

Inmunolocalización del Receptor de Alta Afinidad del Factor de Crecimiento Nervioso en el Oviducto y Útero de la Coneja

Immunolocalization of the Nerve Growth Factor High Affinity Receptor in Rabbits Oviduct and Uterus

María Jesús Cavero Méndez

Tutores:

Rosa M^a García-García y María Arias-Álvarez

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

El factor de crecimiento nervioso (NGF) se conoce principalmente por sus funciones en el sistema nervioso, participando en procesos como el mantenimiento y la supervivencia de poblaciones neuronales. Actualmente se conocen otras funciones en las que este factor juega un papel importante. Entre ellas las que se llevan a cabo en el aparato reproductor, donde NGF y sus receptores participan en la capacitación espermática, el transporte del oocito y la fecundación. El conejo es un buen modelo experimental para estudios reproductivos, por lo tanto el objetivo de este estudio fue inmunolocalizar el receptor de alta afinidad del NGF (tirosin kinasa A, TRKa), en el oviducto y útero de la coneja en la fase folicular y luteal del ciclo, para determinar las posibles implicaciones del NGF. Los resultados mostraron que la distribución del receptor en el oviducto fue principalmente en el epitelio mucoso y en la capa muscular interna mientras que en el útero se inmunolocalizó sobre todo en el epitelio y glándulas endometriales, mostrando mayor señal en la fase luteal. En conclusión, la presencia del receptor en estas localizaciones implica la posible función del NGF en la regulación del ambiente oviductal y uterino en la coneja.

Palabras clave: NGF, neurotrofina, conejo, reproducción, oviducto, útero.

Abstract

The Nerve Growth Factor (NGF) is known for its functions in the nervous system where it takes part in the maintenance and survival of neuronal cells. However, currently it has been shown that there are many other functions in which NGF plays a vital role. Many of these take place in the reproductive system, where NGF and its receptors participate in process such as sperm capacitation, oocyte transport and fertilization. The rabbit is a good model for reproductive studies. The aim of this study was to immunolocalize the high affinity receptor of the NGF (tyrosin kinase a, TRKa) in the oviduct and uterus of the rabbit, in the follicular and luteal phases with the purpose of study the possible effect of the NGF through its receptor. The results shown that the distribution of the receptor in the oviduct was more remarkable in the mucous epithelium and the internal muscular layer, whereas in the uterus, the receptor was found in the epithelium and endometrial glands. In both uterus and oviduct, signal was higher in the luteal phase. In conclusion, the presence of the receptor in these tissues implicates the putative function of NGF in the regulation of oviductal and uterine environment.

Keywords: NGF, neurotrophin, rabbit, reproduction, oviduct, uterus.

Introducción

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una neurotrofina que fue descrita en el cerebro y cuyas funciones engloban la supervivencia, mantenimiento y desarrollo de células neuronales en el sistema nervioso central y periférico. En los últimos años se ha demostrado que aparece también en otras localizaciones como el tracto reproductivo de llamas y alpacas (Adams, Ratto, Huanca y Singh, 2005), cabras (Ren et al., 2005) o conejos (Maranesi et al., 2016). Está implicado en funciones reproductivas como la capacitación espermática, el transporte del oocito en el oviducto y la fecundación (Maruccio et al., 2016). Así mismo, el ambiente hormonal puede influir en su función (Li et al., 2014) por lo que podría tener una regulación distinta en las distintas fases del ciclo reproductivo.

Para desarrollar su función biológica el NGF se une a dos receptores: uno de alta afinidad tirosin kinasa a, TRKa) y otro de menor afinidad, p75. El objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar la presencia del receptor TRKa mediante la técnica de inmunohistoquímica en el oviducto y útero de conejas, en la fase folicular y fase luteal temprana para conocer su posible papel en las funciones que acontecen en el tracto reproductivo de la coneja en esas fases.

Material y métodos

Diseño experimental

Las muestras fueron recogidas de 8 conejas del cruce Nueva Zelanda x California, alojadas en condiciones ambientales controladas (20-25°C, 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad) en la granja experimental del Dpto. de Producción Agraria de la ETSIA de la UPM. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la UPM. Puesto que la coneja es una especie de ovulación inducida, todas las hembras se sincronizaron con 25 UI de gonadotropina coriónica equina (i.m. eCG, Lab. Ovejero, España). Para obtener muestras en la fase folicular, se sacrificaron 5 hembras 48 horas después de la administración de eCG. Para la obtención de muestras en la fase luteal, a los 3 animales restantes se les indujo la ovulación mediante la administración por vía i.m. de 20 µg de gonadorelina (Inducel-GnRH, Lab. Ovejero, España) 7 días antes del sacrificio. Tras el sacrificio de los animales según la legislación vigente (RD 53/2013), se realizó una laparotomía media ventral, se recogieron el útero y el oviducto y se transportaron al laboratorio en medio PBS.

Técnica de inmunohistoquímica

Las muestras fijadas e incluidas en parafina, se deshidrataron en xilol y un gradiente de alcoholes y se sometieron a un tratamiento con calor en una solución de citrato só-

dico (pH 6). La actividad endógena peroxidasa se bloqueó incubando con H₂O₂ al 3% en una solución de metanol durante 30 minutos. Para bloquear las uniones no específicas de inmunoglobulinas se empleó suero de cabra (1:10, Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA) en PBS a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos. Posteriormente, el anticuerpo primario monoclonal de ratón (1:200, Abcam, Cambridge, Reino Unido) se incubó durante toda la noche a RT en un recipiente húmedo. En los controles negativos la incubación del anticuerpo se sustituyó por PBS. Después las muestras y los controles se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado IgG anti-rabbit (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 30 minutos a RT y posteriormente con el complejo avidina-biotina (ABC Vector Elite kit, Vector Laboratories). Después de la incubación con el cromógeno (Vector Nova RED substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories) durante 3 minutos, se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron en medio Depex. Finalmente, se observó al microscopio óptico equipado con una cámara digital (F550; Leica, Wetzlar, Germany) y se realizaron fotografías evaluándose la intensidad de la tinción en las distintas zonas de los tejidos como: débil (+), moderada (++) o intensa (+++).

Resultados

Como muestra la Tabla 1, el receptor se inmunolocalizó en el oviducto de la coneja en ambas fases, apareciendo muy intensamente teñido (+++) el epitelio mucoso del oviducto y con un señal débil (+) la capa muscular externa en ambas fases. Sin embargo, las células de la capa muscular interna, mostraron una tinción moderada (++) en fase folicular y más intensa en fase luteal (+++). En el útero se aprecia señal del receptor en ambas fases. TRKa se inmunolocalizó en el epitelio, en las glándulas del endometrio y en el miometrio, siendo más intensa en la fase luteal en las células epiteliales y glándulas endometriales (Tabla 2). El miometrio presentó una tinción menos intensa respecto al resto de las estructuras estudiadas, mayor en la fase luteal comparada la fase folicular.

Discusión

El receptor TRKA se ha inmunolocalizado en el útero y oviducto de la coneja en las dos fases del ciclo reproductivo, apareciendo distribuido de forma notable en el epitelio mucoso y capa muscular interna del oviducto y en el epitelio y glándulas endometriales en el útero, con mayor intensidad durante la fase luteal. Estos resultados concuerdan con los de Ren et al. (2005), que demostraron la existencia de NGF y sus receptores en el útero, oviducto y ovario de cabras, al igual que Maranesi et al. (2016) en el útero de conejo y Maruccio et al. (2016) en el oviducto de codorniz. Sin embar-

Tabla 1

Intensidad de tinción y distribución de TRKa en el oviducto y útero de coneja.

OVIDUCTO	Fase Folicular	Fase Luteal
Epitelio mucoso	+++	+++
Capa muscular interna	++	+++
Capa muscular externa	+	+
ÚTERO		
Células epiteliales	++	+++
Glándulas Endometriales	++	+++
Miometrio	+	++

go, sólo hay un estudio que muestra la variación del receptor en el oviducto de vacas durante el ciclo (Li et al, 2014).

La distribución del receptor en nuestro trabajo sugiere que NGF juega un papel importante en los procesos reproductivos de la coneja durante todas las fases. Así, la existencia en el epitelio mucoso del oviducto sugiere la participación en la regulación de los procesos de fecundación, transporte y capacitación espermática. En las glándulas uterinas apunta a la participación de NGF en la secreción del útero.

Referencias

- Adams, G. P., Ratto, M. H., Huanca, W., & Singh, J. (2005). Ovulation inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction*, 73(3), 452-457. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040097>
- Li, C., Ma, Y., Yi, K., Wang, C., Li, W., Liu, Z., ... Zhou, X. (2014) The interactions between nerve growth factor and gonadotrophins in bovine oviduct. *Animal Reproduction Science*, 149(3-4), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.030>
- Maranesi, M., Parillo, F., Leonardi, L., Rebollar, P. G., Alonso, B., Petrucci, L., ... Zerani, M. (2016). Expression of nerve growth factor and its receptors in the uterus of rabbits: Functional involvement in prostaglandin synthesis. *Domestic Animal Endocrinology*, 56, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.02.001>
- Maruccio, L., Castaldo, L., D'Angelo, L., Gatta, C., Lucini, C., Cotea, C., ... Nechita, E. L. (2016). Neurotrophins and specific receptors in the oviduct tracts of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Annals of Anatomy*, 207, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.04.033>
- Ren, L., Medan, M. S., Weng, Q., Jin, W., Li, C., Watanabe, G., & Taya, K. (2005). Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrKA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats. *Journal of Reproduction and Development*, 51(3), 399-404.