

# Artículos de revisión



## Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias

<http://rccp.udea.edu.co>

RCCP

### Señales moleculares que afectan la síntesis de $PGF_{2\alpha}$ y $PGE_2$ en el endometrio bovino<sup>✉</sup>

*Molecular signals affecting  $PGF_{2\alpha}$  and  $PGE_2$  synthesis in bovine endometrium*

*Sinais moleculares que afetam a síntese de  $PGF_{2\alpha}$  e  $PGE_2$  no endométrio bovino*

Yasser Lenis Sanín<sup>1\*</sup>, MVZ, Esp, MSC; Martha Olivera Ángel<sup>1</sup>, MV, Dra.Sci.Agr;  
Ariel Tarazona Morales<sup>2</sup>, Zoot, MSC.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo BIOGÉNESIS. Carrera 75 # 65-87  
Bloque 46 Of. 321 Medellín – Colombia.

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo BIOGÉNESIS,  
Calle 59ª # 63-20 Bloque 50 Of 316 Medellín – Colombia.

(Recibido: 7 julio, 2009; aceptado: 18 mayo, 2010)

#### Resumen

*El endometrio bovino es un tejido constituido por dos biotipos celulares, las Células Endometriales Epiteliales (CEEP) y las Células Endometriales Estromales (CEES), que tienen características morfofisiológicas distintas. La ciclicidad de la hembra está determinada entre otros factores por la funcionalidad y duración del Cuerpo Lúteo (CL), el cual produce Progesterona (P4) para el mantenimiento de la gestación. La regulación del CL está mediada por las prostaglandinas de la serie 2 principalmente la  $PGF_{2\alpha}$  y la  $PGE_2$ . El principal factor luteolítico es la  $PGF_{2\alpha}$ , mientras que la  $PGE_2$  estimula y favorece efectos luteotrópicos. Diversas moléculas modulan la síntesis de  $PGF_{2\alpha}$  y  $PGE_2$  en el endometrio bovino como el interferón-tau, la oxitocina, los estrógenos, el Ácido Araquidónico (AA) y el Ácido Linoléico (AL), entre otros. El estudio de la regulación de las rutas de síntesis de estas prostaglandinas es importante para avanzar en la comprensión de los eventos fisiológicos reproductivos, lo cual permite el desarrollo de tecnologías para la manipulación del ciclo estral en el bovino. El propósito de esta revisión es describir los principales estímulos y mecanismos moleculares que afectan la síntesis de  $PGF_{2\alpha}$  y  $PGE_2$  en el endometrio bovino y sus efectos en la ventana de reconocimiento materno embrionario.*

**Palabras clave:** ácido araquidónico, ácido linoléico, cuerpo lúteo, oxitocina, prostaglandinas.

✉ Para citar este artículo: Lenis Y, Olivera M, Tarazona A. Señales moleculares que afectan la síntesis de  $PGF_{2\alpha}$  y  $PGE_2$  en el endometrio bovino. Rev Colomb Cienc Pecu 2010; 23:377-389.

\* Autor para correspondencia: Yasser Lenis Sanin. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo Biogénesis. Carrera 75 # 65-87 Bloque 46 Of. 321 Medellín – Colombia. E-mail: yaserudea@gmail.com.

### Summary

The bovine endometrial tissue contains two cell biotypes with different morphophysiological characteristics: Endometrial Epithelial Cells (EEPC) and Endometrial Stromal Cells (EESC). Female cycle is determined, among other factors, by the functionality and durability of the corpus luteum (CL), which secretes progesterone (P4) for the maintenance of pregnancy. Regulation of CL is mediated by Series 2 prostaglandins, mostly  $PGF_2\alpha$  and  $PGE_2$ . The main factor is luteolytic  $PGF_2\alpha$ , whereas  $PGE_2$  stimulates and promotes luteotrophic effects. Several molecules modulate the synthesis of  $PGF_2\alpha$  and  $PGE_2$  in bovine endometrium, such as interferon- $\tau$ , oxytocin, estrogen, arachidonic acid (AA) and linoleic acid (LA), among others. The study of synthesis regulation of these prostaglandins is important to advance the understanding of reproductive events, allowing to develop technologies for manipulating the estrous cycle in cattle. The purpose of this review is to describe the major stimuli and molecular mechanisms that affect the synthesis of  $PGF_2\alpha$  and  $PGE_2$  in bovine endometrium, and their effects on embryo maternal recognition window.

**Key words:** arachidonic acid, corpus luteum, linoleic acid, oxytocin, prostaglandins.

### Resumo

O tecido endometrial bovina é uma célula consistindo de dois biótipos, Endometrial Células Epiteliais (CEEP) e as células estromais do endométrio (CEES), que apresentam características morfológicas diferentes. A ciclicidade da fêmea é determinada, entre outros fatores, a funcionalidade ea durabilidade do corpo lúteo (CL), que produz progesterona (P4) para a manutenção da gravidez. O regulamento do CL é mediada por prostaglandinas da série 2, principalmente  $PGF_2\alpha$  e  $PGE_2$ . O principal fator é  $PGF_2\alpha$  luteolítico, enquanto que  $PGE_2$  estimula e promove efeitos luteotrófico. Diversas moléculas modulam a síntese de  $PGF_2\alpha$  e  $PGE_2$  no endométrio bovino como interferon- $\tau$ , a ocitocina, o estrogênio, o ácido araquidônico (AA) e ácido linoléico (LA), entre outros. O estudo da regulação das rotas de síntese destas prostaglandinas é importante para fazer avançar a compreensão dos eventos fisiológicos reprodutivos, permitindo o desenvolvimento de tecnologias para a manipulação do ciclo estral em bovinos. O objetivo desta revisão é descrever os principais estímulos e mecanismos moleculares que afetam a síntese de  $PGF_2\alpha$  e  $PGE_2$  no endométrio bovino e seus efeitos sobre o embrião janela reconhecimento materno.

**Palavras chave:** ácido araquidônico, ácido linoléico, corpo lúteo, ocitocina, prostaglandinas.

### Introducción

La estructura y función del cuerpo lúteo como glándula endocrina temporal en el bovino, dependen de múltiples factores endocrinos como la LH (hormona luteinizante), GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), prolactina y catecolaminas que estimulan la actividad luteal induciendo la producción de progesterona en las Células Luteales Grandes (CLG) y Células Luteales Pequeñas (CLP). La pérdida funcional y estructural del Cuerpo Lúteo (CL), es dada por la  $PGF_2\alpha$  que es el principal factor luteolítico el cual se produce en diversos tejidos dentro de los cuales se encuentra el endometrio. La  $PGF_2\alpha$  activa diversas rutas de señalización y de esta forma regula la ciclicidad de la hembra (Olivera *et al.*, 2007; Skarzynski *et al.*, 2000 a; Woclawek *et al.*, 2004).

Los factores moduladores de las rutas luteolíticas y luteotrópicas en el cuerpo lúteo son la  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$ , que pertenecen a las prostaglandinas de la serie 2. La primera tiene como principal efecto el luteolítico, mientras que la segunda favorece tanto los efectos luteotrópicos como luteolíticos, dependiendo del tipo de receptores expresados en el CL (Arosh *et al.*, 2004).

Las  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$ , no solo juegan un papel importante en la regulación de la viabilidad del cuerpo lúteo, sino también en procesos fisiológicos como la ovulación, reconocimiento materno, implantación y parto entre otros, siendo hormonas claves en la regulación de las funciones reproductivas en la hembra bovina (Arosh *et al.*, 2003; Parent *et al.*, 2003 b).

La producción de estas prostaglandinas en el aparato reproductivo se da principalmente en el endometrio, que se encuentra constituido por dos biotipos celulares: las CEEP y las CEES, ambas poseen características metabólicas particulares expresando diferentes cantidades y tipos de receptores en su membrana plasmática, lo cual les confiere diferente capacidad y especificidad de respuesta dependiendo del ligando (Davies *et al.*, 2008; Herath *et al.*, 2009; Asselin *et al.*, 1996; Fortier *et al.*, 1988). Las CEEP y las CEES responden a diversas señales moleculares, fisiológicas y patológicas modulando la producción de  $\text{PGF}_2\alpha$  y  $\text{PGE}_2$ , estas señales deben activar rutas moleculares de una manera coordinada para definir el tipo de prostaglandina a sintetizar, lo anterior depende básicamente del estadio fisiológico de la hembra. (Arosh *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2008; Voigt *et al.*, 1989).

El propósito de esta revisión es describir los principales estímulos moleculares que afectan la síntesis de  $\text{PGF}_2\alpha$  y  $\text{PGE}_2$  en el endometrio bovino, haciendo énfasis en los vacíos del conocimiento.

### Características morfofisiológicas de las CEEP y CEES bovinas

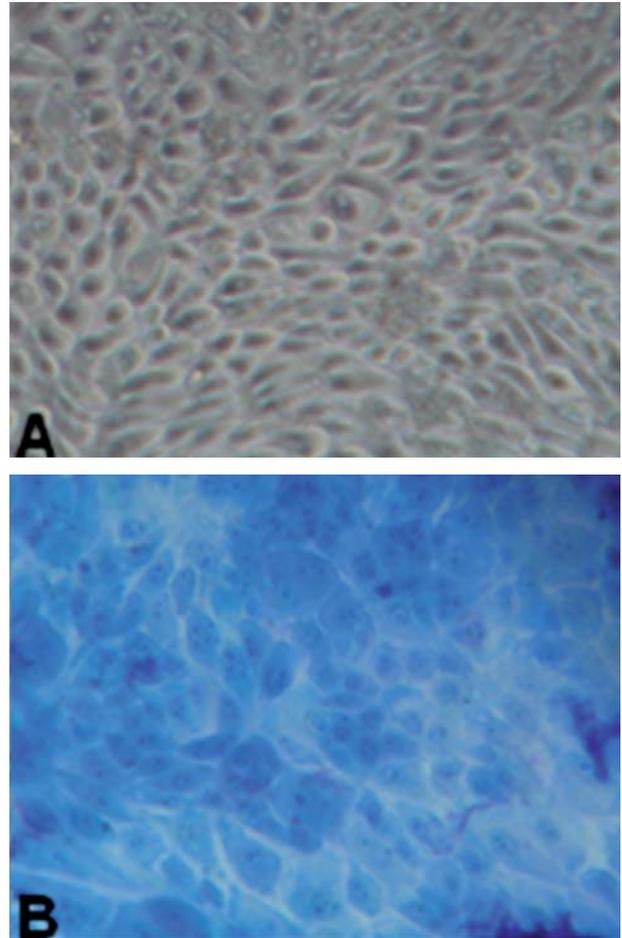
El endometrio bovino es un tejido endocrino complejo altamente especializado, donde las CEEP y las CEES, contribuyen a la regulación del ciclo estral bovino mediante diferentes mecanismos de señalización (Asselin *et al.*, 1997; Asselin *et al.*, 1996; Fortier *et al.*, 1988).

#### *Células Endometriales Epiteliales*

Las CEEP bovinas fueron aisladas por primera vez en 1988 usando protocolos modificados para el aislamiento de células endometriales epiteliales de coneja en el estudio de la ventana de reconocimiento materno embrionario y en la fisiología del endometrio bovino (Fortier *et al.*, 1988; Tithof *et al.*, 2007).

Las células epiteliales presentan morfología cuboidal o columnar en cultivos primarios, esta morfología depende de factores como: la concentración de siembra, la viabilidad pre siembra, la viabilidad pos siembra, y de factores asociados

al protocolo de aislamiento primario (Lenis *et al.*, 2009). Este tipo celular presenta una inhibición de crecimiento por contacto, es decir una vez alcanzan la confluencia (6-7 días pos-siembra), el crecimiento celular disminuye hasta inhibirse. Al momento de la siembra las células poseen una morfología y un tamaño irregular hasta que alcanzan la confluencia, momento en el cual las células forman una monocapa con adherencia al piso del pozo (Murakami *et al.*, 2003) (Figura 1).



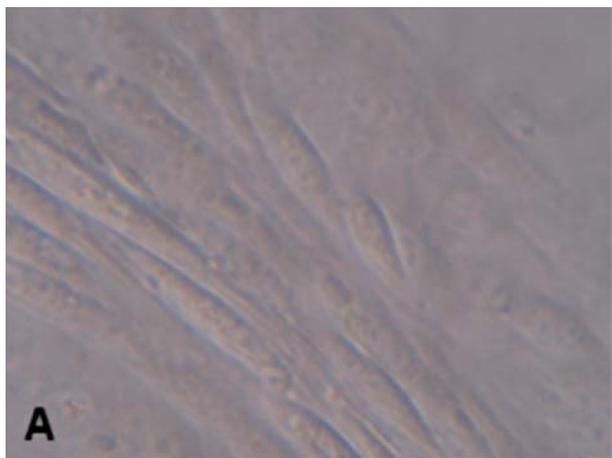
**Figura 1.** Células Endometriales Epiteliales (CEEP). (A) CEEP día 14 de cultivo con confluencia mayor al  $\approx 90\%$ . (B) CEEP día 14 de cultivo con confluencia mayor al  $\approx 80\%$ , teñidas con azul de metileno (Lenis *et al.*, 2009).

En las CEEP la producción basal de  $\text{PGF}_2\alpha$  respecto a  $\text{PGE}_2$  es  $105 \text{ pg/ml} / 53 \text{ pg/ml}$ , respectivamente lo cual corresponde aproximadamente a dos veces más  $\text{PGF}_2\alpha$ , esto es un claro indicador que el epitelio del endometrio bovino posee una mayor capacidad luteolítica (Tithof *et al.*, 2007). Estudios *in vivo*, han demostrado que el principal estímulo fisiológico

que desencadena la síntesis de prostaglandinas es la oxitocina, la cual es liberada en forma pulsátil por la neurohipófisis y el CL. Se han descrito además otros estímulos de membrana, citoplasmáticos y nucleares que regulan también la síntesis de las prostaglandinas (Woclawek *et al.*, 2004).

#### Células Endometriales Estromales

En la actualidad las CEEP, son utilizadas como modelo *in-vitro* para el estudio de las rutas principalmente luteotrópicas y algunas luteolíticas (Hirata *et al.*, 2003). Estas células al ser sometidas a cultivo primario presentan una morfología fibroblastoide alargada 36 horas después de haber sido sembradas, lo que demuestra en parte la validez del modelo puesto que la morfología es un indicador indirecto de la viabilidad y funcionalidad de las células en cultivo (Fortier *et al.*, 1988).



**Figura 2.** Células Endometriales Estromales (CEES). (A) CEES día 8 de cultivo con confluencia mayor al  $\approx 50\%$  (Lenis *et al.*, 2009).

Tanto las CEEP como las CEES presentan un aumento de mRNA y proteínas intracelulares a partir del tercer día de cultivo, lo cual es un indicador de los cambios metabólicos y morfológicos de las células una vez son aisladas y cultivadas. Las CEES producen ambas prostaglandinas, sin embargo la proporción de producción de  $PGE_2$  es ocho veces mayor que la de  $PGF_2\alpha$  (2.6 ng/ $\mu$ g vs 0.34 ng/ $\mu$ g) (Woclawek *et al.*, 2004). Lo anterior pone en evidencia la participación activa de este tejido en los procesos luteoprotectores (Woclawek *et al.*, 2004). El principal estímulo fisiológico para que se desencadene la síntesis de prostaglandinas en las CEES, es el TNF $\alpha$  producido por ellas mismas

(Gabler *et al.*, 2009) y por células inmunitarias como los linfocitos y macrófagos indiferenciados (Skarzynski *et al.*, 2000 b) (Figura 2).

#### Síntesis de $PGF_2\alpha$ y $PGE_2$ en el endometrio bovino

##### Síntesis de $PGF_2\alpha$ y $PGE_2$ en las CEEP

El aumento de la oxitocina luteal durante los días 15 al 18, induce un aumento en la síntesis de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$  en las CEEP y en menor proporción en las CLG y CLP, activando principalmente las rutas luteolíticas (funcional y estructural), que desencadenan la disminución de la producción de progesterona y la apoptosis de las células luteales (Kim *et al.*, 2003).

Las CEEP poseen la capacidad de regular la expresión de receptores de oxitocina en su membrana dependiendo del estadio fisiológico del animal (ciclicidad, gestación o anestro). Una la oxitocina se une a su receptor, estimula una proteína tipo G, induciendo la producción de diacil glicerol (DAG) e inositol tres fosfato (IP3), éste último induce la liberación de las reservas intracelulares de calcio del retículo endoplásmico. El DAG se une a la proteína quinasa C (PKC) y le induce un cambio conformacional desplazándola de la membrana celular hacia el citosol; ésta fosforila a la proteína quinasa (RAF), la cual con sus residuos de serina/ treonina fosforila la MEK, (proteína activada por mitógenos), y esta a su vez fosforila la MAP Kinasa, cuyos sustratos son las fosfolipasas 2G6 (PLA2G6) y la fosolipasas 2G4C (PLA2G4C) las cuales producen  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$ , respectivamente (Tithof *et al.*, 2007).

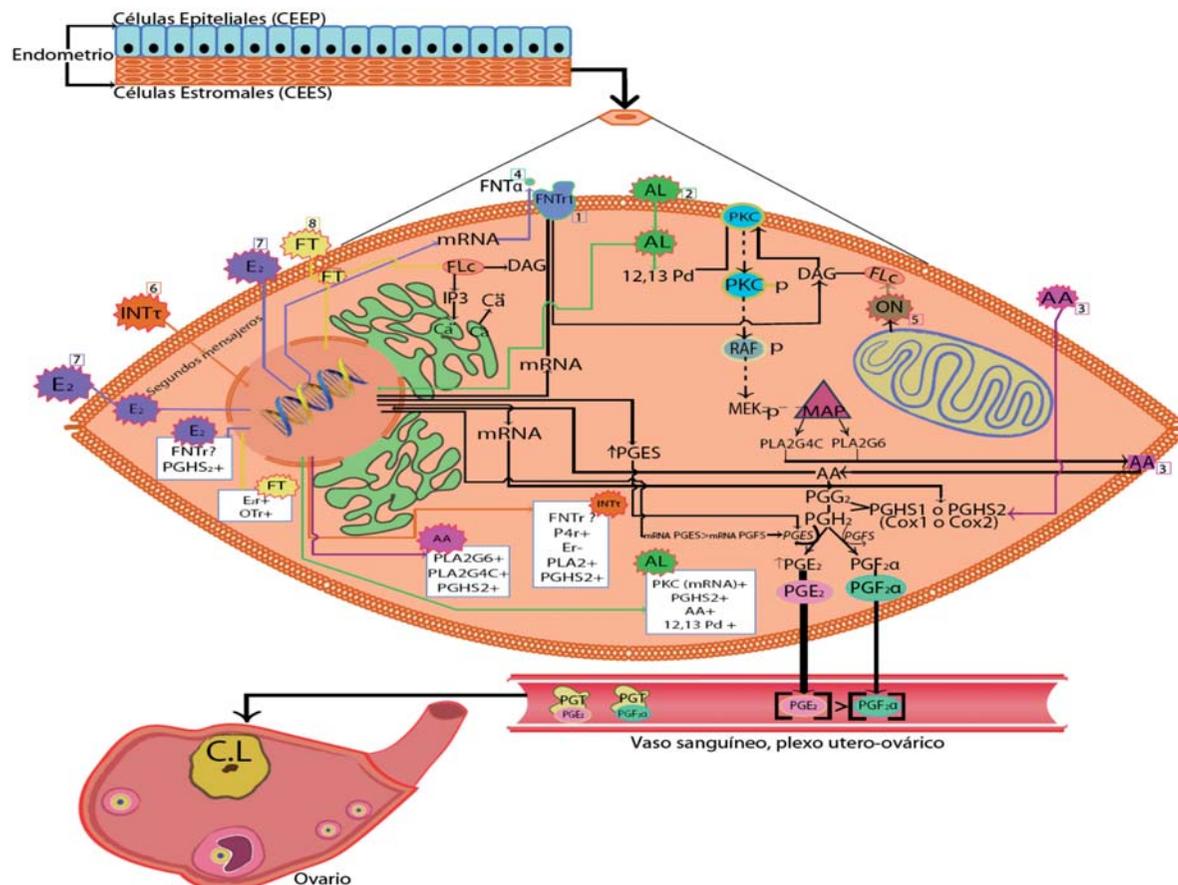
Una vez activadas la PLA2G6 y la PLA2G4C clivan el AA de la membrana en las CEEP, aumentando las concentraciones de éste en su forma libre intracelular, luego el AA debe pasar por dos reacciones: ciclooxigenación y peroxidación para producir prostaglandina G2 (PGG2) y posteriormente prostaglandina GH2 (PGH2) respectivamente. Ambas reacciones las ejecuta en diferentes sitios catalíticos de la prostaglandina H endoperoxidasa sintasa (PGHS) conocida también como ciclooxigenasa (COX) (Mattos *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 1995).



Síntesis de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$  en las CEES

El  $TNF\alpha$  es una citoquina producida por el endometrio en diferentes concentraciones durante todo el ciclo estral de la vaca, y por células inmunitarias como los linfocitos T en condiciones fisiológicas o patológicas como endometritis subclínica y clínica (Gabler *et al.*, 2009). Inicialmente se descubrió que en humanos y ratas el  $TNF\alpha$  aumentaba la síntesis de  $PGF_2\alpha$  por el endometrio, sin embargo no se conocía el efecto en bovinos. Finalmente los resultados de investigaciones en el tema, concluyeron que éste aumentaba la síntesis de  $PGF_2\alpha$  tanto en la fase folicular como en la luteal. Por lo anterior el  $TNF\alpha$ , fue propuesto como posible mediador en el proceso de luteólisis (Miyamoto *et al.*, 2000; Skarzynski *et al.*, 2000 a).

Las CEES poseen receptores de membrana para el  $TNF\alpha$ , se han reportado dos biotipos: el  $TNF-R1$  y  $TNF-R2$ , que activan diferentes rutas moleculares (Skarzynski *et al.*, 2000 b). El mecanismo de acción de  $TNF\alpha$  en las CEES no se conoce a profundidad, pero en las células endoteliales aumenta la producción de la fosfolipasa tipo 2 ( $FL_2$ ) mediante segundos mensajeros, induciendo a la acumulación de AA en el citosol, lo que activa las enzimas involucradas en la síntesis de prostaglandinas, principalmente la  $PGHS1$  y  $PGHS2$ . Después de activadas las enzimas la síntesis toma las mismas rutas bioquímicas que en las CEES (Clark *et al.*, 1988) (Figura 4).



**Figura 4.** Señales moleculares que afectan la síntesis de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$  en la CEES.  
 1. Mecanismo de acción del  $TNF\alpha$ . 2. Mecanismo de acción del AL. 3. Mecanismo de acción del AA. 4. Unión del  $TNF\alpha$  a su receptor. 5. Mecanismo de acción del NO. 6. Mecanismo de acción del Interferón- $\tau$ . 7. Mecanismo de acción de los estrógenos. 8. Mecanismo de acción de los fitoestrógenos.  
 CL: Cuerpo lúteo; OT: Oxitocina; OTr: Receptor para la oxitocina; TNFr: Receptor para el factor de necrosis tumoral tipo alpha; TNF: Factor de necrosis tumoral tipo alfa; FT: Fitoestrógenos; E2: Estrógenos; DAG: Diacilglicerol; PKC: Proteína Kinasa tipo C; IP3: Inositol tres fosfatos; INT au: Interferón trofoblástico; PKA: Proteína Kinasa Tipo A; FLC: Fosfolipasa Tipo C; AL: Ácido linoléico; AA: Ácido Araquidónico; PLA2G6: Fosfolipasa Tipo 2 G6; NO: Óxido Nítrico; PLA2G4C: Fosfolipasa Tipo 2 G 4C; PGES: Prostaglandina E sintasa; PGFS: Prostaglandina F sintasa.

### Señales moleculares que afectan la síntesis de $PGF_2\alpha$ y $PGE_2$ en el endometrio bovino

#### Ácido Linoléico

Existe gran controversia sobre los efectos reproductivos de la suplementación en vacas de producción con grasas de sobre paso ricas en AL. Algunas investigaciones han mostrado que la síntesis de  $PGF_2\alpha$  en el endometrio disminuye en animales suplementados con AL (Cheng *et al.*, 2005; Thatcher *et al.*, 1994) sin embargo, otras demuestran que la  $PGF_2\alpha$  aumenta con la suplementación, afectando directamente la duración del intervalo interestro y el reconocimiento materno embrionario (Robinson *et al.*, 2002).

El AL es un ácido graso esencial poliinsaturado, el cual el organismo transforma en dihomogamma linoléico (DGLA, 20:3, n-6) y en ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6), reacciones que son mediadas principalmente por las enzimas  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasas y por la coenzima-A elongasa (Sprecher, 2000). Éstas elongan la cadena hidrocarbonada y realizan diferentes desaturaciones al ácido graso, el DGLA y el AA, son transformados por las COX en prostaglandinas de la serie 1 y 2 respectivamente (Cheng *et al.*, 2004).

El mecanismo molecular por el cual el AL afecta la síntesis de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$  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 (Cheng *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2005) (Figuras 3 y 4).

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 forbol 12,13 dibutirato, el cual es una molécula que tiene la capacidad de forforilar 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 (Rodríguez *et al.*, 2006). En células endometriales bovinas sometidas a diferentes

concentraciones de AL, se reconoce la activación de genes codificantes para la PGHS2 favoreciendo la síntesis de prostaglandinas (Caldari *et al.*, 2006) (Figuras 3 y 4).

#### Ácido Araquidónico (AA)

El AA es un ácido graso esencial (20:4 n-6), principal precursor de las prostaglandinas de la serie 2; puede ser consumido en la dieta en forma de araquidonato como parte estructural de un triacilglicérido o puede ser biotransformado endógenamente a partir del consumo de AL (Cheng *et al.*, 2004).

En 1997 se demostró que la PGHS1 y PGHS2 poseen una afinidad específica para el AA, dependiendo básicamente del origen del mismo. Si el AA proviene del espacio extracelular la peroxidación y posterior ciclooxigenación la realizará la PGHS1, pero si la fuente de AA es intracelular la encargada de la reacciones es la PGHS2, esto demuestra una afinidad origen-específica y puede ser una vía reguladora de la biosíntesis de las prostaglandinas (Swinney *et al.*, 1997).

En estudios *in-vitro* se demostró la capacidad del AA para activar tanto la PGHS1 como la PGHS2 aún cuando fueron sometidas a inhibidores alostéricos específicos. También se ha descrito al AA como un factor epigenético el cual puede regular la expresión de genes relacionados con la síntesis de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$ . Parent *et al.* (2003a), demostraron en cultivo de células endometriales que el AA aumenta la expresión de genes para la PGHS2 a las 12 horas pos-siembra, sin embargo el gen para la PGHS1 no aumentó su expresión en ninguno de los tiempos de medición, además el AA aumentó directamente la concentración de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$  a las 24 horas pos-siembra en el sobrenadante celular. El mecanismo de acción del AA propuesto esta relacionado con la activación génica directa e indirecta de la PGHS1 (Parent *et al.*, 2003 a) (Figuras 3 y 4).

#### Oxitocina

La oxitocina es un potente factor que regula la activación de las distintas fosfolipasas en las

CEEP y CEES, dando inicio a la biosíntesis de prostaglandinas. También es considerada la principal señal molecular uterotónica, lo que permitió su uso para aumentar las contracciones miométriales y favorecer la presentación del parto en la mujer (Chard, 1989).

Este neuropéptido es producido principalmente en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, sin embargo en algunos mamíferos como la cabra, la oveja y la vaca, es sintetizada y liberada en grandes cantidades por el CL ( $> 1 \mu\text{g/g}$  tejido). La secreción de oxitocina ocurre mediante mecanismos de exocitosis que implican cambios en la conformación del citoesqueleto en las CLG y CLP (Poyser et al., 1995; Salli et al., 2003).

Los efectos fisiológicos de la oxitocina están regulados por la unión de esta a su receptor, ubicado en la membrana de las células que constituyen el endometrio y el miometrio bovino. La expresión de estos receptores está regulada principalmente por los estrógenos producidos durante la dinámica folicular, que aumentan el mRNA para el receptor de oxitocina y su expresión en la membrana plasmática (Farina et al., 2007). El mecanismo de acción de la oxitocina ha sido explicado previamente en la presente e involucra la activación de la PKC por medio del DAG y el IP3 (Figura 3).

#### *Factor de Necrosis Tumoral tipo Alpha*

El efecto del TNF $\alpha$  en el aparato reproductivo en mamíferos ha sido ampliamente estudiado. En 1989 se determinó la concentración del TNF $\alpha$  en mujeres gestantes y no gestantes, en donde se observó que las mujeres gestantes presentaban niveles muy bajos (2.5 pg/ml) comparados con los niveles en mujeres no gestantes (16.2 pg/ml), estos valores sugirieron que en mujeres gestantes hay una supresión de la actividad macrocítica, lo que favorecería la supervivencia embrionaria y fetal (Voigt et al., 1989).

El TNF $\alpha$  posee dos biotipos de receptores en la membrana plasmática de las CEES, el TNF-R1 y TNF-R2 ambos acoplados a una proteína G trimérica. Una vez activados se estimula la síntesis de PGF $_2\alpha$  y PGE $_2$ , el estímulo con TNF $\alpha$  en las

CEEP, no afecta la síntesis de estas prostaglandinas indicando que el estímulo es específico para las CEES (Skarzynski et al., 2000).

El mecanismo de acción del TNF $\alpha$  mediado por el TNF-R1 involucra la activación de la PKC, la cual a su vez y finalmente activa las fosfolipasas tipo C y A $_2$ , el efecto de esta última induce una acumulación del AA en el citoplasma de las CEES, lo que induce la activación de la PGHS1 y PGHS2 induciendo la peroxidación y ciclooxigenación del AA (Skarzynski et al., 2008, Skarzynski et al., 2000), a su vez TNF $\alpha$  induce activación de la expresión génica y una sobrerregulación del gen para PGHS2 aumentando la concentración activa de esta enzima (Okuda et al., 2004). Existen múltiples factores que regulan el efecto del TNF $\alpha$  en las CEES, dentro de los cuales se encuentra el interferón- $\tau$ , el cual afecta directamente la producción de la PGHS2, disminuyendo principalmente la síntesis de PGF $_2\alpha$ , este efecto favorece el reconocimiento materno embrionario. Sin embargo, se han reportado efectos tanto luteolíticos (1  $\mu\text{g}$ ) como luteotrópicos (10  $\mu\text{g}$ ) del TNF $\alpha$  los cuales dependen básicamente del la dosis del mismo (Skarzynski et al., 2008) (Figuras 3 y 4)

#### *Oxido Nítrico (NO)*

El NO es un radical libre que hace parte de las también conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs), que son producidas primariamente a través de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial, pero también son producidas en el citoplasma por la NADPH-oxidasa unida a membrana por la enzima citocromo p450 y por el sistema xantina-xantina oxidasa (Gilbert et al., 1999). Las EROs deben ser rápidamente catabolizadas para evitar el estrés oxidativo celular y la disfunción mitocondrial, que puede conllevar al desencadenamiento de apoptosis (Lu et al., 2009). Este radical es producido en grandes cantidades por las células endoteliales, sin embargo, en la actualidad se conoce que el endometrio bovino produce NO el cual es sintetizado por la óxido nítrico sintasa, la expresión de esta determina la cantidad de NO producido en un momento dado. El NO estimula la síntesis de prostaglandinas

en las CEEP y CEES, teniendo la capacidad de inducir de forma preferencial la activación de las enzimas relacionadas con la síntesis de  $PGE_2$ . Esta acción del NO y las altas concentraciones del TNF $\alpha$  conjunto a la de  $PGE_2$ , son responsables de los efectos luteotrópicos durante la ventana de reconocimiento materno de la preñez (Woclawek *et al.*, 2004). El mecanismo de acción del NO involucra la activación de la guanilato ciclasa y la producción del guanosin monofosfato cíclico (GMPc), el cual a su vez podría activar directamente las diferentes fosfolipasas C y  $A_2$  involucradas en la síntesis de prostaglandinas (Acosta *et al.*, 2008) (Figuras 3 y 4).

#### *Interferón tau*

El Interferón-tau es una citoquina producida por diversos genes expresados en las células trofoectodérmicas del blastocisto en la etapa que precede a la implantación, alcanza niveles máximos durante los días 15 al 17 y se sintetiza hasta el día 28 de gestación (Arosh *et al.*, 2004 y 2002). No sólo media procesos inmunológicos sino también es el principal modulador endocrino para la producción de  $PGE_2$  en CEEP y CEES (Walker *et al.*, 2009). El Interferón-tau es el principal factor antiluteolítico, favorece el proceso de reconocimiento materno embrionario y la posterior implantación, aunque su mecanismo de acción no está totalmente claro, regula la síntesis de prostaglandinas en varios niveles de las rutas para la síntesis de la  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$  (Binelli *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2006; Okuda *et al.*, 2004; Parent *et al.*, 2003b).

El primer mecanismo de regulación propuesto actúa por efectos inhibitorios directos, sobre la expresión de la PGHS2 y de las FLA $_2$  relacionadas con la síntesis de  $PGF_2\alpha$ , esta acción disminuye la concentración de  $PGF_2\alpha$  y de producción neta de AA libre (Cheng *et al.*, 2006), sin embargo algunos de los estudios realizados coinciden en que el Interferón-tau, aumenta la expresión de la PGHS2 y de  $PGE_2$ . Lo anterior evidencia algunos vacíos en el conocimiento y permite proponer nuevos niveles de regulación en la ruta donde posiblemente participa el interferón-tau (Parent *et al.*, 2003 a). Experimentos *in-vitro* realizados en CEEP sometidas a forbol 12,13 dibutirato que

activa la PKC, demostraron que posiblemente el Interferón-tau mediante la interacción con su receptor y activación de segundos mensajeros, inhibía la PKC ya que se disminuía la producción de  $PGF_2\alpha$  inducida por los ésteres de forbol al agregar Interferón-tau. Este mismo efecto de bloqueo del estímulo mediado por Interferón-tau se presentó ante señales moleculares como la de la oxitocina, TNF $\alpha$  y NO (Arosh *et al.*, 2002; Binelli *et al.*, 2000; Okuda *et al.*, 2004).

Un segundo nivel de regulación es que el Interferón-tau estabiliza los receptores para la progesterona en el endometrio e inhibe la expresión génica de los receptores de estrógenos y oxitocina durante el proceso de reconocimiento materno embrionario, lo cual disminuye la biosíntesis de  $PGF_2\alpha$  y  $PGE_2$ , comparado con el estímulo generado sólo por la oxitocina (Spencer *et al.*, 1996; Tithof *et al.*, 2007).

En vacas preñadas el mRNA de los genes que codifican para el receptor de la oxitocina y de los estrógenos fueron dos veces más bajos comparados con los niveles de vacas vacías ciclando. La interacción de los estrógenos con su receptor nuclear activa la expresión del gen que codifica para el receptor de oxitocina, al reducirse el mRNA para el receptor de estrógenos se afecta la expresión del receptor de oxitocina disminuyendo así la cantidad de receptores disponibles para expresarse en las membranas plasmáticas de las CEEP (Arosh *et al.*, 2004; Arosh *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2006; Spencer *et al.*, 1996; Spencer *et al.*, 2000 b) (Figuras 3 y 4).

#### *Estrógenos*

Los estrógenos son producidos principalmente en la corteza adrenal y los folículos ováricos, mediante una ruta esteroideogénica común. Junto con los progestágenos, los estrógenos regulan el ciclo estral bovino mediante la modulación de la producción y liberación de la  $PGF_2\alpha$  (Miguez *et al.*, 2005; Woclawek *et al.*, 2005). Se observó que vacas sometidas a la administración de 17- $\beta$ -estradiol en el día 13 del ciclo estral incrementaban la producción de  $PGF_2\alpha$ , lo que sugirió que los estrógenos tenían una potente actividad luteolítica

indirecta (Woclawek *et al.*, 2005). Los estrógenos tienen la capacidad de regular en varios niveles la ruta de síntesis de prostaglandinas en el endometrio bovino, mediante vías génicas o no génicas (Woclawek *et al.*, 2004).

El primer nivel de regulación génica involucra la expresión de la PGHS<sub>2</sub>, en las células endometriales bovinas permitiendo el aumento de la tasa de peroxidación y ciclooxygenación del AA, los primeros acercamientos respecto a estas rutas de regulación se realizaron en células endoteliales cultivadas *in-vitro* (Hermenegildo *et al.*, 2006).

El segundo nivel de regulación no génica, involucra la activación de segundos mensajeros como el AMPc, PKA y las fosfolipasas tipo C, esto aumentaría la tasa de clivaje de ácidos grasos de membrana y por ende la concentración de AA libre en el citoplasma (Katzenellenbogen, 1996).

El tercer nivel de regulación en la ruta de síntesis génica, comprende el aumento de los receptores de la oxitocina en las CEEP y posiblemente los receptores para el TNF $\alpha$  en las CEES. Los estrógenos una vez se unen a su receptor activan las secuencias promotoras para la expresión del mRNA para el receptor de oxitocina, aumentando la traducción del mRNA y la expresión del receptor en la membrana plasmática. El posible mecanismo por el cual los estrógenos afectan la expresión del receptor para TNF $\alpha$  en las CEES no está totalmente dilucidado (Cheng *et al.*, 2006; Spencer *et al.*, 1996; Spencer *et al.*, 1995) (Figuras 3 y 4).

#### *Fitoestrógenos*

Los fitoestrógenos son compuestos con actividad estrogénica endógena derivados de los metabolitos secundarios en algunas plantas o forrajes (Liu *et al.*, 2009). Estos pueden inducir efectos benéficos o adversos en diversos sistemas y aparatos como el reproductivo. Los fitoestrógenos se clasifican en familias las cuales presentan diferente actividad biológica y efectos. La Daidzeina (DAI) y la Genisteina (GEN) son los principales fitoestrógenos presentes en la soya, los cuales pueden afectar algunos procesos reproductivos como la gestación en diferentes

especies, mediante la activación de los procesos luteolíticos funcionales y estructurales (Woclawek *et al.*, 2005).

La DAI y la GEN aumentan la síntesis de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> en las CEEP y CEES, activando rutas celulares génicas, estos tienen la capacidad de estimular los receptores de estrógenos nucleares, activando mediante rutas enzimáticas la PKC y las fosfolipasa tipo C (Woclawek *et al.*, 2005).

Los fitoestrógenos aumentan preferencialmente la síntesis y secreción de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  en las CEEP, alterando la proporción de producción entre de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> tanto en las CEEP como en las CEES, esto sugiere un efecto luteolítico de los fitoestrógenos los cuales pueden alterar de manera directa el proceso de reconocimiento materno embrionario (Woclawek *et al.*, 2004).

Además de las anteriores, se han estudiado otras señales moleculares que pueden también afectar la síntesis de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> en las CEEP y CEES, dentro de estas que se encuentran la progesterona, los glucocorticoides, las interleucinas tipo 1 y 2, el factor de crecimiento vascular endotelial, y el factor de crecimiento epidérmico entre otras. Condiciones patológicas como la endometritis subclínica y clínica afectan directamente la expresión de las enzimas relacionadas con la síntesis de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> (Krishnaswamy *et al.*, 2010; Tasaki *et al.*, 2009) (Figuras 3 y 4).

Se concluye que la producción de prostaglandinas por el endometrio bovino está regulada de forma multifactorial y que los eventos fisiológicos regulados por ellas dependen de diferentes señales moleculares. Se evidencia que aún existen muchos vacíos en el conocimiento, principalmente en los mecanismos de acción de algunas señales moleculares. La actualización en las nuevas técnicas de laboratorio ha permitido el descubrimiento de nuevas señales moleculares que afectan la síntesis de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> cuyos resultados puestos en contexto, nos permiten aproximarnos al entendimiento de los principales procesos fisiológicos en la reproducción bovina.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del Proyecto “Efecto *in vitro* del ácido linoléico sobre la producción

## Referencias

- Acosta TJ, Bah MM, Korzekwa A, Woclawek-Potocka I, Markiewicz W, Jaroszewski J, Okuda K, Skarzynski D. Acute changes in circulating concentrations of progesterone and nitric oxide and partial pressure of oxygen during prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteolysis in Cattle. *J Reprod Dev* 2008; 55:149-55.
- Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Emond V, Kim JJ, MacLaren L, Fortier M. Molecular cloning and characterization of bovine prostaglandin E<sub>2</sub> receptors EP2 and EP4: expression and regulation in endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 2003; 7:3076-91.
- Arosh JA, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, Maclaren LA, Fortier M. 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 E<sub>2</sub>. *Endocrinology* 2004; 11:5280-93.
- Arosh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol Reprod*. 2002; 1:161-9.
- Asselin E, Bazer FW, Fortier MA. Recombinant ovine and bovine interferons tau regulate prostaglandin production and oxytocin response in cultured bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 1997; 2:402-8.
- Asselin E, Goff AK, Bergeron H, Fortier MA. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F<sub>2</sub> alpha and E<sub>2</sub> and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod* 1996; 2:371-9.
- Binelli M, Guzeloglu A, Badinga L, Arnold DR, Sirois J, Hansen T, Thatcher W. Interferon-tau modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase-A(2) from bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 2000; 2:417-24.
- Caldari-Torres C, Rodríguez-Sallaberry C, Greene ES, Badinga L. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F<sub>2</sub>α production by bovine endometrial cells. *J Dairy Sci* 2006; 3:971-7.
- Chard T. Fetal and maternal oxytocin in human parturition. *Am J Perinatol* 1989; 2:145-52.
- Chen Y, Green JA, Antoniou E, Ealy AD, Mathialagan N, Walker A, Avalle M, Rosenfeld C, Hearne L, Roberts R. Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology* 2006; 5:2127-37.
- 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.
- Cheng Z, Elmes M, Kirkup SE, Abayasekara DR, Wathes DC. Alteration of prostaglandin production and agonist responsiveness by n-6 polyunsaturated fatty acids in endometrial cells from late-gestation ewes. *J Endocrinol* 2004; 2:249-56.
- Clark MA, Chen MJ, Crooke ST, Bomalaski JS. Tumour necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2 activity and synthesis of a phospholipase A2-activating protein in endothelial cells. *Biochem J* 1988; 1:125-32.
- Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White J, Conlan R, O'Farrelly C, Sheldon I. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6:53.
- Farina MG, Billi S, Leguizamón G, Weissmann C, Guadagnoli T, Ribeiro ML, Franchi AM. Secretory and cytosolic phospholipase A2 activities and expression are regulated by oxytocin and estradiol during labor. *Reproduction* 2007; 2:355-64.
- Fortier MA, Guilbault LA, Grasso F. Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *J Reprod Fertil* 1988; 1:239-48.
- 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. *Theriogenology* 2009; 6:993-1004.
- Gilbert D, Colton C. An overview of reactive oxygen species. In *Reactive Oxygen Species in Biological systems: An interdisciplinary Approach*. Kluwer Academic-Plenum Publishers, New York 1999; 679-695.
- Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F<sub>2</sub>α to prostaglandin E<sub>2</sub> in bovine endometrium. *Endocrinology* 2009; 4:1912-20.
- Hermenegildo C, Oviedo PJ, Cano A. Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. *Curr Pharm Des* 2006; 2:205-15.
- Hirata M, Sato T, Tsumagari M, Shimada A, Nakano H, Hashizume K, Ito A. 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.
- Ivanov AI, Romanovsky AA. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci* 2004; 9:1977-93.
- Katzenellenbogen BS. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol Reprod* 1996; 2:287-93.
- 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.
- Krishnaswamy N, Lacroix-Pepin N, Chapdelaine P, Taniguchi H, Kauffenstein G, Chakravarti A, Danyod G, Fortier MA. Epidermal growth factor receptor is an obligatory intermediate for oxytocin-induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin F2 alpha production in bovine endometrial epithelial cells. *Endocrinology* 2010; Jan 15.
- Lenis Y, Olivera M, Tarazona A. Caracterización de la dinámica del cultivo primario *in vitro* de células epiteliales endometriales bovinas, a diferentes concentraciones de siembra. *RCCP* 2009; 22 (3): 566-80.
- Liu ZH, Kanjo Y, Mizutani S. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. *Water Res* 2009 (article in press).
- Lu M, Gong X. Upstream reactive oxidative species (ROS) signals in exogenous oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction. *Cell Biol Int* 2009; 33(6):658-6.
- Mattos R, Guzeloglu A, Badinga L, Staples CR, Thatcher WW. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2 alpha and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 2003; 3:780-7.
- Miguez P, Cunha M, Marques B, Bertan M, Binelli M. Combination of estradiol-17 $\beta$  and progesterone is required for synthesis of PGF2 $\alpha$  in bovine endometrial explants. *Anim. Reprod* 2005; 2: 172-177.
- Miyamoto Y, Skarzynski DJ, Okuda K. Is tumor necrosis factor alpha a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F(2alpha) release at luteolysis in cattle?. *Biol Reprod* 2000; 5:1109-15.
- 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.
- Okuda K, Kasahara Y, Murakami S, Takahashi H, Woclawek-Potocka I, Skarzynski DJ. Interferon-tau blocks the stimulatory effect of tumor necrosis factor-alpha on prostaglandin F2alpha synthesis by bovine endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 2004; 1:191-7.
- Olivera AM, Tarazona MA, Ruiz CT, Giraldo EC. Modelo de luteólisis bovina. *Rev Col Cienc Pec* 2007; 20:387-393.
- Parent J, Villeneuve C, Alexenko AP, Ealy AD, Fortier MA. Influence of different isoforms of recombinant trophoblastic interferons on prostaglandin production in cultured bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 2003a; 3:1035-43.
- 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. *Reproduction* 2003b; 4:539-47.
- Poyser NL. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995; 3:147-95.
- Robinson RS, Pushpakumara PG, Cheng Z, Peters AR, Abayasekara DR, Wathes DC. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction* 2002; 1:119-31.
- Rodríguez C, Caldari-Torres 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.
- 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 F2alpha stimulation of bovine luteal cells. *Biol Reprod* 2003; 6:2053-8.
- Skarzynski D, Piotrowska K, Bah M, Korzekwa A, Woclawek-Potocka I, Sawai K, Okuda K. 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.
- Skarzynski DJ, Kobayashi S, Okuda K. Influence of nitric oxide and noradrenaline on prostaglandin F(2)(alpha)-induced oxytocin secretion and intracellular calcium mobilization in cultured bovine luteal cells. *Biol Reprod* 2000a; 4:1000-5.
- Skarzynski DJ, Miyamoto Y, Okuda K. Production of prostaglandin f(2alpha) by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor alpha: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biol Reprod* 2000b; 5:1116-20.
- Spencer TE, Bazer FW. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 1996; 3:1144-7.
- Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW. Ovine interferon-tau regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. *Biol Reprod* 1995; 3:732-45.
- Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2000; 2-3: 219-31.
- Swinney DC, Mak AY, Barnett J, Ramesha CS. Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid. *J Biol Chem* 1997; 19:12393-8.
- Tasaki Y, Nishimura R, Shibaya M, Lee HY, Acosta TJ, Okuda K. Expression of VEGF And Its Receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: Effects of VEGF on

- Prostaglandin Production in Endometrial Cells. *J Reprod Dev*; 2009.
- Thatcher WW, Staples CR, Danet DG, Oldick B, Schmitt EP. Embryo Health and Mortality in Sheep and Cattle. *J Anim Sci* 1994; 72:16-30.
- Tithof PK, Roberts MP, Guan W, Elgayyar M, Godkin JD. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2 alpha production by bovine endometrial epithelial cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5:16.
- Voigt HJ, Steib L. Tumor necrosis factor and pregnancy a contribution to the immunology of reproduction. *Arch Gynecol Obstet* 1989; 4:223-6.
- Walker AM, Kimura K, Roberts RM. Expression of bovine interferon-tau variants according to sex and age of conceptuses. *Theriogenology* 2009; 72 (1):44-53.
- Woclawek I, Acosta TJ, Korzekwa A, Bah MM, Shibaya M, Okuda K, Skarzynski DJ. Phytoestrogens modulate prostaglandin production in bovine endometrium: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005; 5:326-33.
- Woclawek I, Deptula K, Bah MM, Lee HY, Okuda K, Skarzynski DJ. Effects of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha on production of prostaglandin F2 alpha and E2 in bovine endometrial cells. *J Reprod Dev* 2004; 3:333-40.