

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA PROSTAGLANDINA F₂ ALFA EN EL MIOMETRIO DE ALPACAS (*Lama pacos*) ADULTAS NO GESTANTES

Gustavo Pajuelo A.¹, Milder Ayón S.² y Sergio Cueva M.²

Abstract

The effect of the Prostaglandin F₂α (PGF₂α) upon the myometrium of cranial and caudal segments from the right (RH) and left (LH) uterine horns, as well as on the right (RUB) and left (LUB) segments of the uterine body *in vitro*, was studied in non-pregnant adult alpacas. The results are expressed as percent of maximum tension obtained by depolarization with 50 mM of ClK. Accumulative doses of 1.89 x 10⁻⁷ M, 5.66 x 10⁻⁷ M, 9.41 x 10⁻⁷ M and 1.31 x 10⁻⁷ M of the last concentration of Prostaglandin F₂α, produced muscular myometrium contraction in all segments as follows: in RH 68.63±9.32, 65.42±11.73, in LH 56.12±8.46, 47.72±6.25, RUB 39.72±6.67 and LUB 46.97±4.29 for the first dose; in RH 76.18±2.91, 75.97±13.04, in LH 70.30±7.47, 66.48±6.02, RUB 48.58±7.56 and LUB 57.27±6.49 for the second dose; in RH 83.53±5.51, 85.15±9.32, in LH 79.35±11.35, 73.17±5.94, RUB 45.20±5.92 and LUB 62.50±7.20 for the third dose; and finally, in RH 78.12±7.25, 84.53±14.68, in LH 70.35±11.76, 61.78±3.70, RUB 40.32±6.34 and LUB 59.33±12.08 for the fourth dose, respectively. In conclusion, contraction frequency (%) was greater in the cranial and caudal segments of the right and left uterine horns (P<0.05) than in the uterine body segments. Maximum contraction levels were achieved with the third accumulative dose of Prostaglandin F₂α, but these did not exceed the contraction frequency (%) obtained with ClK.

Key words: Prostaglandin F₂α, *in vitro*, uterine horn, muscle contraction, myometrium, non-pregnant adult alpaca.

Resumen

El presente estudio fue realizado para determinar el efecto de la Prostaglandina F₂α (PGF₂α) sobre el miometrio de los segmentos craneal y caudal de los cuernos uterinos derecho (CD) e izquierdo (CI) y sobre el cuerpo uterino, segmentos derecho (CUD) e izquierdo (CUI) de alpacas adultas no gestantes en condiciones *in vitro*. Los resultados han sido expresados en porcentaje (%) de máxima tensión lograda por despolarización con 50 mM de Cloruro de Potasio. Dosis acumulativas de 1.89 x 10⁻⁷ M, 5.66 x 10⁻⁷ M, 9.41 x 10⁻⁷ M y 1.31 x 10⁻⁷ M de concentración final de Prostaglandina F₂α produjeron contracción muscular del miometrio en todos los segmentos de la siguiente forma: Para la primera dosis en CD 68.63±9.32, 65.42±11.73, en CI 56.12±8.46, 47.72±6.25 y en CUD 39.72±6.67 y en CUI 46.97±4.29; para la segunda dosis en CD 76.18±2.91, 75.97±13.04, en CI 70.30±7.47, 66.48±6.02 y en CUD 48.58±7.56 en CUI 57.27±6.49; para la tercera dosis en CD 83.53±5.51, 85.15±9.32, en CI 79.35±11.35, 73.17±5.94 y en CUD 45.20±5.92 y CUI 62.50±7.20; y, para la cuarta dosis en CD 78.12±7.25, 84.53±14.68, en CI 70.35±11.76, 61.78±3.70 y en CUD 40.32±6.34 y CUI 59.33±12.08, respectivamente. En conclusión, los segmentos craneal y

¹ Práctica privada

² Laboratorio de Fisiología - FMV - UNMSM. E.mail: d170006@unmsm.edu.pe

caudal de los cuernos uterinos se contrajeron en mayor porcentaje ($P < 0.05$) que los segmentos derecho e izquierdo del cuerpo uterino y la máxima respuesta contráctil del miometrio se observó a la tercera dosis acumulativa de Prostaglandina $F_2\alpha$, sin sobrepasar el porcentaje de contracción lograda por CIK

Palabras clave: Prostaglandina $F_2\alpha$, *in vitro*, cuernos uterinos, contracción muscular, miometrio, alpaca adulta no gestante.

Introducción

En camélidos independientemente del lugar de ovulación, la implantación y decidualización del embrión es en el cuerno uterino izquierdo. Este hecho implica que los embriones procedentes del ovario derecho deben migrar para implantarse en el lado opuesto. Se conoce en otras especies que la Prostaglandina $F_2\alpha$ ejerce actividad a nivel del útero, mediante la estimulación de la contracción del músculo liso (Naderali *et al.*, 1997; Phillippe *et al.*, 1997; Parkington *et al.*, 1999). En camélidos, considerando la implantación preferencial de embriones en el cuerno izquierdo, es de interés conocer el efecto de la Prostaglandina $F_2\alpha$ sobre los diferentes segmentos del cuerpo y cuernos uterinos derecho e izquierdo de alpacas adultas no gestantes.

Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Anatomía y Fisiología Animal del Departamento Académico de Ciencias Veterinarias Básicas de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se usaron seis alpacas (*Lama pacos*) hembras no gestantes, con un promedio de edad de cuatro años, con un parto previo, nacidas y criadas alrededor de los 4 000 msnm, que fueron trasladadas a nivel del mar (200 msnm) en donde permanecieron por un período de cuatro meses.

Las muestras para el estudio fueron obtenidas de animales previamente anestesiados. Luego de abrir la cavidad abdominal, se procedió a la medición *in situ*

del cuerpo y cuernos uterinos. Después de separar quirúrgicamente el aparato reproductor femenino, éste fue colocado en un recipiente que contenía líquido nutritivo a temperatura controlada, en donde los cuernos uterinos fueron divididos arbitrariamente en: segmentos craneal y segmentos caudal; y, el cuerpo uterino en: segmento lado derecho y segmento lado izquierdo. Se tomaron muestras de cada segmento, de 1 cm de longitud, las que fueron llevadas a un sistema de cultivo *in vitro* y suspendidas en 13 ml de líquido nutritivo solución Krebs-Hanseleit, mantenidos a 37°C con un pH de 7.4, aireado con una mezcla de gases de 95% de O_2 y 5% de CO_2 . Los segmentos uterinos fueron colocados entre un tensor micrométrico y un transductor de tensión Grass tipo FT 10 y este último conectado a un registrador térmico Hewlett Packard modelo 8805 B. La tensión ejercida sobre el tejido fue de 1 g, correspondiente a 10 mm del papel de registro.

Antes de la aplicación de la Prostaglandina $F_2\alpha$, los segmentos de miometrio acondicionados en el equipo de cultivo *in vitro* tuvieron un periodo de equilibración de aproximadamente 2 h. En este periodo, el tejido fue sometido a lavados con solución Krebs-Hanseleit cada 10 minutos, obteniéndose la tensión óptima de contracción de 1.5 g. La tensión óptima sirvió como base para expresar los cambios observados como respuesta del tejido a la hormona. Luego de este periodo, cada segmento uterino fue sometido a dosis aditivas de diferentes concentraciones de cloruro de potasio (CIK) con el fin de conseguir la máxima respuesta contráctil del miometrio, la que se obtuvo a la concentración de 50 mM de CIK. Esta máxima tensión se consideró como la máxima respuesta del tejido, 100% de la actividad de

miometrio por despolarización de la membrana debido al potasio, y sirvió como punto referencial para obtener los porcentajes de respuesta del tejido uterino a las diferentes dosis acumulativas de la Prostaglandina $F_2\alpha$. Luego, el tejido fue lavado 3 a 4 veces con el líquido nutricio hasta alcanzar nuevamente su nivel normal de tensión óptima. Posteriormente, los segmentos uterinos fueron sometidos a dosis acumulativas de Prostaglandina $F_2\alpha$, administrada por medio de una micropipeta graduable, en moles, cuyas dosis fueron: 1ª dosis: 1.89×10^{-7} M, 2ª dosis: 5.66×10^{-7} M, 3ª dosis: 9.41×10^{-7} M, y; 4ª dosis: 1.31×10^{-6} M, de concentración final. Después de la aplicación de cada dosis de Prostaglandina $F_2\alpha$ se dio un tiempo de respuesta de 5 minutos para luego proceder con la siguiente aplicación. La relación dosis - respuesta a la hormona por parte de los segmentos uterinos se determinó a partir de la tensión óptima. Así se registró la variación como respuesta a la actividad de la hormona.

Con el fin de comparar las respuestas de los segmentos craneal y caudal de los cuernos uterinos derecho e izquierdo y, los segmentos lado derecho y segmento lado izquierdo del cuerpo uterino se usó el análisis de varianza (ANOVA). Al resultar significativa la prueba de Anova, las diferencias específicas entre segmentos fueron analizadas mediante la prueba de Duncan ($P < 0.05$).

Resultados y Discusión

En los Cuadros 1, 2, 3 y 4 se muestran los resultados de contracción muscular lisa en los cuernos uterinos, derecho e izquierdo así como en el cuerpo uterino en respuesta a la acción de la Prostaglandina $F_2\alpha$.

El máximo nivel de contracción logrado no fue mayor a la máxima respuesta contráctil lograda por despolarización con CLK. Se conoce que la actividad estimuladora de la Prostaglandina $F_2\alpha$ sobre el músculo liso se halla asociada con alteraciones en el desplazamiento del ion Cal-

cio, que es inducido por despolarización de la membrana celular, lo que provoca la contracción muscular (Perusquia y Kubli-Garfias, 1992; Naderali *et al.*, 1997; Phillippe *et al.*, 1997; Hirata *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 1999; Parkington *et al.*, 1999). El miometrio uterino responde en diversos grados a la acción de la Prostaglandina $F_2\alpha$, dependiendo de la especie animal, la edad y otros estados fisiológicos (Gordan *et al.*, 1997; Navarro, 1998; Yousufzai *et al.*, 1996; Parkington *et al.*, 1999). La actividad contráctil de la Prostaglandina $F_2\alpha$ en alpacas adultas no gestantes del presente estudio fue menor en comparación a lo hallado en cobayas preñadas (Coleman y Parkington, 1988), y en cobayos prepúberes (Navarro, 1998). Esta diferencia probablemente se debe a particularidades atribuibles a la especie o al estado reproductivo de los animales estudiados.

La máxima respuesta contráctil se logró con la tercera dosis (9.41×10^{-7} M), después de la cual la respuesta disminuyó. Esta máxima respuesta contráctil podría explicarse por la existencia de un alto grado de saturación de los receptores a esta hormona, cuyo origen en este caso es exógeno. La disminución en la contracción del tejido en la cuarta dosis podría deberse a la actividad del sistema de autorregulación de receptores, fenómeno conocido como "up and down regulation" cuyo mecanismo de regulación es aún motivo de estudio (Odore *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 1999). En los valores promedio de respuesta contráctil del miometrio a las diferentes dosis de Prostaglandina $F_2\alpha$ (Cuadros 1, 2, 3 y 4), se observó que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en la contracción del músculo liso uterino de los cuernos uterinos derecho e izquierdo con respecto al cuerpo uterino, en todas las dosis estudiadas. Esta respuesta puede ser explicada por el hecho de que en los segmentos de los cuernos uterinos podrían localizarse un mayor número de receptores específicos para la Prostaglandina $F_2\alpha$ (Perusquia y Kubli-Garfias, 1992; Fang *et al.*, 1997; Phillippe *et al.*, 1997; Baguma *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998).

Cuadro 1. Tensión muscular, expresada en % de la máxima contracción lograda con CIK (100%), en los segmentos de los cuernos uterinos derecho e izquierdo y en segmentos del cuerpo uterino de alpacas adultas no gestantes por efecto de 1.89 x 10⁻⁷ M de Prostaglandina F₂α.

Segmento uterino	Derecho $\bar{X} \pm D.E.$	Izquierdo $\bar{X} \pm D.E.$
Cuerno Craneal	68.63 ± 9.320 ^{A*}	56.12 ± 8.46 ^A
Cuerno Caudal	65.42 ± 11.73 ^A	47.72 ± 6.25 ^A
Cuerpo	39.72 ± 6.67 ^B	46.97 ± 4.29 ^B

\bar{X} : Promedio; D.E.: Desviación estándar.

* Los promedios en columna con letras diferentes difieren significativamente (P<0.05).

Cuadro 2. Tensión muscular, expresada en % de la máxima contracción lograda con CIK (100%), en los segmentos de los cuernos uterinos derecho e izquierdo y en segmentos del cuerpo uterino de alpacas adultas no gestantes por efecto de 5.66 x 10⁻⁷ M de Prostaglandina F₂α.

Segmento uterino	Derecho $\bar{X} \pm D.E.$	Izquierdo $\bar{X} \pm D.E.$
Cuerno Craneal	76.18 ± 2.918 ^{A*}	70.30 ± 7.47 ^A
Cuerno Caudal	75.97 ± 13.04 ^A	66.48 ± 6.02 ^A
Cuerpo	48.58 ± 7.656 ^B	57.27 ± 6.49 ^B

\bar{X} : Promedio; D.E.: Desviación estándar.

* Los promedios en columna con letras diferentes difieren significativamente (P<0.05)

Cuadro 3. Tensión muscular, expresada en % de la máxima contracción lograda con CIK (100%), en los segmentos de los cuernos uterinos derecho e izquierdo y en segmentos del cuerpo uterino de alpacas adultas no gestantes por efecto de 9.41 x 10⁻⁷ M de Prostaglandina F₂α.

Segmento uterino	Derecho $\bar{X} \pm D.E.$	Izquierdo $\bar{X} \pm D.E.$
Cuerno Craneal	83.53 ± 5.51 ^{A*}	79.35 ± 11.35 ^A
Cuerno Caudal	85.15 ± 9.32 ^A	73.17 ± 5.94 ^A
Cuerpo	45.20 ± 5.92 ^B	62.50 ± 7.20 ^B

\bar{X} : Promedio; D.E.: Desviación estándar.

* : Los promedios en columna con letras diferentes difieren significativamente (P<0.05)

Cuadro 4. Tensión muscular, expresada en % de la máxima contracción lograda con CIK (100%), en los segmentos de los cuernos uterinos derecho e izquierdo y en segmentos del cuerpo uterino de alpacas adultas no gestantes por efecto de 1.31×10^{-6} M de Prostaglandina $F_2 \alpha$.

Segmento uterino	Derecho $\bar{X} \pm D.E.$	Izquierdo $\bar{X} \pm D.E.$
Cuerno Craneal	$78.12 \pm 7.25^{A*}$	70.35 ± 11.76^A
Cuerno Caudal	84.53 ± 14.68^A	61.78 ± 3.705^A
Cuerpo	40.32 ± 6.346^B	59.33 ± 12.08^B

\bar{X} : Promedio; D.E.; Desviación estándar.

*: Los promedios en columna con letras diferentes difieren significativamente ($P < 0.05$)

En los animales domésticos, la migración del huevo ó embrión es un evento común durante el período de migración embrionaria. Este fenómeno parece ser modulado por contracciones peristálticas del miometrio, siendo los estrógenos, histamina, prostaglandinas y otros productos del embrión en desarrollo los que podrían estar involucrados en la actividad del miometrio (Tominaga, 1996; Kliem *et al.*, 1998; Stojanov y O'Neill, 1999; Tamada *et al.*, 1999). En ratones, Yang *et al.*, (1997) y Lim *et al.*, (1999), encontraron que la prostaglandina E_2 y $F_2\alpha$ juegan un rol importante para la implantación embrionaria y decidualización en el útero de estos roedores. Estas investigaciones demostraron que los genes receptores para Prostaglandina E_2 y $F_2\alpha$ se expresan temporalmente y en forma específica durante la periimplantación en el útero de ratones. La expresión de estos genes se observó inicialmente en el músculo circular del miometrio los días 3 a 5 de preñez, sugiriendo que esta zona es el blanco primario y punto de partida de las contracciones uterinas requeridas para el transporte, espaciamiento y/o acomodamiento embrionario en el útero, eventos precedidos por diferenciación epitelial celular, proliferación de células del estroma, edema uterino e incremento de la permeabilidad vascular endometrial localizada (Yang *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 1999). El efecto contráctil sobre el miometrio de la Prostaglandina $F_2\alpha$ en las alpacas adultas no gestantes ha-

llado en el presente estudio nos ayuda a entender el comportamiento fisiológico que podría tener esta hormona en el útero de las alpacas y que podría estar influyendo en la implantación embrionaria.

Conclusiones

La musculatura lisa del cuerpo y cuernos uterinos de la alpaca adulta no gestante es sensible a la Prostaglandina $F_2\alpha$ y dosis acumulativas de esta hormona produjeron contracción muscular en el miometrio, cuyo máximo nivel de contracción muscular no fue mayor a la máxima respuesta contráctil lograda por despolarización de la membrana por 50 mM de CIK, y. Los segmentos craneal y caudal de los cuernos uterinos derecho e izquierdo se contrajeron en mayor porcentaje ($P < 0.05$) que los segmentos del cuerpo uterino, indicativo de la presencia de actividad en estos segmentos en alpacas no gestantes.

Literatura Citada

1. Alvarez, R.C.; P.M. Hernandez y G.L.A. Baiza. 1999. Cytokines and growth factors as autocrine and paracrine modulators in the peri-implantation period. Ginecol Obstet Mex. 67: 85-93.

2. **Baguma – Nibasheka, M.; R.A. Wentworth; L.R. Green; S.L. Jenkins y P.W. Nathanielsz. 1998.** Differences in the *in vitro* sensitivity of ovine myometrium and mesometrium to oxytocin and prostaglandins E2 and F2 alpha. *Biol Repro.* 58(1): 73-78.
3. **Coleman H.A. y H.C. Parkington. 1988.** Induction of prolonged excitability in myometrium of pregnant guinea-pigs by prostaglandin F2 alpha. *J Physiol (Lond)* 399: 33-47.
4. **Fang X.; S. Wong y B.F. Mitchell. 1997.** Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation. *Endocrinology.* 138(7): 2763-2768.
5. **Fernández-Baca, S. 1993.** Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Animal Reproduction Science.* 3: 307-323.
6. **Gordan P.L.; S.L. Jenkins; R.A. Wentworth y P.W. Nathanielsz. 1997.** Effect of *in vivo* estradiol administration to bilaterally ovariectomized rats on *in vitro* myometrial responsiveness to prostaglandin F2 alpha and oxytocin. *Biol Repro.* 57(3): 597-601.
7. **Hirata, Y.; A. Kanada; H. Miyai; Y. Mabuchi y K. Aisaka. 1999.** Effects of the new potassium channel opener JTV-506 on coronary vessels *in vitro* and *in vivo*. *Arzneimittelforschung.* 49(3): 199-206.
8. **Kliem, A.; F. Tetens; T. Klonisch; M. Grealy y B. Fischer. 1998.** Epidermal growth factor receptor and ligands in elongating bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 51(4): 402-412.
9. **Lim, H.; R.A. Gupta; W.G. Ma; B.C. Paria; D.E. Moller; J.D. Morrow; R.N. DuBois; J.M. Trzaskos y S.K. Dey. 1999.** Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR delta. *Genes Dev.* 13(12): 1561-1574.
10. **Naderali, E.K.; N. Buttell; M.J. Taggart; A.J. Bullock; D.A. Eisner y S. Wray. 1997.** The role of sarcolemmal Ca (2+) – ATPase in the pH transients associated with contraction in rat smooth muscle. *J Physiol (Lond)* 1; 505(Pt 2): 329-336.
11. **Navarro, G.P. 1998.** Efecto de la Prostaglandina F2a sobre la musculatura uterina del cobayo (*Cavia porcellus*) prepuber. Tesis Medico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 35 p.
12. **Odore, R.; G. Re; P. Badino; A. Donn; D. Vigo; B. Biolatti y C. Girardi. 1999.** Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F2 alpha and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. *Pharmacol Res.* Vol 39 (4): 297-304.
13. **Parkington, H.C.; M.A. Tonta; N.K. Davies; S.P. Brennecke y H.A. Coleman. 1999.** Hyperpolarization and slowing of the rate of contraction in human uterus in pregnancy by prostaglandins E2 and F2 alpha: involvement of the Na pump. *J Physiol (Lond)* 515(Pt 1): 229-243.
14. **Perusquia, M. y C. Kubli-Garfias. 1992.** External calcium dependence of the uterine contraction induced by prostaglandins E2 and F2 alpha and its antagonism with natural progestins. *Prostaglandins.* 43(5): 445-455.
15. **Phillippe, M.; T. Saunders y A. Basa. 1997.** Intracellular mechanisms underlying prostaglandin F2 alpha-stimulated phasic myometrial contractions. *Am J Physiol.* 273(4 Pt 1): E665-E673.
16. **Smith, G.C.; M. Baguma-Nibasheka; W.X. Wu y P.W. Nathanielsz. 1998.** Regional variations in contractile responses to prostaglandins and prostanoid receptor messenger ribonucleic acid in pregnant baboon uterus. *Am J Obstet Gynecol.* 179(6 Pt 1): 1545-1552.
17. **Stojanov, T. y C. O'Neill. 1999.** Ontogeny of expression of a receptor for platelet – activating factor in mouse pre-implantation embryos and the effects of fertilization and culture *in vitro* on its

- expression. *Biol Reprod.* 60(3): 674-682.
18. **Tamada, H.; C. Higashiyama; Takano; N. Kawate; T. Inaba y T. Sawada. 1999.** The effects of heparin binding epidermal growth factor like growth factor on preimplantation embryo development and implantation in the rat. *Life Sci.* 64(22): 1967-1973.
19. **Tominaga, T. 1996.** Studies on the mechanism of embryo implantation. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 48(8): 591-603.
20. **Yang, Z.M.; S.K. Das; J. Wang; Y. Sugimoto; A. Ichikawa y S.K. Dey. 1997.** Potential sites of prostaglandin actions in the periimplantation mouse uterus: differential expression and regulation of prostaglandin receptor genes. *Biol Reprod.* 56(2): 368-379.
21. **Yousufzai, S.Y.; Z. Ye y A.A. Abdel-Latif. 1996.** Prostaglandin F2 alpha and its analogs induce release of endogenous prostaglandins in iris and ciliary muscles isolated from cat and other mammalian species. *Exp Eye Res.* 63(3): 305-310.