividirse en una capa funcional y una capa basal. La primera es la encargada de prepararse para la implantación del blastocisto y en ella sucede la proliferación, secreción y degeneración. La capa basal es el sustrato para que el endometrio pueda regenerarse.

El endometrio y el miometrio funcionan en conjunto para recibir al embrión, sostener su crecimiento y expulsar al feto en el momento del parto. La preparación de un ambiente

receptivo es programada por las hormonas esteroideas ováricas que actúan en forma directa sobre el endometrio y el miometrio, y en forma indirecta a través de diferentes factores de crecimiento y citocinas (Yen 2001).

El útero se halla innervado por terminaciones de tipo colinérgicas (sistema nervioso parasimpático) y adrenérgicas (sistema nervioso simpático) que se ubican alrededor de los vasos sanguíneos y del miometrio.

El miometrio es un tejido de tipo unitario, es decir que posee actividad espontánea que se inicia en una zona específica del tejido llamada "marcapasos". Las contracciones del miometrio aunque no necesariamente sean iniciadas por el impulso nervioso, son coordinadas y reguladas por mediación nerviosa (Burnstock y Prosser 1960). Además responden al estiramiento desarrollando una tensión activa.

El marcapaso uterino se distribuye en todo el tejido. Todas las células del útero pueden ser marcapaso, pero sólo las que poseen excitabilidad elevada pueden generar potenciales de acción.

Existen evidencias para suponer que la transmisión de los potenciales de acción entre las células es eléctrica; probablemente a través de vías de baja resistencia presentes entre células adyacentes (Sladek y col. 1999).

El miometrio (y cualquier otro músculo liso) posee características singulares en comparación con los músculos esqueléticos. Huszar y Walsh (1989) señalaron que estas diferencias representan una ventaja para el miometrio en lo que respecta a la eficiencia de las contracciones uterinas y la expulsión fetal.

Las contracciones miometriales propias del trabajo de parto se diferencian de otras contracciones musculares fisiológicas por el hecho de ser dolorosas. La causa del dolor no se conoce con certeza, pero se han sugerido varias etiologías posibles como la hipoxia del endometrio contraído, la compresión de ganglios nerviosos del cuello uterino y la parte inferior del útero, el estiramiento del cuello uterino durante la dilatación y el estiramiento del peritoneo que recubre el fondo del útero.

Las contracciones uterinas son involuntarias y, en general, independientes del control extrauterino. El bloqueo nervioso asociado con la anestesia epidural no reduce la frecuencia ni la intensidad de las contracciones uterinas.

El intervalo entre contracciones disminuye progresivamente de 10 minutos al comienzo del primer estadio del trabajo de parto a tan solo 1 minuto o menos. Sin embargo, los periodos de relajación entre contracciones uterinas son esenciales para el bienestar fetal, ya que comprometen el flujo sanguíneo útero-placentario, y en última instancia el flujo feto-placentario, en grado suficiente para provocar hipoxemia fetal.

### **2.2.3- Fisiología del ovario.**

A modo de breve reseña histórica podemos mencionar que el médico griego Hipócrates sostenía que las distintas partes del ovario, al que él llamó "oophoron", derivaban de todas las partes del cuerpo.

Después de 2287 años, Baer descubrió el "ovum".

El avance de la tecnología con la llegada del microscopio y los métodos de separación y de tinción celular permitió describir todos los tipos celulares involucrados en la estructura del ovario.

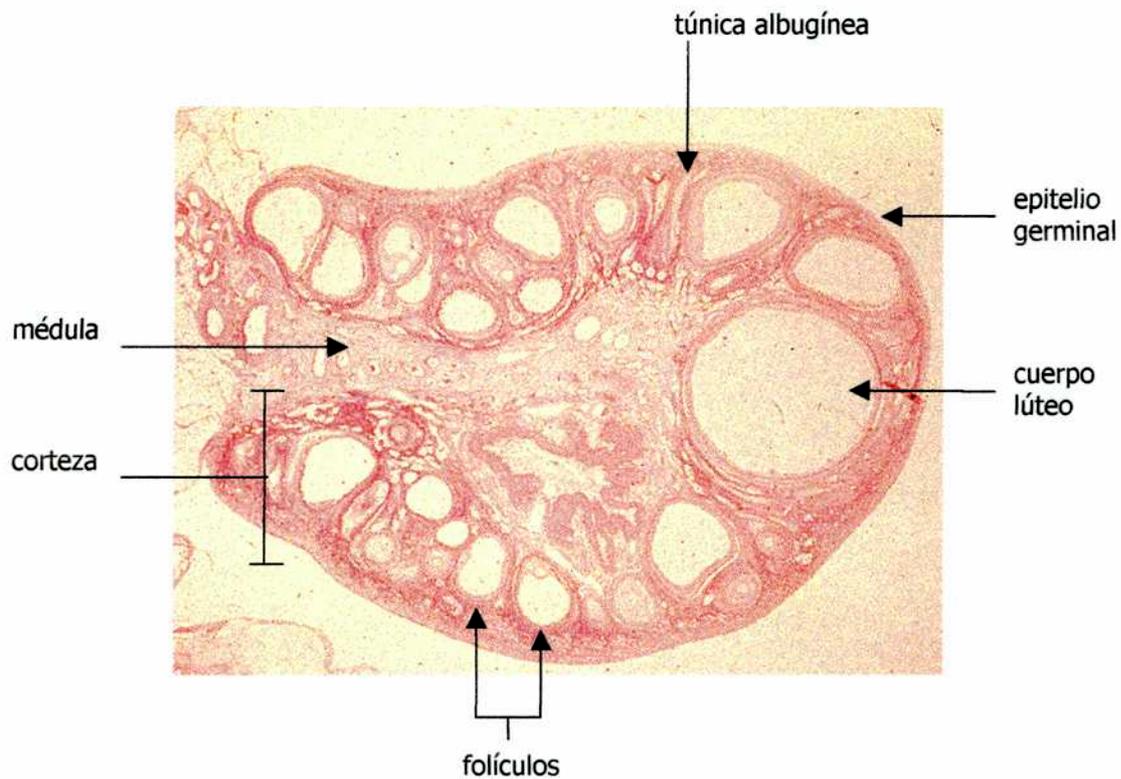
El ovario está cubierto por una capa de epitelio cilíndrico llamada *epitelio germinal*. Debajo se ubica una capa avascular y con escasa capacidad tintorial que está formada por tejido conjuntivo denso y que se denomina *túnica albugínea*. Las fibras de colágeno de esta capa se orientan de forma paralela a la superficie del órgano.

La zona más externa del ovario, la *corteza*, es muy celular y está constituida por células de tipo fibroblástico situadas sobre una trama de finas fibras de colágeno.

La parte más interna del ovario, la *médula*, es más pequeña y está formada por tejido conjuntivo laxo con fibras elásticas, algunas fibras musculares lisas y numerosos vasos arteriales y venosos de los que se originan pequeñas ramas que se dirigen hacia la corteza.

La corteza y la médula se continúan de forma imperceptible sin que exista entre ellas una línea clara de demarcación.

En la corteza existe un elevado número de folículos que muestran grandes variaciones en su tamaño.



---

### ***Corte transversal de ovario***

En la etapa reproductiva, algunos de estos folículos primarios entran en una fase de crecimiento rápido. En su interior se origina el ovocito que luego será liberado. El ovocito queda rodeado por dos capas de células: las de la granulosa (capa interna) y las de la teca (capa externa).

Durante el proceso conocido como ovulación se rompe la pared fina del folículo y se libera un óvulo.

Los demás folículos antrales sufren un proceso natural de degeneración llamado *atresia folicular*.

Después de la ovulación, las células de la teca y de la granulosa sufren una serie de transformaciones morfológicas y bioquímicas. Este proceso se conoce como *luteinización* y origina el cuerpo lúteo (CL).

La mayoría de las células que forman el cuerpo lúteo son de origen no luteal (Nelson y col. 1992). El resto está conformado por células lúteas grandes y células lúteas pequeñas.

Las células lúteas pequeñas (12-20  $\mu\text{m}$  de diámetro) se caracterizan por poseer un gran núcleo oval y contienen un número bajo de gotas lipídicas. En contraste, las células lúteas grandes (30  $\mu\text{m}$  de diámetro) poseen un núcleo esférico y pequeño y un gran contenido de lípidos en su citoplasma.

Ambos tipos celulares expresan la  $3\beta$ -hidroxi esteroide hidrogenasa y la citocromo P450, enzimas involucradas en la síntesis de esteroides. Sin embargo, las células lúteas grandes:

- \* secretan en mayor proporción progesterona ( $P_4$ ), andrógenos y estradiol ( $E_2$ )
- \* presentan una mayor expresión de  $P450_{\text{scc}}$  y  $P450_{\text{aromatasa}}$
- \* poseen más receptores para prolactina y para LH.

Es importante destacar que si bien las células lúteas pequeñas tienen menos sitios de unión a LH, son capaces de responder a esta hormona con un incremento en la secreción de esteroides, de igual proporción que las células lúteas grandes.

En el caso de los roedores, cuando la concepción no ocurre o hacia el final de la preñez, el CL involucrena, proceso conocido como *luteólisis*. La luteólisis se describe como una abrupta disminución en la liberación de  $P_4$  seguida de una regresión estructural y funcional del CL, culminando con la reabsorción de los restos tisulares.

La producción basal y estimulada de  $P_4$  y  $E_2$  por las células lúteas, disminuye con el progreso de las fases lúteas (Stouffer y col. 1977, Fish y col. 1989). La caída en la capacidad esteroideogénica de los CL maduros está acompañada por una reducción en el número de receptores a LH y en la actividad de la adenilato ciclasa (AC) dependiente de LH (Cameron y Stouffer 1982, Eyster y col. 1981).

Durante el proceso luteolítico, las células lúteas pequeñas y grandes comienzan a vacuolizar su citoplasma, se condensa la cromatina nuclear y el citoplasma se torna picnótico (Corner Jr. 1956, Corner 1945). Mientras que aumenta la cantidad de vacuolas autofágicas y heterolisosomas, disminuye la cantidad de retículo endoplasmático liso. Tanto el número de las células lúteas pequeñas como el de las células lúteas grandes disminuye, pero la tasa de disminución de las células pequeñas es menor que la que corresponde a las células lúteas grandes (Brannian y Stouffer 1991a). Por lo tanto, a medida que el CL involucre, existe un cambio gradual en las poblaciones celulares esteroideogénicas.

Las células del sistema inmune y las citoquinas que estas producen están presentes normalmente en el CL (Duncan 2000). La luteólisis está asociada con la infiltración de células del sistema inmune. Los macrófagos se acumulan durante la fase de remodelación del CL y llegan a una cantidad máxima previo a la luteólisis (Duncan y col. 1998). Las funciones de los macrófagos en el entorno luteolítico es muy discutida. Sin embargo, parece haber consenso con respecto a su posible función como removedores del detritus celular (Van Lennys y Madden 1965).

La importancia del útero en la luteólisis fue reconocida por primera vez cuando se observó que la extirpación del útero en cobayos mantenía por más tiempo la integridad y la funcionalidad del CL (Loeb 1987). La extensión de la vida media de los CL luego de la histerectomía también se observó en animales pseudopreñados como la rata (Patwardhan y Lanthier 1984), el ratón (Barke 1970, Critser y col. 1980), el hamster (Caldwell y col. 1967, Duby y col. 1969, Lukaszewska y Greenwald 1969) y el conejo (Asdell y Hammond 1933, Gillard 1937, Chu y col. 1946). La ablación del útero no afecta la vida media del CL en los animales cicantes normales, es decir, que no están pseudopreñados (Caldwell y col. 1967, Duby y col. 1969, Durrant 1927, Dewar 1973).

A diferencia de los roedores, en los primates (incluyendo las mujeres) la histerectomía no afecta el desarrollo lúteo; así los ciclos se completan normalmente (Beling y col. 1970, Doyle y col. 1971).

Al final de la preñez en los roedores, la luteólisis funcional está controlada por el útero y es necesaria para el desencadenamiento del trabajo de parto.

## **LAS PROSTAGLANDINAS**

---

Las prostaglandinas (PGs), junto con los tromboxanos y los leucotrienos son denominados genéricamente eicosanoides, palabra derivada del griego "eico" (veinte), en referencia a las cadenas de 20 carbonos que estos compuestos contienen (Gimeno y col. 1985).

### **3.1- Un poco de historia.**

Los primeros datos de la existencia de las prostaglandinas fueron informados por Kurzrok y Lieb en 1930, quienes encontraron que el fluido seminal humano fresco producía contracciones cuando se aplicaba al miometrio humano.

Al cabo de unos años, Goldblatt (1933) en Inglaterra y Von Euler (1934) en Suecia, descubrieron de manera independiente que extractos de vesícula seminal de carnero poseían actividad vasopresora y estimulante del músculo liso. En 1935, Von Euler, encontró que esta actividad se asociaba con una sustancia liposoluble que poseía propiedades ácidas, a la que denominó PROSTAGLANDINA, porque supuso que provenían de la próstata.

Debido a la carencia de técnicas analíticas adecuadas y a los acontecimientos socio-políticos de la época, la respuesta sobre la estructura química de estos compuestos recién llegó a fines de la década del '50. Bergström y Sjovall aislaron, a partir de la vesícula seminal de oveja, dos de estas sustancias que denominaron PGE y PGF, porque fueron separadas por técnicas de partición en éter dietílico y buffer fosfato respectivamente.

Durante la siguiente década, se descubrió una gran diversidad de actividades biológicas relacionadas con las PGs, así como también las estructuras químicas de cada uno de los miembros de esta familia.

En Diciembre de 1982, en Estocolmo (Suecia), los científicos Sune Bergström, Bengt Samuelsson y John Vane, recibieron el premio Nobel en Medicina por sus descubrimientos concernientes a las prostaglandinas y otros compuestos relacionados biológicamente activos.

### **3.2- Biosíntesis.**

Los eicosanoides son sintetizados por las células animales a partir de ácidos grasos poliinsaturados (AGEPI) de la familia del ácido linoleico, del ácido  $\alpha$ -linolénico o del ácido araquidónico.

En el hombre con dieta occidental, el ácido araquidónico (AA) es el precursor lipídico más abundante. El AA proviene del ácido linoleico de la dieta o se incorpora preformado al organismo cuando se consumen carnes rojas, grasas animales o aceites no marinos.

El AA se absorbe en el intestino y pasa a la circulación sanguínea, en donde se combina con la albúmina. De allí, puede ingresar en los tejidos y almacenarse.

Estos precursores lipídicos que normalmente permanecen almacenados en estructuras celulares membranosas, pueden liberarse ante estímulos apropiados y sufrir entonces una serie de complejos procesos oxidativos a través de los cuales se generan los mediadores biológicamente activos.

Parte del AA liberado de los depósitos hísticos queda libre en el citoplasma para ser sustrato de las enzimas metabolizantes presentes en las fracciones solubles o particuladas del citoplasma. Otra parte se recicla a la membrana plasmática en una reacción de reaclación que requiere ATP y acetil-coenzima A.

#### **3.2.1- Liberación del ácido araquidónico.**

La síntesis de PGs está limitada por la falta de disponibilidad de sustratos precursores que normalmente se encuentran esterificando lípidos de membrana.

El AA forma parte de los depósitos tisulares acilado a fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol. La mayor parte del AA se encuentra esterificando la posición sn-2 de fosfolípidos celulares. Esto significa que no se encuentra libre, sino que ocupa sitios específicos, desde los cuales debe ser previamente liberado por fosfolipasas movilizadoras que lo hacen accesible a las enzimas metabolizantes. Este fenómeno ocurre en una reacción de deacilación, en la mayoría de los casos dependiente de  $Ca^{2+}$ , en la que participan fosfolipasas activadas por estímulos mecánicos, químicos, antigénicos y hormonales.

Dos tipos de fosfolipasas han sido identificados como responsables de la liberación del AA desde sus sitios de almacenamiento, luego de la intervención de los estímulos que las activan: la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y la fosfolipasa C (PLC).

Se han propuesto tres posibles mecanismos de liberación del AA:

1. liberación directa del AA por la acción de la PLA<sub>2</sub> dejando en la membrana un residuo de lisofosfolípido (un fosfolípido sin su ácido graso en la posición 2).
2. generación del AA y de mono-acil-glicerol por la acción secuencial de una fosfoinositol-fosfolipasa C (PLC) y una diglicéridolipasa.
3. intervención de una PLC, más una DGL y una diglicéridocina, fosfato inorgánico y ATP que producen ácido fosfatídico el cual actúa como segundo mensajero provocando la liberación de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares. A su vez el Ca<sup>2+</sup> provoca la activación de una PLA<sub>2</sub> que moviliza finalmente el AA (Irvine 1982, Lapetina 1982).

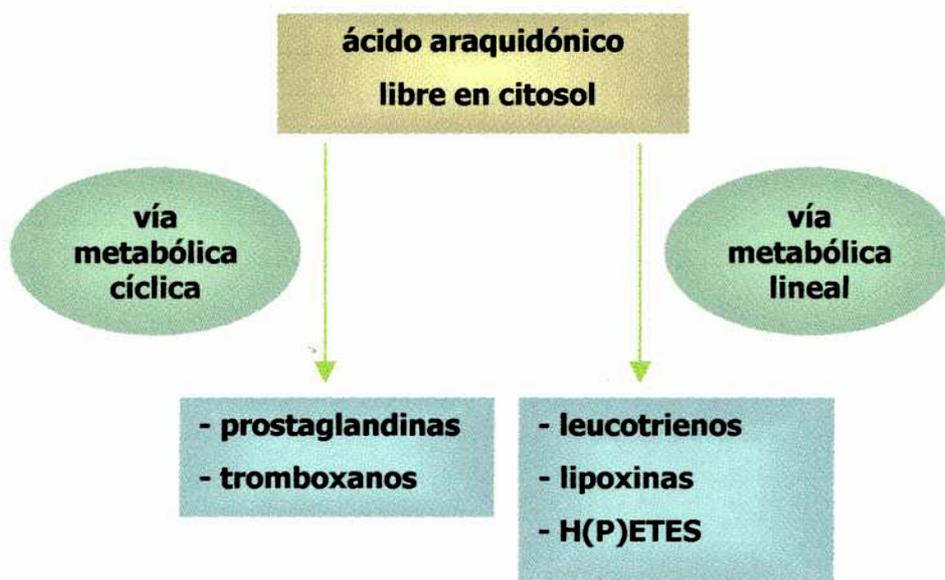
Si bien no hay datos certeros de la mayor prevalencia de un mecanismo por sobre otro, cabe destacar que los tres pueden coexistir en un mismo tejido.

Aunque el AA puede ser liberado por diversas fosfolipasas, las más estudiadas en el tejido gestacional humano incluyen la PLA<sub>2</sub> secretoria (tipo II y V) y la PLA<sub>2</sub> citosólica (Rice 1995). La movilización del Ca<sup>2+</sup> desde los sitios de almacenamiento hasta el citoplasma y su presencia en forma libre son un requerimiento indispensable para activar a las PLA<sub>2</sub>. Ambas fosfolipasas han sido postuladas como enzimas claves en el desencadenamiento del parto (Aitken y col. 1993, Freed y col. 1997).

### 3.2.2- Conversión del AA en prostanoideos bioactivos.

Una vez liberado, el AA puede sufrir distintos procesos, pero principalmente es transformado mediante una oxidación enzimática que puede ocurrir por dos vías distintas:

- la **vía metabólica cíclica** correspondiente a la etapa de formación de eicosanoides por ciclación dando lugar específicamente a las PGs y los tromboxanos.
- la **vía metabólica lineal** que incluye los procesos de metabolismo oxidativo a cargo de las lipoxigenasas dando origen a los leucotrienos, las lipoxinas y los hidroxiácidos (HETEs) e hidroxiperoxiácidos (HPETEs).



---

#### *Vías de metabolización del ácido araquidónico*

La síntesis de las PGs está limitada por la disponibilidad de precursores y por la activación de las fosfolipasas requeridas para que el precursor se torne accesible a las enzimas metabolizantes.

Como ya hemos mencionado, una de las vías metabolizantes del AA libre es la cíclica, que está a cargo de un complejo enzimático llamado **sintasa de prostaglandina H** (PGH) o **ciclooxigenasa** (COX).

La COX es una enzima ampliamente distribuida en células y tejidos de mamíferos con excepción de los glóbulos rojos. Su mayor actividad se detecta en el lado citoplasmático de las membranas de las vesículas de la fracción microsomal. La COX es una glicoproteína de 140 KDa aproximadamente formada por dos subunidades idénticas (Keneth 1994).

La COX posee dos actividades enzimáticas y ambas requieren la presencia de hemo (Smith y col. 1991):

- **ciclooxigenasa** con la que adiciona dos moléculas de oxígeno al AA para formar el intermediario endoperóxido  $PGH_2$
- **peroxidasa** con la cual reduce el  $PGG_2$  a

Los endoperóxidos lábiles, como el  $PGH_2$ , son transformados rápidamente en prostanoïdes con actividad biológica por acción de enzimas citoplásmicas específicas, o bien, en forma no enzimática.

Aunque la distribución de la COX es muy amplia, la transformación enzimática de los endoperóxidos en prostanoïdes varía considerablemente en diferentes tejidos y tipos celulares

Hasta el momento se han identificado dos isoformas de la COX: COX-I y COX-II (Xie y col. 1992, Kujubu y col. 1991). Ambas enzimas catalizan la conversión del AA en  $PGH_2$  y son similares en su estructura aminoacídica. Sin embargo, cada una es producto de un gen distinto y los tamaños de sus respectivos mRNA difieren significativamente (Wen y col. 1993, Xie y col. 1992).

A continuación se comentan las características de cada una de ellas.

	<b>COX-I</b>	<b>COX-II</b>
Expresión (Dong y Yallampalli 1996)	Constitutiva, regulada (Wu K 1995)	Inducible por citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, oncogenes (Salvemini y col. 1993)
Localización tisular (Dong y Yallampalli 1996)	Generalizada	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso.
Acción fisiológica	Protección de las mucosas, mantenimiento de las funciones y homeostasis normales (Whittle y col. 1980; Keneth 1994)	Ovulación, parto, situaciones patológicas particularmente inflamación (Xie y col. 1992)
Glucocorticoides (O'Banion y col. 1992)	No tienen efecto	Inhiben el proceso transcripcional y post-transcripcional
NSAIDS clásicos: - aspirina, indometacina, ibuprofeno, piroxicam (Reece y col. 1996, Keneth 1994)	Gran inhibición	Inhibición
NS-398 30 ng/ml (Futaki y col. 1994)	No tiene efecto	Inhibición selectiva
Meloxicam $10^{-7}$ a $10^{-9}$ M (Engelhardt y col. 1996)	No tiene efecto	Inhibición selectiva

La COX-I se expresa constitutivamente en la mayoría de las células de mamíferos. Algunos trabajos indican que los niveles de COX-I pueden incrementarse por inducción indicando que ambas isoformas de COX serían inducibles, pero los mecanismos por los cuales se inducen serían distintos.

La COX atraviesa por una auto-inactivación irreversible, la cual es intrínseca a la reacción catalítica para la generación de la PGG<sub>2</sub> (Smith y col. 1991). Esta inactivación resulta de la generación de un radical libre tirosilo por la actividad peroxidasa de la enzima, el cual interacciona con el hemo oxigenándolo y bloqueando la actividad ciclooxigenasa. Este efecto no altera la estructura peptídica o el peso molecular de la enzima (Smith y col. 1992), por lo que tanto la forma activa como la inactiva corren hasta la misma posición en un gel desnaturante de poliacrilamida. Tampoco se ve afectada la inmunoreactividad, por lo que pueden ser detectadas usando anticuerpos. Esto es cierto hasta el momento en que la enzima inactiva es degradada por proteasas a fragmentos proteicos de menor peso molecular.

Los endoperóxidos lábiles, específicamente el PGH<sub>2</sub>, son rápidamente transformados en prostanoïdes con competencia biológica por la acción de enzimas citoplasmáticas específicas o por un mecanismo no enzimático:

- PGF<sub>2α</sub> se sintetiza por reducción de PGH<sub>2</sub> por vías enzimáticas y no enzimáticas y, en ciertos tejidos, la PGE<sub>2</sub> puede ser convertida en PGF<sub>2α</sub> por acción de la 9-ceto-reductasa, en una reacción reversible.
- PGE<sub>2</sub> se forma por la acción de la prostaglandina E sintasa, una enzima unida a membrana, en dos pasos: isomerización del endoperóxido y reducción.

Ambas PGs ejercen efectos estimuladores potentes sobre el músculo liso. Son producidas por casi todos los tejidos pero se observan cantidades sustanciales de ellas en foliculo, útero y encéfalo.

La síntesis de PGE<sub>2</sub> en la médula renal durante el embarazo avanzado se encuentra aumentada y se presume que tiene un efecto natriurético.

La prostaciclina, la principal prostaglandina endotelial, también se encuentra aumentada en etapas avanzadas de la gestación y cumple funciones en la regulación de la presión sanguínea, así como en la coagulación.

También se implicó a la prostaciclina como factor que interviene en la resistencia a la angiotensina característica del embarazo normal (Friedman 1988).

### **3.2.3- Catabolismo de las prostaglandinas.**

La actividad de los prostanoides es evanescente ya que poseen una vida media muy corta. Su rápido catabolismo es sinónimo de corto tiempo de presencia, tanto de sus propiedades, como de sus efectos. Los niveles que alcanzan los eicosanoides en un tejido son el resultado del equilibrio entre su síntesis veloz y su degradación igualmente rápida.

Es así, que un rasgo sobresaliente de las PGs es la naturaleza transitoria de su existencia. En algunos casos, la sola presencia de agua produce la hidrólisis de estos compuestos y los transforma en metabolitos inactivos. En otros casos, enzimas presentes en el pulmón, hígado, riñón u otros tejidos producen la pérdida completa de la actividad biológica.

La 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenasa (PGDH) cataliza la oxidación del grupo 15-hidroxilo de las PGs y las convierte en metabolitos inactivos (Hansen 1976). Este es el primer paso en la inactivación de las PGs y en general la concentración máxima de esta enzima se encuentra en bazo, pulmón y corteza renal. La expresión y la actividad de la PGDH también han sido localizadas en útero (Franchi 1985), corion y trofoblasto placentar, mientras que en la preñez tardía también se encuentran presentes en decidua (Germain 1994, Cheung 1992).

Se ha postulado que el rol de la PGDH en las membranas extraplacentarias es de gran importancia en la regulación del pasaje de los prostanoides bioactivos desde el amnios hasta el miometrio. Recientemente se ha demostrado que los niveles de mRNA, proteína y actividad de PGDH en corion se encuentran disminuidos significativamente en algunas mujeres que presentan parto prematuro sin complicaciones de infección, con respecto a mujeres con partos a término (Sangha 1994).

Los principales sustratos de la PGDH son PGE y PGF.

El segundo paso en la degradación secuencial de las PGs es la reducción del doble enlace en la posición 13, por la 13,14-prostaglandina reductasa. Esta enzima es altamente específica y tiene una distribución tisular semejante a la PGDH.

Posteriormente los metabolitos formados son excretados por la orina.

### **3.3- Mecanismo de acción de las PGs.**

Las PGs poseen las siguientes características:

- I.** tienen acción evanescente ya que son rápidamente catabolizadas. La concentración que alcanzan las PGs en los tejidos y demás fluidos resulta de un balance entre los procesos de síntesis y degradación, ambos de corta duración. El proceso de catabolismo, rápido y eficiente, ocurre principalmente en el pulmón. El pulmón recibe sangre venosa cargada de PGs y otras sustancias y entrega sangre arterial depurada de PGs.
- II.** no se encuentran almacenadas ni preformadas como lo están sus precursores: se sintetizan solamente cuando por estímulos específicos sus precursores son liberados desde sus depósitos en respuesta a diversos estímulos como hormonas, antígenos, hipoxia y otros.
- III.** son autacoides, ejerciendo su efecto localmente o en la vecindad de los tejidos que las producen.
- IV.** amplifican o deprimen otras respuestas funcionando como verdaderas hormonas.
- V.** pueden actuar como mediadores fisiológicos o producir respuestas farmacológicas con implicancia en una variedad de procesos como: función renal, inflamatoria, inmune, reproductora, contracción o relajación del músculo liso intestinal, uterino, bronquial y cardíaco, regulación del flujo sanguíneo, liberación de hormonas y estimulación de las funciones plaquetarias.
- VI.** actúan generalmente de a pares, con acción opuesta.

La vía de señalización de las PGs parece estar relacionada con cambios en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  y en los niveles intracelulares del adenosín 3',5'-monofosfato cíclico ( $\text{AMP}_c$ ).

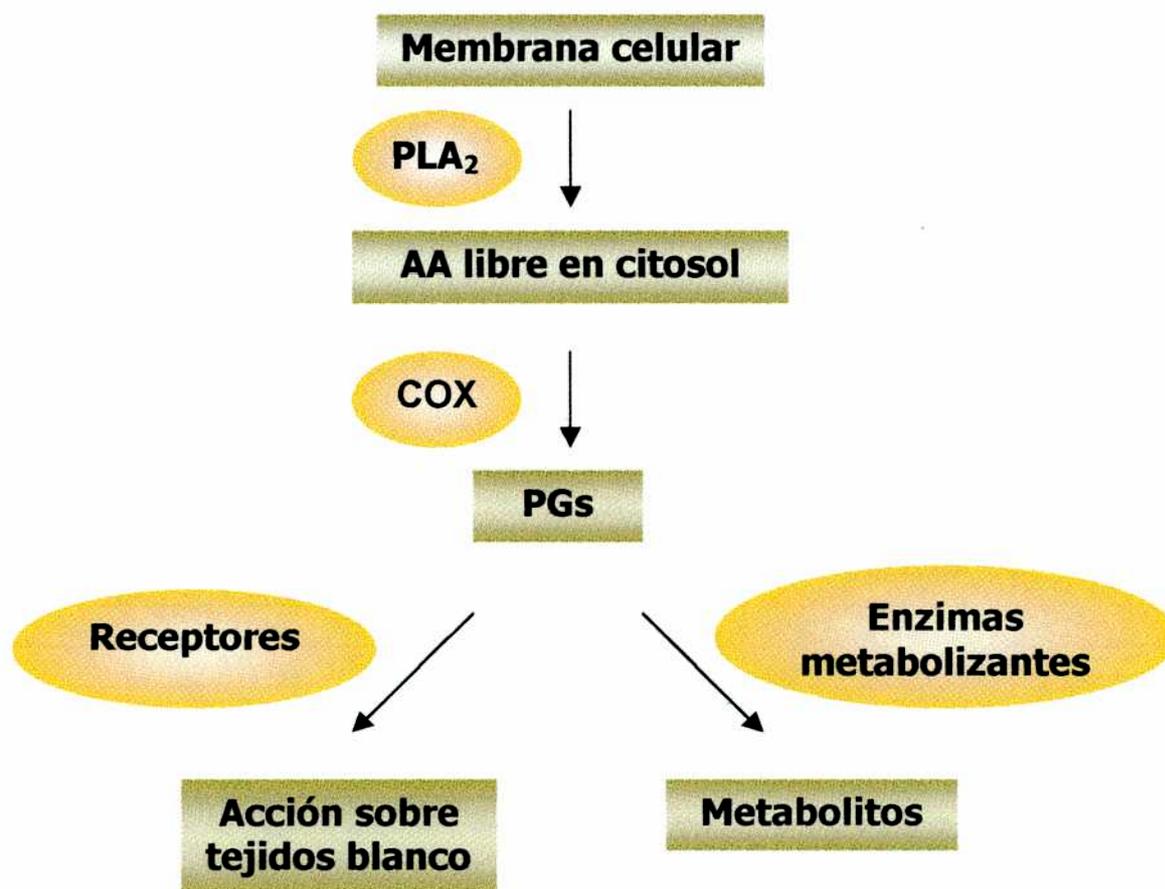
Las PGs producen su acción después de la unión a receptores celulares específicos luego de lo cual, independientemente que éstos sean de membrana o intracelulares, ocurre una estimulación de la enzima adenilato ciclasa que convierte el adenosín trifosfato (ATP) en  $\text{AMP}_c$ . Este segundo mensajero desplaza la subunidad reguladora de una proteína quinasa inactiva dejándola con la subunidad catalítica activa. La subunidad activa es seguidamente

fosforilada en presencia de ATP. La proteína fosforilada puede a su turno activar o inhibir otras proteínas, expresándose finalmente como un efecto biológico global.

Los efectos contráctiles de los prostanoideos sobre el músculo liso pueden estar mediados por la liberación de calcio, mientras que los efectos de relajación estarían mediados por  $AMP_c$ .

Las PGs son mediadoras de la transmisión del mensaje que las hormonas tróficas como la LH, la TSH y la ACTH producen sobre las células efectoras. La interacción entre la hormona y su receptor provoca, a través de la COX, una modulación sobre la síntesis de PGs.

A modo de resumen podemos decir:



---

**Síntesis y degradación de las PGs a partir del AA**

### **3.4- Acción de las PGs sobre el sistema reproductor femenino.**

El descubrimiento de las PGs en el plasma seminal permitió dilucidar el efecto que éstas poseen sobre las contracciones uterinas. Posteriormente se determinó que facilitan la implantación del blastocisto y el transporte del huevo (Evans 1988).

En el útero, las PGs generan contracción de la musculatura lisa ya que promueven la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y el aumento de receptores a oxitocina.

Las PGs también son capaces de inducir abortos. Varios estudios demostraron que la administración intravenosa de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produce aborto en el 80% de los casos. La  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pueden ser abortivas en las primeras semanas de embarazo dada su acción oxitócica, pero ésta acción suele ser inconstante y puede acompañarse de importantes efectos adversos como vómitos, diarrea e hipertermia (Katzung 1992).

Otra acción que presentan las PGs sobre el tejido reproductivo es provocar la regresión del cuerpo lúteo. Se ha determinado que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  de origen uterino causa luteólisis y disminución de la producción de progesterona por el ovario. Esto interrumpe la preñez temprana en la rata y el conejo, especies en las que la preñez depende de la progesterona ovárica y no de la placentaria, como es el caso de los humanos (Soloff 1989).

La dismenorrea es la aparición de dolor asociado con la menstruación. La dismenorrea primaria es atribuida a un incremento endometrial en la síntesis de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  durante la menstruación con concentraciones en el útero que pueden inducir dolor. La administración de agentes inhibidores de la síntesis de prostaglandinas produce una mejoría pronunciada del dolor en aproximadamente el 80% de las mujeres dismenorreicas.

### **3.5- Prostaglandinas y parto.**

#### **3.5.1- Breve historia del parto.**

Desde el inicio de la humanidad y hasta mediados del siglo XX (de 1930 a 1950), la mujer paría en el lugar donde le llegaba la hora, y la mayoría de las veces esto sucedía en su domicilio.

La atención de los trabajos de parto la efectuaban las parteras o comadronas, quienes tenían conocimientos más prácticos y empíricos de la situación en base a su experiencia, pero no estaban capacitadas para resolver las complicaciones que se presentaban con frecuencia. Las medidas de higiene eran casi nulas, la mujer se encontraba consciente y sin ningún tipo de anestesia eficaz. A veces, las parteras proporcionaban sustancias provenientes de hierbas, que muchas veces provocaban más daño que beneficio en el trabajo de parto.

A causa de estas carencias cualquier trabajo de parto prolongado causaba problemas de morbilidad tanto en el bebé como en la madre; por ejemplo, lesiones cerebrales en el niño por disminución de concentración de oxígeno en su sistema nervioso central, y en la madre lo más frecuente era la fiebre puerperal que llegaba a provocar esterilidad secundaria y hasta la muerte. Al mismo tiempo, se practicaba la dilatación cervical manualmente, en el período de expulsión, lo cual hacía que se perdiera el tono muscular provocando prolapsos de la vejiga, recto y hasta de la matriz o útero a través de la entrada de la vagina.

Desde aproximadamente 1930, se empieza la atención obstétrica en algunos hospitales con lo cual bajó el índice de infección y complicación en el parto, por contar con mejores condiciones de limpieza y con un instrumental adecuado.

Por el año 1940 se empieza a usar la sulfa y posteriormente la penicilina con lo cual se lograron avances importantes en complicaciones infecciosas. Al mismo tiempo aparecieron sustancias anestésicas volátiles (éter, cloroformo, trilene) que al respirarse por evaporación disminuían el dolor en la madre, pero provocaban alteración en las funciones cardio-respiratorias tanto en ella como en su hijo.

En el año de 1950 gracias a las investigaciones médicas, se inicia el uso de combinaciones de diversas sustancias para "parir sin dolor" con menores riesgos que los anteriores. A esta combinación se le llamó "cóctel obstétrico", y se componía de una sustancia para el dolor, otra amnésica y una llamada "gangliopléjico" que reforzaba y aumentaba el efecto de las anteriores. Al no estar anestesiada la paciente, pero sí dormida, no participaba ni ayudaba durante el parto. A pesar de las ventajas del cóctel, existía el problema de que el niño naciera deprimido.

Desde 1960, el parto es considerado como un acto quirúrgico y se realiza en clínicas y hospitales en el mayor porcentaje. Hoy es sin dolor gracias al bloqueo epidural efectuado por un anesthesiólogo y consiste en una anestesia regional de la zona lumbar hacia abajo, es decir, del ombligo hacia los miembros inferiores (piernas) que quita el dolor con poca pérdida de la sensibilidad. La paciente al estar despierta puede ayudar en el trabajo de parto, teniendo la seguridad de quién la atiende, de qué trato reciben ella y su bebé y disfrutando del nacimiento, pudiendo estar acompañada por el padre de su hijo.

Al mismo tiempo la asepsia y la antisepsia, así como los medicamentos usados durante y después del parto, disminuyen las complicaciones en forma importantísima tanto para la madre como para el bebé sin afectar funciones cardio-respiratorias de ninguno de los dos. También se usa la oxitocina en forma científica que es una sustancia producida naturalmente por la hipófisis de la madre y que regula y refuerza las contracciones en el trabajo de parto, haciéndolo más breve.

Es más, se puede registrar la actividad de las contracciones uterinas a través de un monitor al igual que los latidos del corazón del bebé, llevando así un registro y control de posibles complicaciones pudiendo solucionarlas a tiempo, la mayoría de las veces.

Actualmente se efectúa la episiotomía en la mujer, que es el corte del piso perineal y un tramo de vagina para prevenir desgarros y la pérdida de tono muscular. Reconstruyendo este piso se resuelve el problema de incontinencia urinario y de los prolapsos mencionados anteriormente.

### **3.5.2- Teorías del parto.**

Durante el embarazo los procesos fisiológicos que ponen en marcha el parto y el trabajo de parto se desconocen. Hasta hace poco se aceptaba que el éxito del embarazo en todas las especies de mamíferos dependía de la acción de la progesterona, hormona responsable de mantener el útero en reposo hasta cerca del término del embarazo. Esta presunción estaba sustentada por el hecho de que en la mayoría de los mamíferos el parto es precedido por una caída en los niveles de progesterona. En muchas de estas especies se observa un descenso, a veces brusco, del nivel plasmático materno de progesterona después de pasado aproximadamente el 95% del embarazo. Además, la administración de progesterona en una fase tardía del embarazo en hembras de estas especies retarda el inicio del parto.

Sin embargo, en el caso de los primates (incluido el ser humano), la iniciación del parto no esta precedida de una disminución del nivel de progesterona. En las mujeres embarazadas, el nivel plasmático de progesterona aumenta durante el embarazo y sólo disminuye después de la expulsión de la placenta, que es el tejido responsable de la síntesis de progesterona en la mujer.

En la actualidad prevalecen dos conceptos generales. Desde una perspectiva superficial, estas teorías consisten en:

- la hipótesis de la abolición del mantenimiento del embarazo.
- la teoría de la inducción del parto por una uterotonina.

Los conceptos postulados por la mayoría de los investigadores combinan algunos aspectos de ambas teorías. Algunos científicos también piensan que, mediante algún mecanismo aún indeterminado, el feto humano maduro enviaría la señal inicial que pone en marcha el proceso del parto.

En realidad, la mayoría de las teorías que intentan explicar el proceso del parto implican una o más uterotoninas, ya sea como un fenómeno primario o como un mecanismo secundario, en los procesos finales del embarazo que conducen al nacimiento.

### **3.5.3- Las prostaglandinas.**

Durante el embarazo la producción de PGs estaría limitada por inhibidores endógenos, de manera tal que se mantiene la quiescencia uterina (Mitchell 1993, Brennecke y col. 1982). A término, y posiblemente en respuesta a la caída de los inhibidores endógenos, se produce un aumento en la concentración de las PGs en los tejidos intrauterinos y esto está correlacionado con el comienzo y el mantenimiento del parto (Thornburn y col. 1988). Consistentemente con este modelo, Gu y colaboradores (1990) encontraron que el nivel de producción de PGs al día 15 de preñez en el miometrio de rata es significativamente menor que al día 22 (día de parto).

El incremento en la producción de PGs dentro del útero cumple un rol fundamental en la iniciación del parto en la mujer (Hisrt y col. 1995a). Los tejidos intrauterinos (Chalis y Olson 1988) y las membranas fetales (Edwin y col. 1996) son la principal fuente de PGs involucradas en la regulación parácrina del parto. Consistentemente, estudios in vitro han demostrado que la producción de PGs aumenta con el comienzo del trabajo de parto. Existe evidencia también que la concentración de PGs en fluido amniótico se incrementa

en asociación con el trabajo de parto y este aumento es probablemente un paso crítico en el proceso de iniciación del parto (Salmon y Amy 1973). La síntesis de PGs también aumenta en la decidua con el comienzo del trabajo de parto. De hecho la decidua es blanco de factores uterinos que estimulan la síntesis de PGs (Mc Donald y col. 1991).

Durante los dos últimos trimestres de embarazo la administración de  $PGE_2$  y de  $PGF_{2\alpha}$  provoca contracciones uterinas y descamación cervical induciendo el trabajo de parto (O'Brien y col. 1986, Hulka y Chepko 1987, Williams y col. 1985). La sensibilidad del útero a las PGs aumenta a medida que la gestación progresa. Durante el parto el nivel de  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  se encuentran aumentados en el fluido amniótico y en el plasma materno (Romero y col. 1989, 1992). Sumado a esto, se sabe también que durante el trabajo de parto el amnios produce  $PGE_2$  exclusivamente, mientras que la decidua sintetiza  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$  y  $PGI_2$  (Romero y col. 1990).

La descamación del cérvix es uno de los sucesos que se observan antes de comenzar el trabajo de parto. La aplicación local de PGs a concentraciones que no producen contracción uterina puede inducir la descamación cervical.

En el amnios humano la actividad de la COX se incrementa con el comienzo del parto (Teixiera y col. 1993, 1994). Esto sugiere que se debe alcanzar un nivel crítico de COX necesario para desencadenar el parto. Rice y colaboradores (1988) han demostrado en oveja, que un pico en la actividad de la enzima precede el trabajo de parto. Por otro lado Hirst y colaboradores (1995 b) encontraron en amnios humano niveles incrementados del mRNA de COX-II previos al parto, y determinaron que este aumento estaba correlacionado con la actividad enzimática. Los trabajos de Rice y de Hirst avalan la premisa de que las PGs son producidas antes del trabajo de parto siendo causa de y no una consecuencia del mismo.

### **3.6- Prostaglandinas y el proceso luteolítico.**

Como se mencionó anteriormente, hacia el final de la preñez en roedores el CL involucrena, y en este proceso, el útero tiene una activa participación.

Ya en 1974, Ginther propuso que en los roedores, el útero sería la fuente de un factor que transportado hacia el ovario a través de la vasculatura produciría la regresión del CL.

La secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por parte del útero hacia la vena uterina está asociada temporalmente con la regresión lútea espontánea e inducida hormonalmente en varias especies entre las que se encuentra la rata (Castracane y Shaikh 1976).

Si bien el CL tiene la capacidad de producir  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , no sería ésta la responsable del inicio de la luteólisis. En la rata se postula que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ovárica solamente reforzaría mediante un mecanismo de retroalimentación positivo sobre el útero, el efecto luteolítico desencadenado por la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina.

Numerosa evidencia apoya esta observación:

- en la rata (Lau y col. 1975) y el ratón (Crister y col. 1981) el tratamiento con indometacina, un inhibidor no selectivo de la COX, retrasa la luteólisis espontánea y alarga la pseudopreñez. En el mono Rhesus la administración de indometacina a una dosis que previene el desencadenamiento del parto no prolonga la vida media del CL (Manaugh y Novy 1976).
- la inmunización contra  $\text{PGF}_{2\alpha}$  previene la luteólisis espontánea en oveja (Scaramuzzi y Baird 1976), vaca (Fairclough y col. 1981) y cobayo (Poser y Horton 1975).
- la concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en el endometrio es máxima durante la luteólisis en la oveja (Wilson y col. 1972), el cobayo (Poyser 1972), el caballo (Vernon y col. 1981), la rata (Doebler y col. 1981) y el conejo (Lytton y Poyser 1982) pseudopreñados.
- en la rata, el nivel de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en la circulación uterina aumenta hacia el final del ciclo estral, justo antes de que los niveles de  $\text{P}_4$  empiecen a disminuir (Doebler y col. 1981).

*In vitro*, las  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{I}_2$  y  $\text{D}_2$  estimulan la función luteal (Stouffer y col. 1977, Bennegard y col. 1990), mientras que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  la inhibe (Brannian y Stouffer 1991, Hamberger y col. 1979, Houmard y col. 1991). Se ha demostrado *in vivo* que las infusiones de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  directamente en el CL provocan la regresión luteal (Aulleta y col. 1973, 1984, Wilks 1980).

En la rata preñada la luteólisis debe ser evitada ya que la  $\text{P}_4$  de origen lúteo es esencial para el mantenimiento de la gestación temprana, media y tardía.

Se ha postulado la acción de un factor luteotrófico que impediría que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ejerza su efecto (Kelly y col. 1975, Robertson y col. 1982). Este factor luteotrófico, probablemente sea semejante a la prolactina, e incluso, se cree que actuaría a través de los receptores para prolactina.

Hacia el final de la preñez el aumento en la expresión de la COX-I sería el responsable de aumentar la producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina. Gross y colaboradores (1998) informaron que en ratones deficientes en COX-I, la producción uterina de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  fue significativamente menor hacia el final de la preñez, prolongando el inicio del trabajo de parto. La administración de este prostanoide restauró el inicio del parto como ocurría en los animales sin deficiencia de COX-I. Es por esto, que se postula que la COX-I tendría un papel fundamental en la inducción de la luteólisis necesaria para el inicio del parto, mientras que el posterior incremento en la expresión de COX-II contribuiría al aumento en la síntesis de las PGs responsables de estimular la contractilidad miometrial (Tsuboi y col. 2003).

Se han propuesto distintos mecanismos de acción para la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  luteolítica:

- una rápida disminución en el flujo sanguíneo luteal (Nett y col. 1976, Niswender y col. 1976)
- una disminución en el número de receptores a LH (Behrman y col. 1978)
- un desacople entre el receptor de LH y la AC (Fletcher y Niswender 1982)
- la activación de la PKC (Wiltbank y col. 1989)
- el influjo de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wiltbank y col. 1989, Hoyer y Marion 1989)
- un efecto citotóxico (Silvia y col. 1984).

Aunque existe numerosa evidencia acerca de todos estos efectos, la acción de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  parece diferir entre especies y los efectos demostrados *in vitro* no siempre coinciden con lo observado *in vivo*. En el caso de la rata, la administración de una dosis luteolítica de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no afecta el flujo sanguíneo luteal (Behrman y col. 1979); sin embargo, disminuye dramáticamente la unión de LH a las células del CL, bloquea la activación de la AC y estimula la pérdida de receptores de LH.

Es importante mencionar que en los primates la regulación de la luteólisis no sería estrictamente dependiente de PGs uterinas, ya que la histerectomía no prolonga la vida media del CL (Neill y col. 1969, Beling y col. 1970, Castracane y col. 1979). Además, el CL es la principal fuente de esteroides necesarios para el mantenimiento del embarazo sólo durante los tres primeros meses. Después, la placenta sustituye al CL como órgano productor de esteroides.

## **PROGESTERONA**

---

### **4.1- Descubrimiento.**

Las hormonas esteroideas ováricas regulan gran parte de las funciones reproductivas. Corner y Allen en 1929 demostraron que extractos de cuerpo lúteo de cerdo podían causar una proliferación progestacional en el útero de conejos. Estas observaciones llevaron al aislamiento e identificación de la progesterona en 1934.

Durante los años siguientes, numerosos estudios describieron las múltiples funciones de las hormonas ováricas y su habilidad para regular el crecimiento y el desarrollo de los órganos sexuales femeninos (Burrows 1951).

### **4.2- Biosíntesis de progestágenos.**

Tanto las células de la granulosa como las teca-intersticiales pueden sintetizar progestágenos. Las lipoproteínas constituyen la fuente más abundante para la biosíntesis de los esteroides, pero el colesterol endógeno también puede ser utilizado para ello (Tureck y Strauss 1982). Los ésteres de colesterol son hidrolizados y posteriormente transportados a las mitocondrias. El colesterol que ingresó a las mitocondrias se convierte en pregnenolona y su transformación a progesterona ocurre rápidamente.

### **4.3- Mecanismo de acción.**

Los efectos fisiológicos de la  $P_4$  están mediados por la unión de esta hormona a proteínas intracelulares específicas denominadas receptores de  $P_4$  (PR). Se caracterizaron dos isoformas del PR en el pollo (Khun y col. 1977), en el ser humano (Lessey y col. 1988) y en la rata (Ogle 2002). Estas dos isoformas se denominan PR-A y PR-B. Ambas se originan a partir de un único gen por la transcripción alternativa de dos promotores y la iniciación en dos codones AUG diferentes (Kraus y col. 1993).

PR-A y PR-B se expresan en numerosas especies. El nivel absoluto y la proporción estequiométrica de cada uno dependen del desarrollo y del estado hormonal. Esto sugiere

que la expresión diferencial de PR-A (72-86 KDa) ó de PR-B (110-120 KDa) podría ser fundamental para una respuesta celular apropiada a la  $P_4$ . La importancia del nivel de expresión de PR-A y PR-B se ha determinado en ratones transgénicos que adicionalmente contienen una u otra isoforma. Los animales que contienen una copia adicional de PR-A desarrollan malformaciones en la glándula mamaria mientras que los que contienen un exceso de PR-B presentan un crecimiento alveolar inapropiado de la glándula (Shyamala y col. 2000).

Las isoformas de PR tienen diferente función: PR-B actúa como un activador transcripcional de genes; PR-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada por PR-B o por otros receptores a hormonas esteroideas, como receptores a estrógeno o glucocorticoides (Vegeto y col. 1993).

Cuando se expresan en cantidades equimolares las isoformas A y B pueden hacerlo como homodímeros A:A, B:B ó heterodímeros A:B (Conneely y Lydon 2000).

El PR es un factor de transcripción miembro de una superfamilia de receptores nucleares (Evans 1988, Mangelsdorf y col. 1995). Las hormonas esteroideas entran en la mayoría de las células por difusión, aunque en algunos casos presentan algún tipo de transporte activo. Una vez dentro de la célula blanco, la  $P_4$  se une a PR presente en el citoplasma o en el núcleo, produciéndose un cambio conformacional. El complejo hormona – receptor se dimeriza y adquiere una alta afinidad por secuencias regulatorias presentes en el DNA. La unión del complejo hormona – receptor a los elementos regulatorios usualmente resulta en la activación o inhibición de la transcripción génica. Luego, la  $P_4$  se elimina de la célula mientras que el receptor queda disponible para formar una nueva unión (Clarck y Mani 1994).

Diversos autores han informado una regulación diferencial en la expresión de las isoformas PR-A y PR-B en útero y cerebro de mamíferos (Mangal y col. 1993, Guerra-Araiza y col. 2000).

En útero, los PR se encuentran en epitelio, estroma y miometrio. La expresión espacio-temporal de los PR en estos compartimentos está controlada por  $E_2$  (Jordan y col. 1979).

En la siguiente tabla se ilustra la regulación de la expresión de las isoformas de PR en útero y cerebro de mamíferos.

---

---

---

Estos datos sugieren que en el tejido reproductivo existe un mecanismo de regulación de la expresión de PR muy complejo. Este mecanismo probablemente juegue un rol importante en la regulación de los procesos reproductivos mediados por la P<sub>4</sub>.

#### **4.4- Efectos de la progesterona.**

La progesterona participa en la regulación del desarrollo y funcionamiento de los tejidos reproductivos, así como también en la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso central de los mamíferos (Graham y Clarck 1997).

Una de las acciones más significativas de la P<sub>4</sub> es su participación durante la preñez. Durante la preñez temprana, la P<sub>4</sub> es esencial para la diferenciación del endometrio y el proceso de implantación. En estadios más avanzados de la gestación, la P<sub>4</sub> participa en el mantenimiento de la quiescencia uterina, ya que disminuye la excitabilidad del miometrio (Csapo 1981) y su sensibilidad a oxitocina (Yang y col. 1997).

Junto con el E<sub>2</sub>, la P<sub>4</sub> regula la contractilidad del oviducto influenciando el transporte del huevo hacia el útero en el momento apropiado (Blandau y col. 1977). Además, estimula la actividad secretoria del epitelio oviductal induciendo la secreción de fluido que permite el desarrollo temprano del embrión.

Durante el desarrollo temprano del cuerpo lúteo, la P<sub>4</sub> secretada inhibe la división de las células epiteliales y estromales uterinas, induce el aumento de las glándulas endometriales e incrementa la vascularización del estroma (Porter y Finn 1977). También

aumenta dramáticamente el contenido de glucógeno de las células epiteliales. En muchas especies, la  $P_4$  actúa sobre las células miometriales inhibiendo las contracciones en bloque. De esta manera, la  $P_4$  prepara el endometrio para el cuidado y el soporte del embrión hasta que ocurra la implantación y la placentación (Niswender y Nett 1994).

Bajo la influencia de la  $P_4$ , la consistencia del moco cervical se transforma en una matriz viscosa con alto contenido de filamentos glicoproteicos que impiden el pasaje de materiales hacia el interior o hacia el exterior del útero (Porter y Finn 1977).

En algunas especies, como la rata y el conejo, el parto es precedido por un descenso en los niveles de  $P_4$  conjuntamente con un incremento en los niveles de  $E_2$  (Labhsetwar y Watson 1974). En humanos y en monos no disminuye el nivel plasmático de  $P_4$  sino que hay un continuo incremento, por lo que en estas especies, la caída de  $P_4$  no sería una señal de iniciación del parto (Chwalisz y Garfield 1994). Sin embargo, en estudios clínicos con antiprogestinas como onapristone ó RU-486, se observa un incremento en la respuesta miometrial e inducción del borramiento del cervix. Adicionalmente, se ha observado que estos compuestos son altamente efectivos en la inducción del parto prematuro en especies en las que no se produce la caída de  $P_4$  sérica a término.

Algunos autores postulan que cambios sustanciales en los efectos de estrógenos y  $P_4$  pueden existir debido a las alteraciones en los niveles de sus receptores. Los PR se reducen un 25% en el miometrio en el momento del parto (Fang y col. 2002). Actualmente, este mecanismo se conoce como "withdrawal funcional".

## **EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL**

---

Los factores de crecimiento son un grupo de moléculas formado por diversos polipéptidos que constituyen un capítulo marcadamente distinto dentro de la endocrinología.

La biología de estos factores difiere de las hormonas clásicas en que ni su lugar de síntesis ni su sitio de acción están restringidos a un tejido específico. Varios factores de crecimiento pueden actuar en forma parácrina y en algunos casos también tienen efecto autócrino.

La falta de información precisa acerca de los lugares de acción y de síntesis de los factores de crecimiento sumado al escaso material purificado para investigar con animales intactos, hacen que el estudio de las funciones fisiológicas normales de muchos de estos factores permanezca aún sin conocerse.

### **5.1- Estructura del Factor de Crecimiento Epidermal.**

El Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) es un polipéptido de 53 aminoácidos con tres puentes disulfuro. Fue aislado por primera vez de la glándula submaxilar de ratones (Cohen 1962).

El EGF es sintetizado en primera instancia como una molécula precursora larga, pre-pro-EGF (1200 aa), que se localiza en membrana plasmática (Gray y col. 1983, Scott y col. 1983). Luego sufre un clivaje proteolítico que da origen al EGF (53 aa), a otros 8 polipéptidos tipo EGF y a una secuencia hidrofóbica característica de proteínas de membrana.

A continuación se detalla la secuencia primaria del EGF (Savage y col. 1972):

**NH<sub>2</sub>**

**COOH**

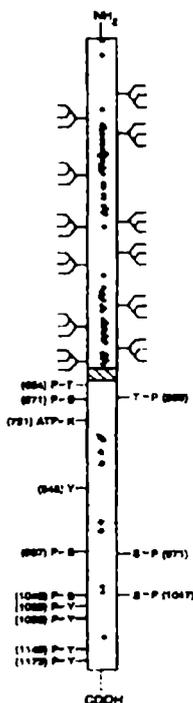
Sin embargo, bajo algunas circunstancias el clivaje no ocurre y entonces estos péptidos sólo pueden interactuar con los receptores ubicados en las membranas de las células adyacentes (Lennard y col. 1998).

Estudios con células transfectadas han demostrado que el EGF puede existir como una proteína de membrana glicosilada (Mroczkowski y col. 1989).

El mecanismo por el cual el pre-pro-EGF es procesado hasta dar la molécula madura de EGF y las funciones de este precursor, aún son desconocidos. El precursor intacto de EGF aislado de riñón de ratón o de células transfectadas con cDNA para el pre-pro-EGF, posee la actividad biológica del EGF maduro.

## 5.2- Estructura del receptor de EGF.

Los efectos biológicos del EGF están mediados por la unión a un receptor transmembrana (R-EGF), una glicoproteína de 170 KDa compuesta por una cadena polipeptídica de 1186 aminoácidos. Aproximadamente 40 KDa del receptor están formados por residuos glicosilados (Carpenter y Cohen 1990). El R-EGF posee un dominio hidrofóbico transmembrana que lo mantiene anclado a la célula. La porción extracelular une al EGF, mientras que la intracelular desencadena la señal. El R-EGF tiene la capacidad de unir no sólo al EGF sino también a los péptidos tipo EGF que se originan a partir del pre-pro-EGF.



El dominio intracelular del R-EGF posee actividad tirosina quinasa intrínseca (Carpenter y col. 1978). La estimulación de la actividad quinasa del receptor ocurre cuando el EGF se une al dominio extracelular del receptor provocando la autofosforilación del dominio intracelular en una tirosina específica.

Cerca del extremo carboxi - terminal del R-EGF hay otros cuatro sitios de autofosforilación en tirosinas (Downward y col. 1984, Margolis y col. 1989). Se ha postulado que este dominio constituye una región de autoinhibición por autofosforilación o clivaje proteolítico (Bertics y col. 1988, Walton y col. 1990).

Se cree que una vez que el EGF se une a su receptor se induce la oligomerización del mismo. Esto permitiría fosforilaciones inter-receptor de las tirosinas.

### 5.3- Transducción de la señal.

El tratamiento de células intactas con EGF produce un incremento no sólo de fosfotirosinas, sino también de fosfoserinas y fosfotreoninas. La fosforilación en serinas y treoninas se debería a la actividad quinasa de proteínas citoplasmáticas previamente activadas en la cascada iniciada por el EGF; es decir, que la fosforilación en estos aminoácidos no se debería a un mecanismo de autofosforilación como el que ocurre con las tirosinas.

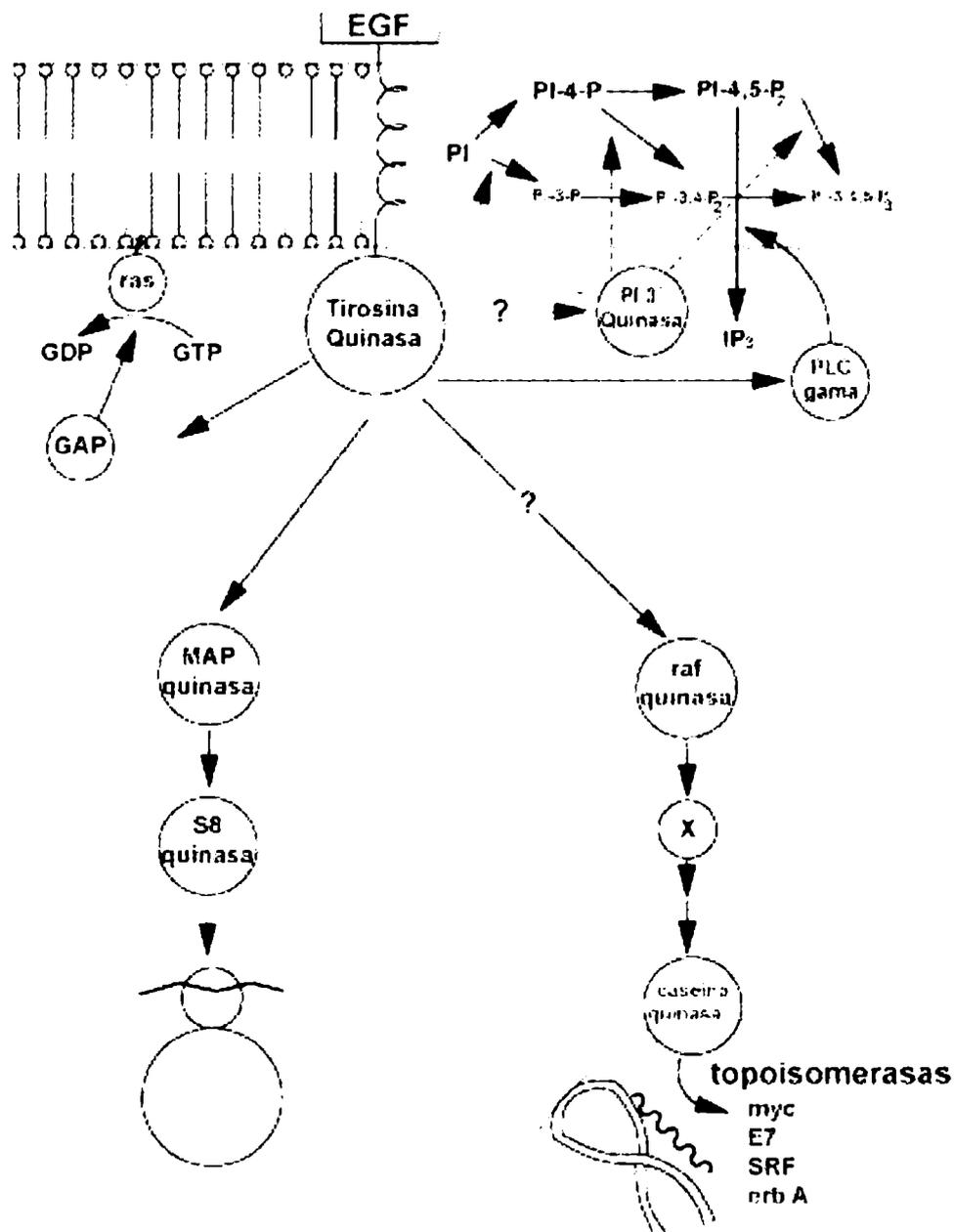
Esto sugiere que las quinasas activadas durante la señalización del receptor tienen otros sustratos además del propio R-EGF, formando un loop de regulación de su actividad tirosina quinasa.

Se ha informado que la fosforilación en serina por la proteína quinasa C (PKC) atenúa la actividad del dominio tirosina quinasa y la capacidad de unión del EGF en el dominio extracitoplasmático.

La actividad tirosina quinasa endógena es esencial para la señalización, y su activación es el primer paso luego de la unión del EGF al receptor (Carpenter and Cohen 1990).

Las siguientes moléculas han sido caracterizadas como sustratos de la actividad tirosina quinasa del receptor: PLC- $\gamma$ 1, PI-3 quinasa, GAP, MAP quinasa, *raf* quinasa, lipocortina I y *c-erb* B2 (Carpenter y Cohen 1990).

La vía de señalización mejor caracterizada es la que involucra a la PLC-  $\gamma$ 1. El EGF se une al dominio extracitoplasmático y activa la autofosforilación del receptor provocando un incremento en la actividad tirosina quinasa endógena. El R-EGF fosforila una PLC-  $\gamma$ 1, la cual a su vez hidroliza un inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) desde la membrana plasmática (Rhee y col. 1989). El IP3 incrementa el nivel intracelular de  $Ca^{2+}$ . El DAG junto con el  $Ca^{2+}$  liberado activan subsecuentemente una PKC la cual, entre otras proteínas blanco, fosforila al R-EGF atenuando su actividad.



### Vías de señalización del EGF

La unión del EGF al receptor provoca la activación del mismo y seguidamente se induce un mecanismo de internalización: el R-EGF activado es endocitado en vesículas cubiertas de clatrina. Luego, esta vacuola se fusiona con endosomas y el R-EGF se degrada finalmente en los lisosomas (Burke y col. 2001). Este mecanismo se conoce como "down regulation" del receptor. Se piensa que este proceso junto con las fosforilaciones en serina y treonina funcionarían como mecanismos de atenuación de la señal.

Sin embargo, evidencias experimentales han demostrado que las señales citoplasmáticas desencadenadas por el receptor pueden continuar disparándose luego de la endocitosis. Se han observado diversos complejos citoplasmáticos acoplados al R-EGF tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma durante el transporte hasta los lisosomas. Los complejos proteicos asociados al receptor son "compartimiento - específicos". Si bien algunas moléculas se detectan asociadas al R-EGF tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma, otras sólo se encuentran presentes en los endosomas o en los lisosomas, sugiriendo algún tipo de función específica asociada a la actividad del receptor.

Burke y colaboradores (2001) demostraron que el R-EGF se inactiva antes de su degradación en los lisosomas. Aparentemente, este proceso se debería a la remoción del EGF del receptor ubicado en los endosomas, más que a la degradación proteolítica del mismo.

#### **5.4- Funciones del EGF y su receptor.**

El EGF es un potente mitógeno para una gran variedad de células de origen endodérmico, mesodérmico y ectodérmico. Estimula la proliferación y diferenciación de las células epiteliales de la piel, la córnea, el pulmón, la tráquea y el tracto gastrointestinal (Lennard y col. 1998). También promueve el crecimiento y migración de los queratinocitos y aumenta la proliferación de los fibroblastos y las células del embrión.

Además de sus efectos proliferativos, el EGF muestra una gran variedad de otras acciones biológicas independientes de su modulación del mecanismo de división celular, lo que sugiere que el EGF podría tener funciones que aún no han sido reconocidas.

En la actualidad existen numerosos trabajos que vinculan al EGF con importantes mediadores de la preñez y el parto.

## **EL EGF EN LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA**

---

Como hemos mencionado anteriormente, el EGF además de ser un factor de crecimiento y actuar como tal, en muchos casos se comporta como una hormona. Esta observación abre la posibilidad de que el EGF pueda tener otro tipo de efectos y funciones además de los que se han estudiado hasta este momento.

En la actualidad existen numerosos trabajos que involucran al EGF como partícipe de la fisiología reproductiva de las hembras.

### **6.1- Localización del EGF y su receptor.**

Tanto el factor de crecimiento epidermal como su receptor han sido localizados en distintos tejidos del aparato reproductor femenino.

A continuación se enumeran en detalle:

útero de rata y ratón (Bany y Kennedy 1995)

oviducto y endometrio de cerda (Wollenhaupt y col. 1997)

placenta de yegua (Lennard y col. 1998)

útero y placenta de mujeres (Lin y col. 1988, Richards y col. 1983).

Antes describió ya en 1973 la presencia de EGF en el líquido amniótico de mujeres embarazadas. Más tarde, en 1978, Barka y sus colaboradores encontraron EGF en sangre materna y fetal.

Un grupo de investigadores chinos informó que tanto la concentración de EGF como la de progesterona aumentaba en el suero de mujeres embarazadas conforme avanzaba la gestación (Wang y col. 1998).

En 1996, el grupo de Varner publicó un trabajo donde informó que la concentración de EGF en el líquido amniótico de mujeres embarazadas se correlacionaba positivamente con el progreso de la gestación (> 38 semanas) y que la concentración de EGF en el líquido amniótico de mujeres que presentaban trabajo de parto activo no difería significativamente del encontrado en mujeres a término con cesáreas programadas (sin trabajo de parto). Además, las mujeres que presentaban partos prematuros no mostraban un aumento de EGF en el líquido amniótico. Por otro lado, Moharam y colaboradores habían publicado anteriormente (1992) un trabajo en el cual describían que la

concentración máxima de EGF en líquido amniótico se observaba entre las semanas 21 y 28 de gestación, y que luego este nivel caía hasta valores similares a los encontrados durante el primer trimestre y en mujeres no embarazadas. Este mismo perfil es el que encontraban en la orina. Más viejo todavía es el trabajo de Hoffman y colaboradores (1988), quienes encontraron que la concentración de EGF en la orina de mujeres embarazadas aumentaba linealmente en las semanas 6 a 20 de gestación, y luego cae previo al inicio del trabajo de parto. Observarob también que la concentración de EGF en orina no difería significativamente entre la preñez temprana (<12 semanas) y el momento del parto.

Desde hace varios años se están realizando estudios en los que se emplea el factor de crecimiento epidermal en la terapéutica de los bebes con problemas de retardo en el crecimiento intra-uterino. Un estudio publicado por Wang y colaboradores en 1998, revela que los cambios en la concentración de EGF en el suero materno pueden tomarse como un marcador de maduración fetal. Otros autores realizaron experimentos en conejos, en los que administraron EGF intra-amniótico logrando acelerar la maduración del intestino delgado fetal (Buchmiller y col. 1993). Por otro lado, se están realizando numerosas investigaciones en las que se emplea el EGF como un acelerador de la maduración pulmonar fetal (Goetzman y col. 1994). Estos estudios son particularmente importantes, para aquellos casos en los que se presenta una amenaza de parto prematuro.

## **6.2- EGF y prostaglandinas.**

En la actualidad existe numerosa bibliografía que relaciona los efectos y las vías metabólicas de las PGs con el EGF. En particular, aquí se mencionan aquellos relacionados con el inicio del trabajo de parto.

Se ha informado que el EGF modula la vía de las PGs en las células de amnios humanas. Mitchell (1987) describió que el EGF estimula de manera dosis - dependiente la síntesis de PGE<sub>2</sub> en estas células. Por su parte, Casey y colaboradores (1988) encontraron que el EGF de origen murino induce la expresión de COX-II en células de amnios humanas cultivadas en monocapa.

Estos hallazgos son de particular interés dado que un aumento en la tasa de producción de PGE<sub>2</sub> por el amnios, es clave en el mecanismo de desencadenamiento del parto.

Además, confirmaría el efecto -directo o indirecto- del EGF sobre la movilización del AA (Mitchell 1991).

El comienzo del trabajo de parto a término o pre-término requiere del aumento en la síntesis de PGs intra-uterinas. Las infecciones intra-uterinas con la consecuente producción de citoquinas están frecuentemente ligadas al parto pre-término (Coulam y col. 1993). El EGF potencia el efecto de la IL-1 y el TNF- $\alpha$  sobre la síntesis de la PGE<sub>2</sub>, a través de la estimulación de COX-II en fibroblastos gingivales humanos.

En este sentido, el efecto sinérgico de factores de crecimiento y citoquinas podría ser de importancia fisiológica para la regulación del crecimiento de los tejidos regenerativos durante la inflamación y reparación que ocurren en el proceso de parto, ovulación e implantación (Modéer y col. 1993).

En el mono baboon, la aparición del EGF y su receptor en las células estromales del útero durante la preñez coincide con el proceso de decidualización, hecho que ocurre previamente al comienzo del parto (Slowey y col. 1994).

En nuestro laboratorio hemos descrito en el útero de rata estrogenizada, que el EGF estimula la síntesis de PGs vía un incremento en la actividad de COX-II por el óxido nítrico (Ribeiro y col. 1999).

En 1987, el grupo de Gardner, encontró que el EGF *in vitro* era capaz de estimular la contracción del miometrio proveniente tanto de ratas inmaduras como de ratas adultas. Dos años más tarde, junto con Stancel (1989) informaron que este efecto era dependiente de la síntesis de PGs y de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a las células.

Por otro lado, Tamada y colaboradores (2000) publicaron un trabajo donde informaban que la infusión intraluminal de EGF dentro de los cuernos uterinos del carnero, reducía la actividad contráctil uterina, ya fuera que la hembra estuviera en estro como en diestro.

### **6.3- EGF, R-EGF y hormonas esteroideas.**

Varios autores han encontrado que las hormonas esteroideas, estradiol y progesterona, son capaces de modular la unión del EGF a su receptor, la expresión de éste y su estado de activación.

Mukku y Stancel (1985 a) demostraron que la administración de  $17\beta$ -E<sub>2</sub> a ratas inmaduras incrementa la unión del EGF a las membranas uterinas, sin cambio en la afinidad de los R-EGF, pero con un aumento en su expresión y en la actividad tirosina quinasa endógena. En otro trabajo de ese mismo año (Mukku y Stancel 1985 b), estos autores encontraron que las membranas uterinas provenientes de hembras pre-púberes poseían sitios de unión al R-EGF de alta afinidad y saturables. El EGF se unía mayoritariamente a una especie de 170 KDa, pero también, aunque minoritariamente a una proteína de 150 KDa.

El perfil de expresión correspondiente al mRNA del R-EGF en el útero de ratón presenta diferencias según se trate de hembras preñadas o de hembras ovariectomizadas (Das y col. 1994). Así mismo, la cinética de unión del EGF a su receptor también es diferente.

En el útero proveniente de hembras preñadas (día 1 a 8 de gestación) se observan dos clases de sitios de unión, mientras que en el útero de las hembras ovariectomizadas sólo se observa un tipo de sitio de unión.

La administración de  $17\beta$ -E<sub>2</sub> o de P<sub>4</sub> a las hembras ovariectomizadas incrementa la expresión del mRNA para el R-EGF, como así también el número de sitios de unión. Sin embargo, cuando se administra P<sub>4</sub> solamente, la bioactividad del R-EGF es indetectable. Así, el E<sub>2</sub> parecería ser esencial para la bioactividad de estos receptores.

Dai y Ogle (1999) informaron sobre la presencia del R-EGF inactivo y fosforilado en decidua de ratas preñadas. Ambas formas, llegan al máximo de su expresión en los días 10 a 12 de gestación (cuando el nivel plasmático de progesterona es elevado). Luego, con el progreso de la preñez, la expresión cae. El tratamiento con RU-486, un antiprogestágeno, en el día 10 de preñez disminuye la expresión del R-EGF, inactivo y fosforilado, hasta el nivel observado en el grupo control.

Resultados similares se describen en el mono Rhesus, en donde se detectó expresión de EGF y su receptor en el epitelio luminal y glandular del tejido uterino (Yue y col. 2000). La intensidad de la marca es baja en los días 1 y 2 de preñez y luego comienza a aumentar gradualmente desde el día 3 de gestación, alcanzando el nivel máximo entre los días 9 y 11.

#### **6.4- EGF en la fisiología ovárica.**

En la actualidad es sabido que varios factores de crecimiento bien caracterizados tienen efectos moduladores *in vitro* sobre la diferenciación de las células de la granulosa y sobre la esteroidogénesis. Sin embargo, no está claro cuál es la concentración intra-ovárica de estos factores en los distintos estadios del desarrollo ovárico, cuáles son sus fuentes celulares de producción (intra- o extra-ováricas) y cuáles son sus acciones regulatorias *in vivo*.

Se ha encontrado que el EGF se une a receptores de alta afinidad y baja capacidad en las células de la granulosa, ejerciendo distintos efectos moduladores sobre la síntesis de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> (Jones y col. 1982).

El EGF inhibe la síntesis de E<sub>2</sub> y aumenta la de P<sub>4</sub>, estimulada por FSH, en las células de la granulosa provenientes de ratas inmaduras hipofisectomizadas y tratadas con estradiol (Jones y col. 1982, Hsueh y col. 1981).

Además, se ha descrito que el EGF corta el efecto estimulador de la FSH sobre la secreción de P<sub>4</sub> en las células de la granulosa, aumentando el catabolismo de la 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (Knecht y Catt 1983).

En estudios con células de granulosa de chanco se encontró que el EGF inhibe la biosíntesis de estradiol estimulada por FSH e incrementa la síntesis de P<sub>4</sub> estimulada por FSH o hCG, sólo luego de largos períodos de incubación en cultivo (Schomberg y col. 1983).

Otros estudios demuestran que en las células de la granulosa de la rata la expresión de los R-EGF está regulada por FSH y LH, siendo máxima en el estadio de proestro del ciclo (St Arnaud y col. 1983, Jones y col. 1982). Este resultado sugiere que el efecto del EGF debe estar coordinado con otros eventos hormonales.

El único efecto del EGF *in vivo* sobre el ovario, fue descrito por el grupo de Lintern-Moore en 1981. Este grupo de investigadores demostró que el EGF *in vivo* era capaz de retrasar el desarrollo de los folículos primordiales en ratones neonatos.

**hipótesis y objetivos**

---

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

El conocimiento actual acerca de las moléculas que controlan la motilidad uterina y su regulación en el inicio del parto nos permite detallar los antecedentes más destacados como punto de partida para elaborar la hipótesis de trabajo.

- El EGF in vitro modula la síntesis de PGs en diversos sistemas experimentales.
- La P4 y el E2 modulan la expresión del receptor de EGF en el útero de roedores.
- Se ha detectado la expresión de EGF y su receptor en útero y placenta de roedores, yeguas, cerdas y mujeres.
- La concentración de EGF en el líquido amniótico de mujeres aumenta con el progreso de la gestación.
- La concentración de EGF en el líquido amniótico de mujeres con trabajo de parto pre-término es menor que la de mujeres con trabajo de parto espontáneo y con cesáreas programadas.
- La administración intra – uterina de EGF disminuye la contracción del miometrio en carneros en estro y diestro.

En este contexto, la hipótesis y los objetivos de este trabajo se circunscriben a,

### **Hipótesis general**

#### **Objetivos.**

- 1- Estudiar el efecto de la administración intra – uterina de EGF sobre el inicio del parto.
- 2- Analizar el mecanismo por el cual el EGF modularía el inicio del parto.
- 3- Estudiar la posible participación del EGF endógeno en el inicio del parto.

**materiales y métodos**

---

## **1- Medios y drogas.**

### **1.1- Drogas.**

Los anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina, las membranas de nitrocelulosa, el Rojo Ponceau S, el DTT, la cloramina T, el metabisulfito de sodio, el permount y los antisueros fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

Los antisueros de progesterona y de LH fueron provistos por G. D. Niswender, Colorado State University, Fort Collins, CO.

El Factor de Crecimiento Epidermal fue provisto por Cayman Chemical (Ellsworth Road, MI, USA).

El anticuerpo anti – EGF fue suministrado por IgG Corporation (Nashville, Reino Unido). El segundo anticuerpo utilizado en el RIA de EGF fue provisto Peninsula y por el Centro de Diagnóstico de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

El material radioactivo utilizado para los ensayos de actividad de radioconversión y radioinmunoanálisis (RIA) fue obtenido de Amersham Corporation (Arlington Heights, II, USA) y Cayman:

- [5,6,8,9,11,12,14,15(n)-<sup>3</sup>H]-prostaglandina F<sub>2α</sub>(160Ci/mmol,200uCi/ml)
- [5,6,8,9,11,12,14,15(n)-<sup>3</sup>H]-prostaglandina E<sub>2</sub>(130Ci/mmol,100uCi/ml)
- 17α-Hydroxy[1,2,6,7-<sup>3</sup>H] progesterona (60 Ci/mmol, 1mCi/ml)
- [1-<sup>14</sup>C]-ácido araquidónico (50 μCi/ml)
- <sup>125</sup>I (0.25 mCi/μl)

Los reactivos para western blot fueron suministrados por Sigma y Bio-Rad. Los anticuerpos utilizados para la detección de COX-I y COX-II fueron suministrados por Cayman. Los anticuerpos contra R-EGF, pR-EGF y PR fueron provistos por Santa Cruz Biotechnology.

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

## **1.2- Medios utilizados.**

### **Líquido de centelleo para muestras acuosas.**

70 ml de líquido de centelleo concentrado (0.5 gr POPOP + 40 gr PPO + 1 l tolueno) + 630 ml tolueno + 300 ml tritón.

### **Krebs – Ringer – Bicarbonato (KRB).**

145 mM Na<sup>+</sup> + 6 mM K<sup>2+</sup> + 2 mM Ca<sup>2+</sup> + 1.3 mM Mg<sup>2+</sup> + 126.1 mM Cl<sup>-</sup> + 25.3 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + 1.3 mM SO<sub>4</sub><sup>=</sup> + 1.2 mM PO<sub>4</sub><sup>=</sup> + 11 mM glucosa.

### **Líquido de centelleo para muestras sólidas.**

50 mg POPOP + 4 gr PPO + 1 l tolueno.

### **Buffer de corrida.**

Tris base 15 g/l pH=8.3 + glicina 72 g/l + SDS 5 g/l.

### **Buffer de transferencia.**

25 mM Tris ph=8.1-8.4 + 192 mM glicina + 20% v/v metanol.

### **Rojo Punzo S.**

0.2 % ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo) fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico + 3 % ácido tricloroacético + 3 % ácido sulfosalicílico.

### **Buffer de inhibidores para COX y PR.**

20 mM de buffer Tris pH=7.4 + 1mM EDTA + 2 µg/ml aprotinina + 10 µg/ml leupeptina + 10 µg/ml DTT + 100 µg/ml STY + 1 mg/ml ácido caproico + 1 mg/ml de benzamidina.

### **Buffer de inhibidores para R-EGF y pR-EGF.**

20 mM de buffer Pipes pH=7 + 1mM EDTA + 2 µg/ml aprotinina + 10 µg/ml leupeptina + 10 µg/ml DTT + 100 µg/ml STY + 1 mg/ml ácido caproico + 1 mg/ml de benzamidina + 1mM ortovanadato de sodio.

**Buffer RIA PGs.**

7.3 mM  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  + 2.7 mM  $KH_2PO_4$  + 154 mM ClNa + 7.1 mM albúmina bovina + 15.4 mM azida sódica - pH=7.4

**Buffer RIA P<sub>4</sub>.**

40 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  + 34 mM  $NaH_2PO_4$  + 154 mM ClNa + 0.1 % gelatina + 0.02 % azida sódica - pH = 7

**Buffer RIA LH.**

PBS 0.01M + 1% BSA.

**PBS - NRS 3% - EDTA (para diluir el primer anticuerpo y el inespecífico del RIA de LH).**

97ml de PBS 0.01M + 1.8612g de EDTA disódico – Se lleva a pH 7.6 con Na OH  
3ml NRS

**Buffer muestra.**

0.3 % de azul de bromofenol + Tris 0.5 M pH=6.8 + 1% SDS + 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol + glicerol 10 % v/v.

**Solución de lavado (TTBS).**

50 mM Tris / HCl pH=7.5 + 500 mM NaCl + 0.1 % Tween 20.

**TBS.**

50 mM Tris / HCl pH=7.5 + 500 mM NaCl.

## **2- Animales utilizados.**

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, de peso homogéneo (200 gr - 300 gr) mantenidas bajo condiciones de temperatura (23°C - 25°C) y ciclos de luz - oscuridad (14 h luz, 10 h oscuridad) constantes.

Se colocaron en apareo hembras en estro (etapa receptiva) con machos de la misma cepa (entre 4 y 6 meses de edad). La preñez se constató realizando un extendido vaginal y verificando la presencia de espermatozoides. Para ello se colocó en la vagina de la rata una pipeta Pasteur estéril cargada con solución fisiológica, se dejó que el líquido penetrara y luego se aspiró el contenido vaginal, colocándolo sobre la superficie de un portaobjetos. Se observó al microscopio óptico con bajo aumento (100x).

Se separaron aquellas ratas que contenían espermatozoides en el tracto vaginal y se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* hasta el día de preñez indicado.

La concepción en roedores se define como la "presencia de espermatozoides en la vagina" y se ha informado que en un 94% de los casos es criterio de predicción de preñez en ratas (Chow y Augustin 1987).

La preñez en la cepa Wistar bajo las condiciones de nuestro bioterio tiene una duración de 22 días, definiendo el día 1 como aquel en el que se observan espermatozoides en el fluido vaginal.

### **2.1- Determinación de la dosis efectiva de EGF.**

Con el objetivo de investigar el efecto del EGF sobre el inicio del parto, se trabajó con los siguientes grupos experimentales:

- 1) Hembras tratadas con EGF:** se administró de forma intra-uterina (i/u) una dosis simple de EGF a hembras preñadas de 20, 21 o 22 días. Las dosis de EGF empleadas fueron de 15, 30, 60, 120, 250 o 500 ng por rata. Se registró la hora y el día de inicio de trabajo de parto.
- 2) Hembras sham:** hembras preñadas de 20, 21 o 22 días recibieron i/u el mismo volumen de vehículo utilizado para disolver el EGF (250 µl de solución fisiológica, 0.9% NaCl).

Las hembras se anestesiaron por inhalación de éter y se les practicó un corte de 1.5 cm en la zona medio ventral de manera de acceder al útero por visualización directa.

**3) Hembras controles no tratadas:** hembras preñadas que no recibieron ningún tratamiento.

El efecto de la inyección *per se* se verificó comparando el momento de disparo del parto en las hembras control con respecto al momento de disparo del parto en las hembras sham.

Una vez establecida la dosis efectiva de EGF, tanto las hembras control, como las sham y las tratadas se sacrificaron por dislocación cervical. Mediante una incisión longitudinal medio-ventral se extrajeron los tejidos de interés, se limpiaron de grasa y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización (excepto para la medición de contractilidad).

## **2.2- Obtención de las muestras.**

### **2.2.1- Estudio de la expresión del R-EGF durante la preñez.**

Hembras controles preñadas de 5, 13 y 18 a 22 días se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajo el útero limpiándolo de grasa, placenta y fetos. El tejido se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento para la técnica de western blot.

### **2.2.2- Ovarios.**

Hembras controles preñadas de 13 días, hembras sham preñadas de 21 y 22 días y hembras tratadas con EGF fueron sacrificadas y se les extrajeron los ovarios. Los mismos fueron sometidos al protocolo de fijación para histología descrito más adelante.

### **2.2.3- Cuerpos lúteos.**

Hembras preñadas de 21 y 22 días se sacrificaron por dislocación cervical y mediante una incisión longitudinal medio-ventral se extrajeron los ovarios, se limpiaron de grasa y se colocaron en una caja de Petri conteniendo PBS a 4°C.

Los ovarios provenientes de un mismo tratamiento están formados por un grupo de cuerpos lúteos en la misma edad o estado de desarrollo. Esto posibilitó la observación de los mismos bajo lupa.

Los ovarios se colocaron sobre un papel de filtro embebido en solución fisiológica y apoyado sobre una caja de Petri con hielo. Utilizando jeringas de tuberculina con agujas 20/21 G se separaron los cuerpos lúteos uno a uno. Los cuerpos lúteos provenientes del mismo ovario se guardaron juntos a -70°C hasta su posterior utilización en el protocolo de western blot.

### **2.2.4- Suero.**

Hembras sham preñadas de 21 y 22 días y hembras tratadas con EGF se anestesiaron por inhalación de éter. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardiaca y se dejaron a temperatura ambiente hasta su coagulación. Luego se centrifugaron a 3000 g durante 10 min para separar el suero. Las muestras provenientes de los diferentes tratamientos se guardaron a -20°C hasta su utilización en el protocolo de radioinmunoensayo.

### **2.2.5- Líquido amniótico.**

Hembras controles en distintos días de gestación (13 y 18 a 22) se sacrificaron por dislocación cervical y se les practicó una incisión longitudinal medio-ventral de manera de obtener las muestras de líquido amniótico por visualización directa de los cuernos uterinos. Se punzó la pared del útero y las membranas fetales con una aguja 30G y se aspiró el líquido contenido en los sacos uterinos cuidando no romper vasos sanguíneos. Las muestras provenientes de los distintos tratamientos se guardaron a -70°C hasta ser utilizadas en el radioinmunoensayo.

### 3- Técnica de radioconversión.

En el útero se analizó la producción de PGs mediante la técnica de radioconversión que permite cuantificar la síntesis de PGs marcadas a partir de ácido araquidónico (AA) exógeno.

Los úteros provenientes de los distintos tratamientos se descongelaron, se pesaron y se colocaron en un vial conteniendo 2 ml de medio KRB. Se adicionó 50  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-AA y se incubó durante 1 h en baño Dubnoff a 37°C con agitación y en atmósfera de carbógeno (95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ ). La determinación de las PGs se realizó en dos pasos sucesivos:

1- *Extracción*: los metabolitos del [ $^{14}\text{C}$ ]-AA son ácidos débiles que pueden ser extraídos por solventes orgánicos donde se encuentran en forma protonada. Luego de la incubación con [ $^{14}\text{C}$ ]-AA, las muestras se llevaron a pH= 3 - 3.5 con HCl 1N lo que provocó la conversión de las PGs en su forma no disociada insoluble en agua. Posteriormente se adicionó a cada muestra 2 ml de acetato de etilo para extraer las PGs en este solvente y se dejaron 24 h a 4°C. Pasado este tiempo, se extrajo el acetato de etilo y se realizaron dos lavados más con el mismo solvente para optimizar la extracción. Las tres extracciones se reunieron en un mismo vial y se dejaron secar en estufa a baja presión. Los prostanooides se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de metanol.

2- *Cromatografía en placa delgada*: para separar las PGs extraídas se utilizaron placas de TLC de aluminio sílica gel. Las PGs resuspendidas se sembraron con tubos capilares. Paralelamente se corrieron testigos de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . La placa se desarrolló dentro de una cuba saturada con una mezcla de benceno : dioxano : ácido acético en una proporción de 60:30:3 (v:v).

Una vez que se corrió y se secó la placa, se procedió a cortarla en cuadrados de 1cm. Cada uno se colocó en un vial con 10 ml de líquido de centelleo para muestras sólidas. Luego de homogeneizar con vórtex, la radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido (Bechman). Se cuantificó la cantidad de proteínas totales de cada muestra por el método de Bradford (1976). La síntesis de [ $^{14}\text{C}$ ]-PGs se expresó como % cpm en placa / mg proteína / 1h.

#### **4- Técnica de radioinmunoensayo.**

Mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) con anticuerpo específico, se determinó:

- el nivel de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> en líquido amniótico (Campbell y Ojeda 1987) y liberado por el útero (Jaffe y Behrman 1974)
- la concentración de P<sub>4</sub> (Abraham y col. 1971) y LH (Niswender y col. 1968) en suero
- el contenido de EGF en líquido amniótico.

##### **4.1- Procesamiento de las muestras.**

- **Líquido amniótico:** para la extracción de los prostanoïdes se colocó un volumen fijo de líquido amniótico en un vial. Luego se acidificó (pH=3) con HCl 1N y se adicionaron 2 ml de acetato de etilo por triplicado. Los extractos se secaron en estufa de vacío y se guardaron a 4°C hasta su posterior utilización.

Para la determinación del contenido de EGF, las muestras de líquido amniótico se centrifugaron a 5000 g durante 10 min, determinándose el EGF en el sobrenadante.

- **Suero:** se colocó un volumen fijo de suero en un tubo cónico de vidrio. Para la extracción de P<sub>4</sub> se adicionaron 2 ml de éter etílico. Se homogenizó con vórtex y se guardó a -20°C hasta lograr la congelación de la fase acuosa y en consecuencia la separación de la fase orgánica conteniendo la hormona. Se volcó la fase orgánica a un vial. La extracción se repitió dos veces más. Las tres fases orgánicas recolectadas se secaron en estufa de vacío y las muestras se guardaron a 4°C hasta su utilización. Los sueros utilizados en el RIA de LH no recibieron tratamiento previo.

- **Útero:** los fragmentos uterinos provenientes de los distintos tratamientos se colocaron en viales conteniendo 2 ml de medio KRB y se incubaron durante 1 h a 37°C en atmósfera de carbógeno. Luego se acidificó (pH=3) con HCl 1N y se adicionaron 2 ml de acetato de etilo por triplicado. Los extractos se secaron en estufa de vacío y se guardaron a 4°C hasta su posterior utilización.

#### 4.2- Determinación de PGs.

Las muestras y todos los reactivos fueron reconstituidos en buffer RIA de PGs. A partir de una solución madre de PGs se realizaron diluciones hasta obtener una concentración final de 0.08 µg/ml (8000 pg), a partir de la cual se construyó la curva de calibración haciendo diluciones seriadas al medio (15 - 4000 pg).

A continuación se detallan los volúmenes empleados:

	buffer	muestra	antisuero	radioactivo	carbón
estándar	800	-	-	100	-
inespecífico	600	-	-	100	200
tubo O	100	-	500	100	200
curva cal.	-	100	500	100	200
muestra	-	100	500	100	200

*Los volúmenes están expresados en µl.*

Luego de la adición del antisuero se incubó 30 min a 4°C. Posteriormente se adicionó la PGs marcada y se incubó durante 1 h a 4°C. Las formas libres y unidas se separaron por el agregado de una suspensión de carbón activado (1%) – dextrán (0.1%) seguido de una centrifugación a 2000 g durante 15 min a 4°C (Sorvall RC-5B). El sobrenadante se volcó en viales que contenían 10 ml de líquido de centelleo para muestras acuosas. La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo Bechman.

Para obtener una distribución normal de los datos se aplicó una transformación logarítmica. Los datos se expresaron como pg PGs / mg proteína / 1h (para el caso de las PGs liberadas a partir de los fragmentos uterinos) o como pg PGs / ml líquido amniótico.

El método posee una reactividad cruzada menor al 0.1% para las prostaglandinas analizadas.

La sensibilidad es de 5 pg/tubo y la constante de afinidad es  $K_a = 1.5 \cdot 10^{10}$  L/mol.

#### 4.3- Determinación de progesterona.

Las muestras y todos los reactivos se resuspenden en buffer RIA P<sub>4</sub>.

A partir de una solución madre de P<sub>4</sub> se realizaron diluciones sucesivas para obtener una concentración final de 0.08 µg/ml (8000 pg). La curva de calibración se construyó a partir del tubo de 8000 pg haciendo diluciones seriadas al medio (15 - 4000 pg).

En la siguiente tabla se detallan los volúmenes empleados:

	buffer	muestra	antisuero	radioactivo	carbón
estándar	500	-	-	100	-
inespecífico	300	-	-	100	200
tubo O	100	-	200	100	200
curva cal.	-	100	200	100	200
muestra	-	100	200	100	200

*Los volúmenes están expresados en µl.*

El antisuero y la hormona marcada se adicionaron juntas y se incubó a 4°C por 18 h. Las formas libres y unidas se separaron por el agregado de una suspensión de carbón activado (1%) – dextrán (0.1%) seguido de una centrifugación a 2000 g durante 15 min a 4°C (Sorvall RC-5B). El sobrenadante se volcó en viales que contenían 10 ml de líquido de centelleo para muestras acuosas. La radioactividad de cada muestra se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

Para obtener una distribución normal de los datos se aplicó una transformación logarítmica. Los datos se expresaron como ng progesterona / ml suero.

#### 4.4- Determinación de LH.

El nivel sérico de LH se determinó utilizando la LH N° 15 desarrollada en ovinos y los resultados se expresaron en términos de la preparación de referencia (NIDKD – LH), gentilmente cedidos por el Dr. Niswender.

Las muestras y todos los reactivos fueron reconstituidos en buffer RIA de LH. A partir de una solución madre de LH (25 ng/100  $\mu$ l) se realizaron diluciones sucesivas al medio para obtener la curva estándar (25 – 0.025 ng / 100  $\mu$ l).

En la siguiente tabla se detallan los volúmenes empleados y la temperatura y tiempo de incubación:

	muestra	1 <sup>er</sup> anticuerpo 24 h a 4°C	radioactivo 24 h a 4°C	2 <sup>do</sup> anticuerpo 4 h a temp. amb.	PEG 8%
estándar	-	-	100	-	-
inespecífico	-	100	100	100	1000
tubo O	-	100	100	100	1000
curva cal.	100	100	100	100	1000
muestra	100	100	100	100	1000

*Los volúmenes están expresados en  $\mu$ l.*

El PEG 8% se utilizó para facilitar la precipitación del complejo antígeno – anticuerpo. Luego se centrifugó a 2000 g durante 30 min a 4°C en una centrífuga Sorval RC-5B. El sobrenadante se descartó y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo gama. Los resultados se expresaron como ng LH / ml suero.

#### **4.5- Determinación del EGF.**

En primer lugar se puso a punto la técnica de RIA para la determinación de EGF en fluidos de rata y posteriormente se realizaron las mediciones en el líquido amniótico. Esta técnica se basó en la descrita por Carpenter y Cohen en 1976.

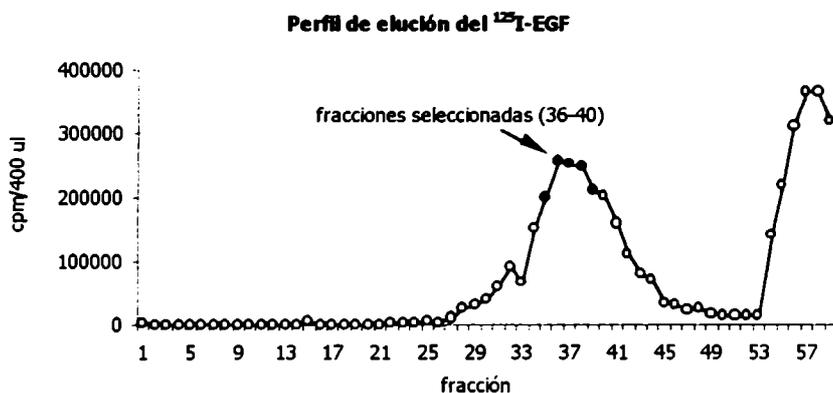
##### **4.5.1- Puesta a punto de la curva de unión antígeno anticuerpo vs concentración de EGF.**

- **Marcación del EGF con I<sup>125</sup>.**

Se agregó EGF 1 $\mu$ g/ $\mu$ l a buffer fosfato 0.05 M pH= 7.5 conteniendo 0.5 mCi de Na<sup>125</sup>I (proporción 2:1 Na<sup>125</sup>I : EGF). Para comenzar la reacción se agregó cloramina T. Se

agitó y se esperaron 20 seg luego de los cuales se detuvo la reacción con metabisulfito de sodio 8 mg/ml. Finalmente se agregó KI 10 mg/ml.

- **Separación del  $^{125}\text{I}$ -EGF.**



Se cargó una columna Sephadex G-50 con la mezcla de reacción y se colectaron fracciones de 400 µl. Se contaron alícuotas de 5 µl en un contador gama (Rak LKB).

- **Determinación de la concentración óptima de primer anticuerpo.**

Las fracciones seleccionadas se incubaron con el primer anticuerpo (anticuerpo policlonal desarrollado en conejo: 1/2500, 1/5000 y 1/50000) durante 72 h a 4°C. Este valor representó la unión máxima del anticuerpo (valor BO).

Las fracciones seleccionadas también se incubaron sin primer anticuerpo para determinar el porcentaje de unión no específica (valor NSB).

Posteriormente, se incubaron las BO y NSB con el segundo anticuerpo (1/50000) resuspendido en 0.5% de suero normal de conejo con PEG 8% para facilitar la precipitación del complejo formado. La incubación se llevó a cabo durante 2 h a 4°C.

Por último, se centrifugó a 1500 g por 30 min y se contó la marca del precipitado en un contador gama Rak LKB.

- **Determinación de la curva estándar.**

Se incubaron sucesivas concentraciones de EGF con el primer anticuerpo (1/50000) durante 72 h a 4°C. Luego se incubó con el segundo anticuerpo (1/50000) por 2 h a 4°C. Finalmente se centrifugó a 1500 g durante 30 min y se contó la marca del precipitado en un contador gama Rak LKB.

#### **4.5.2- Determinación del contenido de EGF en líquido amniótico.**

Se utilizaron muestras de líquido amniótico obtenidas a partir de hembras controles preñadas en día 13 y días 18 a 22.

Se incubaron 100  $\mu$ l de muestra con 100  $\mu$ l de anticuerpo anti – EGF (1/50000) y 100  $\mu$ l de  $^{125}$ I-EGF durante 72 h a 4°C.

Luego se agregó el segundo anticuerpo (250  $\mu$ l, IgG desarrollada en cabra contra conejo, 1/50000) y se incubó durante 2 h a 4°C. El segundo anticuerpo se disolvió en PEG 8% para favorecer la precipitación del complejo antígeno – anticuerpo.

Finalmente, los tubos conteniendo las muestras, los estándares y el inespecífico se centrifugaron a 1500 g durante 30 min a 4°C.

El sobrenadante se descartó y se contó la radioactividad del precipitado. La sensibilidad del método fue de 50 pg/ $\mu$ l. Los resultados se expresaron como pg EGF / ml LA.

### **5- Inmunoelectrotransferencia (Western Blot).**

#### **5.1- Procesamiento de la muestra.**

Los tejidos a -70°C se descongelaron y se homogenizaron en buffer de inhibidores. Para el caso de las COX y los PR, los homogenatos se sonicaron (Ultrasonic Cell Disrupter, Microson, Heat System Inc.) durante 30 segundos y se centrifugaron a 1500 g por 5 min para remover los restos tisulares.

En el caso de las muestras para la determinación del R-EGF y del pR-EGF, luego de la homogenización las muestras se centrifugaron a 2000 g durante 10 min.

La concentración de proteínas se determinó por el ensayo de Bradford (1976).

#### **5.2- Separación electroforética de las proteínas.**

Los sobrenadantes de cada homogenato se hirvieron durante 5 min en buffer muestra. Cada muestra estaba formada por tejido proveniente de 4 animales distintos. Se sembraron 60  $\mu$ g de proteína total en cada calle. Para el caso del pR-EGF se sembraron 100  $\mu$ g de proteína total por calle.

Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) según la técnica descrita por Laemmli (1970).

Las muestras se corrieron primero en un gel concentrador 4% 0.125 M Tris pH=6.8. El porcentaje del gel separador varió de acuerdo a la proteína que se quiso detectar. Para las enzimas COX y el receptor de P<sub>4</sub> se utilizó uno al 7.5% y para el receptor de EGF el gel se preparó al 6%. Las muestras se separaron a 0.03 Amperes constantes hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. Los marcadores de peso molecular (BioRad) se corrieron bajo las mismas condiciones.

Se sembraron los siguientes controles positivos:

- homogenato de macrófagos estimulados con LPS e INF- $\gamma$  para la COX-II
- homogenato de vesícula seminal de carnero para COX-I
- homogenato de glándulas submaxilares de rata para el R-EGF y pR-EGF.

### **5.3- Electrotransferencia de las proteínas.**

Una vez que finalizó la corrida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Sigma, 0.45  $\mu$ m) utilizando un aparato de transblot (BioRad). La transferencia se llevó a cabo a 4°C durante 18 h a voltaje constante (40 V).

La membrana transferida se tiñó con Rojo Punzo S. Esta tinción se realizó con el objetivo de comprobar que las muestras sembradas en cada calle presentaban la misma cantidad de proteínas totales y que el proceso de transferencia se había realizado correctamente.

Posteriormente, las membranas se lavaron exhaustivamente con TBS y se bloquearon durante 60 min a temperatura ambiente en TTBS conteniendo 5% de leche descremada.

### **5.4- Detección inmunológica.**

Luego del bloqueo las membranas se incubaron con el primer anticuerpo por 18 h a 4°C. A continuación se detallan las características de los anticuerpos empleados:

Tipo de anticuerpo	Dilución empleada	Dilución del segundo anticuerpo

Los primeros anticuerpos son policlonales desarrollados en conejo y las diluciones de los mismos se realizaron en TBS.

Las membranas se lavaron tres veces por 10 min en TTBS y posteriormente se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo diluido en TBS. Luego, las membranas se lavaron como se mencionó para el primer anticuerpo.

Los segundos anticuerpos utilizados están acoplados a fosfatasa alcalina. El revelado de la membrana se realizó con la sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil toluidina fosfato ( $\beta$ CIP) y azul de p-nitrotetrazolio (N $\beta$ T) (Sigma).

### 5.5- Identificación de las bandas proteicas.

Las bandas proteicas se identificaron mediante el uso de los marcadores de peso molecular y los controles positivos. La ubicación de cada banda se calculó usando una regresión logarítmica a partir de las posiciones de los marcadores de peso molecular. La posición de cada banda se tomó como la distancia desde el origen de la corrida hasta el centro de cada una.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida (mm) por la proteína a determinar}}{\text{distancia recorrida (mm) por la proteína patrón}}$$

Las membranas se digitalizaron mediante un scanner UMAX Astra 1220S y la intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J (NIH). Los resultados se expresaron como la densidad óptica relativa a la actina.

## **6- Medición de la contractilidad uterina.**

Se extrajeron cuernos uterinos a partir de hembras sham y de hembras tratadas con EGF y se colocaron en medio KRB a temperatura ambiente. Cada cuerno se dividió por un corte transversal en dos mitades iguales. Los segmentos se colocaron en cajas de Petri conteniendo solución KRB a temperatura ambiente y gaseado constante con 95% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>.

Cada segmento (1cm) se abrió mediante un corte longitudinal; uno de los extremos se sujetó a una vara de vidrio y se sumergió en una cámara conteniendo 20 ml de la solución KRB a 37°C y gaseado constante. El otro extremo del tejido se sujetó a un calibrador de tensión conectado a un amplificador que dirige directamente la escritura del oscilógrafo.

Luego se aplicó una tensión de descanso de 1 g a cada segmento del tejido y se midió la tensión isométrica desarrollada (IDT) y la frecuencia de las contracciones (FC).

Los valores IDT (expresados en mg) representan la amplitud media de todas las contracciones medidas durante un periodo de 10 min. Los valores FC son el número medio de los ciclos de contracción observados durante el mismo periodo.

Los segmentos uterinos fueron previamente incubados sin tensión durante 10 minutos en las cámaras.

Las variaciones en el IDT y la FC durante el período de incubación son expresadas como el porcentaje de cambio con respecto al control.

## **7- Técnica de histología.**

Se utilizaron ovarios provenientes de hembras controles preñadas de 13 días, de hembras sham preñadas de 21 y 22 días y de hembras tratadas con EGF a las 4 h, 8 h, 12 h, 24 h (día 22) y 48 h (día 23) post – tratamiento.

En primer lugar, los ovarios se colocan en una solución de PFA 4% durante 18 h a 4°C. Luego, el tejido se deshidrató mediante sucesivos pasajes en alcoholes (desde 70%

hasta 100%). Cada incubación se realizó por 18 h a temperatura ambiente. Finalmente, se incluyeron en parafina y se realizaron los cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor.

Previo a proceder con la técnica de tinción con hematoxilina – eosina, se procedió a eliminar la parafina de los cortes histológicos incluidos en parafina.

Luego de la tinción, los cortes se montaron con Permount.

Se tomaron fotos de los ovarios provenientes de hembras controles, hembras sham y hembras tratadas con EGF a dos aumentos: 2.5x y 40x. El factor de conversión utilizado fue de 1.25.

Se contaron los tipos celulares de interés en un campo con aumento 40x. El número de células se normalizó a 100 células totales.

## **8- Análisis estadísticos.**

La evaluación estadística se realizó aplicando la prueba de ANOVA (uno o dos factores) seguido de una Comparación Múltiple de Tukey's. Para el caso de dos tratamientos, la prueba estadística empleada fue el "t" de Student.

Los datos fueron expresados como los valores medios  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Cuando  $p < 0.05$  se consideraron significativas las diferencias entre las medias.

**resultados**

## **1- Estudio de la administración i/u de EGF sobre el inicio del parto.**

En primer lugar se estudió si el EGF era capaz de modular el inicio del parto.

Para ello, se realizó una curva dosis – respuesta del mismo en distintos días de gestación. Hembras preñadas de 20, 21 o 22 días recibieron una dosis única i/u de EGF. Las dosis ensayadas fueron 15, 30, 60, 120, 250 o 500 ng. Los animales sham recibieron el mismo volumen i/u de solución salina (el vehículo en el que se disolvió el EGF) en los días de gestación mencionados.

Se registró el día y la hora de inicio del trabajo de parto.

El inicio del parto en los animales tratados con solución salina (sham), ocurrió en promedio el día 22 de gestación a las 20:00 h, con una variación aproximada de 2 horas, hecho que no difirió de las hembras control (hembras no tratadas). Este resultado nos muestra que la inyección intra – uterina *per se* no afectó el inicio del parto (Tabla 1).

Ninguna de las dosis estudiadas modificó el inicio del parto cuando se administraron en el día 22 de preñez.

El parto de los animales tratados con 15, 30 o 60 ng de EGF en los días 20, 21 o 22 de preñez comenzó durante la noche del día 22, al igual que el de las hembras sham.

La dosis de 120 ng de EGF administrada en el día 20 de gestación no afectó el inicio del trabajo de parto. Sin embargo, las dosis de 250 y 500 ng de EGF administradas en el día 20 de gestación retrasaron el inicio del parto en  $12.8 \pm 0.4$  y  $10 \pm 0.3$  h respectivamente. La diferencia de dos horas que se registró entre estas dosis no fue significativa.

Tanto la dosis de 120 ng como las de 250 y 500 ng de EGF fueron capaces de retrasar el inicio del parto cuando se administraron en el día 21 de gestación: 120 ng de EGF:  $9.9 \pm 1.0$  h, 250 ng de EGF:  $12.9 \pm 0.8$  h y 500 ng de EGF:  $19.8 \pm 0.7$  h, con respecto a las hembras sham (Figura 1).

Estos resultados muestran que el parto de las hembras tratadas con EGF i/u en el día 21 de preñez, comenzó el día 23 de gestación (48 h post – administración de EGF) en lugar de en el día 22 como ocurrió en los animales sham.

Este efecto sobre el inicio del parto parecería ser dosis – dependiente, ya que a medida que se incrementó la dosis de EGF, el retraso sobre el inicio del parto fue mayor. La diferencia en horas entre las tres dosis ensayadas fue estadísticamente significativa.

El retraso de 19 h observado para la dosis de 500 ng administrada en el día 21 de gestación equivale, aproximadamente, a un 5% de la duración total de la preñez. En el caso de la gestación en humanos, 5% de la gestación representa dos semanas de embarazo.

A pesar de que el tratamiento con EGF afectó el tiempo total de la preñez retrasando el inicio del parto, el tratamiento no modificó la duración total del trabajo de parto.

Por otro lado, la administración de EGF tampoco modificó el comportamiento general de las hembras ni de las crías. Las madres tratadas con EGF alimentaron y cuidaron a sus crías como lo hicieron las hembras sham.

Como se muestra en la siguiente tabla, el número de crías nacidas y el peso de las mismas no se modificaron por el tratamiento con EGF:

	<b>sham</b>	<b>500 ng de EGF</b>
Número de crías		
Peso de las crías		

<b>Dosis de EGF administrado</b>							
	<b>sham</b>	<b>15 ng</b>	<b>30 ng</b>	<b>60 ng</b>	<b>120 ng</b>	<b>250 ng</b>	<b>500 ng</b>
<b>día 20</b>						12.8 ± 0.4 <sup>A</sup>	10.3 ± 0.3 <sup>A</sup>
<b>día 21</b>					9.9 ± 1 <sup>A</sup>	12.9 ± 0.8 <sup>A,B</sup>	19.8 ± 0.7 <sup>C,D</sup>
<b>día 22</b>							

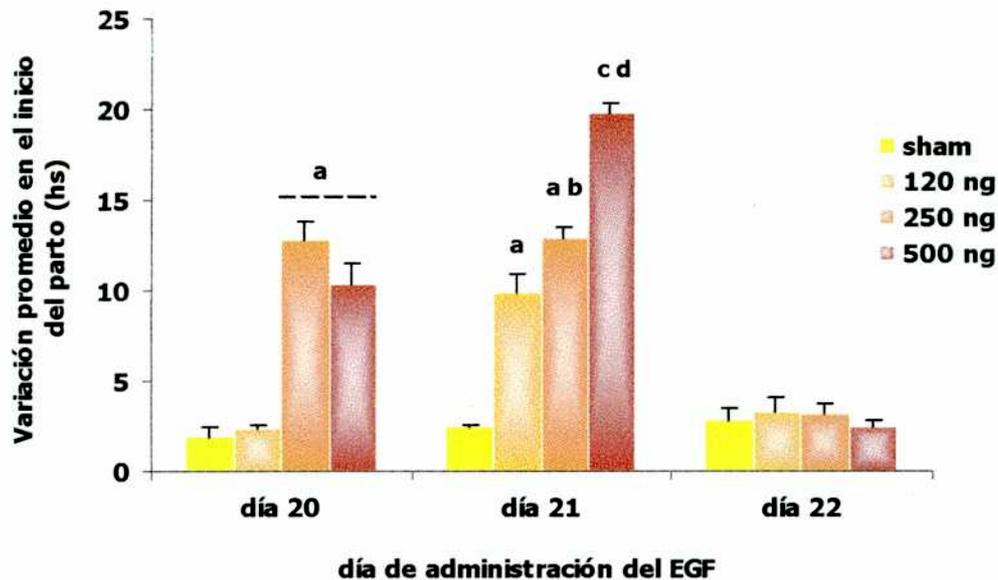
**Tabla 1**

**Efecto de la administración i/u de EGF sobre el inicio del parto.**

Hembras preñadas en día 20, 21 y 22 recibieron una dosis i/u de EGF. Las hembras sham se trataron con 250 µl de solución fisiológica i/u. Se registró la hora y el día de inicio del parto. El parto en las hembras sham ocurrió en el día 22 de gestación. Los valores se expresan como la variación promedio (en horas) en el inicio del parto comparado con las hembras sham (parto: 8 pm).

<sup>A</sup>p < 0.01 vs sham; <sup>B</sup>p < 0.05 vs 120 ng EGF; <sup>C</sup>p < 0.001 vs control; <sup>D</sup>p < 0.01 vs 120 y 250 ng EGF.

n=6 para cada día y dosis analizados.



**Figura 1.**

**Efecto de la administración i/u de EGF sobre el inicio del parto.**

Hembras preñadas de día 20, 21 y 22 recibieron una dosis intra-uterina de EGF (120, 250 o 500 ng). Las hembras sham recibieron 250  $\mu$ l de solución fisiológica.

El gráfico representa la variación promedio en horas en el inicio del parto con respecto a las hembras sham.

a:  $p < 0.01$  vs sham; b:  $p < 0.05$  vs 120 ng EGF; c:  $p < 0.001$  vs control; d:  $p < 0.01$  vs 120 ng/250 ng EGF

n=6 para cada día y dosis analizados

## **2- Análisis del mecanismo de acción del EGF sobre el inicio del parto.**

El hecho que el EGF produjera un importante retraso en el inicio del parto, nos llevó a estudiar algunos de los principales factores involucrados en este evento, para determinar cuál o cuáles estaban afectados por el tratamiento con EGF.

Para ello, se siguió el siguiente diseño experimental:



Tanto los animales sham (inyectados i/u con solución fisiológica) como los tratados con EGF en el día 21 de gestación, se sacrificaron el día 22 entre las 10 y las 11 de la mañana.

## **2.1- Efecto de la administración i/u de EGF sobre la síntesis uterina de PGs.**

Varios autores han informado que las PGs son las responsables de desencadenar las contracciones uterinas necesarias para la expulsión fetal (Romero y col. 1994, Bukowski y col. 2001). En particular, las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> son potentes estimuladores de la contractilidad miometrial y son producidas por los tejidos reproductivos durante el parto (Gu 1990). Ambas PGs poseen actividad uterotónica (Vane 1973).

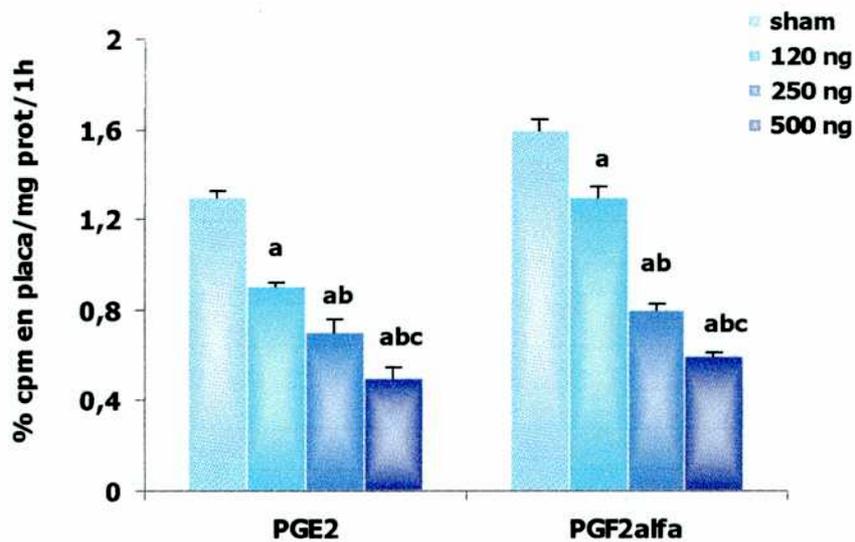
Previamente, habíamos observado que la administración i/u de 120, 250 y 500 ng de EGF en el día 21 de gestación provocaba, en forma dosis – respuesta, un retraso sobre el inicio del parto.

Por ello, decidimos investigar si estas dosis de EGF modificaban la duración de la preñez a través de una modulación sobre la síntesis de PGs.

Los fragmentos uterinos provenientes de animales sham y de los animales tratados con EGF (120, 250 y 500 ng), se incubaron con [<sup>14</sup>C]-AA, precursor en la síntesis de PGs, durante 1 h y se cuantificó la producción de PGs.

Las tres dosis de EGF administradas en el día 21 de gestación disminuyeron significativamente la producción uterina de las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>, comparada con los valores obtenidos para las hembras sham (Figura 2).

El efecto del EGF sobre la síntesis de PGs fue dosis – dependiente, ya que a medida que se incrementó la dosis administrada de EGF, el efecto inhibitorio sobre la producción de ambas PGs fue estadísticamente mayor.



**Figura 2.**

**Efecto de la administración i/u de EGF sobre la síntesis uterina de PGs.**

Se estudió la producción uterina de PGs en animales sham y tratados con 120, 250 o 500 ng de EGF i/u en el día 21 de gestación.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con n=4 fragmentos uterinos.

a:  $p < 0.001$  vs sham; b:  $p < 0.01$  vs 120 ng EGF; c:  $p < 0.001$  vs 250 ng EGF

Teniendo en cuenta que la dosis de 500 ng de EGF administrada en el día 21 de gestación fue la más efectiva sobre el retraso del inicio del parto y sobre la síntesis de PGs, decidimos continuar los estudios utilizando esta dosis.

## **2.2- Detección de las isoformas de la COX en el útero de rata tratada con EGF.**

La COX es la enzima que cataliza la conversión de AA a prostanoïdes bioactivos. Como se mencionó anteriormente, existen dos isoformas, COX-I y COX-II.

Gross y colaboradores, en 1998, informaron que en ratones deficientes en COX-I, la producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  fue significativamente menor al final de la preñez. Por otro lado, un gran número de trabajos muestran que cantidades crecientes de PGs (especialmente  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) y la inducción de la COX-II, son detectadas en el tejido uterino durante el parto a término (Gu 1990, Vane 1973).

Dado que la síntesis de PGs se vio afectada por la administración i/u de 500 ng de EGF en el día 21 de gestación, decidimos determinar si esta dosis de EGF tenía además un efecto sobre el nivel proteico de las isoformas de la COX.

Previo al análisis de cada extracto proteico, las muestras fueron sometidas a una cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Cada muestra fue sembrada en carriles separados, las proteínas totales de cada extracto fueron separadas por electroforesis (SDS – PAGE) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos correspondientes.

Las bandas de cada fracción proteica obtenida en los diferentes estadios analizados fueron normalizadas contra actina (43 KDa), como una medida de control de siembra constante en cada carril.

En la Figura 3 podemos observar el nivel proteico de la COX-I y la COX-II uterinas bajo las diferentes condiciones experimentales. El nivel proteico de ambas enzimas se encontró disminuido por el tratamiento con EGF, hecho que correlacionó con el nivel de PGs cuantificado por radioconversión.

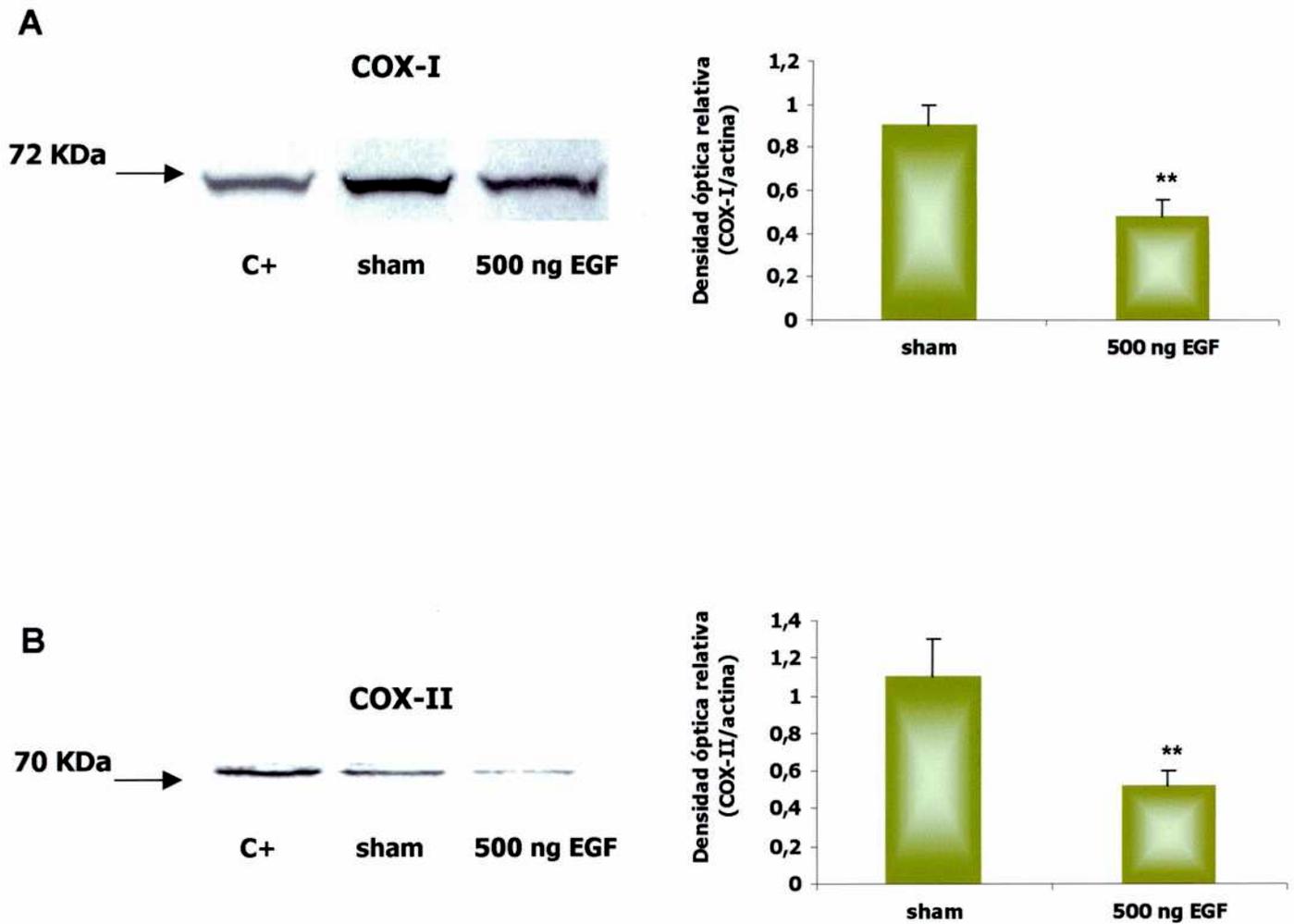
En la Figura 3A, se observa que una fracción proteica de aproximadamente 72 KDa fue reconocida por el anticuerpo dirigido contra COX-I. El carril 1 presenta una banda correspondiente a un lisado de vesícula seminal de carnero (control positivo), mientras que las calles siguientes corresponden a las fracciones proteicas de los diferentes tratamientos.

El análisis densitométrico de las bandas revela que la isoforma COX-I disminuyó por la administración i/u de 500 ng de EGF con respecto a las hembras sham ( $p < 0.01$ ).

La Figura 3B revela que la isoforma COX-II se encuentra presente en el útero, ya que el anticuerpo contra COX-II reaccionó específicamente con una banda de 70 KDa en las fracciones provenientes de las hembras sham (carril 2) y de las ratas tratadas con EGF (carril 3). En el primer carril se observa una banda correspondiente a macrófagos murinos estimulados con LPS e INF- $\gamma$  (control positivo).

La administración i/u de 500 ng de EGF en el día 21 de gestación disminuyó significativamente el nivel proteico de la COX-II uterina ( $p < 0.01$ ).

Así, estos resultados muestran que la administración i/u de 500 ng de EGF en el día 21 de gestación disminuye tanto el metabolismo del AA como el nivel proteico de las isoformas de las COX uterinas.



**Figura 3.**

**Detección de COX-I y COX-II en el útero de rata tratada con EGF.**

A- WB representativo y análisis densitométrico de las bandas obtenidas de COX-I.

B- WB representativo y análisis densitométrico de las bandas obtenidas de COX-II.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con n=4 fragmentos uterinos.

\*\* p < 0.01 vs control

### **2.3- Efecto de la administración i/u de EGF sobre las contracciones miométriales.**

Como ya hemos mencionado, las PGs participan de los mecanismos involucrados en el inicio y la progresión del parto. Las  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  son potentes estimuladores de la contractilidad del miometrio uterino (Wiqvist 1983).

Dado que la administración de EGF disminuyó tanto la síntesis de PGs como el nivel proteico de ambas isoformas de la COX, decidimos investigar si este tratamiento era capaz de modificar el perfil de las contracciones uterinas en las ratas preñadas a término.

Fragmentos uterinos provenientes de hembras sham y de hembras inyectadas i/u con 500 ng de EGF en el día 21 de gestación, fueron montados en un aparato de contractilidad acoplado a un oscilógrafo, luego de lo que se determinaron la amplitud (IDT) y la frecuencia de las contracciones miométriales.

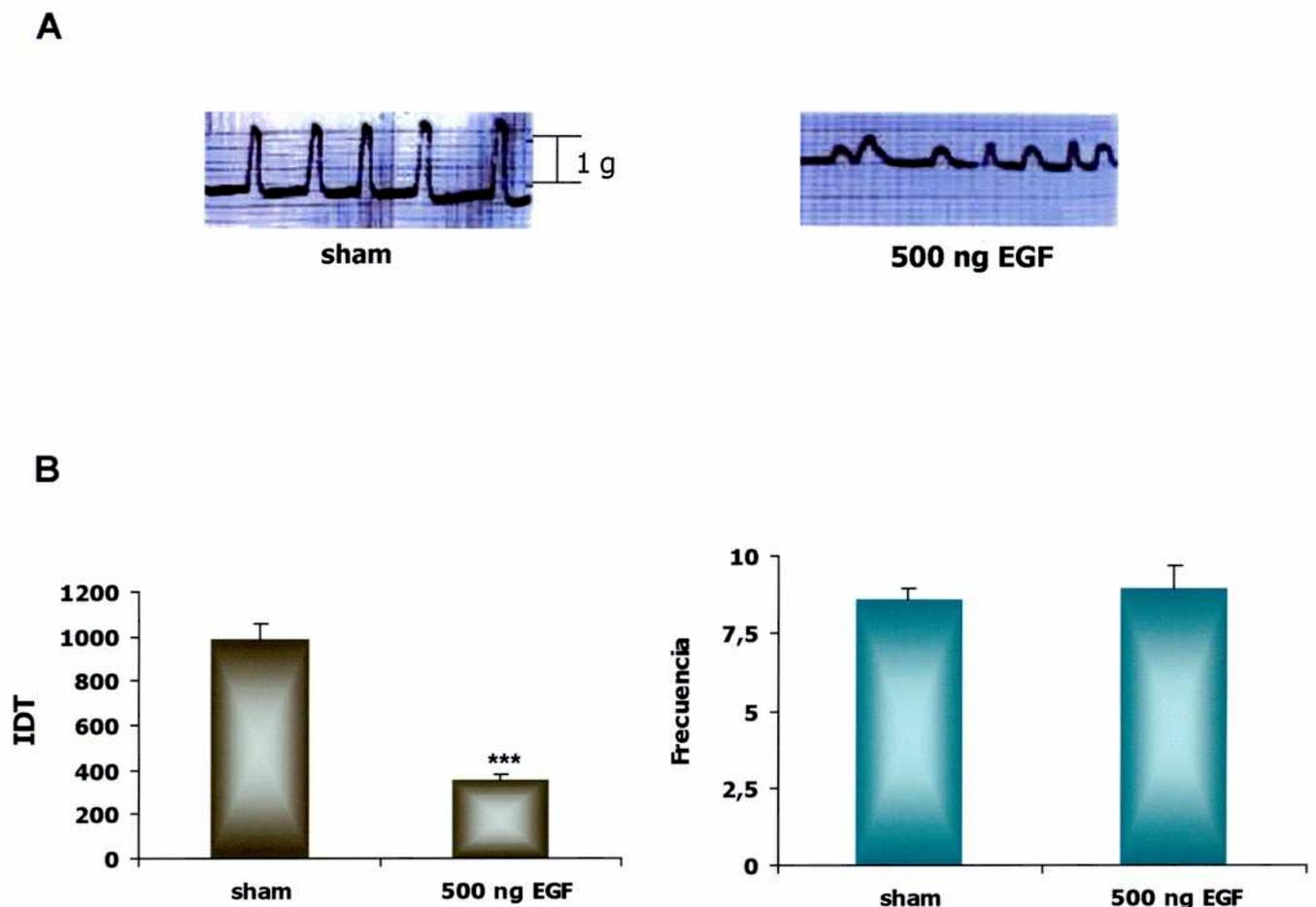
La Figura 4 muestra un perfil de contractilidad miométrial representativo. Se observa que la administración i/u de 500 ng EGF en el día 21 de gestación fue capaz de modular la contractilidad uterina en las ratas preñadas a término (Figura 4A).

El tratamiento con EGF disminuyó significativamente la amplitud de las contracciones uterinas con respecto a las hembras sham, pero no fue capaz de modificar la frecuencia de las mismas (Figura 4B).

La amplitud de las contracciones uterinas registrada para los úteros provenientes de las hembras tratadas con EGF fue, aproximadamente, un 60% menor que la registrada para el tejido uterino proveniente de los animales sham.

Se observa además que las contracciones miométriales de las hembras sham presentaron un patrón constante en el tiempo. Sin embargo, las contracciones miométriales de las ratas tratadas con EGF no tuvieron un patrón de repetición del registro de contracción.

Estos resultados muestran que la administración i/u de EGF además de inhibir la producción de PGs, mediadoras de la contractilidad uterina, modificó la actividad contráctil miométrial.



**Figura 4.**

**Efecto de la administración i/u de EGF sobre las contracciones miométriales.**

Hembras preñadas de 21 días recibieron 500 ng i/u de EGF. Las hembras sham recibieron 250  $\mu$ l de solución fisiológica.

A- Perfil representativo de las contracciones uterinas registradas para las hembras sham y tratadas con EGF.

B- Amplitud y frecuencia de las contracciones correspondientes a las hembras sham y tratadas con EGF. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con n=4 fragmentos uterinos.

\*\*\*  $p < 0.05$  vs control

## **2.4- Efecto de la administración i/u de EGF sobre la concentración de PGs en líquido amniótico.**

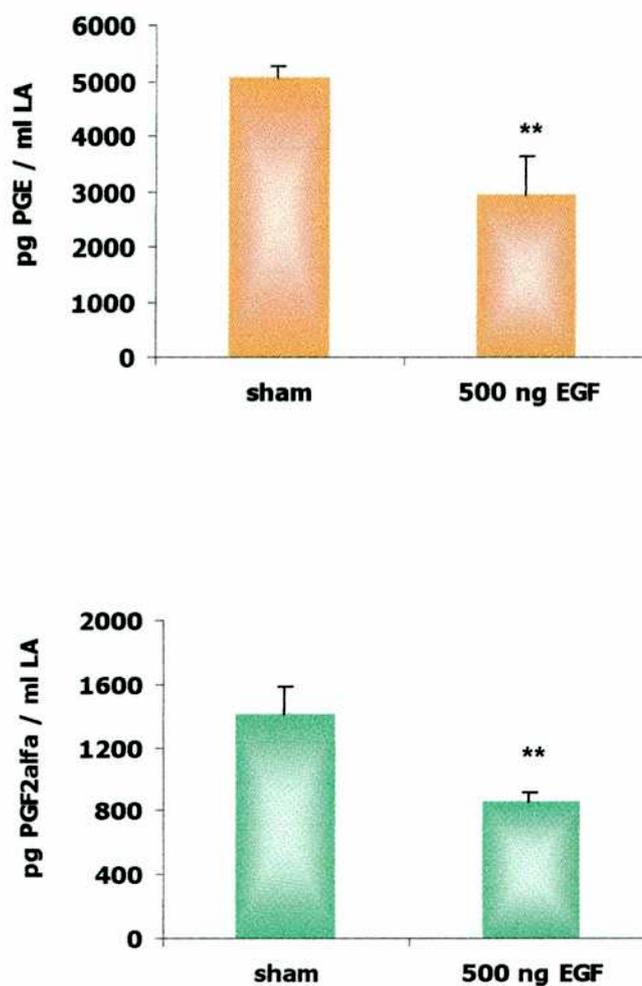
La concentración de prostanoïdes y sus metabolitos en el plasma y en el fluido amniótico comienza a aumentar previo al inicio del trabajo de parto a término y continúa aumentando durante todo el proceso de parto (Romero y col. 1994). Estos cambios están acompañados por un aumento en la estimulación de la actividad y la expresión de enzimas claves en el metabolismo del AA (Skinner y Challis 1985).

Los resultados muestran que la administración i/u de 500 ng de EGF en el día 21 de gestación disminuye en el útero tanto la actividad como la expresión de las COX.

Basados en esto, decidimos investigar si la concentración de PGs en líquido amniótico se encontraba alterada por el tratamiento con EGF.

Para ello realizó un radioinmunoanálisis (RIA) a partir de las muestras de líquido amniótico extraídas de ratas sham y de ratas tratadas con EGF.

Se observó que la administración de EGF disminuyó significativamente la concentración de la PGE<sub>2</sub> ( $p < 0.01$ ) y de la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ( $p < 0.01$ ), comparada con la concentración obtenida para estos prostanoïdes en el líquido amniótico proveniente de las hembras sham (Figura 5).



**Figura 5.**

**Efecto de la administración i/u de EGF sobre la concentración de  $PGF_{2\alpha}$  y PGE en líquido amniótico.**

Hembras preñadas de 21 días recibieron 500 ng i/u de EGF. Las hembras sham recibieron 250  $\mu$ l de solución fisiológica. Se determinó por RIA la concentración de PGs en líquido amniótico.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con n=6.

\*\*  $p < 0.01$  vs control

## **2.5- Efecto de la administración i/u de EGF sobre el nivel sérico de progesterona.**

La progesterona juega un rol preponderante en el establecimiento y mantenimiento de la preñez. La P<sub>4</sub> participa durante las primeras etapas de la gestación preparando el endometrio para la implantación fetal y el crecimiento del embrión. Se ha observado que la concentración de P<sub>4</sub> disminuye previo al inicio del trabajo de parto en numerosas especies, incluidas la rata (Sanyal 1978) y el ratón (Soares y Talamantes 1984).

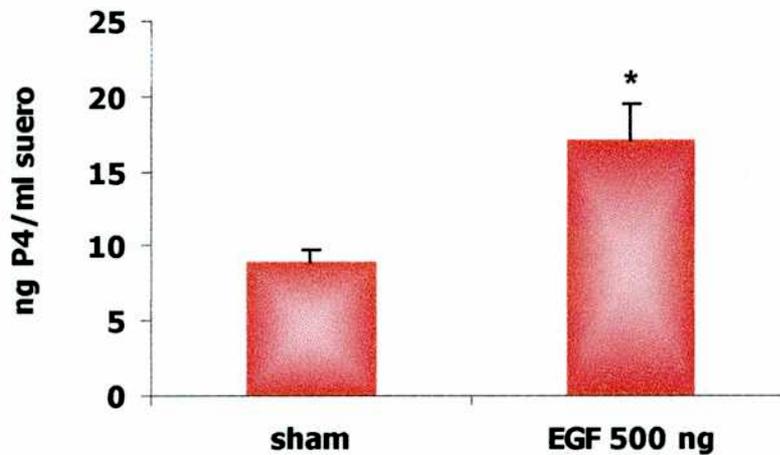
Desde hace ya muchos años, Csapo (1956) ha sugerido que en roedores la caída en el nivel de progesterona sería una de las señales para el inicio del parto.

Dado que en las hembras tratadas con EGF el parto comienza aproximadamente 19 h después que el de las hembras sham, decidimos investigar si la administración i/u de 500 ng de EGF era capaz de modular el nivel sérico de progesterona.

Para ello se realizó un RIA a partir de muestras de suero extraídas de ratas sham y de ratas tratadas con EGF.

Los resultados indicaron que el tratamiento intra-uterino con EGF aumentó la concentración de progesterona en suero, comparada con la obtenida en las hembras que recibieron solución fisiológica (Figura 6).

La concentración de progesterona sérica obtenida en sueros provenientes de hembras tratadas con EGF i/u fue aproximadamente el doble del valor observado en los de hembras sham ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.**

**Efecto de la administración i/u de EGF sobre el nivel de P<sub>4</sub> en suero.**

Hembras preñadas 21 días recibieron 500 ng intra-uterinos de EGF. Las hembras sham recibieron 250  $\mu$ l de solución fisiológica. Se determina por RIA la concentración de progesterona sérica.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con sueros provenientes de n=5 hembras.

\* p < 0.05 vs control

## **2.6- Efecto del EGF sobre la LH sérica.**

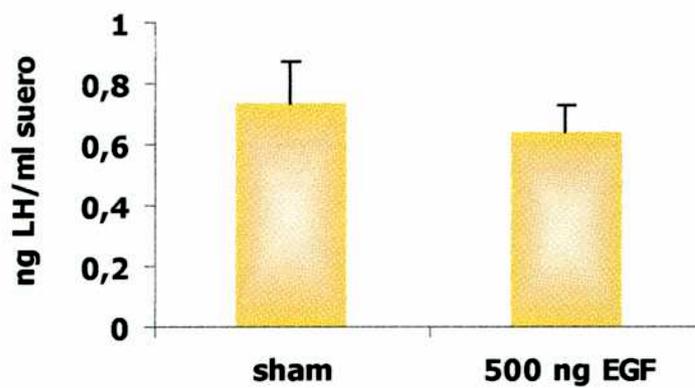
La función reproductora normal se caracteriza por una serie de cambios cíclicos en la producción ovárica de hormonas esteroides (estradiol y progesterona) suscitados por cambios cíclicos en la secreción hipofisaria de LH y FSH y de los pulsos de hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH).

El desarrollo y el funcionamiento del cuerpo lúteo se hallan bajo control hormonal. El pico ovulatorio de LH estimula la luteinización de las células de la granulosa durante el ciclo ovárico. Niveles menores de LH, segregados en pulsos adecuados, como ocurre durante la gestación, pueden mantener a partir de entonces una elevada tasa de producción de progesterona por el cuerpo lúteo.

Dado que se observó un efecto del EGF sobre la concentración de progesterona sérica, el próximo paso fue investigar si el tratamiento i/u con 500 ng de EGF en el día 21 de gestación modulaba la secreción de LH.

Para ello se realizó un RIA a partir de muestras de suero extraídas de ratas sham y de ratas tratadas con EGF.

Los resultados muestran que el tratamiento con EGF no afectó la concentración sérica de LH con respecto a las hembras sham (Figura 7).



**Figura 7.**

---

**Efecto de la administración i/u de EGF sobre el nivel sérico de LH.**

Hembras preñadas de día 21 recibieron 500 ng intra-uterinos de EGF. Las hembras sham recibieron 250  $\mu$ l de solución fisiológica. Se determina por RIA la concentración de LH sérica.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos realizados con sueros provenientes de n=5 hembras.

## 2.7- Estudio temporal del efecto del EGF sobre el útero y el ovario.

En nuestro laboratorio hemos observado que hacia el final de la gestación en la rata, se produce un aumento en la expresión de la COX-I uterina. Varios autores han propuesto que este aumento de COX-I estimularía la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por el útero, desencadenándose entonces la luteólisis y la consecuente caída de progesterona sérica, evento necesario para el desencadenamiento del parto. Ratones deficientes en COX-I tienen una producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  significativamente menor hacia el final de la preñez y retraso en el inicio del parto. La administración de dicho prostanoide, restauró en estos ratones el inicio del parto (Gross y col. 1998). Es por ello que se postula a la COX-I como la isoforma responsable de la síntesis de la PGF luteolítica y de la caída de progesterona; mientras que la COX-II contribuiría al aumento de la contractilidad miometrial.

Los resultados mostrados hasta el momento indican que el tratamiento i/u con 500 ng de EGF en el día 21 de gestación es capaz de:

- disminuir la expresión de COX-I uterina
- reducir la producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina
- aumentar el nivel de  $\text{P}_4$  sérica

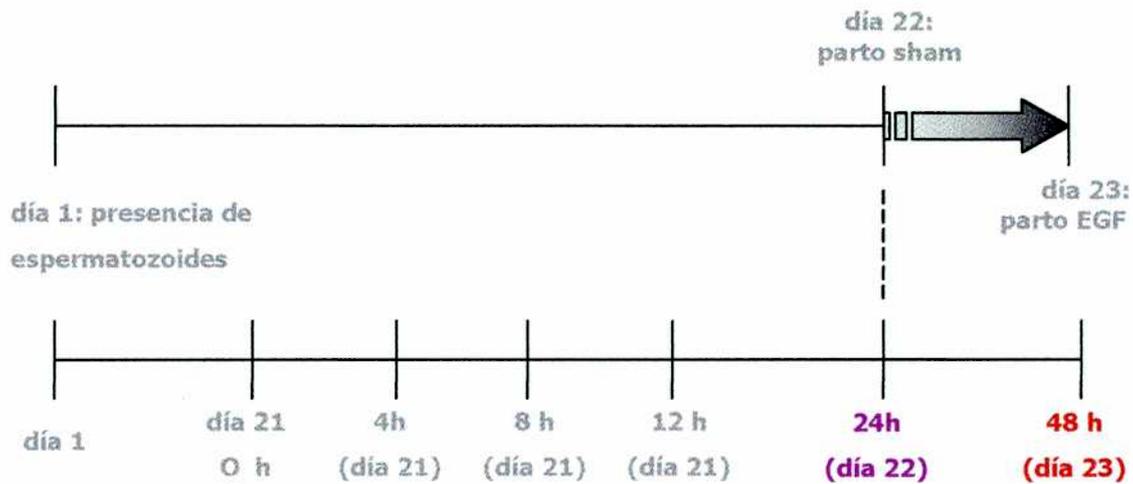
El EGF podría estar retrasando la luteólisis funcional necesaria para el inicio del parto, lo que explicaría el aumento de la progesterona sérica observado. Este efecto podría ser ejercido por dos vías:

- 1- en el ovario:** actuando sobre el CL modulando la síntesis y/o la secreción de  $\text{P}_4$  y/o
- 2- en el útero:** regulando la expresión de COX-I y la síntesis de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (PGs luteolítica, que posteriormente impactará sobre el CL).

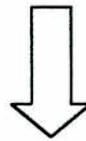
Para estudiar si el útero y/o el ovario estaban involucrados en el efecto del EGF, hembras preñadas de 21 días recibieron una dosis i/u de 500 ng de EGF y fueron sacrificadas 4 h, 8 h, 12 h, 24 h (día 22) y 48 h (día 23) post – administración de EGF. Las hembras sham recibieron 250  $\mu\text{l}$  de solución fisiológica y se sacrificaron a las 4 h, 8 h, 12 h y 24 h (día 22) luego del tratamiento. Las 24 h post – tratamiento

corresponden al día 22 de gestación (día del parto en las hembras sham) y las 48 h post – tratamiento corresponden al día del parto en las hembras tratadas con EGF.

En el siguiente esquema se presenta el diseño experimental seguido en esta sección:



- 500 ng i/u  
- sham: sc. fisiológica



Las hembras sham se sacrificaron a las 0 h, 4 h, 8 h, 12 h y 24 h luego de la administración de solución fisiológica.

Las hembras tratadas se sacrificaron a las 4 h, 8 h, 12 h, 24 h y 48 h luego de la administración del EGF.

### **2.7.1- Efecto del EGF en el tiempo sobre la síntesis de PGF<sub>2α</sub> uterina.**

Datos de la literatura indican que previo al inicio del trabajo de parto se produce un aumento en la síntesis de PGs uterinas (Thornburn y col. 1988). Probablemente la desaparición de factores inhibitorios permitiría, en primera instancia, la expresión de la COX-I en el útero (Scaramuzzi y Baird 1976), desencadenando el aumento de la síntesis de PGF<sub>2α</sub>, conocida PGs luteolítica (Gross y col. 1998).

Sobre la base de estos antecedentes y de los resultados hasta aquí obtenidos, se decidió estudiar el perfil de síntesis de la PGF<sub>2α</sub> en el tiempo, luego de la administración i/u de 500 ng de EGF en el día 21 de gestación.

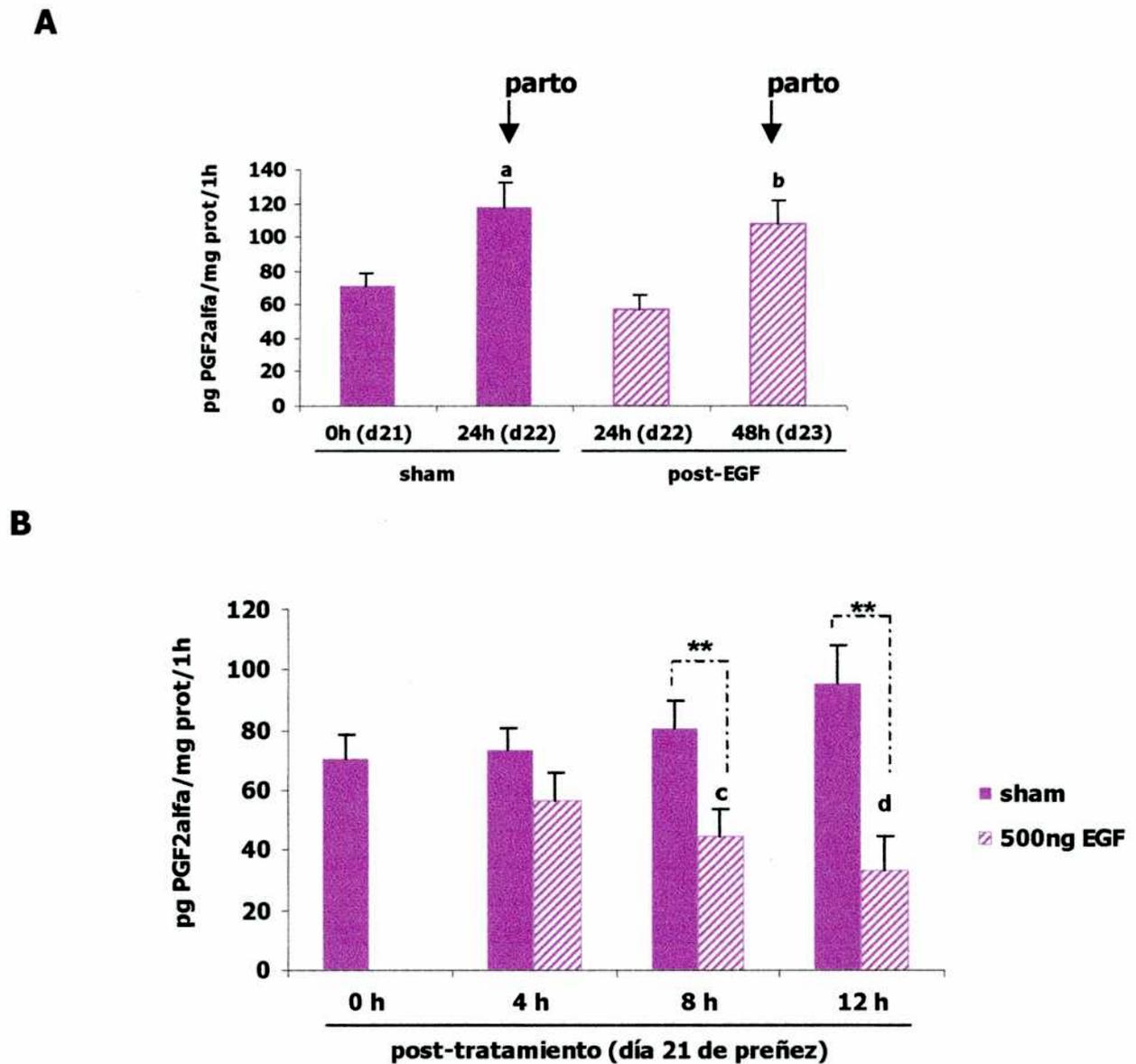
Para ello, se cuantificó por RIA la liberación de PGF<sub>2α</sub> a partir de fragmentos uterinos obtenidos en las condiciones ya mencionadas.

En la Figura 8A se observa que a las 24 h del tratamiento con EGF (día 22), la síntesis de PGF<sub>2α</sub> uterina estaba disminuida con respecto a lo observado a las 24 h (día 22) para los animales sham y fue similar a la obtenida a las 0 h en las hembras sham preñadas de 21 días.

Adicionalmente, cuando se analiza la producción uterina de PGF<sub>2α</sub> de animales tratados con EGF, se observa que a las 48 h (día 23 de gestación, momento en el cual ocurre el parto), los niveles de PGF<sub>2α</sub> fueron similares a los obtenidos en el día 22 para las hembras sham.

En la Figura 8B se muestra la síntesis de la PGF<sub>2α</sub> a las 4 h, 8 h y 12 h post – tratamiento. En el caso de las hembras sham la síntesis de PGF<sub>2α</sub> aumenta significativamente a lo largo de las horas registradas.

El tratamiento con EGF moduló progresivamente en el tiempo la inhibición sobre la síntesis de la PGF<sub>2α</sub> e invierte el perfil obtenido para los animales sham. A las 8 h (día 21) post – administración de EGF comenzó a disminuir la síntesis del prostanoide con respecto a las 0 h (día 21, sham), haciéndose mínima a las 12 h (día 21) post – tratamiento. Ya a las 24 h (día 22) la producción de PGF<sub>2α</sub> volvió a aumentar en los animales tratados con EGF, y como se mencionó en la Figura 8A, el valor obtenido fue similar al del día 21 de gestación (0 h) en las hembras sham.



**Figura 8.**

**Estudio de la producción uterina de PGF<sub>2α</sub> luego del tratamiento i/u con EGF.**

A- Producción uterina de PGF<sub>2α</sub> en hembras sham (0 h día 21, 24 h día 22) y en hembras tratadas con 500 ng de EGF i/u (24 h día 22, 48 h día 23).

B- Perfil de producción PGF<sub>2α</sub> uterina luego del tratamiento con solución fisiológica (sham) o con 500 ng EGF en el día 21 de gestación.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con n=4 fragmentos uterinos.

a:  $p < 0.001$  vs 24h (d22); b:  $p < 0.001$  vs 24h (d22) y 48h (d23)

c:  $p < 0.01$  vs 0h (d21) y 4h (d21); d:  $p < 0.001$  vs el resto de los tratamientos

\*\*  $p < 0.01$  sham vs 500 ng EGF

### **2.7.2- Efecto del EGF en el tiempo sobre la expresión de COX-I.**

Los estudios anteriores sugerían un efecto del EGF sobre el sistema COX / PGs en el útero de rata preñada a término. Como ya hemos mencionado, se postula que a término un incremento en la expresión de COX-I produciría un aumento en la síntesis de la  $PGF_{2\alpha}$ , necesario para el desencadenamiento de la luteólisis y posteriormente del parto.

Por lo tanto se investigó el nivel proteico de la COX-I en extractos proteicos provenientes de fragmentos uterinos de animales sham y de hembras tratadas con EGF.

Los distintos fragmentos uterinos fueron sometidos a un análisis por Western Blot. Cada muestra fue sembrada en carriles separados, las proteínas totales separadas electroforéticamente y posteriormente, transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con el anticuerpo correspondiente como se detalla en materiales y métodos. Se realizó un análisis densitométrico y la normalización de cada banda obtenida con respecto a la proteína actina.

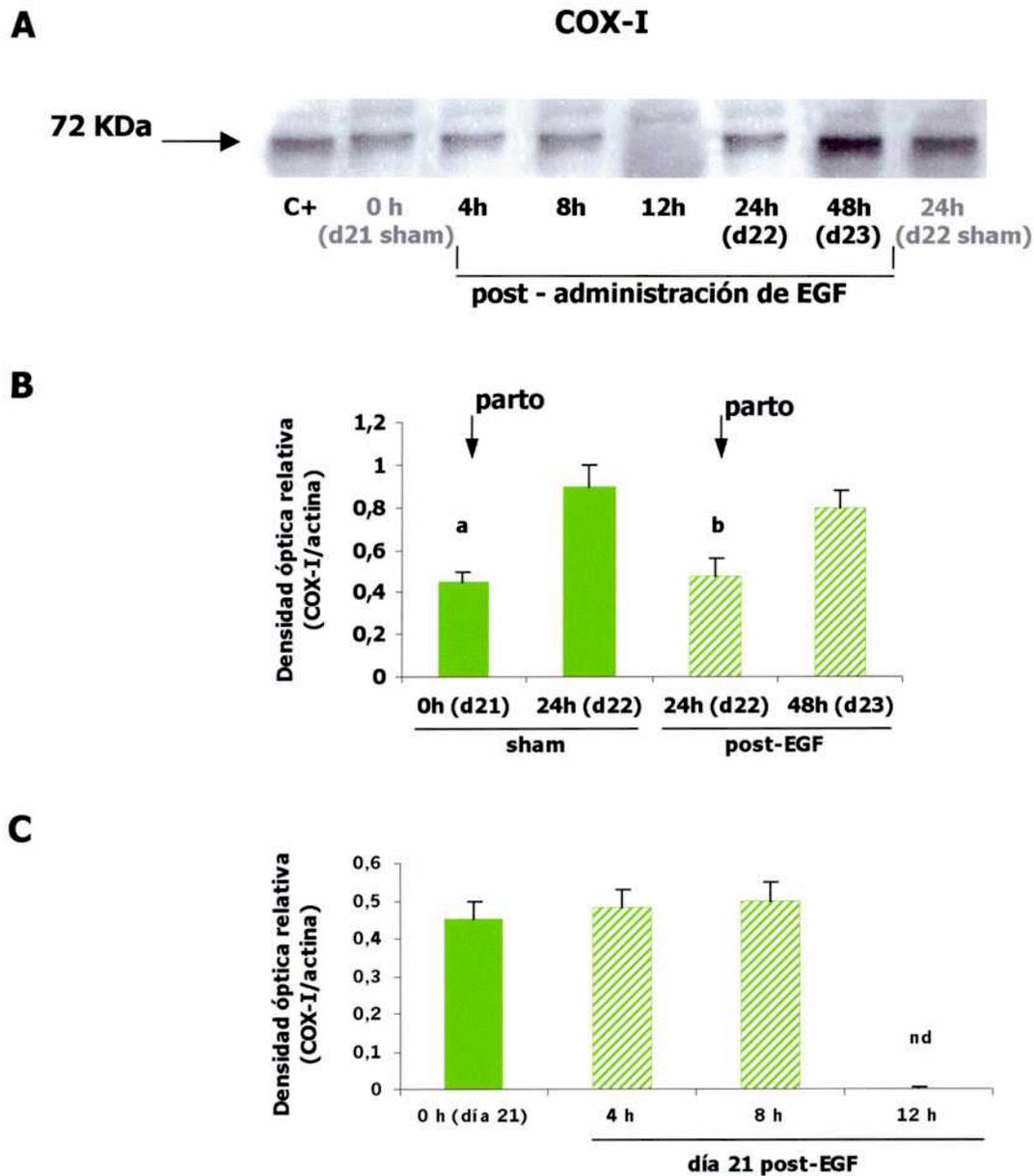
Los resultados obtenidos indican la presencia de la isoforma constitutiva de la ciclooxigenasa, COX-I, en nuestro sistema (Figura 9).

En la Figura 9A se observa que el anticuerpo para COX-I reaccionó específicamente con una banda de 72 KDa tanto en las fracciones provenientes de los animales sham (carril 2 y carril 8), como en aquellas provenientes de los animales sometidos al estudio del efecto del EGF en el tiempo (carriles 3 al 7). El primer carril muestra una banda correspondiente a un homogenato de vesícula seminal de carnero utilizada como control positivo.

El análisis densitométrico de las bandas (Figura 9B) revela que la expresión de la COX-I a las 24 h post – EGF (día 22), fue menor que el registrado a las 24 h para este grupo experimental (día del parto de las sham) y fue similar al obtenido a las 0 h del día 21 para las hembras sham. Las hembras tratadas con EGF alcanzaron un nivel de expresión aproximadamente igual al de las hembras sham, recién en el día 23, es decir, en el día que se desencadena el parto en los animales tratados.

En la Figura 9C se muestra el análisis densitométrico correspondiente a las bandas obtenidas para COX-I a las 4, 8 y 12 h post – tratamiento de EGF. Se observa que la expresión de COX-I disminuyó hasta niveles no detectables a las 12 h post – tratamiento.

Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en el experimento anterior, donde se observó una disminución paulatina en la producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , la cual se hizo mínima a las 12 h, aumentó a las 24 h y llegó al máximo en el día 23 post - EGF.



**Figura 9.**

**Estudio de la expresión uterina de COX-I luego del tratamiento i/u con EGF.**

A- WB representativo de COX-I.

B- Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en hembras sham preñadas de 21 y 22 días y en hembras tratadas con 500 ng de EGF i/u, 24 h (día 22) y 48 h (día 23, momento del parto) luego del tratamiento.

C- Análisis densitométrico de las bandas obtenidas 4, 8 y 12 h luego del tratamiento con 500 ng EGF en el día 21 de gestación.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con n=4.

a:  $p < 0.01$  vs día 22 sham; b:  $p < 0.01$  vs día 22 sham y día 23

### **2.7.3- Efecto del EGF en el tiempo sobre la concentración de progesterona.**

Como se ha mencionado en la introducción, la progesterona en muchas especies actúa sobre las células miometriales inhibiendo las contracciones en bloque. De esta manera, la progesterona prepararía el endometrio para el cuidado y el soporte del embrión hasta que ocurra la implantación y/o la placentación (Niswender y Nett 1994).

En la rata y el conejo, el cuerpo lúteo es responsable de mantener la secreción de progesterona durante toda la preñez. En estas especies, el parto es precedido por un descenso en los niveles de progesterona (Labhsetwar y Watson 1974).

Hacia el final de la gestación un aumento en la expresión de COX-I con el concomitante incremento en la síntesis uterina de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , desencadenaría el proceso luteolítico con la consecuente caída en los niveles plasmáticos de progesterona y la subsiguiente generación de las contracciones uterinas.

Dado que se observó que el tratamiento con EGF moduló en el tiempo la producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y el nivel proteico de COX-I, se decidió estudiar el efecto del EGF en el tiempo sobre la progesterona.

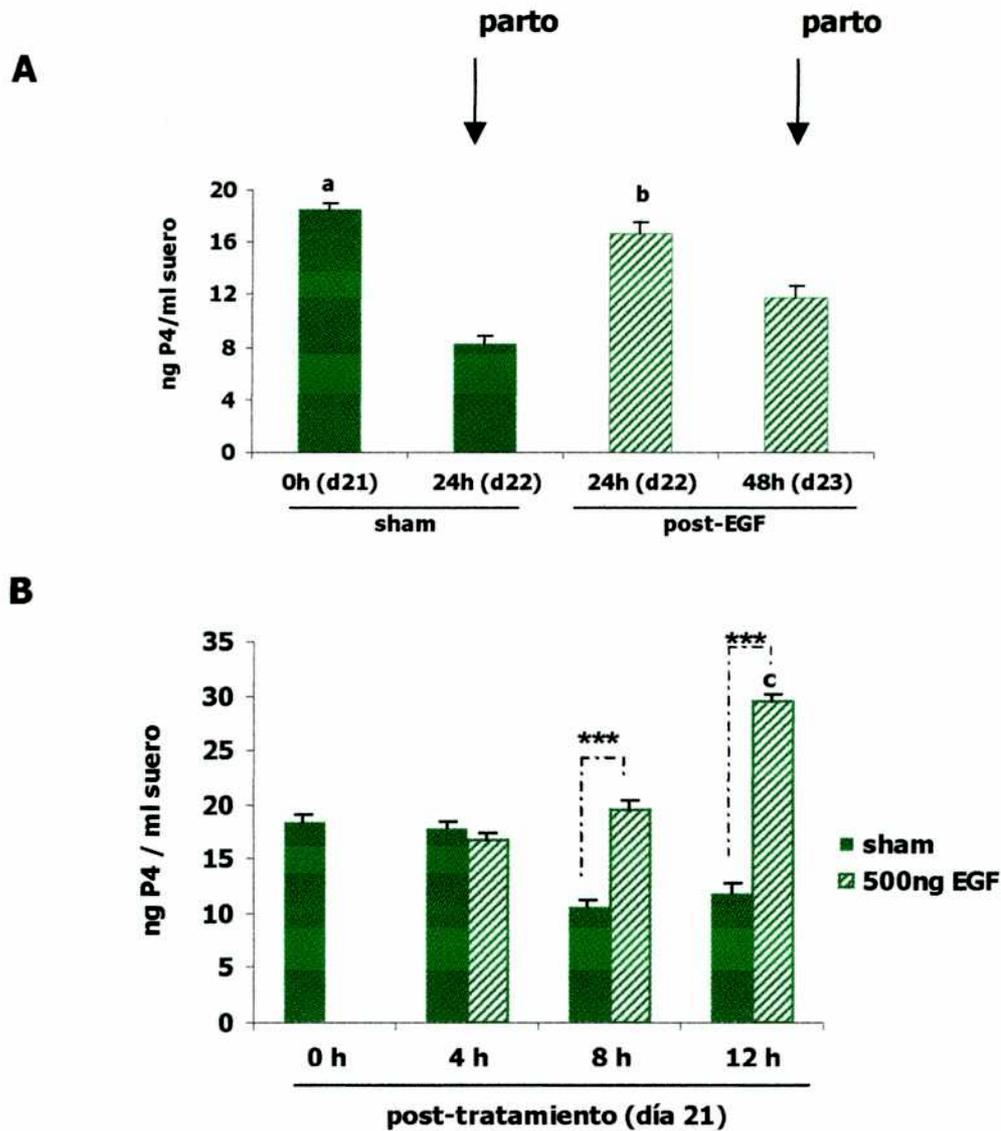
Para ello, se cuantificó por RIA la concentración de progesterona a partir de sueros extraídos en las condiciones ya mencionadas.

Como ya se describió en la Figura 6, se observó que la administración de 500 ng de EGF en el día 21 de gestación aumentó la progesterona sérica con respecto al día 22 de las hembras sham (Figura 10A). Este valor fue similar al de las hembras control en el día 21 de gestación. Luego, en el día 23 de gestación, día del parto en las hembras tratadas, la progesterona disminuyó como ocurre en los animales sham.

En la Figura 10B se muestra para las hembras tratadas con EGF la concentración máxima de progesterona se obtuvo a las 12 h.

En el caso de las hembras sham a las 8 h post – administración de solución fisiológica se registró una disminución en la progesterona sérica; este valor se mantuvo hasta las 12 hs post – tratamiento.

Al comparar el perfil de progesterona de las hembras inyectadas con EGF con los obtenidos para la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y la COX-I, se observa una correlación temporal inversa entre el incremento de progesterona y las mínimas síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y expresión de COX-I.



**Figura 10.**

**Estudio de la concentración de P<sub>4</sub> sérica luego del tratamiento i/u con EGF.**

A- Concentración de P<sub>4</sub> sérica en hembras sham y en hembras tratadas con 500 ng de EGF i/u, 24 h luego del tratamiento (día 22) y en el momento del parto.

B- Perfil de P<sub>4</sub> sérica 4, 8 y 12 h luego del tratamiento con 250 µl de solución fisiológica (hembras sham) o 500 ng EGF en el día 21 de gestación.

Los resultados representan la media ± SEM de 3 experimentos realizados con n=4 fragmentos uterinos.

a:  $p < 0.01$  vs 24 h (día 22 sham); b:  $p < 0.01$  vs 24 h (día 22 sham) y 48 h (día 23);

c:  $p < 0.001$  vs el resto; \*\*\*  $p < 0.001$  animales sham vs animales tratados con EGF

#### **2.7.4- Efecto del EGF en el tiempo sobre la morfología de los CL.**

El cuerpo lúteo es una estructura compleja formada tanto por células lúteas como por células de origen no luteal (fibroblastos, células endoteliales, células de la sangre). El cuerpo lúteo funciona como una glándula endocrina: recibe señales a través de los vasos sanguíneos y vuelca sus productos a la circulación sistémica.

Durante la preñez en la rata, el CL secreta progesterona a lo largo de toda la gestación manteniendo el entorno uterino adecuado para el desarrollo del embrión. Hacia el final de la preñez, las células lúteas sufren un proceso de apoptosis que lleva a la caída de los niveles séricos de progesterona y por lo tanto, al desencadenamiento del parto.

Estos cambios bioquímicos están acompañados por cambios en las características y en la proporción de las distintas poblaciones celulares que se encuentran en el CL. Los tipos celulares y las formas de las células cuando la secreción de progesterona es elevada, son distintos a los que se observan hacia el final de la gestación.

El siguiente paso fue entonces, estudiar la morfología de los cuerpos lúteos provenientes de los distintos grupos experimentales. Para ello, los ovarios se fijaron con PFA 4% y posteriormente se sometieron a una tinción con hematoxilina – eosina. Finalmente, se observaron al microscopio con aumentos de 2.5x y 40x. El factor de conversión utilizado fue de 1.25. En cada caso, se muestra una foto representativa del grupo experimental.

En la Figura 11 se presenta una vista panorámica (aumento total: 31.25) de la morfología de los ovarios provenientes de los distintos tratamientos. Se observó que tanto las hembras sham y las tratadas con EGF presentaban cuerpos lúteos en los ovarios.

En el caso de los ovarios de animales controles en el día 13 de gestación, se observaron dos CL grandes, folículos en distintos grados de desarrollo y vasos sanguíneos gruesos, característicos del hilio ovárico (Figura 11A). Entre estos vasos había mayor proporción de células conectivas que matriz extracelular. Las hembras control de día 21 también presentaron dos cuerpos lúteos en este corte (Figura 11B). En comparación con el parénquima ovárico y el tamaño de los folículos, estos CL parecían más grandes que los observados para las hembras de día 13. También se observaron folículos en diferentes etapas de su desarrollo. Tanto para el día 13 como para el día 21 control, los cuerpos lúteos poseían límites claros y definidos. Los cortes

de ovario de las hembras sham (Figura 11C) y de las hembras tratadas con EGF (Figura 11D, E, F, G y H), no presentaron desde el punto de vista panorámico una diferencia cualitativa con respecto a lo observado para el día 21 control.

Posteriormente, se analizaron con un aumento total x500 las características de las células contenidas en los cuerpos lúteos.

Las hembras preñadas de día 13 presentaron un gran monomorfismo celular (Figura 12A). Las células de la granulosa de aspecto pavimentoso y amoldadas entre sí, poseían un núcleo ligeramente basófilo y excéntrico. Tanto el nucleolo como la membrana nuclear estaban bien definidos. El citoplasma de aspecto espumoso, con zonas blancas ópticamente negativas, se correspondió con los tipos celulares que poseen un alto contenido de compuestos de origen lipídico.

Las células de la granulosa de las hembras controles de 21 días de gestación presentaron un citoplasma más eosinófilo, es decir, menos espumoso y por lo tanto con menor contenido de material lipídico (Figura 12B). Sin embargo, entre estas células todavía aparecían mezcladas algunos tipos celulares con su citoplasma más claro. El núcleo se observó con una tinción basófila intensa y homogénea. La membrana nuclear estaba bien definida y el nucleolo no se distinguió del resto. Entre las células de la granulosa aparecían elementos celulares de aspecto fibroblástico que le proporcionaban más consistencia a la estructura del cuerpo lúteo.

Las células presentes en los CL provenientes de las hembras sham preñadas de 22 días no presentaron una solución de continuidad entre ellas (Figura 12C). Para el resto de las características analizadas, no difirieron de lo observado para las controles de 21 días.

En el caso de las hembras tratadas, los primeros cambios aparecieron a las 8 h post – administración de EGF.

La apariencia de las células lúteas en los CL extraídos 4 h post – EGF fue similar a la del día 21 de las hembras sham (Figura 12D). Presentaron una mezcla de células con citoplasma espumoso y células con citoplasma eosinófilo homogéneo. Por otro lado, las células lúteas estaban separadas entre sí, sin presentar una solución de continuidad.

A las 8 h post– tratamiento con EGF los CL parecieron “re – luteinizados” (Figura 12E). Las células lúteas no estaban separadas entre sí, sino que recuperaron el aspecto pavimentoso. El color de la tinción del citoplasma fue más claro que el observado en el día 21 de los animales sham. Sin embargo, si bien los citoplasmas presentaban en su

mayoría un aspecto espumoso, los núcleos se mantuvieron en su mayoría como los del día 21 de las hembras sham, con una tinción azul intensa y homogénea, sin nucleolo evidente y con la membrana nuclear bien definida. Se debe mencionar que un bajo porcentaje de células mostraron un nucleolo evidente. Además, se observaron menos elementos fibroblásticos.

A pesar de que a las 12 h post – administración de EGF, los citoplasmas claros y espumosos no fueron tan evidentes como a las 8 h, el número de núcleos con nucleolos evidentes fue superior al observado a las 8 h (Figura 12F). Nuevamente, desapareció la solución de continuidad entre las células de la granulosa, que se observó a las 8 h post – tratamiento con EGF.

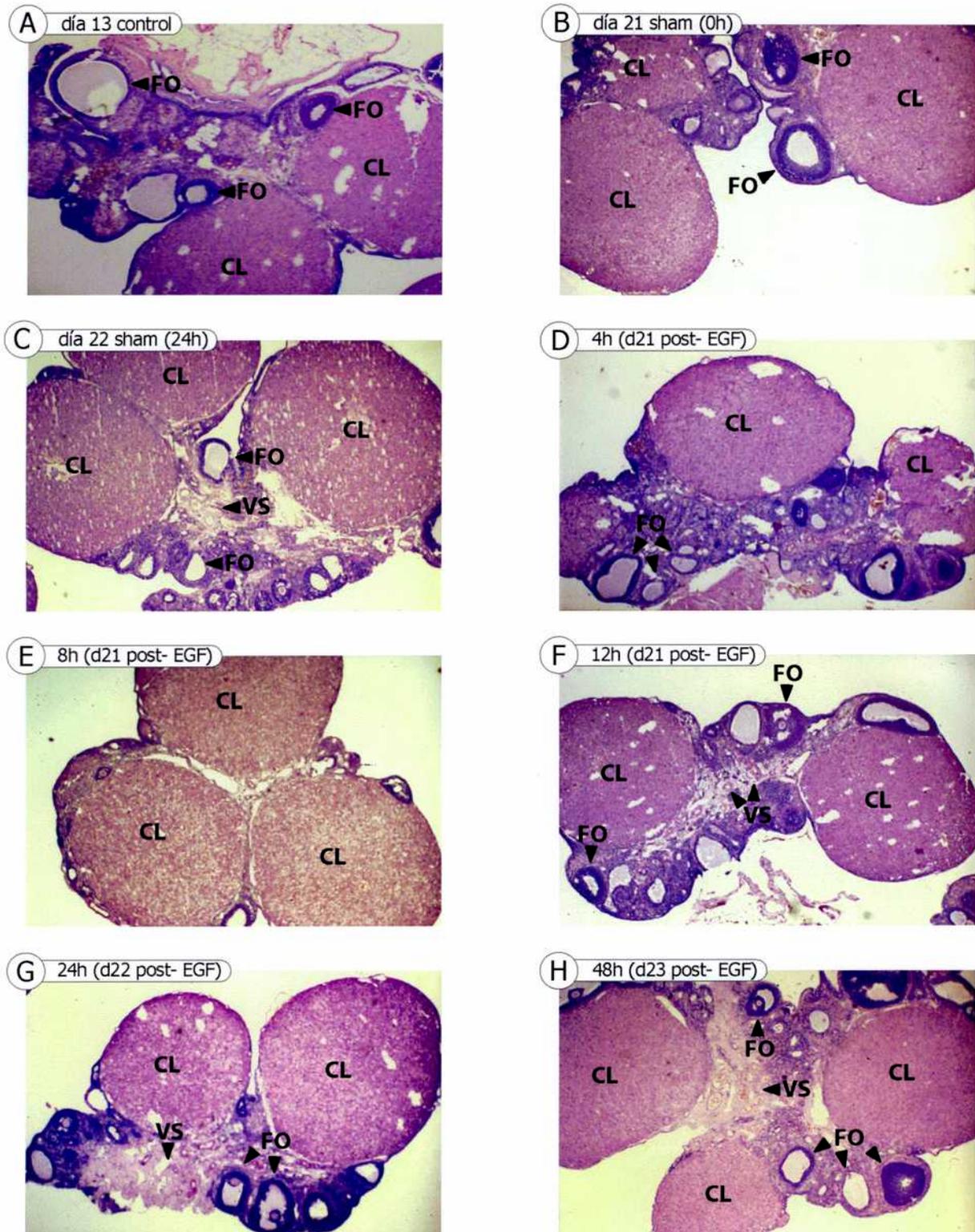
Luego de 24 h de administrado el EGF, las células lúteas volvieron a tener un aspecto similar al observado para el día 21 de los animales sham (Figura 12G). Los citoplasmas se presentaron eosinófilos, parejos, casi sin espacios blancos, y los núcleos teñidos de azul intenso sin que se evidencie el nucleolo. La cantidad de células de tipo fibroblástico también se encontró aumentada con respecto a las 8 y a las 12 h post – EGF.

En el día 23, día del parto de las hembras tratadas, las poblaciones celulares presentes en el cuerpo lúteo fueron semejantes a las descritas para las hembras sham de 22 días de gestación (Figura 12H). En este caso, se observó además, una gran desorganización y pleomorfismo celular.

En la tabla que se muestra a continuación se ilustra cuantitativamente lo descrito anteriormente.

	66	24	22
	6	3	92
	2	3	94
	21	1	78
	68	6	30
	13	17	51
	4	3	94
	3	5	92

*Se contó el número de células correspondientes y se expresan cada 100 células totales.*

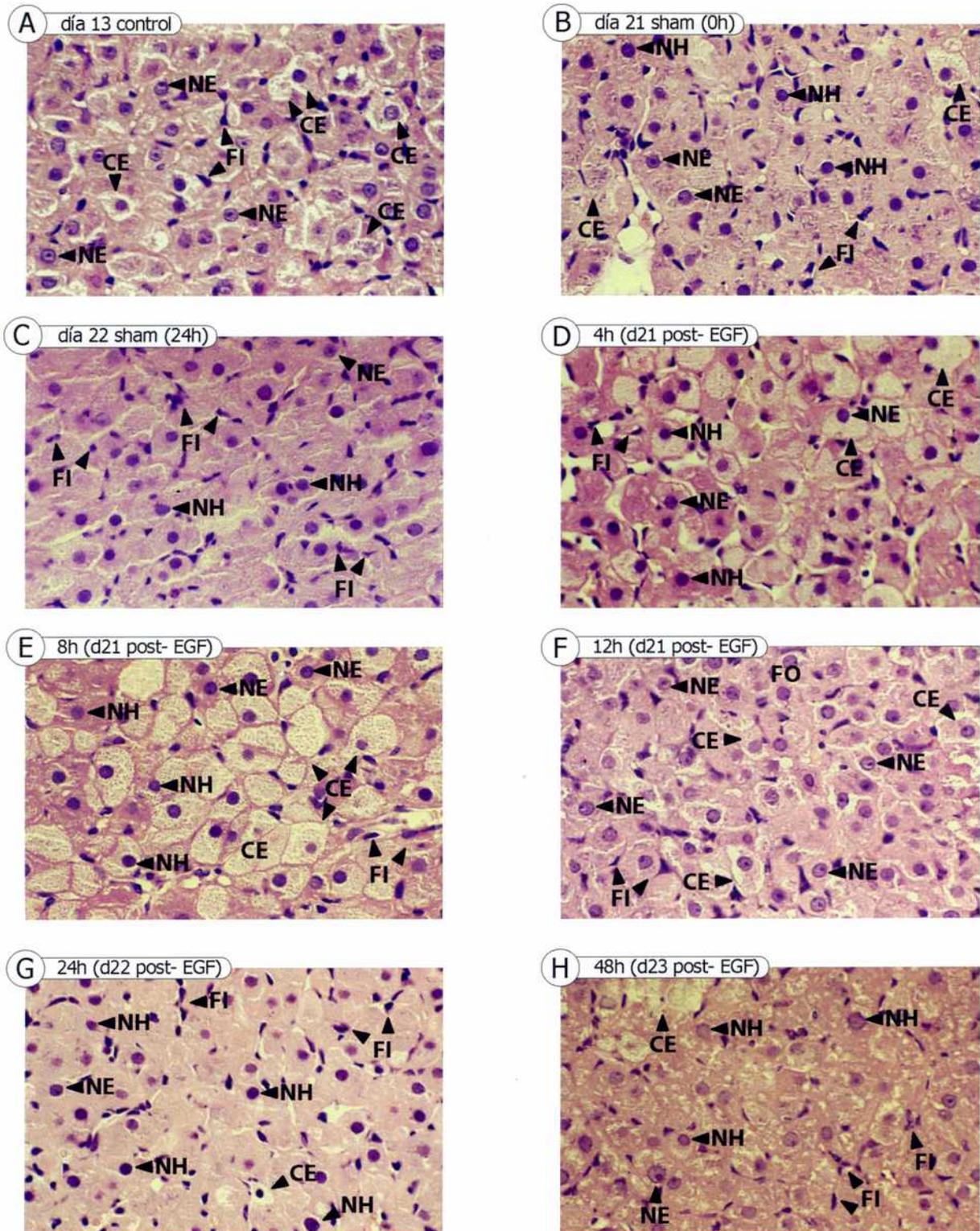


**Figura 11.**

### Efecto del EGF en el tiempo sobre la morfología de los CL.

Se obtuvieron ovarios a partir de: hembras controles preñadas de 13 días, hembras sham preñadas de 21 y 22 días y hembras tratadas con 500 ng de EGF. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina. Aumento total: 31,25x

**CL:** cuerpo lúteo; **FO:** folículo; **VS:** vasos sanguíneos



**Figura 12.**

### Efecto del EGF en el tiempo sobre la morfología de los CL.

Se obtuvieron ovarios a partir de: hembras controles preñadas de 13 días, hembras sham preñadas de 21 y 22 días y hembras tratadas con 500 ng de EGF. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina. Aumento total: 500x

**CE:** citoplasma espumoso; **NH:** núcleo homogéneo; **NE:** nucléolo evidente; **FI:** fibroblasto

### **2.7.5- Efecto del EGF en el tiempo sobre la expresión uterina de PR.**

Un gran número de las acciones fisiológicas de la progesterona involucran su unión a receptores. La progesterona se une a los PR, éstos se dimerizan y activan o inhiben la transcripción de diversos genes.

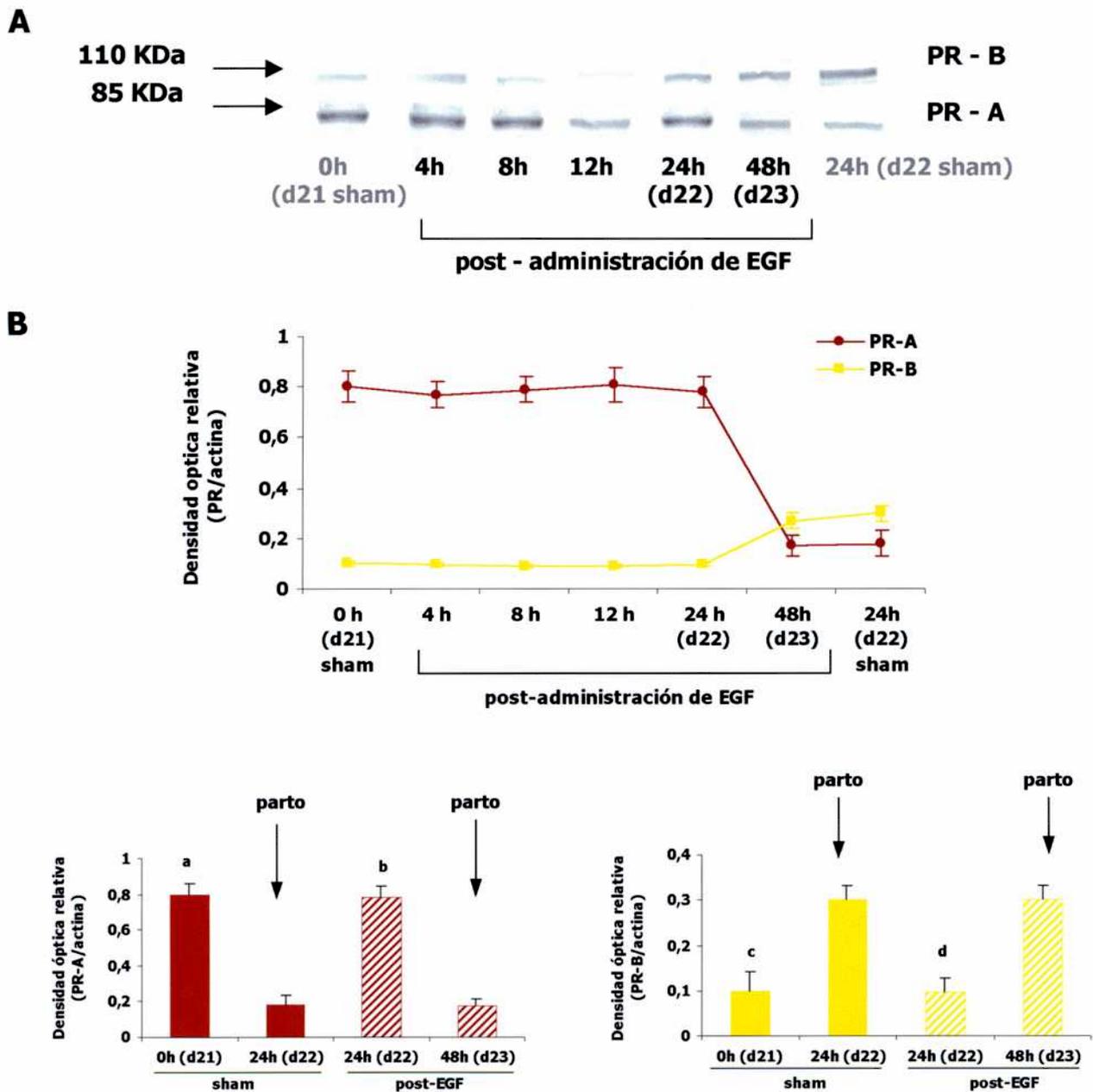
Las isoformas de PR tienen diferente función. Se ha postulado que PR-A es la isoforma "anti – parto" y actúa como un represor transcripcional de aquellos genes involucrados en el aumento de la contractilidad miometrial, incluido el gen que codifica para PR-B. En cambio, PR-B sería "pro – parto" actuando como un activador transcripcional y propiciando el desencadenamiento del trabajo de parto.

Los niveles relativos de las isoformas de PR en una célula blanco pueden determinar la naturaleza y la magnitud de la respuesta a la progesterona, por lo que es necesario conocer la expresión de las isoformas de PR y cómo se regula en el sistema de interés. Por ello se decidió investigar el nivel proteico de PR-A y PR-B en las hembras sham preñadas de día 21, en las hembras sham preñadas de 22 días y en las hembras tratadas con EGF a las 4, 8, 12, 24 h post – EGF y en el momento del parto (día 23). Los extractos proteicos provenientes de los distintos tratamientos se sometieron a una inmunoelectrotransferencia, según como se detalla en materiales y métodos.

En la Figura 13A se muestra un Western Blot representativo, en el que se observan dos bandas que corresponden a ambas isoformas de PR: PR-A de 85 KDa y PR-B de 110 KDa, para todos los tratamientos estudiados.

Los resultados del análisis densitométrico revelan que el tratamiento con EGF fue capaz de modular la expresión de ambas isoformas de PR (Figura 13B). A las 24 h post– administración de EGF la expresión de PR-A y de PR-B fue similar a la registrada para el día 21 de las hembras sham y sólo en el día 23, día del parto en las tratadas, alcanzaron los valores observados para el día 22 de las hembras sham.

Se debe mencionar además, que el efecto del EGF sobre PR-B se observó ya a las 12 h de tratamiento: la administración de 500 ng de EGF provocó a las 12 h post – EGF una disminución del 50% en su expresión con respecto al día 21 de las hembras sham.



**Figura 13.**

**Estudio en el tiempo de la expresión uterina de PR luego de la administración i/u de EGF.**

A- WB representativo de PR.

B- Análisis densitométrico de las bandas obtenidas.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con n=4.

a:  $p < 0.01$  vs 24 h sham (día 22); b:  $p < 0.01$  vs 24 h sham (día 22) y 48 h post - EGF (día 23); c:  $p < 0.01$  vs 24 h sham (día 22); d:  $p < 0.01$  vs 24 h sham (día 22) y 48 h post - EGF (día 23)

### **2.7.6- Estudio de la expresión del receptor de EGF en el cuerpo lúteo.**

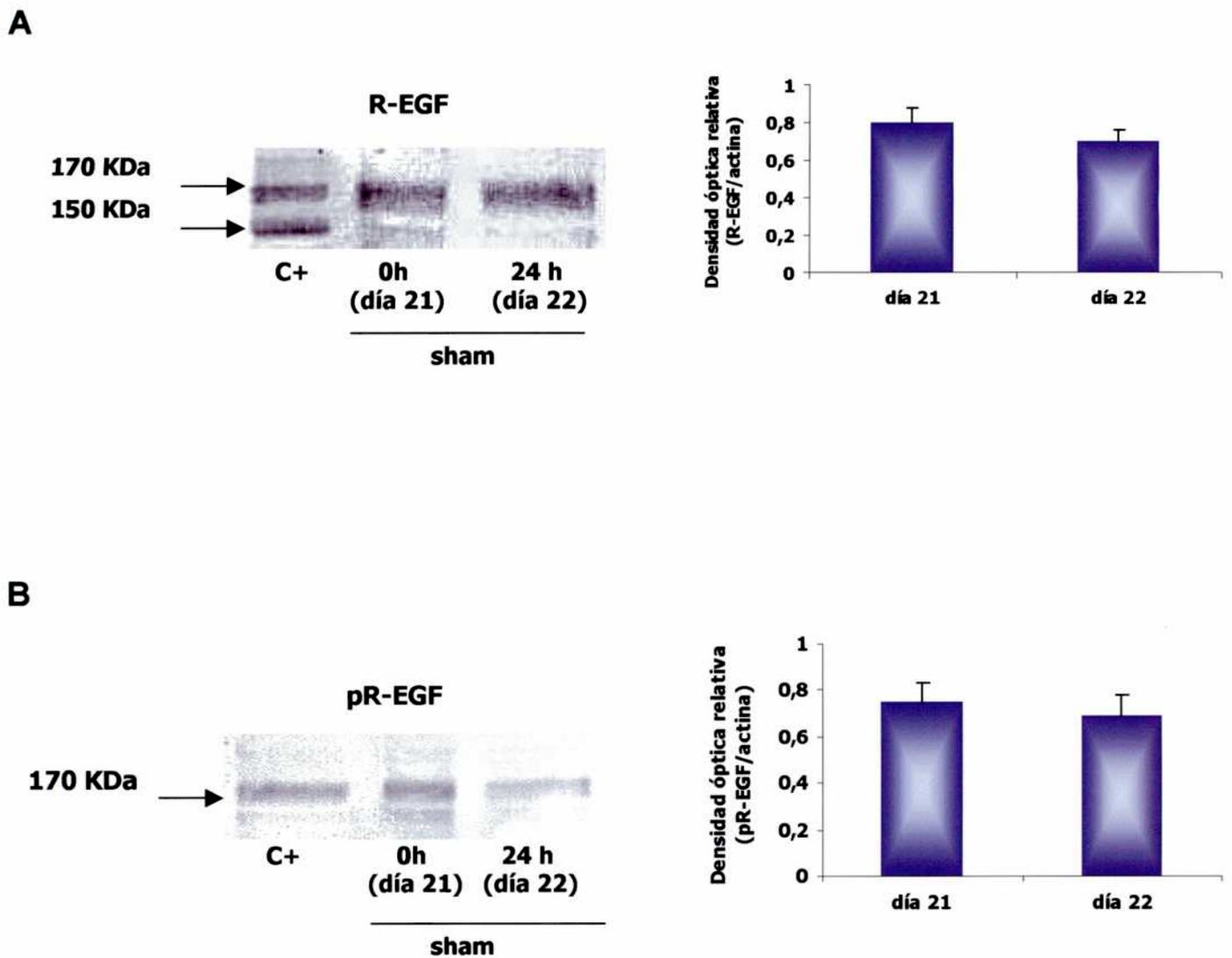
Estudios de otros autores muestran que el CL es capaz de responder al EGF. Luciano y colaboradores (1994) informan que el EGF reduce la apoptosis de las células grandes de la granulosa estimulando la síntesis de P<sub>4</sub>. El grupo de Jones (Jones,1982) demostró que las células de la granulosa provenientes de hembras estrogenizadas poseen R-EGF de alta afinidad y baja capacidad.

Como se postuló al comienzo de esta sección, el efecto retardatorio del EGF sobre el inicio del parto podría estar mediado tanto por una vía directa sobre el ovario como por una vía indirecta mediada por un efecto sobre el útero. Por medio de los experimentos realizados en esta tesis no fue posible discernir si el efecto del EGF se circunscribía al útero o una acción directa sobre el ovario también estaba involucrada. De esta manera, al no poder descartar la posibilidad de que el EGF estuviera ejerciendo su efecto uniéndose directamente a un receptor específico en la membrana plasmática del CL, se investigó si los CL provenientes de las hembras preñadas expresaban este receptor.

Para ello, los cuerpos lúteos extraídos de hembras sham preñadas de 21 días y de las hembras sham preñadas de 22 días se sometieron a una corrida electroforética y luego de la transferencia las membranas se incubaron tanto con el anticuerpo contra el receptor total (R-EGF) como contra el receptor fosforilado (pR-EGF).

En la Figura 14 se observa que los cuerpos lúteos provenientes de hembras preñadas de día 21 y de día 22 expresaron el R-EGF y el mismo se encontró fosforilado, es decir que estaba en su estado activado.

Del análisis densitométrico de las bandas reveladas se desprende que ni la expresión del R-EGF (Figura 14A) ni la expresión del pR-EGF (Figura 14B) variaron entre los días analizados.



**Figura 14.**

**Detección del receptor de EGF (R-EGF) en útero de rata durante la preñez.**

A- WB representativo del R-EGF y análisis densitométrico de las bandas obtenidas.

B- WB representativo del pR-EGF y análisis densitométrico de las bandas obtenidas.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con n=4.

### **3- Estudio de la posible participación del EGF endógeno en el inicio del trabajo de parto.**

De los experimentos presentados hasta el momento, se desprende que la administración de EGF exógeno (500 ng en el día 21 de gestación) retrasa el inicio del parto modulando los principales mediadores de la quiescencia uterina y la contractilidad miometrial.

El siguiente paso fue investigar si el EGF endógeno participaba en el inicio del trabajo de parto en la rata.

#### **3.1- Análisis de la expresión uterina de los receptores de EGF.**

Como se ha mencionado en la introducción, se ha descrito la presencia del receptor de EGF en tejidos reproductivos de distintas especies. Además, se ha informado que el mismo se encuentra regulado por progesterona y estradiol, dos hormonas esteroideas que regulan la quiescencia uterina y el desencadenamiento del parto en roedores (Das y col. 1994). Así mismo, un estudio realizado en decidua de rata durante la primera mitad de la gestación, muestra que la expresión de este receptor correlaciona con el progreso de la preñez en esta etapa (Dai y Ogle 1999).

Con el objetivo de estudiar el perfil uterino de expresión del receptor de EGF durante la preñez, hembras controles se sacrificaron en los días 5, 13 y 18 a 22 de gestación. Se procedió a realizar un ensayo de Western Blot a partir de extractos proteicos provenientes de fragmentos uterinos de hembras en los diferentes días de gestación. También se utilizaron proteínas provenientes de un extracto de glándula salival como control positivo.

Las membranas de nitrocelulosa obtenidas luego de la transferencia se incubaron con un anticuerpo contra el R-EGF total y con uno dirigido contra la forma fosforilada y activa del receptor, el pR-EGF.

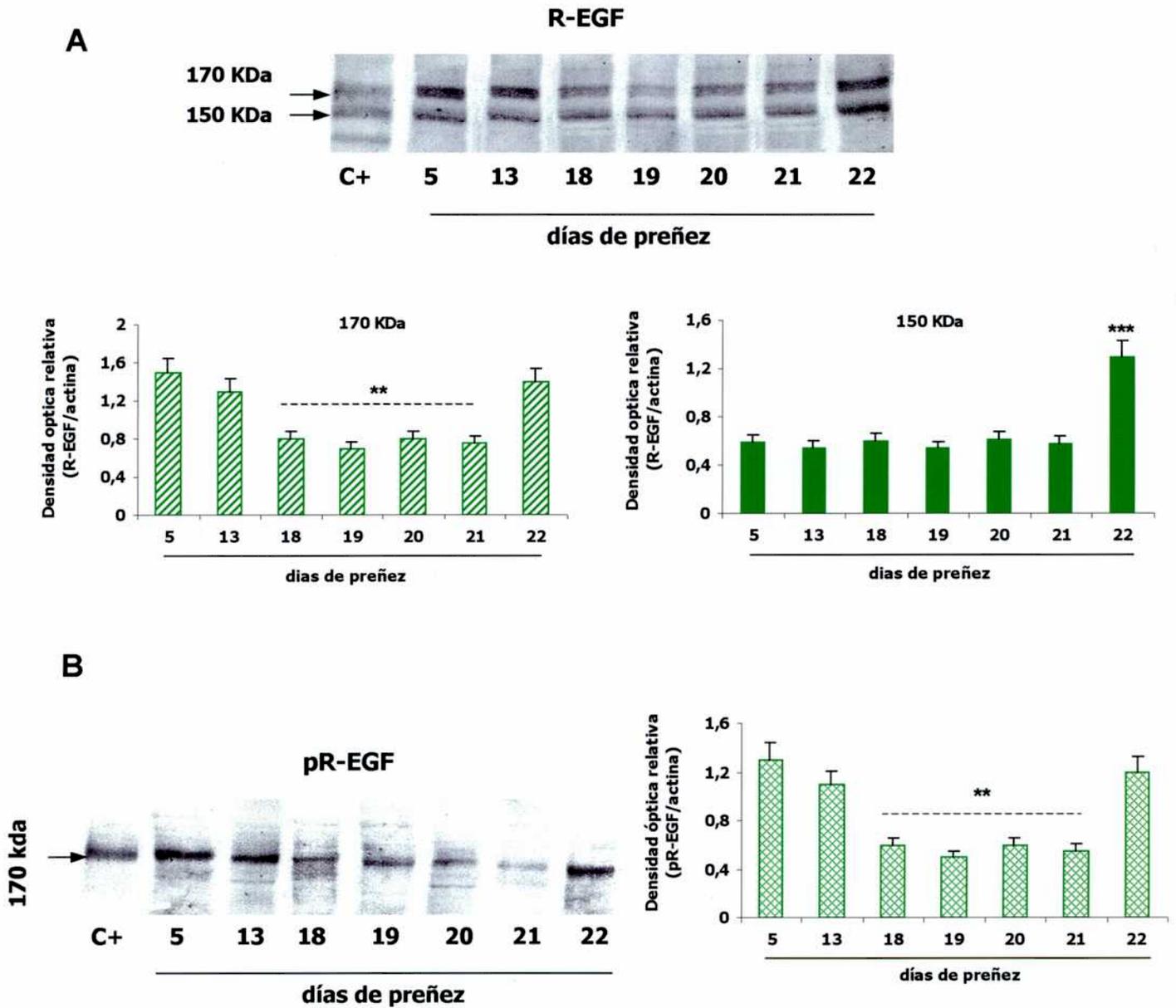
En la Figura 15A, se observa que dos fracciones proteicas de aproximadamente 170 y 150 KDa fueron reconocidas por el anticuerpo dirigido contra el R-EGF. El carril 1 presenta una banda correspondiente a un lisado de glándula salival (control positivo),

mientras que las calles siguientes corresponden a las fracciones proteicas de los diferentes días de preñez.

El análisis densitométrico de las bandas revela que el nivel proteico de la isoforma de 170 KDa se encontró aumentada al inicio (días 5 y 13) y al final (día 22) de la gestación ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, la isoforma de 150 KDa mantuvo estable el nivel proteico durante la mayor parte de la gestación y aumentó en el día 22 ( $p < 0.001$ ).

La Figura 15B indica que la forma activa del receptor de EGF (pR-EGF) se encuentra presente en el útero durante la gestación, ya que el anticuerpo contra el pR-EGF reaccionó específicamente con una banda de 170 KDa en las fracciones provenientes de las hembras en distintos días de preñez (carriles 2 al 8). En el primer carril se observa una banda correspondiente a un lisado de glándula salival (control positivo). El nivel proteico del receptor activado fue máximo en los días 5, 13 y 22 de gestación, mientras que disminuyó en los días 18 a 21 ( $p < 0.01$ ).

Estos resultados indican que el receptor de EGF se encuentra presente en el útero de rata durante la gestación y que el mismo está activado. Así mismo, tanto la expresión del receptor total como la del pR-EGF se encontraron reguladas en los distintos estadios de preñez analizados.



**Figura 15.**

**Detección del receptor de EGF en útero de rata gestante.**

A- WB representativo del R-EGF y análisis densitométrico de las bandas obtenidas.

B- WB representativo del pR-EGF y análisis densitométrico de las bandas obtenidas.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con n=5.

\*\*  $p < 0.01$  vs el resto de los días; \*\*\*  $p < 0.001$  vs el resto de los días analizados

### **3.2- Análisis del contenido de EGF en el líquido amniótico.**

La presencia de EGF en el líquido amniótico de mujeres embarazadas fue descrita por Ances en 1973. Desde entonces se han publicado varios trabajos al respecto. Sin embargo, ya sea por variaciones en las especies estudiadas o por el método de detección empleado, no hay un consenso con respecto a la concentración de EGF en el líquido amniótico de mujeres embarazadas a lo largo de la gestación. Por otro lado, no hay estudios acerca de la concentración de EGF en el líquido amniótico de ratas preñadas.

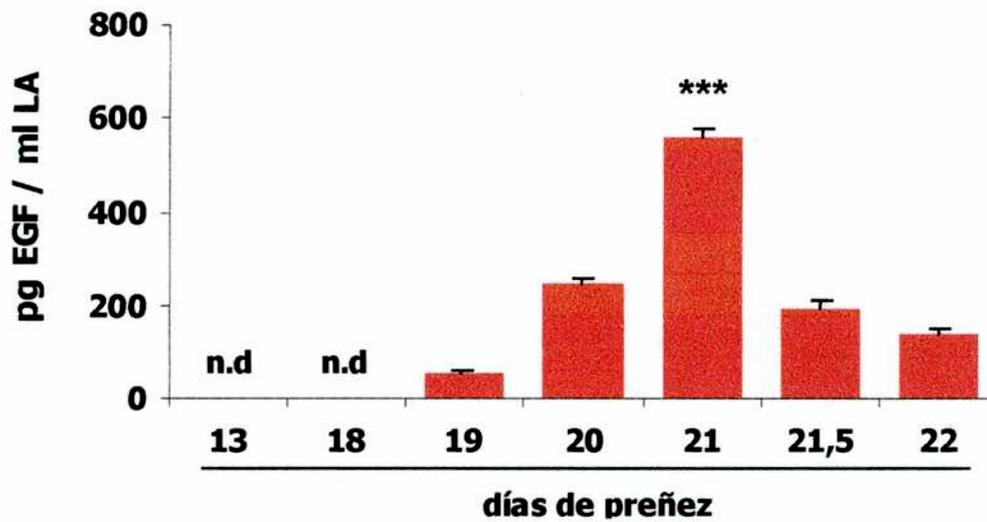
En base a estos antecedentes, se decidió determinar el contenido de EGF en líquido amniótico de ratas en distintos días de gestación.

Para ello, en primer lugar se puso a punto la técnica de RIA para determinar el contenido de EGF en fluidos de rata.

Luego, se determinó la concentración de este péptido en líquido amniótico extraído a partir de hembras controles preñadas en día 13 y 18 a 22 de gestación.

En la Figura 16 se presenta el perfil de EGF en el líquido amniótico durante la preñez en la rata. Se observa que el nivel de EGF aumentó progresivamente durante la gestación, haciéndose máximo en el día 21 y disminuyendo hasta el día 22.

La concentración de EGF en el líquido amniótico obtenido de hembras preñadas de día 13 y de día 18 no fue detectable, ya que estos animales poseían menos de 50 pg/ml de EGF, el límite de sensibilidad del método.



**Figura 16.**

**Determinación de la concentración de EGF en líquido amniótico durante la preñez.**

Se extrajo líquido amniótico de ratas preñadas en día 13 de preñez, días 18 a 22 de gestación y a las 12 h del día 21 control. La concentración de EGF se determinó mediante un RIA con anticuerpo específico.

Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos realizados con  $n=8$ .

\*\*\*  $p < 0.001$  vs el resto de los días analizados

**discusión**

El embarazo, tiene un impacto fundamental en la salud de un país. Por lo tanto, el mejoramiento de la calidad de vida de las madres y los recién nacidos debe ser uno de los objetivos a cumplir en la agenda de salud pública.

La responsabilidad del registro de nacimientos, decesos maternos y fetales, partos normales, pre o post – término, cesáreas, abortos, conocimiento y utilización de métodos anticonceptivos, amamantamiento, consulta prenatal temprana, internación por complicaciones en el embarazo, tabaco durante el embarazo, monitoreo de anomalías fetales y desórdenes genéticos, síndrome alcohólico fetal y bajo peso al nacer, debe corresponder al estado y sus organizaciones gubernamentales apoyadas por las investigaciones que están llevando a cabo diversas organizaciones de tipo no gubernamental.

En nuestro laboratorio investigamos algunos de los mecanismos fisiopatológicos que se desarrollan durante la preñez.

En particular, presentamos en este trabajo la participación del factor de crecimiento epidermal en el inicio del parto.

La regulación de la función uterina es compleja e involucra la participación de diversos agentes. Varios investigadores han estudiado como funcionan los mediadores endócrinos y parácrinos que se encuentran involucrados en el mantenimiento de la preñez y el disparo del parto, pero los mecanismos precisos de este delicado proceso aun no han sido dilucidados. Los esteroides gonadales (estrógeno y progesterona) median algunas de las funciones de contractilidad uterina durante la preñez temprana y el parto. No menos importante es el papel de citoquinas pro - inflamatorias, quimoquinas y factores de crecimiento los cuales orquestan algunos de los eventos que disparan el parto a término y pre – término.

La mayoría de los estudios sobre el factor de crecimiento epidermal se han centrado en la estimulación que ejerce este factor sobre la proliferación celular. Sin embargo, el EGF interviene también en otro tipo de procesos biológicos. Esta observación sugiere que el EGF tendría funciones aún no descritas sobre la fisiología de los mamíferos. En los últimos años se ha hecho cada vez más evidente la participación del EGF en la preñez y el parto.

Varios autores han informado la presencia del EGF y su receptor en diversos tejidos reproductivos de mamíferos como el útero y la placenta de mujeres (Kennedy y col. 1994, Richards y col. 1983, Lin y col. 1988, Rao y col. 1985), roedores (Huet-Hudson y col. 1990), cerdas (Henricks y col. 1972, Vaughan y col. 1992, Swanchara y col. 1995, Lee 1993) y ovejas (Lacroix y Cann 1993).

El EGF también está presente en el suero materno y fetal y en el fluido amniótico de mujeres embarazadas (Barka y col. 1978, Ances 1973) donde su concentración se correlaciona con el progreso de la gestación (Varner y col. 1996).

Además del EGF, también se ha encontrado su receptor en tejidos con importantes funciones durante la gestación. Varios trabajos demuestran la presencia de receptores de alta afinidad en amnios, corion y decidua humana (Lai y Guyda 1984, Hirata y col. 1982). Por otro lado, la placenta de diferentes especies mostró marcación positiva para el R-EGF (O'Keefe y col. 1974, Hock y Hollenberg 1980, Carson y col. 1983).

En base a los antecedentes de la literatura, es que decidimos investigar la participación del EGF en el inicio del parto. Para ello, adoptamos dos estrategias: analizar el efecto del EGF exógeno sobre el disparo del parto y estudiar la participación del EGF endógeno en el inicio del trabajo de parto a término.

En primer lugar analizamos el efecto del tratamiento con EGF exógeno sobre la preñez a término.

La administración i/u de EGF en los días 20 o 21 de preñez retrasan el inicio del parto espontáneo hasta el día 23 de gestación. Normalmente, bajo las condiciones de nuestro bioterio, el parto de las ratas comienza entre la tarde y la noche del día 22 de preñez. La administración de 250 y 500 ng de EGF en el día 20 de gestación retrasaron el inicio del parto en aproximadamente 10 h. Cuando analizamos la acción del EGF administrado en el día 21 de preñez, encontramos un efecto dosis – respuesta: mientras que 120 ng retrasaron 9 h el inicio del parto, 250 ng y 500 ng fueron capaces de retrasar el inicio del trabajo de parto 12 h y 19 h respectivamente.

El retraso de 19 h producido por la dosis de 500 ng de EGF, representa un período de tiempo significativo para la gestación de la rata, la cual tiene una duración de 22 días (19 h corresponde a un 5 % de la duración total de la preñez). Es importante mencionar que una vez desencadenado el parto, las hembras tuvieron un trabajo de

parto normal. Además, el tratamiento con EGF no afectó el comportamiento ni el estado general de las madres y de sus crías.

Esta es la primera vez, que se describe que el EGF ejerce un efecto inhibitorio sobre el inicio del parto.

Los eicosanoides, particularmente las PGs, juegan un rol clave en el desencadenamiento del parto (Keirse 1990). Estudios realizados en humanos muestran un incremento en la producción intra-uterina de PGs (Skinner y Challis 1985), así como un aumento de actividad y cantidad de las enzimas claves en su biosíntesis previo al trabajo de parto (Hirst y col. 1995b, Mijovic y col. 1998). Los estudios realizados por Reece y colaboradores (1984) muestran que los sitios uterinos involucrados en la producción de PGs incluyen tanto al miometrio como al endometrio. Es bien reconocido, que las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> son responsables del incremento en la contractilidad miometrial observado al término de la gestación, ya que poseen una potente actividad uterotónica (Vane y Williams 1973).

Varios autores han demostrado que el EGF regula la expresión de la COX y la producción de PGs en diferentes tejidos reproductivos. Mitchell informó que el EGF de origen murino y de origen humano aumenta la producción de PGE<sub>2</sub> en células de amnios en cultivo (Mitchell 1987). Por otro lado, Faber y colaboradores (1996) encontraron que, en el tejido miometrial humano proveniente de cesáreas y de partos a término, la inmunomarcación del EGF se correlaciona con la de las PGs. Otros autores han encontrado que la incubación con EGF de células deciduales, amnióticas y del estroma endometrial, induce un aumento concentración – dependiente en la producción de las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> (Casey y col. 1988, Mitchell 1991, Bany y Kennedy 1995).

Decidimos investigar entonces, si el retraso en el inicio del parto inducido por el EGF, estaba mediado por una regulación sobre la síntesis de PGs.

En el presente estudio demostramos que la administración i/u de 120, 250 y 500 ng de EGF en el día 21 de gestación modificaron la síntesis de las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>. Estas dosis de EGF fueron capaces de inhibir la producción de ambas PGs en el tejido uterino proveniente de hembras preñadas de 22 días.

Así, el efecto de retraso dosis – respuesta sobre el inicio del parto, fue paralelo a la inhibición sobre estas PGs, observándose el mayor efecto para la dosis de 500 ng de EGF.

En base a que el tratamiento con 500 ng de EGF tuvo el efecto más fuerte sobre el retraso en el inicio del parto, y dado que fue la dosis que produjo la mayor inhibición sobre la producción de PGs, decidimos continuar los estudios utilizando esta dosis.

Dada la importante acción uterotónica de las PGs, especialmente las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>, la regulación de su síntesis y metabolismo en el tejido uterino y su entorno, es crítica para el control del nivel de prostanoïdes bioactivos que llegan a sus sitios de acción en el miometrio. La Dra. Farina (2003) demostró que tanto la COX-I como la COX-II se encuentran reguladas durante la preñez y que los niveles de ambas isoformas aumentan hacia el momento del parto. Así mismo, el grupo de Bukowski (2001) informó que hacia el final de la preñez, la expresión de la COX-II aumenta en el útero.

El siguiente paso fue determinar si la administración de 500 ng de EGF en el día 21 de gestación modificaba la expresión de las isoformas de la COX, enzima responsable de la conversión de AA en PGs.

Los análisis de western blot revelan que el tratamiento i/u con 500 ng de EGF inhibió significativamente la expresión de COX-I y COX-II.

Así, parecería que el EGF administrado en el día 21 de gestación es capaz de modular en el útero de 22 días de preñez, tanto la actividad como la expresión de la ciclooxigenasa.

El miometrio produce predominantemente PGI<sub>2</sub>, a diferencia del amnios, el corion y la decidua. La PGI<sub>2</sub> es un potente vasodilatador y un relajante del músculo liso y, hace ya muchos años, se ha demostrado que inhibe el incremento del tono uterino producido por la PGF<sub>2α</sub> *in vitro* (Omini y col. 1979). Si bien el miometrio no es un productor importante de prostaglandinas, es uno de los tejidos blanco principales de estos mediadores lipídicos. Se sabe que las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> estimulan la contractilidad miometrial ya que incrementan el calcio intracelular a través de su interacción con receptores específicos. Ni la densidad, ni la afinidad de estos receptores, parecen cambiar durante el parto (Okazaki y col. 1981).

En la mujer, desde el primer trimestre de embarazo, el útero sufre contracciones irregulares que, por lo general, no producen dolor. El primero en prestar atención a este fenómeno fue J. Braxton Hicks en 1872, por lo que estas contracciones se conocieron con su nombre. Las contracciones de Braxton Hicks aparecen en forma impredecible y esporádica y suelen carecer de ritmo; su asiduidad aumenta durante las últimas dos semanas de embarazo.

Durante el trabajo de parto, la intensidad y la frecuencia de las contracciones uterinas va en aumento y se continúan con la contribución de los pujos maternos. El aumento en la actividad contráctil durante el trabajo de parto activo se relaciona en forma directa con el incremento de las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> producidas por la unidad feto – placentaria.

Así, nuestro siguiente objetivo fue vincular los efectos inducidos por el EGF sobre los niveles de eicosanoides con la función fisiológica de estos mediadores en el útero.

Examinamos entonces, la posible acción de la administración i/u de 500 ng de EGF en el día 21 de gestación, sobre la contractilidad espontánea miometrial. El análisis de los espectros de contractilidad muestran que el tratamiento con EGF redujo en un 60% la amplitud de las contracciones miometriales, pero no modificó la frecuencia de las mismas.

Gardner y colaboradores (1987) demostraron que la incubación de fragmentos uterinos de ratas inmaduras y adultas ovariectomizadas con EGF, produce un aumento de las contracciones miometriales. El EGF incubado *in vitro* con segmentos aislados del miometrio podría ejercer su efecto mediante la unión directa a sus receptores uterinos. En nuestro trabajo, la administración de EGF se realizó *in vivo* de manera que es posible que factores ausentes en el tratamiento *in vitro*, estuvieran influyendo sobre la contracción del miometrio. En el trabajo de Gardner, el útero ha sido removido e incubado con EGF, de manera que este tipo de efecto no ha sido investigado.

Por otro lado, los resultados presentados por el grupo de Tamada coinciden con lo observado en nuestro laboratorio. Tamada y colaboradores (2000) informaron, en un trabajo realizado *in vivo* con carneros en estro y diestro, que la infusión intra-luminal de EGF en el interior de los cuernos uterinos produce una reducción de la actividad contráctil del útero.

Del análisis del patrón de contractilidad se desprende además, que el espectro de las contracciones miometriales de las hembras sham fue diferente al que presentaron las

hembras tratadas con EGF. En los animales sham, todas las porciones del útero parecerían estar sincronizadas, alcanzando así una presión máxima en forma casi simultánea. Este patrón de contracción es muy similar al descrito por Hendricks en 1968 para las mujeres en trabajo de parto activo. El perfil de contracción de las hembras tratadas con EGF fue desperejo e inconstante en el tiempo.

Estos resultados sugieren que la administración de EGF no sólo afecta la fuerza de las contracciones uterinas, sino que además modifica la forma en la que se desarrollan.

Si bien es posible que este efecto del EGF sea una consecuencia de la caída en la producción de PGs por el útero, no se puede descartar la posibilidad de que el EGF ejerciera su efecto directamente sobre la contractilidad espontánea, ya que el útero de rata gestante expresa R-EGF.

Como ya hemos mencionado, la acumulación de PGs en el líquido amniótico, derivadas de los tejidos feto-placentarios durante el trabajo de parto, ha sido postulada como el medio por el cual las PGs llegan hasta el miometrio induciendo la contractilidad miometrial (Romero y col. 1994, Weiner y col. 1994). Observaciones previas (Faber y col. 1996), como las aquí presentadas, señalan la importancia de los eicosanoides derivados de los tejidos feto-placentarios y su posible regulación por factores de crecimiento.

Decidimos entonces analizar el efecto del EGF sobre la concentración de PGs en el líquido amniótico.

Al igual que lo observado en el tejido uterino, la administración i/u de 500 ng de EGF en el día 21 de preñez disminuyó significativamente la concentración de las PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> en el fluido amniótico proveniente de hembras preñadas de 22 días.

Es posible entonces que una menor síntesis de PGs uterinas junto con una disminución en la concentración de PGs amnióticas, disminuyan la fuerza con que se producen las contracciones miometriales.

No se puede dejar de mencionar que la concentración de PGs en el líquido amniótico no es solamente una consecuencia de la producción uterina de estos eicosanoides, sino que los prostanooides producidos por la placenta y por las membranas fetales, también son volcados a la cavidad amniótica y por lo tanto influyen en la concentración registrada.

En 1956, Csapo demostró que la concentración de progesterona en plasma se encontraba baja tanto en los partos a término como en los partos pre – término.

La caída en el nivel de progesterona potencia la producción de agonistas que contribuyen a la contractilidad miometrial y desencadena cambios en el útero que aumentan la efectividad de los mismos.

Veinte años más tarde, Siiteri y colaboradores (1977) propusieron que la progesterona producida por la placenta y los ovarios, es la hormona esencial en la gestación de los mamíferos debido a su capacidad para inhibir las respuestas mediadas por los linfocitos T involucradas en el rechazo tisular. Ellos señalaron que la progesterona ha sido denominada de manera correcta "la hormona del embarazo" porque parece ser fundamental para su mantenimiento en todos los mamíferos examinados, y su presencia se detectó en especies que representan a todas las clases de vertebrados y aún a formas inferiores, como los moluscos.

En nuestro laboratorio, la Dra. Mariana Farina investigó la participación de la progesterona durante la preñez y el parto. La Dra. Farina observó que la concentración de progesterona es máxima en el día 13 de gestación (mitad de la preñez) y cae en momentos previos al inicio del parto (día 22 de preñez). Además demostró que el perfil sérico de la progesterona era inverso al registrado para las prostaglandinas uterinas (Farina y col. 2003).

Basados en estos antecedentes y en el hecho de que el EGF exógeno retrasó el inicio del parto, decidimos analizar si la administración i/u de EGF modificaba el nivel sérico de progesterona.

Encontramos que el tratamiento con 500 ng de EGF en el día 21 de gestación, mantiene alta la concentración de P<sub>4</sub> sérica en el día 22 de preñez, comparado con el nivel medido en el suero extraído de las ratas sham en día 22. Es decir, la administración de EGF previno la caída de progesterona necesaria para el inicio de las contracciones uterinas y en consecuencia el desencadenamiento del trabajo de parto.

Nuestros resultados coinciden con los de Manna y colaboradores (2002), quienes observaron que el EGF aumenta la síntesis de progesterona en células tumorales de Leydig, induciendo cascadas regulatorias asociadas con la proteína StAR.

En 1990, el grupo de Arakawa informó que la incubación con EGF de células de la granulosa provenientes de hembras preñadas de dos días, no afectaba el nivel basal de secreción de progesterona. Una diferencia con el trabajo realizado por Arakawa, es que

en nuestro modelo experimental la administración de EGF se realizó *in vivo* dentro de la luz de los cuernos uterinos. En segundo lugar, el grupo de Arakawa empleó células de la granulosa extraídas de hembras en el comienzo de la gestación, cuando la secreción de progesterona es mayor que al final de la preñez. Por otro lado, Jones y colaboradores (1982) demostraron que el EGF estimula de manera dosis – dependiente la secreción de progesterona en células de la granulosa en cultivo. Las diferencias en los modelos experimentales utilizados por los distintos autores no es trivial, ya que como informó el grupo de Radford (1987), el EGF presenta diferentes efectos sobre la función lútea, de acuerdo al estadio del ciclo estral en el que se administra.

En la actualidad se sabe que la naturaleza pulsátil de la liberación hipotalámica de GnRH determina la secreción episódica de gonadotrofinas hipofisarias. La periodicidad y la amplitud del ritmo pulsátil de secreción de GnRH / gonadotrofinas son fundamentales para regular las actividades gonadales y, por lo tanto, todo el eje reproductivo. Nuevas evidencias sugieren que las neuronas de GnRH estarían dotadas de receptores de neurotransmisores, GnRH, catecolaminas, hormonas esteroideas y tiroideas y factores de crecimiento. La LH es el regulador clave de la esteroidogénesis en el ovario.

Dado que habíamos observado un efecto del EGF sobre la progesterona, de origen ovárico, investigamos si el tratamiento con EGF, modulaba la concentración sérica de LH, evidenciando así un efecto sobre la hipófisis.

Observamos que la administración intra – uterina de EGF no modificó el nivel sérico de LH. Si bien estos resultados nos sugieren que el EGF, administrado en forma intra-uterina, no afecta la glándula hipofisaria y que su acción se limita al útero y al ovario, debemos mencionar que las hormonas LH y FSH están disminuidas durante la gestación como consecuencia de las concentraciones elevadas de progesterona, y que en el segundo trimestre del embarazo, el nivel sérico de LH se encuentra por debajo de los límites de detección de muchos radioinmunoensayos (Rubinstein y col. 1978). Así, es posible que variaciones pequeñas producidas por el tratamiento con EGF no hayan sido detectadas en nuestro ensayo.

Luego de la ovulación, el folículo dominante se reorganiza para convertirse en cuerpo lúteo. Después de la ruptura folicular los capilares y los fibroblastos del estroma

circundante proliferan y penetran la membrana basal. Simultáneamente, las células de la granulosa y de la teca sufren cambios morfológicos conocidos como "luteinización". El cuerpo lúteo es una glándula endócrina temporaria y es la mayor fuente de esteroides sexuales en la fase post – ovulatoria del ciclo. La expectativa de vida funcional del CL en la mujer es de  $14 \pm 2$  días. Luego de este período, el CL involuciona espontáneamente, a menos que se produzca la fertilización del ovocito. Durante la gestación, el CL dobla su tamaño durante las primeras 6 semanas (Gillman y Stein 1941). Este incremento se produce como consecuencia de la proliferación del tejido conectivo y los vasos sanguíneos, junto con la hipertrofia de las células luteinizadas de la granulosa y de la teca.

En la mujer embarazada, la hCG secretada por el trofoblasto mantiene la capacidad de secretar progesterona por el cuerpo lúteo, lo que ayuda a mantener la gestación temprana hasta que la placenta retome esa función luego del primer trimestre (Yoshimi y col. 1969). En los roedores, el CL es la mayor fuente de progesterona necesaria para el mantenimiento de la preñez, durante todo este período (Wright y col. 1980). Previo al desencadenamiento del trabajo de parto se produce una caída en los niveles séricos de progesterona como consecuencia del proceso luteolítico (Soloff 1989). En primates, incluida la especie humana, donde no se produce esta disminución de la progesterona sérica sino hasta que se elimina la placenta, tiene lugar un "withdrawal funcional de la progesterona", es decir que disminuye la expresión de los receptores de progesterona en el útero, y por lo tanto se observan los cambios bioquímicos que ocurren en las otras especies, necesarios para el desencadenamiento del parto.

En nuestro modelo experimental, hemos observado que la administración i/u de EGF mantiene elevado el nivel sérico de progesterona lo que produciría el retraso en el inicio del parto. Nosotros planteamos entonces como hipótesis, que el EGF podría estar previniendo el proceso luteolítico protegiendo al cuerpo lúteo y por lo tanto retrasando el parto. Así, el CL permanecería funcional por más tiempo y no se produciría la caída de progesterona en el día 22 de gestación, necesaria para el inicio del parto.

Es ampliamente aceptado que en el desencadenamiento del proceso luteolítico en la rata participan las COX-I y PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  uterinas. Hacia el final de la preñez, y antes del inicio del trabajo de parto, aumenta la expresión uterina de COX-I, responsable del incremento en la producción de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , conocida PG luteolítica.

En la rata, este factor luteolítico uterino parecería pasar directamente desde la vena uterina a la arteria ovárica (Del Campo y Ginther 1973). A pesar de no existir una conexión de tipo vascular entre ellas, existen zonas de estrecha superposición. Estos vasos comparten una túnica adventicia común y poseen paredes delgadas en las regiones donde hacen contacto.

Así, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a través de esta unión útero – ovárica alcanza el CL, sin pasar por la circulación sistémica, y desencadena la luteólisis estructural y funcional. Como consecuencia, caen los niveles séricos de  $\text{P}_4$ , provocando un aumento de la expresión de la COX-II uterina y de la síntesis de las PGs responsables de desencadenar las contracciones miométriales.

Nuestro siguiente paso fue estudiar la posible modulación, por el EGF exógeno, del mecanismo de la luteólisis.

Los resultados muestran que entre el día 21 y el día 22 de gestación, en las hembras sham, se produjo un aumento significativo de la expresión de COX-I y de la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterinas.

Analizamos entonces, estos importantes mediadores de la luteólisis luego del tratamiento con EGF. Las hembras se sacrificaron 4, 8, 12, 24 h (día 22) y 48 h (día 23, parto en las tratadas). Tanto la expresión de COX-I como la producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterinas disminuyeron significativamente siendo mínimas a las 12 h post - EGF, comparadas con el día 21 de preñez de las hembras sham.

Por otro lado, el perfil de la progesterona fue inverso al de la COX-I y la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Esta hormona esteroidea llegó al máximo nivel sérico a las 12 h post – tratamiento.

La capacidad de síntesis y liberación de progesterona por las células lúteas está íntimamente relacionada con el aspecto de los CL.

Como la PGs luteolítica se encontraba disminuida luego del tratamiento con EGF y observábamos también un aumento en la progesterona sérica, estudiamos si existía un efecto sobre la morfología de los CL.

Los resultados muestran que los ovarios de animales controles en el día 13 de gestación presentaban un gran monomorfismo celular y citoplasmas de aspecto espumoso, características que se corresponden con los tipos celulares que poseen un alto contenido de compuestos de origen lipídico. Las células de la granulosa de las

hembras sham de 21 y 22 días de gestación presentaron en cambio, citoplasmas más eosinófilos, es decir, menos espumosos y por lo tanto con menor contenido de material lipídico. Esta imagen es la típica que corresponde a las células en regresión por la condensación nuclear.

A las 8 h post – tratamiento con EGF los CL parecieron “re – luteinizados” y las células lúteas recuperaron el aspecto pavimentoso. En el día 23, día del parto de las hembras tratadas, las poblaciones celulares presentes en el cuerpo lúteo fueron semejantes a las descritas para las hembras sham de 22 días de gestación.

Los resultados descritos anteriormente, muestran un efecto inhibitorio temprano del EGF exógeno sobre la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina. Este efecto se correlaciona con la presencia de cuerpos lúteos funcionales y la ausencia de la disminución en la progesterona sérica.

Como ya se ha mencionado, el mantenimiento de la funcionalidad de los cuerpo lúteos y por lo tanto, de los niveles de progesterona impiden el aumento en la expresión de la COX-II, enzima responsable de la síntesis de las PGs necesarias para la generación de las contracciones uterinas del parto.

Debido a que un gran número de las acciones fisiológicas de la progesterona están mediadas a través de la interacción con las isoformas de PR, analizamos la regulación de su expresión por el EGF.

Las isoformas de PR tienen diferente función. Se ha postulado que PR-A es la isoforma “anti – parto” y actúa como un represor transcripcional de aquellos genes involucrados en el aumento de la contractilidad miométrial, incluido el gen que codifica para PR-B. En cambio, PR-B sería “pro – parto” actuando como un activador transcripcional y propiciando el desencadenamiento del trabajo de parto.

A las 24 h post– administración de EGF la expresión de PR-A se mantuvo alta y la de PR-B baja, coincidiendo con los valores observados en el día 21 de las hembras sham. Sin embargo, a las 12 h luego del tratamiento, el EGF moduló solamente la isoforma PR-B alcanzando el mínimo de su expresión.

En trabajos previos hemos descrito que la progesterona aumenta la expresión de los PR-A y disminuye la de los PR-B (Weissman y col. 2002), lo que sugiere que el mantenimiento de los niveles séricos de este esteroide debido al tratamiento con EGF, permite que la expresión de sus receptores sea similar a la de los días previos al parto.

El efecto del EGF sobre la concentración de progesterona sérica que hemos observado en este trabajo, podría deberse tanto a un efecto directo del EGF sobre el CL como a un efecto indirecto a través del tejido uterino. Por medio de los experimentos realizados en esta tesis no fue posible discernir si el efecto del EGF se circunscribía al útero o una acción directa sobre el ovario también estaba involucrada. Por ello, no hemos descartado la posibilidad de que el EGF estuviera ejerciendo su efecto a través de una unión específica sobre receptores en el CL.

Decidimos entonces estudiar la expresión de los R-EGF en los CL provenientes de hembras sham preñadas de día 21 (día de la administración de EGF) y día 22.

En los ambos días de preñez se encontró expresión del R-EGF, como así también la forma fosforilada del mismo, aunque no se detectaron diferencias en los niveles proteicos de ninguna de las formas estudiadas.

Este resultado nos sugiere que existe la posibilidad de un efecto directo del EGF sobre los cuerpos lúteos.

De esta manera, los resultados hasta aquí presentados indican que el tratamiento con EGF es capaz de modificar los mediadores que intervienen en el proceso luteolítico en el sentido de la preservación del CL, así el EGF protegería al CL ejerciendo un efecto de retraso sobre la luteólisis, permitiendo entonces la prolongación de la preñez.

Hemos presentado un modelo animal en el cual es posible estudiar el parto post – término. La administración intra – uterina de EGF en el día 21 de gestación disminuyó la actividad y la expresión de la COX. Además mantuvo elevada la concentración sérica de progesterona. El efecto fisiológico global fue la reducción en la fuerza de las contracciones uterinas que provocaron un retraso en el inicio del parto.

El EGF está presente en el fluido amniótico humano y su concentración aumenta con el progreso del trabajo de parto (Barka y col. 1978). También se ha informado que es capaz de estimular la síntesis de PGs en tejidos amnióticos y deciduales *in vitro* (Mitchell 1987, Skinner y Challis 1985).

En 1996, el grupo de Varner publicó un trabajo donde describían el perfil de concentración de EGF en el líquido amniótico de mujeres durante el embarazo. Estos autores observaron que en el líquido amniótico proveniente de mujeres con parto pre – término la concentración de EGF era menor que en las que presentaban parto a término.

Fue entonces de nuestro interés investigar la posible participación del EGF endógeno en el desencadenamiento del parto.

En primer lugar investigamos la expresión de los receptores para EGF en el útero de rata gestante. Observamos que el receptor de EGF se encuentra presente en el útero de rata durante la gestación y que el mismo está fosforilado, es decir en su forma activa (pR-EGF). Así mismo, tanto la expresión del receptor total como la del pR-EGF estaban reguladas en los distintos estadios de preñez analizados.

Hasta el momento no hay informes que describan el perfil de variación del EGF en el fluido amniótico de roedores. Estudiamos entonces por RIA el perfil de EGF en el líquido amniótico durante la preñez en la rata.

Los resultados muestran que la concentración de EGF aumentó progresivamente durante la preñez, haciéndose máxima en el día 21 de gestación y disminuyendo progresivamente hasta el día 22.

Por un lado, se ha informado que la expresión del EGF en las células del epitelio uterino de ratón se encuentra estimulada por los estrógenos (Huet-Hudson y col. 1990). Por otro lado, Trujillo y colaboradores (2001) encontraron que durante la gestación en la rata, los estrógenos aumentan en el día 21. Podríamos pensar entonces, que probablemente el aumento observado en la concentración amniótica de EGF está relacionado con el aumento de estrógeno sérico registrado hacia finales de la gestación.

Como hemos mencionado en las secciones anteriores, en la rata, la progesterona mantiene la quiescencia uterina durante la gestación y disminuye en los últimos días de preñez (Farina y col. 2003), permitiendo el aumento en la expresión de las enzimas encargadas de la síntesis de PGs, necesarias para la luteólisis y el parto.

El perfil del EGF en el líquido amniótico presenta una correlación inversa a la del nivel sérico de progesterona. De esta manera, los resultados hallados en este trabajo

sugieren que el EGF endógeno podría ser responsable de un mecanismo que prevendría la regresión del CL, probablemente esperando la madurez fetal indispensable para la vida extra-uterina.

La amplia gama de componentes que se encuentran involucrados en la regulación de la quiescencia uterina durante la preñez y la contractilidad miometrial en el momento del parto, sugiere que este proceso está finamente regulado y que una falla en el mismo podría conducir a una deficiencia en la capacidad reproductiva, como el parto prematuro, uno de los principales problemas en perinatología.

Este trabajo contribuye al esclarecimiento de la regulación de las moléculas que modulan la motilidad uterina durante el proceso de parto.

**conclusiones**

- El EGF, administrado en forma intrauterina,
  - retrasa el inicio del parto en la rata
  - disminuye la síntesis de PGs y la expresión de las COX uterinas
  - reduce la amplitud de las contracciones miométricas
  - impide el aumento de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  luteolítica y la caída de la progesterona sérica
  - produce la "re-luteinización" los cuerpos lúteos
  - regula la expresión de los receptores de progesterona.
  
- La concentración de EGF en el líquido amniótico y los receptores de EGF uterinos están regulados durante la preñez.

El EGF exógeno modula los mecanismos moleculares involucrados en el inicio del parto a través de un efecto inhibitorio sobre la luteólisis.

María Susana Ribeiro

Andrés Sánchez

**referencias**

**Abraham GE, Swerdloff R, Tulchinaky D and Odell WD.** Radioimmunoassay of plasma progesterone *Journal of Clinical Endocrinology* **32** 619–624 (1971).

**Aitken MA, Farrugla W, Wong MH, Scott KF, Brennecke SP, Rice GE.** Type II phospholipase A2 in human gestational tissues: extractable immuno- and enzymatic activity in fetal membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **1170** (3): 314-20 (1993).

**Ances IG.** Serum concentrations of epidermal growth factor in human pregnancy *Am J Obstet Gynecol* **115**: 357 (1973).

**Arakawa S, Isobe S, Mori H, Kambegawa A, Kan R, Okinaga S, Arai K.** The effect of epidermal growth factor (EGF) on progesterin secretion and cyclic AMP synthesis in cultured luteal cells from pregnant rats *Endocrinol Jpn* **37**: 479 (1990).

**Asdell SA y Hammond J.** The effect of prolonging the lifespan of the corpus luteum in the rabbit by hysterectomy *Am J Physiol* **103**: 600 (1933).

**Auletta FJ, Speroff L, Caldwell BV.** Prostaglandin F2 $\alpha$  - induced steroidogenesis and luteolysis in the primate corpus luteum *J Clin Endocrinol Metab* **36**: 405 (1973).

**Bany BM y Kennedy TG.** Regulation by epidermal growth factor of prostaglandin production and cyclooxygenase activity in sensitised rat endometrial stromal cells in vitro *J Reprod Fert* **104**: 57 (1995).

**Barka T, Vander Noen H, Greslk EW, Kerenyi T.** Immunoreactive epidermal growth factor in human amniotic fluid *Mt Sinai J Med* **45**: 679 (1978).

**Barke A.** Influences of an IUD on the leukocytic content of the uterus and on the duration of pseudopregnancy in mice *J Reprod Fert* **23**: 243 (1970).

**Beckman JS y Crow JP.** Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation *Biochem Soc Trans* **21**: 330 (1993).

**Behrman HR, Grinwich DH, Hichens M, MasDonald GJ.** Effect of hysterectomy, prolactin and prostaglandin F2 $\alpha$  on gonadotropin binding in vivo and in vitro in the corpus luteum *Endocrinol* **103**: 349 (1978).

**Behrman HR, Luborsky – Moore JL, Pang CY, Wright K, Dorflinger LJ.** Mechanisms of PGF2 $\alpha$  action in functional luteolysis. In: *Ovarian Follicular and Corpus Luteum Function, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Eds. Channing CP, Marsh J, Sadler WA. Pp. 557 Plenum Press, New York (1979).

**Beling GC, Marcus SL, Markam SM.** Functional activity of the corpus luteum following hysterectomy *J Clin Endocrinol Metab* **30**: 30 (1970).

**Bennegard B, Hahlin M, Hamberger L.** Luteotropic effects of prostaglandins I2 and D2 on isolated human corpora lutea *Fertil Steril* **54**: 459 (1990).

**Bergtröm S y Sjövall J.** The isolation of prostaglandins. *Acta Chem. Scand.* **11**: 1086 (1957).

**Bertics PJ, Chen WS, Hubler L, Lazar CS, Rosenfeld MG, Gill GN.** Alteration of epidermal growth factor receptor activity by mutation of its primary carboxyl-terminal site of tyrosine self-phosphorylation *J Biol Chem* **263**: 3610 (1988).

**Blandau RJ, Brackett B, Brenner RM.** The oviduct. In: *Frontiers in reproduction and fertility control*. Eds. Greep RO y Koblinsky MA. Pp. 132 MIT Press, Cambridge (1977).

**Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* **72**: 246 (1976).

**Brannian JD y Stouffer RL.** Cellular approaches to understanding the function and regulation of the primate corpus luteum *Sem Reprod Endocrinol* **91**: 341 (1991 a).

**Brannian JD y Stouffer RL.** Progesterone production by monkey luteal cells subpopulations at different stages of the menstrual cycle: changes in agonist responsiveness *Biol Reprod* **44**: 141 (1991 b).

**Brennecke S, Bryce R, Turnbull A, Mitchell M.** Inhibition of prostaglandin synthase by maternal plasma factor(s) in early human pregnancy *Br J Obs Gyn and Reprod Biol* **89**: 612 (1982).

**Buchmiller TL, Shaw KS, Chopourian HL, Lloyd KC, Gregg JP, Rivera FA, Lam ML, Diamond JM, Fonkalsrud EW.** Effect of transamniotic administration of epidermal growth factor on fetal rabbit small intestinal nutrient transport and disaccharidase development *Pediatr Surg* **28**: 1239 (1993).

**Bukowski R, Mc Kay L, Shi S, Saad GR, Garfield RE.** The effects of cervical application of inhibitors of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 on delivery in rats *Am J Obstet Gynecol* **185**: 959 (2001).

**Burke P, Schooler K, Willey S.** Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking *Mol Biol Cell* **12**: 1897 (2001).

**Burnstock G y Prosser CL.** *Am J Physiol* **198**: 921 (1960).

**Burrows H.** Biological actions of sex hormones. Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge (1951).

**Caldwell BV, Mazer RZ, Wright PA.** Luteolysis as affected by uterine transplantation in the Syrian hamster *Endocrinol* **80**: 477 (1967).

**Cameron JL y Stouffler RL.** Gonadotropin receptors of the primate corpus luteum II. Changes in available luteinizing hormone and chorionic gonadotropin binding sites in macaque luteal membranes during non fertile menstrual cycle *Endocrinol* **110**: 2068 (1982).

**Campbell WB y Ojeda SR.** Measurement of prostaglandins by radioimmunoassay *Methods in Enzymology* **141**: 323 (1987).

**Carpenter G y Cohen S.** <sup>125</sup>I-labeled human epidermal growth factor: binding, internalization and degradation in human fibroblasts *J Cell Biol* **71**: 159 (1976).

**Carpenter g, King L, Cohen S.** Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro *Nature* **276**: 409 (1978).

**Carpenter G y Cohen S.** Epidermal Growth Factor *J Biol Chem* **265**: 7709 (1990).

**Carson SA, Chase R, Ulep E, Scommegna A, Benveniste R.** Ontogenesis and characteristics of epidermal growth factor receptors in human placenta *Am J Obstet Gynecol* **147**: 932 (1983).

**Casey LM, Korte K, Mac Donald P.** Epidermal growth factor stimulation of prostaglandin E2 biosynthesis in amnion cells. Induction of prostaglandin H2 synthase *J Biol Chem* **263**: 7846 (1988).

**Castracane VD y Shalkh AA.** Effect of decidual tissue on the uterine production of prostaglandins in pseudopregnant rats *J Reprod Fertil* **46**: 101 (1976).

**Castracane VD, Moore GT, Shalkh AA.** Ovarian function of hysterectomized *Macaca fascicularis* *Biol Reprod* **20**: 462 (1979).

**Challis J y Olson D.** Parturition En *The Physiology of Reproduction* Eds. Knobil E, Neill J. Pp. 1271 Raven Press, New York (1988).

**Cheung PY, Walton JC, Tai HH, Riley SC, Challis JR.** Localization of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in human fetal membranes, decidua and placenta during pregnancy *Gynecol Obstet Invest* **33**: 142 (1992).

**Chu JP, Lee CC, You SS.** Functional relation between the uterus and the corpus luteum *J Endocrinol* **4**: 392 (1946).

**Chwalsz K y Garfield R.** Role of progesterone during pregnancy: models of parturition and preeclampsia *Z Geburtsh u Perinat* **198**: 170 (1994).

**Clarck J y Mani S.** Actions of ovarian steroids hormones En *The physiology of reproduction* Eds. Knobil E y Neill JD. Pp 1012 Raven Press, New York (1994).

**Conneely OM y Lydon JP.** Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms *Steroids* **65**: 571 (2000).

**Corner GW y Allen WM.** Physiology of the corpus luteum *Am J Physiol* **88**: 326 (1929).

**Corner GW.** Development, organization and breakdown of the corpus luteum in the rhesus monkey *Carnegie Contrib Embryol* **31**: 117 (1945).

**Corner GW Jr.** The histological dating of the human corpus luteum of menstruation *Am J Anat* **98**: 377 (1956).

**Couliam CH, Edwin SS, La Marche S, Mitchell M.** Actions of interleukin-2 on amnion prostaglandin biosynthesis *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent Fatty Acids* **49**: 959 (1993).

**Crister ES, Rittledge JJ, French RL.** Role of the uterus and the conceptus in regulating luteal lifespan in the mouse *Biol Reprod* **23**: 558 (1980).

**Crister ES, Rittledge JJ, French LR.** Effect of indomethacin on the interestrud interval of intact and hysterectomized pseudopregnant mice *Biol Reprod* **24**: 1000 (1981).

**Csapo A.** Force of Labor En *Principles and Practice of Obstetrics and Perinatology* Eds. Iffy L, Kaminetzky H y Wiley J. Pp. 761 New York (1981).

**Csapo A.** Progesterone block *Am J Anat* **98**: 273 (1956).

**Dai D y Ogle TF.** Progesterone regulation of Epidermal Growth Factor Receptor in rat decidua basalis during pregnancy *Biol Reprod* **61**: 326 – 332 (1999).

**Das SK, Tsukamura H, Paria BC, Andrews GK, Dey S.** Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mice uterus *Endocrinol* **134**: 971 (1994).

**Dei Campo CH y Ginther OJ.** Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: guinea pigs, rats, hamsters and rabbits *Am J Vet Res* **33**: 2561 (1973).

**Dewar AD.** Effects of hysterectomy on corpus luteum activity in the cyclic, pseudopregnant and pregnant mouse *J Reprod Fertil* **33**: 77 (1973).

**Doebler JA, Wickersham EW, Anthony A.** Uterine prostaglandin F<sub>2α</sub> content and 20- $\alpha$ -hydroxy-steroid dehydrogenase activity in individual ovarian compartments during pseudopregnancy in the rat *Biol Reprod* **24**: 871 (1981).

**Dong YL y Yallampalli C.** Interaction between nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> pathways in pregnant rat uteri *Am J Physiol* **270**: 471 (1996).

**Downward J, Parker P, Waterfield MD.** Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor *Nature* **311**: 483 (1984).

**Doyle LL, Barclay DL, Duncan GW, Kirton KT.** Human luteal function following hysterectomy as assessed by plasma progesterin *Am J Obstet Gynecol* **110**: 92 (1971).

**Duby RT, McDaniel JW, Spilman CH, Black DL.** Utero-ovarian relationships in the golden hamster I. Ovarian periodicity following hysterectomy *Acta Endocrinol* **60**: 595 (1969).

**Duncan WC, Roger FE, Illingworth PJ.** The human corpus luteum: reduction in macrophages during stimulated maternal recognition of pregnancy *Human Reprod* **13**: 2435 (1998).

**Duncan WC.** The human corpus luteum: remodeling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy *Rev Reprod* **5**: 12 (2000).

**Durrant EP.** Studies on vigor XI. Relationship of hysterectomy to voluntary activity in the white rat *Am J Physiol* **82**: 14 (1927).

**Edwin S, Romero R, Munoz H, Branch D, Mitchell M.** 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid and human parturition *Prostaglandins* **51**: 403 (1996).

**Engelhardt G, Böegel R, Schnitzer Ch, Utzmann R.** Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism *Biochem Pharmacol* **51**: 21 (1996).

**Evans RM.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily *Science* **240**: 889 (1988).

**Eyster KM, Ottobre JS, Souffer RL.** Adenylate cyclase in the corpus luteum of the rhesus monkey III. Changes in basal and gonadotropin sensitive activities during the luteal phase of the menstrual cycle *Endocrinol* **117**: 1571 (1981).

**Faber BM, Metz SA, Chegini N.** Immunolocalization of Eicosanoid Enzymes and Growth Factors in Human Myometrium and Fetoplacental Tissues in Failed Labor Inductions *Obstet Gynecol* **88**:174 (1996).

**Fairclough RJ, Smith JF, McGowan LT.** Prolongation of the oestros cycle in cows and ewes after passive immunization with PGF antibodies *J Reprod Fertil* **62**: 213 (1981).

**Fang x, Wong S, Mitchell B.** Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late-gestation rat uterus *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**: 1167 (2002).

**Farina M, Ribeiro ML, Weissman C, Estévez A, Franchi A.** Progesterone regulates uterine PGF<sub>2α</sub> synthesis and catabolism during pregnancy in the rat *Reproduction* (2003, enviado).

**Fisch B, Margara RA, Winston RM, Hillier SG.** Cellular basis of luteal steroidogenesis in the human ovary *J Endocrinol* **122**: 303 (1989).

**Fletcher PW y Niswender GD.** Effect of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  on progesterone secretion and adenylate cyclase activity in ovine luteal tissue *Prostaglandins* **20**: 803 (1982).

**Franchi A, Faletti A, Gimeno MF, Gimeno AL.** Influence of sex hormones on prostaglandin dehydrogenase activity in the rat uterus *Prostaglandins* **29**: 953 (1985).

**Freed KA, Moses EK, Brennecke SP, Rice GE.** Differential expression of type II, IV and cytosolic PLA<sub>2</sub> messenger RNA in human intrauterine tissues at term. *Mol. Hum. Reprod.* **3** (6): 493-9 (1997).

**Friedman SA.** Preeclampsia: A review role of prostaglandins *Obstet Gynecol* **71**: 122 (1988).

**Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S.** NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro *Prostaglandins* **47**: 55 (1994).

**Gardner RM, Lingham RB, Stancel GM.** Contractions of the isolated uterus stimulates by epidermal growth factor *FASEB J* **1**: 224 (1987).

**Gardner RM y Stancel GM.** Blockade of epidermal growth factor – induced uterine contractions by indomethacin and nordihydroguaritic acid *J Pharmacol Exp Ther* **250**: 882 (1989).

**Germain AM, Smith J, Casey ML, MacDonald PC.** Human fetal membrane contribution to the prevention of parturition: uterotonin degradation *J Clin Endocrinol Metab* **78**: 463 (1994).

**Gillard JL.** The effects of hysterectomy on mammary development in the rabbit *Am J Physiol* **120**: 300 (1937).

**Gillman J y Stein H.** The human corpus luteum of pregnancy *Surg Gynecol Obstet* **72**: 129 (1941).

**Glnther OJ.** Internal regulation of physiological processes through venoarterial pathways: a review *J Anim Sci* **39**: 550 (1974).

**Goetzman BW, Read LC, Plopper CG, Tarantal AF, George – Nascimento C, Merritt TA, Whisett JA, Styne D.** Prenatal exposure to epidermal growth factor attenuates respiratory distress syndrome in rhesus infants *Pediatr Res* **35**: 30 (1994).

**Goldblatt MW.** The Clinica del Lavoro. *J. Soc. Chem. Ind.* **52**: 1056 (1933).

**Graham JD y Ciarcke CL.** Physiological actions of progesterone in target tissues *Endocr Rev* **18**: 502 (1997).

**Gray A, Duil TJ, Ullrich A.** Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor *Nature* **303**: 722 (1983).

**Gross GA, Imamura T, Luedke C, Vogt SK, Olson LM, Nelson MD, Sadosky Y, Muglia LJ.** Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of marine labor *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11875 (1998).

**Gu W, Rice E, Thornburn D.** Prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> $\alpha$  in mid – pregnant rat uterus and at parturition *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent Fatty Acids* **40**: 27 (1990).

**Guerra-Aralza C, Cerbon MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo J.** Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle *Life Sci* **66**: 1743 (2000).

**Hafez.** *Animales de laboratorio*, OPS (1987).

**Hamberger L, Nilsson L, Dennefors B, Kharn I, Sjören A.** Cyclic AMP formation of isolated human corpora lutea in response to hCG – interference by PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . *Prostaglandins* **17**: 615 (1979).

**Hansen HS.** 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase. A review *Prostaglandins* **12**: 647 (1976).

**Hendricks CH.** Uterine contractility changes in the early puerperium En *Clinical Obstetrics and Gynecology, thromboembolic disorders, physiology of labor* Eds. Anderson GV y Guilligan EJ Pp. 125, Harper and Row, New York (1968).

**Henricks DM, Guthrie HD, Handlin DL.** Plasma estrogen, progesterone and luteinizing hormone levels during the estrous cycle in pigs *Biol Reprod* **6**: 210 (1972).

**Hirata Y, Sueoka S, Uchihashi M, Yoshimoto Y, Fujita T, Matsukura S, Motoyama T.** Specific binding sites for epidermal growth factor and its effect on human chorionic gonadotropin secretion by cultured tumor cell lines: comparisson between trophoblastic and non trophoblastic cells *Acta Endocrinol (Copenh)* **101**: 281 (1982).

**Hirst J, Teixeira F, Zakar T, Olson D.** Prostaglandin H synthase-2 expression increases in human gestational tissues with spontaneous labour onset *Reprod Fertil Dev* **7**: 633 (1995a).

**Hirst J, Teixeira F, Zakar T, Olson D.** Prostaglandin endoperoxide-H synthase-1 and -2 messenger ribonucleic acid levels in human amnion with spontaneous labor onset *J Clin Endocrinol Metab* **80**: 517 (1995b).

**Hock RA y Hollenberg MD.** Characterization of the receptor for epidermal growth factor urogastrone in human placenta membranes *J Biol Chem* **255**: 10731 (1980).

**Hoffman GE, Rao ChV, Brown MJ, Murray LF, Schultz GS, Siddiqi TA.** Epidermal Growth Factor in urine of nonpregnant women and pregnant women throughout pregnancy and at delivery *J Clin Endocrinol Metab* **66**: 119 (1988).

**Houmard BS, Guan Z, Stokes BT, Ottobre JS.** Activation of the phosphatidil – inositol pathways in the primate corpus luteum by prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *Endocrinol* **131**: 743 (1991).

**Hoyer PB y Marion SL.** Influence of agents that affect intracellular calcium regulation on progesterone secretion in small and large luteal cells of the sheep *J Reprod Fertil* **86**: 445 (1989).

**Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK, Dey SK.** Estrogen regulates epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells *Molec Endoc* **4**: 510 (1990).

**Hulka J y Chepko M.** Vaginal prostaglandin E1 analogue (ONO-802) to soften the cervix in first trimester abortion *Obstet Gynecol* **69**: 57 (1987).

**Huszar G y Walsh MP.** Biochemistry of the myometrium and cervix. En *Biology of the uterus* Eds. Wynn RM y Jollie WP. Pp. 355. Plenum, New York (1989).

**Hsueh AJ, Welsh Jr T, Jones PBC.** Inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis by epidermal growth factor *Endocrinol* **108**: 2002 (1981).

**Irvine RF.** How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells *Biochem J* **204**: 3 (1982).

**Jaffe BM y Behrman HR.** *Methods of Hormone Radioimmunoassay* Eds. Jaffe y Behrman. Pp. 19 Academic Press., N.Y (1974).

**Jones PBC, Welsh Jr TH, Hsueh AJ.** Regulation of ovarian progestin production by epidermal growth factor in cultured rat granulosa cells *J Biol Chem* **257**: 11268 (1982).

**Jordan VC, Dix CJ, Prestwitch G.** Inhibition of cell division and stimulation of progesterone receptor synthesis in rat oestrogen target tissues by non-steroidal antioestrogens *Adv Exp Med Biol* **117**: 133 (1979).

**Katzung BG.** The Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes and Related Compounds En *Basic and clinical Pharmacology* Eds. Appleton & Lange. Pp. 264 Norwalk, Connecticut (1992).

**Keirse C.** Eicosanoids in Human Pregnancy and Parturition En *Eicosanoids in reproduction* Eds. M Mitchell. Pp. 199 CRC Press, Boca Raton, Florida (1990).

**Keneth K.** Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase *Adv Pharmacol* **33**: 179 (1994).

**Kelly PA, Shiu RPC, Robertson MC, Friesen HG.** Characterization of rat chorionic mammatropin *Endocrinol* **96**: 1187 (1975).

**Kennedy J, Brown KD, Vaughan TJ.** Expression of genes for the epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine oviduct and endometrium *Biol Reprod* **50**: 751 (1994).

**Khun RW, Schrader WT, Coty WA, Conn M, O'Malley BW.** Progesterone-binding components of chick oviduct. Biochemical characterization of purified oviduct progesterone receptor B subunit *J Biol Chem* **252**: 308 (1977).

**Knetch M y Catt KJ.** Modulation of camp – mediated differentiation in ovarian granulosa cells by epidermal growth factor and platelet derived growth factor *J Biol Chem* **258**: 2789 (1983).

**Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS.** Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters *Mol Endocrinol* **7**: 1603 (1993).

**Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Hershman HR.** TIS 10, a phorbol ester tumor promoter inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase / cyclooxygenase homologue *J Biol Chem* **266**: 12866 (1991).

**Kurzrok R, Lieb CC.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **26**: 268 (1930).

**Labhsetwar A y Watson D.** Temporal relationship between secretory patterns of gonadotropins, estrogens, progestins and prostaglandin F in periparturient rats *Biol Reprod* **10**: 103 (1974).

**Lacroix MC y Kann G.** Ontogeny and characterization of Epidermal growth factor receptors on the fetal area of the sheep placenta *J Endocrinol* **136**: 43 (1993).

**Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**: 680 (1970).

**Lai WH y Guyda HJ.** Characterization and regulation of epidermal growth factor in human fetal membranes *J Clin Endocrinol Metab* **58**:1034 (1984).

**Lapetina EG.** Platelet-activating factor stimulates the phosphatidylinositol cycle. Appearance of phosphatidic acid is associated with the release of serotonin in horse platelets *J Biol Chem* **257**: 7314 (1982).

**Lau IF, Saksena SK, Chang MC.** Effects of indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis, on the length of pseudopregnancy in rats and hamster *Acta Endocrinol* **78**: 343 (1975).

**Lennard SN, Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F.** Expression of epidermal growth factor and its receptor in equine placental tissues *J Reprod Fertil* **112**: 49 (1998).

**Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS Jr.** Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle *J Clin Endocrinol Metab* **67**: 334 (1988).

**Lin TH, Verner G, Kirkland JL, Stancel GM.** Autoradiographic localization of epidermal growth receptors to all major uterine cell types *Biol Reprod* **38**: 430 (1988).

**Lintern – Moore S, Moore GP, Panaretto BA, Robertson D.** Follicular development in the neonatal mouse ovary; effect of epidermal growth factor *Acta Endocrinol (Copenh)* **96**: 123 (1981).

**Loeb LV.** The effect of extirpation of the uterus on the life and function of the corpus luteum in the guinea pig *Proc Soc Exp Biol Med* **20**: 441 (1987).

**Luciano AM, Pappalardo A, Ray C, Peluso JJ.** Epidermal growth factor inhibits large granulosa cell apoptosis by stimulating progesterone synthesis and regulating the distribution of intracellular free calcium *Biol Reprod* **51**: 646 (1994).

**Lukaszewska JH y Greenwald GS.** Comparison of luteal function in pseudopregnant and pregnant mice *J Reprod Fertil* **20**: 185 (1969).

**Lytton FDC y Poyser NL.** Prostaglandin production by rabbit uterus and placenta in vitro *J Reprod Fertil* **66**: 591 (1982).

**MacDonald P, Koga S, Casey M.** Decidual activation in parturition: examination of amniotic fluid for mediators of the inflammatory response *Ann NY Acad Sci* **622**: 315 (1991).

**Manaug LC y Novy MJ.** Effects of indomethacin on corpus luteum function and pregnancy in rhesus monkey *Fertil Steril* **27**: 588 (1976).

**Manna PR, Huhtaniemi IT, Wang XJ, Eubank DW, Stocco DM.** Mechanisms of epidermal growth factor signaling: regulation of steroid biosynthesis and the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig tumor cells *Biol Reprod* **67**: 1393 (2002).

**Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, Weigel NL.** Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle *J Steroid Biochem Mol Biol* **63**: 195 (1993).

**Mangelsdorf DJ, Thummei C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P y col.** The nuclear receptor superfamily: the second decade *Cell* **83**: 835 (1995).

**Margolis BL, Lax I, Kris R, Dombalagian M, Honegger AM, Howk R, Glivol D, Ullrich A, Schlessinger J.** All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/neu are located in their carboxyl-terminal tails. Identification of a novel site in EGF receptor *J Biol Chem* **264**: 10667 (1989).

**Mijovic JE, Zakar T, Nairn TK, Olson DM.** Prostaglandin Endoperoxide H synthase (PGHS) activity and PGHS-1 and PGHS-2 messenger ribonucleic acid abundance in human chorion throughout gestation and with preterm labor *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 1358 (1998).

**Mitchell M.** Epidermal growth factor actions on arachidonic acid metabolism in human amnion cells *Biochimica et Biophysica Acta* **928**: 240 (1987).

**Mitchell M.** The regulation of decidual prostaglandin biosynthesis by growth factors, phorbol esters, and calcium *Biol Reprod* **44**: 871 (1991).

**Mitchell M, Edwin S, Lundin-Schiller S, Silvr RM, Smotkin D, Trantmen MS.** Mechanism of interleukin-1 beta stimulation of human amnion prostaglandin biosynthesis: mediation via a novel inducible cyclooxygenase *Placenta* **14**: 615 (1993).

**Mod er T, Yucel-Lindberg T, Inuma M, Lerner UH, Anderson G.** Epidermal growth factor potentiates interleukin 1 and tumor necrosis factor-induced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts *Cytokines* **5**: 1984 (1993).

**Moharam A, Aleem F, Farmakides G, Schulman H, Maghzangy M, Rashed A, Konstantinou E.** Urinary and amniotic epidermal growth factor during normal and abnormal pregnancies. A comparison based upon umbilical Doppler velocimetry *Gynecol Endocrinol* **6**: 287 (1992).

**Mroczkowski B, Reich M, Chen K, Bell GI, Cohen S.** Recombinant human epidermal growth factor precursor is a glycosylated membrane protein with biological activity *Mol Cell Biol* **9**: 2771 (1989).

**Mukku VR y Stancel GM.** Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen *J Biol Chem* **260**: 9820 (1985 a).

**Mukku VR y Stancel GM.** Receptors for epidermal growth factor in the rat uterus *Endocrinol* **117**: 149 (1985 b).

**Neill JD, Johansson EDB, Knobil E.** Failure of hysterectomy to influence the normal pattern of cyclic progesterone secretion in the rhesus monkey *Endocrinol* **84**: 464 (1969).

**Nelson SE, McLean MP, Jayatilak PG, Gibori G.** Isolation, characterization and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum *Endocrinol* **130**: 954 (1992).

**Nett TM, McClellan MC, Niswender GD.** Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology *Biol Reprod* **15**: 66 (1976).

**Niswender GD, Midgley AR, Monroe SE, Reichart LE.** Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine <sup>131</sup>I. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **128**: 807 (1968).

**Niswender GD, Reimers TJ, Dieckman MA, Nett TM.** Blood flow: a mediator of ovarian function *Biol Reprod* **14**: 64 (1976).

**Niswender GD y Nett TM.** Corpus luteum and its control in infraprime species En *The physiology of reproduction* Eds. Knobil E y Neill JD. Pp. 781 Raven press, New York (1994).

**O'Banion MK, Winn V, Young DA.** cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4888 (1992).

**O'Brien W, Knuppei R, Cohen G.** Plasma prostaglandin metabolite levels after use of prostaglandin E2 gel for cervical ripening *Am J Obstet Gynecol* **155**: 1037 (1986).

**Ogle TF.** Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy *Steroids* **67**: 1 (2002).

**Okasaki T, Casey ML, Okita JR y col.** Initiation of human parturition: biosynthesis and metabolism of prostaglandins in human fetal membranes and uterine decidua *Am J Obstet Gynecol* **139**: 373 (1981).

**O'Keefe E, Hollenberg MD, Cuatrecasas P.** Epidermal growth factor: characteristics of specific binding in membranes from liver, placenta and target tissues *Arch Biochem Biophys* **154**: 518 (1974).

**Omini C, Foico GC, Pasargkilan R y col.** Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) in pregnant human uterus Prostaglandins **17**: 113 (1979).

**Patwardhan VV y Lanthier A.** Effect of prostaglandin F<sub>2α</sub> on the hCG – stimulated progesterone production by human corpora lutea *Prostaglandins* **27**: 465 (1984).

**Porter DG y Finn CA.** The biology of the uterus En *Frontiers in reproduction and fertility control* Eds. Greep RO y Koblinsky MA. Pp. 132 MIT Press, Cambridge (1977).

**Poser NL y Horton EN.** Plasma progesterone levels in guinea pigs actively immunized against PGF<sub>2α</sub> hysterectomized or treated with intra-uterine indomethacin *J Endocrinol* **67**: 81 (1975).

**Poyser NL.** Production of prostaglandins by the guinea pig uterus *J Endocrinol* **54**: 147 (1972).

**Radford HM, Panaretto BA, Avenell JA, Turnbull KE.** Effect of mouse epidermal growth factor on plasma concentrations of FSH, LH and progesterone and on oestrus, ovulation and ovulation rate in merino ewes *J Reprod Fertil* **80**: 383 (1987).

**Rao CV, Ramani N, Chegini N, Stadig BK, Carman FR, Woost PG, Schultz GS, Cook CL.** Topography of human placental receptors for epidermal growth factor *J Biol Chem* **260**: 1705 (1985).

**Reece MC, Anderson AB, Demers LM, Turnbull AC.** Endometrial and myometrial prostaglandin release during the menstrual cycle in relation to menstrual blood loss *J Clin Endocrinol Metab* **58**: 813 (1984).

**Reece MS, Mc Gregor JA, Allen KG, Mathias M, Harris M.** Prostaglandins in selected reproductive tissues in preterm and full term gestations *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent Fatty Acids* **55**: 303 (1996).

**Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY.** Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C *Science* **244**: 546 (1989).

**Ribeiro ML, Perez Martinez S, Ogando D, Farina M, Franchi A.** The effect of Epidermal growth factor on prostaglandin synthesis of estrogenized rat uterus is mediated by nitric oxide *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent Fatty Acids* **61**: 353 (1999).

**Rice G, Wong M, Thorburn G.** Gestational changes in prostaglandin synthase activity of ovine cotyledonary microsomes *J Endocrinol* **118**: 265 (1988).

**Rice G.** Secretory type II phospholipase A<sub>2</sub> and the generation of intrauterine signals. *Reprod. Fertil. Dev.* **7** (6): 1471-9 (1995).

**Richards RC, Beardmore JM, Brown PJ, Molloy CM, Johnson PM.** Epidermal growth factor receptors on isolated human placenta syncytiotrophoblast plasma membrane *Placenta* **4**: 133 (1983).

**Robertson MC, Gilliespi B, Friesen HG.** The purification and characterization of rat placental lactogen (rPL): rPL-I and rPL-II *Endocrinol* **111**: 1862 (1982).

**Romero R, Brody D, Oyarzun E, Mazor M, Wu Y, Hobblins J, Durum S.** Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition *Am J Obstet Gynecol* **160**: 1117 (1989).

**Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal P.** Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection *J Clin Inv* **85**: 1392 (1990).

**Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, Copeland D, Williams J.** Tumor necrosis factor in preterm and term labor *Am J Obstet Gynecol* **166**: 1576 (1992).

**Romero R, Baumann P, Gonzalez R, Gomez R, Rittenhouse L, Behnke E and Mitchell MD.** Amniotic fluid prostanoid concentrations increase early during the course of spontaneous labor at term *Am J Obstet Gynecol* **171**: 1613 (1994)

**Rubinsteln LM, Pariow AF, Dersko C, Hershman JM.** Pituitary gonadotropin response to LHRH in human pregnancy *Obstet Gynecol* **52**: 172 (1978).

**Salmon J y Amy J.** *Prostaglandins* **4**: 523 (1973).

**Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currier MG, Needleman M.** Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7240 (1993).

**Sangha RK, Walton JC, Ensor CM, Tai HH, Challis JR.** Immunohistochemical localization, messenger ribonucleic acid abundance and activity of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in placenta and fetal membranes during term and preterm labor *J Clin Endocrinol Metab* **78**: 982 (1994).

**Sanyal MK.** Secretion of progesterone during gestation in the rat. *J Endocrinol.* **79(2)**:179-90. (1978)

**Savage CR, Inagami T, Cohen S.** The primary structure of Epidermal Growth Factor *J Biol Chem* **247**: 7612 (1972).

**Scaramuzi RJ y Baird DT.** The oestrus cycle of the ewe after active immunization against PGF<sub>2α</sub> *J Reprod Fertil* **46**: 39 (1976).

**Schomberg DW, May JV, Mondschein JS.** Interactions between hormones and growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation in vitro *J Steroid Biochem* **19**: 291 (1983).

**Scott J, Ureda M, Quiroga M, Sanchez-Pescador R, Fong N, Selby M, Rutter WJ, Bell GI.** Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins *Science* **221**: 236 (1983).

**Shyamala G, Yang X, Cardiff RD, Daie E.** Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3044 (2000).

**Silteri PK, Febres F, Clemens LE y col.** Progesterone and maintenance of pregnancy: Is progesterone nature's immunosuppressant? *Ann NY Acad Sci* **286**: 384 (1977).

**Silvia WJ, Fitz TA, Mayan MH, Niswender GD.** Cellular and molecular mechanisms involved in luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe *Anim Reprod Sci* **7**: 57 (1984).

**Skinner KA y Challis JR.** Changes in the synthesis and metabolism of prostaglandins by human fetal membranes and deciduas at labor *Am J Obstet Gynecol* **151**: 519 (1985).

**Sladek M, Westerhausen-Larson A, Roberts J.** Endogenous nitric oxide suppresses rat myometrial connexin 43 gap junction protein expression during pregnancy *Biol Reprod* **61**: 8 (1999)

**Slowey MJ, Verhage HG, Fazleabas AT.** Epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and epidermal growth factor receptor localization in the baboon (*Papio anubis*) uterus during the menstrual cycle and early pregnancy *J Soc Gynecol Investig* **4**: 277 (1994).

**Smith WL y Marnett LJ.** Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis *Biochem Biophys Acta* **1083**: 1 (1991).

**Smith WL, Elling TE, Kulmacz RJ, Marnett LJ, Tsai A.** Tyrosyl radicals and their role in hydroperoxide-dependent activation and inactivation of prostaglandin endoperoxide synthase *Biochemistry* **31**: 3 (1992).

**Soares MS, Talamantes F.** Pre-parturitional changes in serum prolactin, placental lactogen, growth hormone, progesterone and corticosterone in the C3H/HeN mouse. *J. Dev. Physiol.* **6(5)**: 423-9 (1984).

**Soloff MF.** Endocrine control of parturition En *Biology of the uterus* Eds. Wynn RM, Jollie WP. Pp 559 Plenum Medical Book Company, New York and London (1989).

**Stouffler RL, Nixon WE, Gulyas B, Hodgen GD.** Gonadotropin – sensitive progesterone production by rhesus monkey luteal cells in vitro: a function of age of the corpus luteum during the menstrual cycle *Endocrinol* **100**: 506 (1977).

**St Arnaud R, Walker P, Kelly PA, Labrie F.** Rat ovarian epidermal growth factor receptors: characterization and hormonal regulation *Mol Cell Endocrinol* **31**: 43 (1983).

**Swanchara KW, Henricks DM, Birrenkott GP, Bodine AB, Richardson ME.** Expression of epidermal growth factor and the EGF receptor in the porcine oviduct *Biol Reprod* **53**: 911 (1995).

**Tamada H, Yoh C, Inaba T, Takano H, Kawate N, Sawada T.** Epidermal Growth Factor (EGF) in the goat uterus: immunohistochemical localization of EGF and EGF receptor and effect of EGF on uterine activity in vivo *Theriogenology* **54**: 159 (2000).

**Teixeira F, Zakar T, Hirst J, Guo F, Machin G, Olson D.** Prostaglandin endoperoxide H synthase (PGHS) activity increases with gestation and labour in human amnion *J Lipid Mediat* **6**: 515 (1993).

**Teixeira F, Zakar T, Hirst J, Guo F, Sadowsky D, Machin G, Deminaczuk N, Resch B, Olson D.** Prostaglandin endoperoxide-H synthase (PGHS) activity and immunoreactive PGHS-1 and PGHS-2 levels in human amnion throughout gestation, at term, and during labor *J Clin Endocrinol and Metab* **79**: 1396 (1994).

**Thornburn G, Parkington H, Rice G, Jenkin G, Sigger J, Shepherd R, Myles K.** Regulation of electrical activity in the myometrium of pregnant ewe En *The endocrine control of fetus* Eds. Kunsel W y Jensen A. Pp. 391 (1988).

**Tietze F.** Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues *Anal Biochem* **27**: 502 (1969).

**Trujillo M, Candenás L, Cintado C, Magraner J, Fernández J, Martín J, Pinto F.** Hormonal Regulation of the Contractile Response Induced by Okadaic Acid in the Rat Uterus *J Pharmacol Exp Therap* **296**: 841 (2001).

**Tsuboi K, Iwane A, Nakasawa S, Sugimoto Y, Ichikawa A.** Role of prostaglandin synthase 2 in murine parturition: study on ovariectomy-induced parturition in prostaglandin F receptor deficient mice *Biol Reprod* **69**: 195 (2003).

**Tureck RW y Strauss JF.** Progesterone synthesis by luteinized human granulosa cells in culture: role of the novo sterol synthesis and lipoprotein – carried sterol *J Clin Endocrinol Metab* **54**: 367 (1982).

**Van Lennys EW y Madden LM.** Electron microscopic observations of the involution of the human corpus luteum of menstruation *A Zellforsch Mikrosk Anat* **66**: 365 (1965).

**Vane JR, Williams KI.** The contribution of prostaglandin production to contractions of the isolated uterus of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **48**: 629-639 (1973).

**Varner M, Dildy A, Hunter B, Dudley D, Clark S, Mitchell M.** Amniotic fluid epidermal growth factor levels in normal and abnormal pregnancies *J Soc Gynecol Invest* **3**: 17 (1996).

**Vaughan TJ, Littlewood CJ, Pascall JC, Brown KD.** Epidermal Growth factor concentrations in pig tissues and body fluids measured using a homologous radioimmunoassay *J Endocrinol* **135**: 77 (1992).

**Vegeto E, Shabaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, Mc Donnell DP.** Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function *Mol Endocrinol* **7**: 1244 (1993).

**Vernon MW, Zavy MT, Aisquith RL, Sharp DC.** Prostaglandin F<sub>2α</sub> in the equine endometrium: steroid production and production capacities during the estrous cycle and early pregnancy *Biol Reprod* **25**: 581 (1981).

**Von Euler US.** Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **175**: 78 (1934).

**Walton GM, Chen WS, Rosenfeld MG, Gill GN.** Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and enhanced in vivo tyrosine phosphorylation of cell substrates *J Biol Chem* **265**: 1750 (1990).

**Wang D, Cao S, Cul L.** Assessment of fetal maturation by epidermal growth factor in serum pregnant women *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **33**: 150 (1998).

**Weissman C, Farina M, Ribeiro ML, Franchi A.** La progesterona regula la expresión de su receptor en útero de rata durante la preñez *Medicina* **62**: 428 (2002).

**Wen PZ, Warden C, Fletcher BS, Kujubu DA, Herschman HR, Lusis AJ.** Chromosomal organization of the inducible and constitutive prostaglandin synthase/cyclooxygenase genes in mouse *Genomics* **15**: 458 (1993).

**Whittle B, Higgs GA, Eakins KE, Moncada S, Vane JR.** Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa *Nature* **284**: 271 (1980).

**Wilks JW.** Effect of (15S) – methyl – prostaglandin F<sub>2α</sub> methyl ester and estrogens upon the corpus luteum and conceptus of the rhesus monkey *Prostaglandins* **20**: 807 (1980).

**Williams J, Wilkerson W, O'Brien W, Knuppel R.** Use of prostaglandin E2 topical cervical gel in high-risk patients: a critical analysis *Obstet Gynecol* **66**: 769 (1985).

**Wilson L Jr, Cenedelia RJ, Butcher RL, Inskeep EK.** Levels of prostaglandins in uterine endometrium during the ovine estrous cycle *J Anim Sci* **34**: 93 (1972).

**Wiltbank MC, Guthrie PB, Mattson MP, Kater SB, Niswender GD.** Hormonal regulation of free intracellular calcium in small and large ovine luteal cells *Biol Reprod* **41**: 771 (1989).

**Wiqvist N, Lindblom B, Wikland M, Wilhelmsson L.** Prostaglandins and uterine contractility. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* **113**: 23-9 (1983).

**Wright K, Pang CY, Behrman HR.** Luteal membrane binding of prostaglandin F2 alpha and sensitivity of corpora lutea to prostaglandin F2 alpha – induced luteolysis in pseudopregnant rats *Endocrinol* **106**:1333 (1980).

**Wolienhaupt K, Tiemann U, Einspanier R, Schneider R, Schneider F, Kanitz W, Brussow KP.** Characterization of the epidermal growth factor receptor in pig oviduct and endometrium *J Reprod Fertil* **111**: 173 (1997).

**Wu KK.** Molecular regulation and augmentation of prostacyclin biosynthesis *Agents Actions Suppl* **45**: 11 (1995).

**Xie W, Robertson DL, Simmons DL.** *Drug Dev Res* **25**: 249 (1992).

**Yen YK.** The fragility of fertility *Nat Genet* **29**: 243 (2001).

**Yue ZP, Yang ZM, Li SJ, Wang HB, Harper MJK.** Epidermal growth factor family in Rhesus monkey uterus during the menstrual cycle and early pregnancy *Mol Reprod Dev* **55**: 164 (2000).

**Yoshimini T, Strott C, Marshall J, Lipsett M.** Corpus luteum function in early pregnancy *J Clin Endocrinol Metab* **29**: 225 (1969).