

## Efecto del ácido linoléico sobre la producción de las prostaglandinas $\text{PGF}_2\alpha$ y $\text{PGE}_2$ en células endometriales

### Linoleic acid effect on $\text{PGF}_2\alpha$ and $\text{PGE}_2$ prostaglandin production in endometrial cells

Yasser Lenis S,<sup>1\*</sup> M.Sc, Martha Olivera A,<sup>2</sup> Ph.D, Ariel Tarazona M,<sup>3</sup> M.Sc.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Grupo de investigación CENTAURO. Medellín, Colombia. <sup>2</sup>Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Laboratorio Syngamia, Grupo de investigación BIOGÉNESIS. Medellín, Colombia. <sup>3</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de producción Animal. Medellín, Colombia. \*Correspondencia: yaserudea@gmail.com

Recibido: Diciembre de 2011; Aceptado: Octubre de 2012.

#### RESUMEN

**Objetivo.** Evaluar el efecto *in vitro* del ácido linoléico sobre la producción de  $\text{PGF}_2\alpha$  y  $\text{PGE}_2$  en células endometriales epiteliales bovinas (CEEP). **Materiales y métodos.** Se cultivaron CEEP aisladas de tejido uterino y se suplementaron con AL a diferentes concentraciones (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ), oxitocina (OT) (0.1  $\mu\text{M}$ ) e interferón trofoectodérmico bovino (bINT- $\tau$ ) (50 ng/ml). Se cuantificó la  $\text{PGF}_2\alpha$  y  $\text{PGE}_2$  a distintos tiempos (12, 24 y 36h). En el control, la  $\text{PGF}_2\alpha$  en el sobrenadante aumentó en el tiempo de cultivo y fue 1.2 veces mayor que la producción de  $\text{PGE}_2$ . **Resultados.** El ácido linoléico disminuyó la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  ( $p < 0.05$ ) en el sobrenadante, y no afectó ( $p > 0.05$ ) la producción de  $\text{PGE}_2$ . El efecto conjunto de AL y OT sobre la producción de  $\text{PGF}_2\alpha$  difirió para cada uno de los tiempos; el ácido linoléico inhibió parcialmente el efecto estimulante de la OT sobre la producción de  $\text{PGE}_2$ , el efecto conjunto del AL y el bINT- $\tau$  aumentó ( $p < 0.05$ ) esta inhibición hasta la hora 24. **Conclusiones.** El ácido linoléico afecta negativamente la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  en el sobrenadante a través del tiempo. Respecto a la  $\text{PGE}_2$  se concluye que el ácido linoléico por sí solo no afecta la concentración en el sobrenadante.

**Palabras clave:** Endometrio, interferones, luteólisis, maternal, oxitocina (Fuente: MeSH)

#### ABSTRACT

**Objective:** Evaluate the *in vitro* effect of AL on the production of  $\text{PGF}_2\alpha$  and  $\text{PGE}_2$  in bovine epithelial endometrial cells (CEEP). **Materials and methods.** Isolated CEEP were cultured and supplemented with AL at different concentrations (1 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ ), oxytocin (OT) (0.1  $\mu\text{M}$ ) and bovine interferon (BINT- $\tau$ ) (50 ng / ml).  $\text{PGF}_2\alpha$  and  $\text{PGE}_2$  were quantified as response variables at different times. In the control, the concentration of  $\text{PGF}_2\alpha$  in the supernatant increased over time and was 1.2 times greater than the production of  $\text{PGE}_2$ . **Results.** AL reduced the concentration of  $\text{PGF}_2\alpha$  ( $p < 0.05$ ) in the supernatant, and did not affect ( $p > 0.05$ ) the production of  $\text{PGE}_2$ . The combined effect of LA and OT in the production of  $\text{PGF}_2\alpha$  is different in time, LA partially inhibited the stimulatory effect of OT in the production of  $\text{PGE}_2$ , the joint effect of LA and BINT- $\tau$  increased ( $p < 0.05$ ) when this inhibition at 24h. **Conclusions.** LA alone negatively affects the concentration in the supernatant of  $\text{PGE}_2$  in time. Regarding  $\text{PGE}_2$ , LA alone does not affect the concentration in the supernatant.

**Key Words:** Endometrium, interferons, luteolysis, maternal, oxytocin (Source:MeSH).

## INTRODUCCIÓN

En la reproducción, la acción de las prostaglandinas es fundamental para la lisis del cuerpo lúteo (CL), la ovulación, el reconocimiento embrionario, la implantación y el parto (1-3). En el tejido reproductivo las prostaglandinas son sintetizadas principalmente en el endometrio, tejido altamente especializado, constituido por dos biotipos celulares; células endometriales epiteliales (CEEP) y las células endometriales estromales (CEES), las cuales poseen características morfológicas y funcionales distintas (2).

En el hígado y glándula mamaria, el ácido linoléico (AL) precursor de las prostaglandinas, puede ser biotransformado a otros PUFAs como ácido linolénico, dihomolínolénico, o a ácido araquidónico (AA), por las enzimas  $\Delta 6$  desaturasa, elongasa y  $\Delta 5$  desaturasa. El AA es el principal precursor de las prostaglandinas de la serie 2, dentro de las cuales se encuentran las prostaglandinas  $F_2$  alpha ( $PGF_2\alpha$ ) y la  $E_2$  ( $PGE_2$ ) (4).

Las CEEP presentan morfología cuboidal o columnar, conforman el epitelio luminal uterino y responden principalmente a la oxitocina (OT) para inducir la síntesis de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$ ; las CEES poseen una morfología fibroblastoide, forman el estroma, y responden al factor de necrosis tumoral tipo alpha ( $FNT\alpha$ ) para la síntesis de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$ ; las primeras son las responsables de inducir y modular los efectos luteolíticos, debido a una mayor relación en la producción de  $PGF_2\alpha$  respecto a la de  $PGE_2$ , mientras que las CEES son las responsables de modular los efectos luteotrópicos por su proporción en la producción de  $PGE_2$ , la cual es mayor respecto a la de  $PGF_2\alpha$  (1,5).

El aumento de la producción de oxitocina luteal durante los días 15 al 18 (6), induce un aumento en la síntesis de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$  en las CEEP y en menor proporción en las células luteales grandes (CLG) y células luteales pequeñas (CLP), activando principalmente las rutas luteolíticas mediadas por apoptosis (7-9).

Dependiendo del estadio fisiológico del animal (ciclicidad, gestación o anestro), las CEEP regulan la expresión de receptores de oxitocina en la membrana (OTr); una vez estos se unen a su ligando (OT), se estimula una ruta de señalización por proteína G, induciendo la liberación del AA de la membrana. El AA se ciclooxygena y peroxida para producir prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) y posteriormente prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Ambas reacciones son ejecutadas en diferentes sitios catalíticos

de la prostaglandina H endoperoxidasa sintasa (PGHS) conocida también como ciclooxigenasa (COX) (5,10). Posteriormente la PGH<sub>2</sub> puede sufrir dos procesos: un proceso de isomeración mediante las isomerasas: prostaglandina  $E_2$  sintasa citoplasmática (cPGES) y prostaglandina  $E_2$  sintasa citoplasmática microsomal tipos 1 y 2 (mPGES1) y (mPGES2), las cuales producen  $PGE_2$  (11,12); o un proceso de reducción mediante la reductasa prostaglandina F sintasa (PGFS) generando  $PGF_2\alpha$ . Una vez producidas la  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$ , estas se liberarán y mediarán diversos procesos reproductivos como el reconocimiento del embrión por parte de la hembra bovina (3, 13, 14).

El bINT- $\tau$  es la señal hormonal principal de modulación para disminuir el efecto de la OT y favorecer los procesos luteotrópicos funcionales y estructurales, lo que garantiza la producción de progesterona y la integridad de las células que constituyen el CL, favoreciendo el proceso de reconocimiento materno embrionario y la posterior implantación. Aunque, el mecanismo de acción del bINT- $\tau$  no está totalmente claro, se sabe que disminuye la síntesis de  $PGF_2\alpha$  en el endometrio bovino (1,15-17).

El mecanismo por el cual la suplementación con grasas protegidas pudiera estar afectando estas señales se desconoce, por lo cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del AL, bINT- $\tau$  y OT sobre la producción de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$ , en un modelo *in vitro* de CEEP bovinas (2,3).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio.** El experimento fue realizado en la Universidad de Antioquia Facultad de Ciencias Agrarias, Laboratorio Syngamia.

**Aislamiento de células endometriales epiteliales (CEEP).** Los úteros fueron recolectados en la planta de beneficio local dentro de los 15 minutos posteriores al desangrado del animal y transportados a 4°C hasta el laboratorio, donde fueron procesados dentro de las 2 horas siguientes a la obtención. Se acogieron los criterios de selección de los tractos reproductivos descritos por Arosh (2), con los cuales se buscó que los úteros estuvieran bajo influencia hormonal de una fase temprana del ciclo estral (día 2-7), esto fue evaluado por observación de estructuras foliculares y lúteas en los ovarios. Una vez en el laboratorio los úteros fueron lavados y desinfectados exteriormente con solución salina al 0.9% (p/v) y clorhexidina, luego desvascularizados y posteriormente se expuso el endometrio el cual fue lavado y

desinfectado con clorhexidina. La disgregación celular se realizó en cabina de flujo laminar, el endometrio fue raspado suavemente de forma longitudinal con una cuchilla de escalpelo y las células obtenidas fueron lavadas tres veces con Hanks balanced salt solution (HBSS Sigma Aldrich St Louis Co. H 9394) libre de calcio y magnesio, suplementado con el 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB-Gibco 16000-044) y 1% (p/v) de penicilina estreptomina (Sigma Aldrich St- P0781), posteriormente se centrifugó a 2500 RPM por 10 minutos para obtener el paquete celular para el cultivo.

**Cultivo Celular.** El cultivo celular se realizó a una concentración de 500.000 células/ml, en placas de 24 pozos (Falcom 35-3047) utilizando RPMI-1640 (Sigma Aldrich St Louis Co. R 8758) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y 1% (p/v) de penicilina más 1% (p/v) estreptomina y llevadas condiciones ambientales controladas ( $\approx$ 90% de humedad, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> y 37.5°C). Se realizó recambio del medio de cultivo cada 2 días hasta lograr confluencia de  $\approx$ 90%.

**Tratamientos.** Para la aplicación de los tratamientos, el medio fue remplazado en su totalidad y las células fueron lavadas 2 veces utilizando RPMI-1640; este momento se consideró como hora 0 para los tiempos de medición de las variables respuesta.

Las CEEP, se suplementaron con tres concentraciones de AL (Sigma Aldrich St-L1376) a 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M (1, 10, 16). Para evaluar la funcionalidad en cultivo y de forma indirecta la viabilidad de las CEEP, fueron tratadas con OT (Sigma Aldrich St-03251) a 0.1  $\mu$ M (18). El posible efecto inhibitorio del bINT- $\tau$  sobre la producción de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  en las CEEP, se evaluó suplementando el medio con 50 ng/ml de bINT- $\tau$  recombinante; para la interacción entre todos los tratamientos se suplementaron las CEEP con las respectivas mezclas de estos, evaluando como variable respuesta la concentración de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub>, en el medio de cultivo celular a 12, 13, 24 y 36 horas.

Los tratamientos fueron:

- T1:** Ácido Linoléico 1  $\mu$ m,
- T2:** Ácido Linoléico 10  $\mu$ m,
- T3:** Ácido Linoléico 100  $\mu$ m,
- T4:** Oxitocina 0.1  $\mu$ m,
- T5:** bINT- $\tau$  50ng/ml,
- T6:** Oxitocina 0.1  $\mu$ m e bINT- $\tau$  50ng/ml,
- T7:** Oxitocina 0.1  $\mu$ m y Ácido Linoléico 1  $\mu$ m,
- T8:** Oxitocina 0.1  $\mu$ m y Ácido Linoléico 10  $\mu$ m,
- T9:** Oxitocina 0.1  $\mu$ m y Ácido Linoléico 100  $\mu$ m,
- T10:** bINT- $\tau$  50 ng/ml y Ácido Linoléico 1  $\mu$ m

**T11:** bINT- $\tau$  50 ng/ml y Ácido Linoléico 10  $\mu$ m  
**T12:** bINT- $\tau$  50 ng/ml y Ácido Linoléico 100  $\mu$ m,  
**T13:** Control (Medio de cultivo sin ningún tratamiento).

Se realizaron tres réplicas para cada uno de los tratamientos, los tiempos y las concentraciones fueron adaptados y modificados según los criterios generales de Parent (1)

**Medición de prostaglandinas PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub>.** A las 12, 24 y 36 horas posterior a la incubación se recolectó el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta la medición, la cual se realizó utilizando un lector de ELISA MR-210 Plus Microplate reader, Biotek, Vermont, Estados Unidos de Norte America. Se utilizaron los kits desarrollados por Assay Designs, Inc., y su uso se realizó acorde con las instrucciones y especificaciones del fabricante.

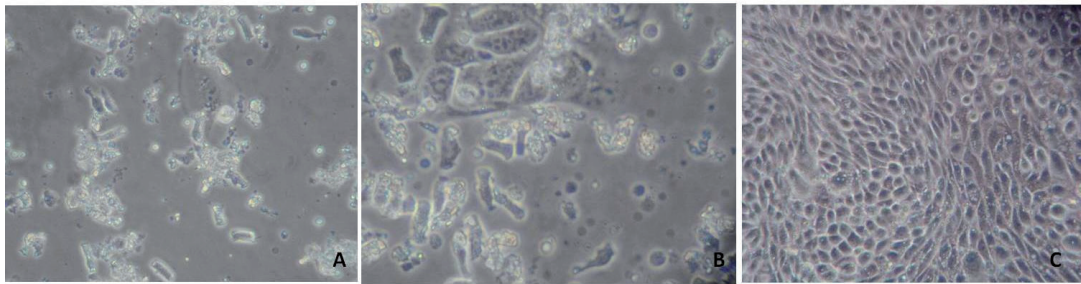
**Análisis Estadístico.** Se empleó un diseño de clasificación experimental completamente aleatorizado de medidas repetidas efecto mixto, donde los tratamientos fueron considerados como efecto fijo y el sobrenadante efecto aleatorio. Se emplearon igual número de replicas por tratamiento siendo balanceado el diseño, determinando por los criterios BIC Y AIC el modelo óptimo el cual fue el de simetría compuesta. Se evaluó como variables respuesta la producción de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub>, convalidándose los supuestos adscritos al modelo experimental. Se efectuaron contrastes ajustados por el método de Tukey con base en un nivel de significancia estadístico del 5%, utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.3, California del Norte, Estados Unidos de Norteamérica.

## RESULTADOS

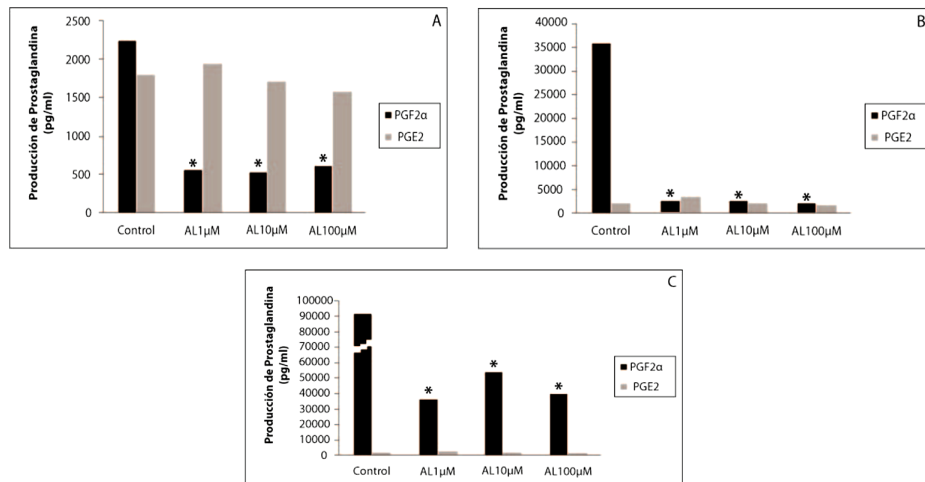
**Aislamiento y cultivo celular.** Una vez sembradas, las células no experimentaron ningún cambio morfológico aparente hasta el día 3; momento en el que se inició la formación de islotes celulares de forma irregular, estos islotes fueron reportados en trabajos previos por Parent y Skarzynski (1,19). La adherencia celular inició desde las 24 horas de cultivo, logrando una confluencia superior al  $\approx$ 90% al día 14 de cultivo. Las células presentaron las características reportadas por Parent (1), inhibición por contacto, apariencia cuboidal, columnar o piramidal (19) (Figura 1).

### Producción de prostaglandinas

**Control.** La producción basal de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  a la hora 12 de análisis, superó la producción (1.2 veces) de PGE<sub>2</sub>. Se registró un aumento progresivo en el tiempo de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , hasta valores superiores 92.000 pg/ml a la hora 36, mientras que la PGE<sub>2</sub>, no se afectó en el tiempo (Figura 2: A, B, C).



**Figura 1.** Cinética y dinámica de las CEEP en cultivo primario. Las CEEP no presentaron cambios aparentes desde el día 1 (A) hasta el día 4-5 (B) de cultivo donde comenzaron el proceso de adhesión por zonas, posteriormente, el día 13-14 (C) alcanzaron una confluencia de  $\approx 90\%$ .



**Figura 2:** Producción de prostaglandinas por las CEEP sometidas a AL 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . La cuantificación de las prostaglandinas se realizó 12 (A), 24 (B) y 36 (C) horas, después de ser sometidas a los respectivos tratamientos. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de PGF<sub>2</sub>α con respecto al control, \*\* Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de PGE<sub>2</sub> con respecto al control. (Barras sesgadas = valores superiores a 92000 pg/ml de PGF<sub>2</sub>α).

**Efecto de AL.** Con la adición del AL la concentración de PGF<sub>2</sub>α siempre fue menor respecto al control, aunque aumentó de manera ascendente en el tiempo ( $p < 0.05$ ). La concentración en el sobrenadante de PGE<sub>2</sub> no se afectó en el tiempo respecto al control ( $p > 0.05$ ) (Figura 2: A, B, C).

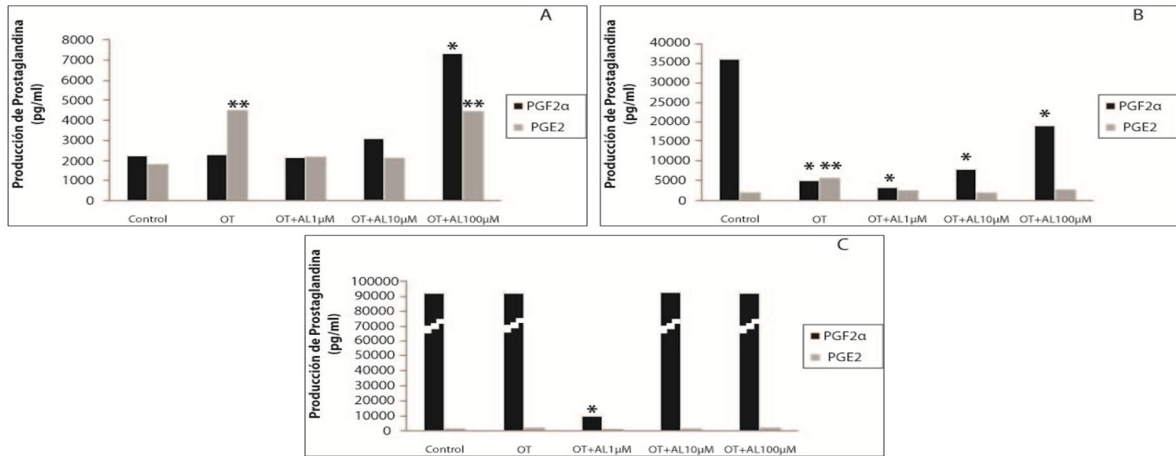
**Efecto de la OT.** La OT disminuyó la concentración de PGF<sub>2</sub>α en el sobrenadante respecto al control en el tiempo ( $p > 0.05$ ), y aumentó la concentración de PGE<sub>2</sub>, de forma tiempo dependiente a las 12 y 24 horas ( $p < 0.05$ ).

El efecto de la OT sobre la producción de PGF<sub>2</sub>α en las CEEP suplementadas con AL, es afectado por la dosis y el tiempo. A las 12 horas la OT y el AL 1  $\mu\text{M}$  no afectaron las concentraciones de PGF<sub>2</sub>α, pero a las 24 y 36 horas disminuyeron las concentraciones ( $p < 0.05$ ). A las 24 horas la OT y el AL en sus tres concentraciones disminuyeron la producción de PGF<sub>2</sub>α ( $p < 0.05$ ), y la interacción de OT y AL 100  $\mu\text{M}$  sólo aumentaron la concentración a la hora 12 de análisis; produciendo 7500 pg/

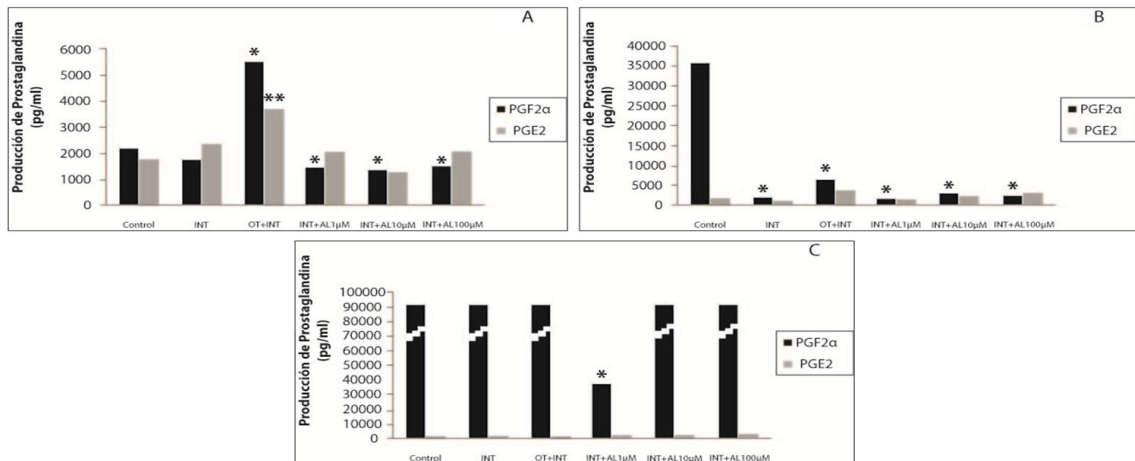
ml comparando con el control que produce 2000 pg/ml. La concentración de PGE<sub>2</sub> aumentó en el sobrenadante sólo a las 12 horas con AL 100  $\mu\text{M}$  y no fue tiempo dependiente ( $p < 0.05$ ) (Figura 3: A, B y C)

**Efecto del bINT- $\tau$ .** El bINT- $\tau$  no afectó la concentración de PGF<sub>2</sub>α ni a las 12 y ni a las 36 horas, pero la disminuyó a las 24 horas ( $p < 0.05$ ). La interacción entre la OT y el bINT- $\tau$  induce una concentración de 5300 pg/ml de PGF<sub>2</sub>α, a las 12 y 24 horas; a las 12 horas las concentraciones de PGF<sub>2</sub>α, en respuesta a la interacción, superaron a las del control mientras que a las 24 horas fueron significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ). A la hora 36 no se afectó la concentración de PGF<sub>2</sub>α en el sobrenadante ( $p > 0.05$ ).

El efecto conjunto del bINT- $\tau$  y el AL a las diferentes concentraciones, disminuyeron la concentración PGF<sub>2</sub>α en el sobrenadante, a las horas 12 y 24 de análisis ( $p < 0.05$ ), a la hora 36 la interacción entre bINT- $\tau$  y el AL, no afectaron la concentración de PGF<sub>2</sub>α, a excepción del AL



**Figura 3.** Producción de prostaglandinas por las CEEP sometidas a OT 0.1  $\mu$ M, AL 1  $\mu$ M+ OT 0.1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M+ OT 0.1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M+ OT 0.1  $\mu$ M. La cuantificación de las prostaglandinas se realizó 12 (A), 24 (B) y 36 (C) horas, después de ser sometidas a los respectivos tratamientos. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  con respecto al control, \*\* Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de PGE<sub>2</sub> con respecto al control. (Barras sesgadas= valores superiores a 92000 pg/ml de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ).



**Figura 4.** Producción de prostaglandinas por las CEEP sometidas a 50 ng/ml de bINT- $\tau$ , AL 1  $\mu$ M+ bINT- $\tau$  50 ng/ml, AL 10  $\mu$ M+ bINT- $\tau$  50 ng/ml y 100  $\mu$ M+ bINT- $\tau$  50 ng/ml. La cuantificación de las prostaglandinas se realizó 12 (A), 24 (B) y 36 (C) horas, después de ser sometidas a los respectivos tratamientos. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  con respecto al control, \*\* Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de PGE<sub>2</sub> con respecto al control. (Barras sesgadas= valores superiores a 92000 pg/ml de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ).

1  $\mu$ M el cual la disminuyó ( $p < 0.05$ ). El bINT- $\tau$  no afectó la producción de PGE<sub>2</sub> en el tiempo respecto al control cuando se adicionó en forma conjunta con el AL ( $p > 0.05$ ) (Figura 4: A, B y C).

## DISCUSIÓN

Al igual que lo reportado previamente por Parent (1), las células aisladas formaron islotes que corresponden a agregados de células epiteliales, el primer reporte que describe la cinética en cultivo primario de este tipo celular, fue realizado por Lenis (20). Las células aisladas cumplieron los criterios de clasificación morfológica reportados

por Parent (1), lo cual se consideró para corroborar el tipo celular deseado. Un segundo criterio de clasificación celular se basó en la funcionalidad para producir prostaglandinas, se encontró la misma tendencia de producción (mayor PGF<sub>2</sub> $\alpha$  que PGE<sub>2</sub>) que en lo reportado por Tithof (13).

Pese a que las concentraciones de siembra usadas en este trabajo fueron menores (600.000 cel/ml) a las utilizadas por Tithof (13) (1.5 x 10<sup>6</sup> cel/ml); nosotros encontramos 1.2 veces mayor producción de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (2300 pg/ml) que de PGE<sub>2</sub> (1800 pg/ml), mientras que Tithof (13),



encontró 2.0 veces mas  $\text{PGF}_2\alpha$ :110 pg/ml que  $\text{PGE}_2$ :52 pg/ml (13). Sin embargo, es posible que el uso de líneas comerciales comparado con cultivos primarios sea responsable en parte de esta diferencia.

Estos resultados sugieren, que la funcionalidad evaluada como la producción de  $\text{PGF}_2\alpha$  y  $\text{PGE}_2$  en células aisladas en cultivo primario vs líneas comerciales es diferente, lo cual podría atribuirse a varios factores:

1. Las células comerciales son sometidas a procesos de criopreservación que podría modificar las rutas de señalización molecular y de esta forma la funcionalidad,
2. Estas células provienen de diferentes pasajes a partir del cultivo primario inicial, se desconoce el número de pasaje exacto de la línea comercial, y se asume una funcionalidad similar, aun cuando la dinámica de la senescencia celular no está descrita en la literatura, como tampoco su relación con la funcionalidad,
3. Las líneas comerciales no especifican el día del ciclo estral del útero del cual fue aislado el cultivo primario, lo cual podría también generar diferencias en la funcionalidad.

Cuando se analiza la funcionalidad de las CEEP en el tiempo, el comportamiento de la concentración de la  $\text{PGF}_2\alpha$ , aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ), pasando de 2300 pg/ml a mas de 92.000 pg/ml a las 36 horas de cultivo sin haber sido sometidas a ningún estímulo; lo que corrobora que existe una regulación en la expresión de genes constitutivos que transcribirían para la enzima Cox1, lo que conllevaría a las células a producir  $\text{PGF}_2\alpha$  de forma permanente, esto también lo afirmó Cheng (16) y hasta la fecha no hay propuestas de rutas alternativas para la transformación del AA.

Lo anterior, pone de manifiesto que existe una reserva de sustratos para que las CEEP los transformen en araquidonato y aumenten de forma progresiva la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  en el sobrenadante. Se ha comprobado para células de riñón canino que la principal reserva de sustratos son los fosfolípidos y triacilglicéridos de la membrana plasmática, y aunque para CEEP esta fuente no se ha comprobado, esto ha sido previamente hipotetizado por Meier (21).

Como este es el primer reporte de la producción de  $\text{PGF}_2\alpha$  a través del tiempo, no existen investigaciones similares con las cuales comparar. Lo más cercano es el experimento de Mann (22), quien incubó explantes uterinos que contenían tanto células epiteliales, como estromales y miometriales. En este caso no encontró aumento a través del tiempo en la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  hasta las 96 horas de cultivo.

Una vez descrita la dinámica del cultivo y su funcionalidad basal en el tiempo, se probó el efecto de diferentes tratamientos sobre la producción de prostaglandinas.

**AL.** La acción del AL en el tiempo sobre la producción de  $\text{PGF}_2\alpha$  es claramente inhibitoria bajo las condiciones de cultivo empleadas en el presente experimento; lo que está acorde con lo reportado por Cheng (16) cuando usaron AL en el medio de cultivo de explantes endometriales. Sin embargo, lo anterior contradice lo encontrado por Mattos (10) en células endometriales aisladas donde el AL no afectó ni la síntesis ni la secreción de  $\text{PGF}_2\alpha$ , es claro que los tipos celulares y las condiciones de estudio han sido muy diferentes entre los reportes de la literatura, por lo cual se sugiere que se deben realizar experimentos bajo condiciones estandarizadas para reducir este efecto sobre las variables. En estudios realizados *in vivo*, al suplementar vacas de producción de leche con dietas ricas en AL, se encontró el aumento en la concentración de OT, que indujo un incremento en la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  en sangre. Las diferencias encontradas entre *in vivo* e *in vitro* demuestran que los resultados no son comparables y que el AL podría tener diferentes vías metabólicas afectando la producción de prostaglandinas de forma directa o indirecta (16).

El mecanismo molecular por el cual el AL afecta la síntesis de  $\text{PGF}_2\alpha$  y  $\text{PGE}_2$  en las células endometriales no es claro, algunos estudios recientes muestran que el AL modula la expresión de algunos genes relacionados con la producción de la maquinaria enzimática involucrada en la síntesis de prostaglandinas (10, 16).

Según la hipótesis propuesta, el AL podría ser el sustrato para la producción de AA mediante su posible desaturación y elongación en el útero, lo que aumentaría las concentraciones de AA, y por tanto de la  $\text{PGF}_2\alpha$ . Sin embargo, los resultados mostraron que las CEEP suplementadas con AL disminuyeron las concentraciones de  $\text{PGF}_2\alpha$  en el sobrenadante; lo que sugiere que el AL podría modular negativamente la ruta de síntesis de la  $\text{PGF}_2\alpha$ , mediante varias rutas como:

1. el desplazamiento del AA de la membrana citoplasmática al espacio extracelular por el AL, lo que generaría, una disminución del AA libre y un aumento del AL en el citoplasma, aumentando la oxigenación y peroxidación por las ciclooxigenasas tipo 1 y 2 del AL (16, 23);
2. Hasta el momento no se ha comprobado que las CEEP puedan metabolizar el AL a AA, por lo que se generaría una acumulación de AL y AA en el espacio intracelular y por consiguiente una competencia por el sitio catalítico de las ciclooxigenasas (24);
3. La acumulación

intracitoplasmática de AL podría estar originando un bloqueo de la ruta de producción de PGF<sub>2</sub>α esto reduciría la posibilidad de que el AA fuera transformado en prostaglandinas de las serie 2 (16, 24, 25). La producción de PGE<sub>2</sub> no se afectó con el AL lo que concuerda con lo reportado por Meier (21).

El mecanismo de acción del AL y de sus isómeros como el Ácido linoléico conjugado (ALC) involucra la activación o no de la PKC mediante la producción de phorbol 12,13 dibutirato, el cual es una molécula que tiene la capacidad de fosforilar diversos compuestos celulares como la PKC y la bomba sodio potasio ATPasa. Además, tiene la capacidad de regular la expresión génica mediante la activación directa de promotores nucleares (26). Caldari et al (17) demostraron que células endometriales bovinas sometidas a diferentes concentraciones de AL, activaron genes codificantes para la PGHS2, que es el sustrato común para las prostaglandinas de la serie 2; sin embargo, nuestros resultados sugieren que el AL regula selectivamente la expresión de genes codificantes para la ruta de producción de la PGF<sub>2</sub>α, sin afectar la ruta de producción para la PGE<sub>2</sub>.

**OT.** Parent (1), fue de los primeros investigadores en reportar que la suplementación de OT a CEEP, induce la síntesis y liberación de PGF<sub>2</sub>α en mayor cantidad que PGE<sub>2</sub> hasta las 24 horas de cultivo (19), estudios posteriores de Woclawek (27) lo han corroborado. No obstante, en este trabajo la OT no tuvo efecto sobre la PGF<sub>2</sub>α pero si indujo un aumento en la concentración de PGE<sub>2</sub>, en las primeras 24 horas de cultivo (PGF<sub>2</sub>α < PGE<sub>2</sub>); este resultado también ha sido reportado por Kotani (28), en cultivo de CEEP humanas y se explica por la presencia en la superficie celular de la enzima oxitocinasa que metaboliza la OT inhibiendo su ruta de acción y favoreciendo la síntesis de PGE<sub>2</sub> (29). Sin embargo, a las 36 horas se presentó un cambio en la concentración y proporción de la PGF<sub>2</sub>α en el sobrenadante (PGF<sub>2</sub>α > PGE<sub>2</sub>). Este aumento posiblemente se deba a que la enzima oxitocinasa se libera al medio de cultivo inactivándose, o a un cambio inducido por el medio sobre la maquinaria enzimática a través del tiempo, la cual podría aumentar la expresión de la PGFS y disminuir la PGES como lo hipotetizó Murakami (18).

A las 12 horas el AL 100 μM junto con la OT aumentan, la concentración de la PGF<sub>2</sub>α y PGE<sub>2</sub> en el sobrenadante, lo que sugiere un efecto dosis dependiente, el cual posiblemente se deba a una tasa mayor de reemplazo del AA por el AL en la membrana celular, incrementando la posibilidad de síntesis de ambas prostaglandinas como lo hipotetiza Cheng (16). La OT no modifica el

efecto inhibitorio del AL sobre la producción de PGF<sub>2</sub>α a las 24 horas de cultivo, lo que demuestra mayor efecto biológico del AL comparado con la OT.

Estos resultados muestran que el efecto biológico del AL depende de varios factores internos y externos como la concentración del mismo, las condiciones de cultivo, el tiempo y posiblemente el metabolismo celular. Se sugieren estudios posteriores usando otras concentraciones intermedias que permitan demostrar un efecto de umbral de acción del AL en bajas y altas concentraciones o diferentes concentraciones de oxitocina.

Dado que los resultados reportados en la literatura son controversiales, se evidencia la necesidad de profundizar en el efecto de la oxitocina y la expresión de sus receptores en las CEEP.

**bINT-τ.** El bINT-τ juega un papel importante durante el reconocimiento materno-embionario, para evitar la pérdida de función del CL mediada por las prostaglandinas especialmente la PGF<sub>2</sub>α; la ruta más aceptada es que el bINT-τ modula la transcripción del OTr evitando la ruta de acción de la oxitocina y de esta forma reduciendo la producción de prostaglandinas. Sin embargo, Parent (1) propuso que el bINT-τ por si sólo es capaz de influir directamente sobre la producción de prostaglandinas modulando la expresión de genes inducibles como el de Cox2 y las fosfolipasas tipo 2.

Los resultados de este trabajo muestran que el bINT-τ por si sólo no estimuló ni inhibió las células para la producción de PGF<sub>2</sub>α ni a las 12 ni a las 36 horas; lo que concuerda con lo reportado por Tithof (13). Este hallazgo se podría explicar según lo propuesto por Roberts (30), quien describió una pérdida del efecto hormonal del bINT-τ en el medio de cultivo a través del tiempo. Sin embargo, sólo a las 24 horas el bINT-τ redujo significativamente (p<0.05) la concentración de PGF<sub>2</sub>α, lo que coincide con la hipótesis de Parent (1), quien propuso que el bINT-τ previene la síntesis y liberación pulsátil de la PGF<sub>2</sub>α. A la luz de los hallazgos de este trabajo, se podría pensar que durante las primeras 12 horas no se evidencia activación de la ruta celular desencadenada por el bINT-τ por el tiempo que requeriría la activación de la ruta completa. Los efectos del bINT-τ se verían reflejados a las 24 horas, tiempo durante el cual redujo la concentración de PGF<sub>2</sub>α en el medio de cultivo, a las 36 horas aparentemente el bINT-τ, perdió la capacidad de afectar la ruta de producción de la PGF<sub>2</sub>α posiblemente a que el mismo pudo haber sufrido procesos de inactivación o metabolismo.

La ruta activada por el bINT- $\tau$  pareciera ser diferencial para ambas prostaglandinas, ya que no hubo efecto en el tiempo sobre la producción de PGE<sub>2</sub>, esto contradice lo descrito por Parent (1), quien encontró un efecto positivo al suplementar las células con bINT- $\tau$ .

Aun cuando de forma independiente ni la OT ni el bIFN $\tau$  favorecen la síntesis de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , en este estudio se encontró un efecto sinérgico entre bIFN $\tau$  y OT que favorece la síntesis de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  a las 12 horas posterior a la suplementación, hallazgos que contradicen lo encontrado por Tithof (13), quienes observaron que el bIFN $\tau$  disminuye el efecto estimulante de la OT sobre la producción de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  en la CEEP. Este efecto se pierde a las 24 horas donde el bIFN $\tau$  y la OT afectaron negativamente la concentración de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  en el sobrenadante posiblemente por una pérdida del efecto biológico del bIFN $\tau$  y a las 36 donde la interacción no la modificó (30).

El bIFN $\tau$  bloquea el efecto estimulante de la OT sobre la producción de PGE<sub>2</sub> a las 24 y 36 horas del cultivo, esto concuerda con lo reportado por Tithof (13), donde la interacción no afectó la concentración de PGE<sub>2</sub> en el sobrenadante, sin embargo, a las 12 horas no se presentó el efecto inhibitorio de las 24 y 36 y la concentración de la PGE<sub>2</sub> fue mayor, posiblemente por una regulación negativa, inducida por el bIFN $\tau$  y la OT sobre la expresión de algunos genes relacionados con la síntesis de esta (27).

Al evaluar la respuesta de la interacción del bIFN $\tau$  y el AL a las 12 y 24 horas, se evidencia el mismo resultado que cuando se evaluó el efecto del AL

de forma individual, lo cual muestra que no hay efecto del bIFN $\tau$  en presencia del AL sobre la producción de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ; esta acción posiblemente se deba a la disminución del AA libre por el desplazamiento ejercido por el AL, efecto que podría no modular el bIFN $\tau$ . Esta respuesta se mantuvo hasta las 36 horas, donde el efecto inhibitorio del AL sobre la producción de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  se pierde, a excepción de cuando se suplementaron con AL 1  $\mu$ M, concentración que continúa disminuyéndola lo que contradice lo encontrado por Mattos (10). Este efecto del AL 1  $\mu$ M podría explicarse por algún posible mecanismo de autorregulación donde el AL se mantiene activo mientras no supere un cierto umbral de concentración, en cambio, el efecto se bloquea al superar el umbral; de esta forma la concentración 1  $\mu$ M siempre bloquea la producción de prostaglandinas mientras que 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M no tuvieron efecto conjunto con el bIFN $\tau$ .

En conclusión las CEEP bajo condiciones controladas, producen cantidades ascendentes de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  en el tiempo, superando los 92.000 pg/ml a las 36 horas de cultivo. La concentración de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> en el sobrenadante, depende de: el tipo de cultivo celular, la concentración inicial de siembra, de la viabilidad y funcionalidad celular. El AL regula negativamente la síntesis de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y modula los efectos del bIFN $\tau$  y OT para la producción de prostaglandinas en cultivo primario de CEEP, adicionalmente el AL no afecta la síntesis y secreción de la PGE<sub>2</sub>.

#### Agradecimientos.

Colciencias: financiación Joven Investigador Contrato 2008-1312008, Convenio Universidad San Martín-Universidad de Antioquia.

## REFERENCIAS

1. Parent J, Villeneuve C, Fortier MA. Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE2 and PGF2 alpha in epithelial cells from bovine endometrium. *Reprod* 2003; 4:539-47.
2. Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Emond V, Kim JJ, MacLaren LA, Fortier MA. Molecular cloning and characterization of bovine prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4: expression and regulation in endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinol* 2003; 7:3076-91.
3. Arosh JA, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, MacLaren LA, Fortier MA. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinol* 2004; 11:5280-93.
4. Tapiero H, Couvreur P, Tew KD. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother* 2002; 56:215-222.



5. Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W, Einspanier R. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *Theriogenol* 2009; 6:993-1004.
6. Salli U, Saito N, Stormshak F. Spatiotemporal interactions of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein with the actin cytoskeleton and exocytosis of oxytocin upon prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  stimulation of bovine luteal cells. *Biol Reprod* 2003; 6:2053-8.
7. Kim S, Choi Y, Spencer TE, Bazer FW. Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:58.
8. Acosta TJ, Bah MM, Korzekwa A, Woclawek I, Markiewicz W, Jaroczewski JJ et al. Acute changes in circulating concentrations of progesterone and nitric oxide and partial pressure of oxygen during prostaglandin f<sub>2</sub> $\alpha$ -induced luteolysis in cattle. *J Reprod Dev* 2008; 2:149-55.
9. Olivera M, Tarazona A, Ruíz T, Giraldo C. Modelo de luteólisis bovina. *Rev Col Cienc Pec* 2007; 20:387-393.
10. Mattos R, Guzeloglu A, Badinga L, Staples CR, Thatcher WW. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 2003; 3:780-7
11. Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE et al. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  to prostaglandin E<sub>2</sub> in bovine endometrium. *Endocrinol* 2009; 4:1912-20.
12. Hirata M, Sato T, Tsumagari M, Shimada A, Nakano H, Hashizume K et al. Differential regulation of the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by cytokines and growth factors in bovine endometrial stromal cells and trophoblast cell line BT-1 in vitro. *Biol Reprod* 2003; 4:1276-81.
13. Tithof PK, Roberts MP, Guan W, Elgayyar M, Godkin JD. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> $\alpha$  production by bovine endometrial epithelial cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5:16.
14. Hermenegildo C, Oviedo PJ, Cano A. Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. *Curr Pharm Des* 2006; 2:205-15.
15. Okuda K, Kasahara Y, Murakami S, Takahashi H, Woclawek I, Skarzynski DJ. Interferon-tau blocks the stimulatory effect of tumor necrosis factor-alpha on prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  synthesis by bovine endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 2004; 1:191-7.
16. Cheng Z, Abayasekara DR, Wathes DC. The effect of supplementation with n-6 polyunsaturated fatty acids on 1-, 2- and 3-series prostaglandin F production by ovine uterine epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 2:128-35.
17. Caldari C, Rodriguez C, Greene ES, Badinga L. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production by bovine endometrial cells. *J Dairy Sci* 2006; 3:971-7.
18. Murakami S, Shibaya M, Takeuchi K, Skarzynski DJ, Okuda K. A passage and storage system for isolated bovine endometrial epithelial and stromal cells. *J Reprod Dev* 2003; 6:531-8.
19. Skarzynski D, Piotrowska K, Bah M, Korzekwa A, Woclawek I, Sawai K et al. Effects of exogenous tumour necrosis factor-alpha on the secretory function of the bovine reproductive tract depend on tumour necrosis factor-alpha concentrations. *Reprod Domest Anim* 2008; 9999:1-9.
20. Lenis Y, Olivera M, Tarazona A. Aislamiento, y caracterización de células epiteliales endometriales bovinas en cultivo primario. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2009; 22-3: 566-80.
21. Meier S, Ledgard AM, Sato TA, Peterson AJ, Mitchell MD. Polyunsaturated fatty acids differentially alter PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> release from bovine trophoblast and endometrial tissues during short-term culture. *Anim Reprod Sci* 2009; 2-4:353-60.
22. Mann GE. Hormone control of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha) production and oxytocin receptor concentrations in bovine endometrium in explant culture. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 3:217-26.

23. Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 2007; 2:190-201.
24. Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001; 7-8:669-73.
25. Weems W, Weems YS, Randel RD. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J* 2006; 171: 206-228.
26. Rodríguez C, Caldari C, Greene ES, Badinga L. Conjugated linoleic acid reduces phorbol ester-induced prostaglandin F2alpha production by bovine endometrial cells. *J Dairy Sci* 2006; 10:3826-32.
27. Woclawek I, Acosta TJ, Korzekwa A, Bah MM, Shibaya M, Okuda K et al. Phytoestrogens modulate prostaglandin production in bovine endometrium: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005; 5:326-33.
28. Kotani Y, Iwase A, Ando H, Mizutani S. Oxytocin-induced prostaglandin E2 (PGE2) synthesis is regulated by progesterone via oxytocinase in Ishikawa cells. *Horm Metab Res* 2005; 37:1-9.
29. Farina MG, Billi S, Leguizamón G, Weissmann C, Guadagnoli T, Ribeiro ML et al. Secretory and cytosolic phospholipase A2 activities and expression are regulated by oxytocin and estradiol during labor. *Reproduction* 2007; 2:355-64.
30. Roberts MP. Interferon-tau, a Type 1 interferon involved in maternal recognition of pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18(5-6):403-408.