



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **CAMBIOS CELULARES Y MOLECULARES EN EL OVIDUCTO DE LA CONEJA DURANTE LA GESTACIÓN TEMPRANA: MITOSIS, APOPTOSIS Y RECEPTORES A HORMONAS ESTEROIDES**

## **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A**

**M. EN C. SANTIAGO RENÉ ANZALDÚA ARCE**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES**

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2005.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dedico la presente tesis a:**

**A mi esposa: Claudia Rocío Torres Díaz,**

**a mis hijos: Nydia Carolina**

**Alan Andrés y**

**Arturo Y.**

**A mi padre Enrique Anzaldúa Rodríguez, con amor.**

**A la memoria de mi madre: Nidia Mireya Arce Aguilar.**

**De manera muy especial a mi asesor, el Doctor Marco Antonio Cerbón Cervantes, por su paciencia, sabiduría y generosidad inagotables.**

**A los miembros del jurado:**

**Dra. Ma. Del Carmen Uribe Aranzábal**

**Dr. Luis Felipe Jiménez García**

**Dr. Horacio Merchant Larios**

**Dr. Roberto Domínguez Casalá**

**Dra. Ma. Elena Calderón Segura**

**De forma particular al Dr. Ignacio Camacho Arroyo por sus consejos y amistad.**

**ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA Y EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES Y CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS : Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica: IN 212101 y PAPIIT IN 05 DE LA Dirección General de Asuntos del Personal Académico- U.N.A.M.**

# INDICE

I. RESUMEN.....	5
II. ABSTRACT.....	7
III. INTRODUCCIÓN.....	9
IV. ARTÍCULOS.....	16
a) Histomorphological Changes in the Oviduct Epithelium of the Rabbit During Early Pregnancy.....	16
b) Regional differences in expression of progesterone receptor in the oviduct and the uterus of the rabbit during early pregnancy.....	17
ANTECEDENTES.....	41
Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos Durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.....	41
V. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	42
VI. OBJETIVOS GENERALES.....	42
OBJETIVOS PARTICULARES.....	42
VII. METODOLOGÍA.....	44
a) Animales.....	44
b) Recolección de tejidos.....	44
c) Estudios Histológicos.....	44
d) Obtención del RNA total.....	44
e) Estudio inmunohistoquímico.....	45
f) Determinación del índice de apoptosis y mitosis.....	45
g) Análisis de los datos.....	46

<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
a) <b>Altura y cuantificación de células PAS+ y PAS-.....</b>	<b>47</b>
b) <b>Expresión de receptores a hormonas esteroides     en el oviducto.....</b>	<b>47</b>
c) <b>Inmunohistoquímica de los receptores a progesterona.....</b>	<b>47</b>
<b>IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>48</b>
a) <b>Principales cambios histomorfológicos en las     diversas regiones anatómicas del oviducto de conejas     gestantes y su posible papel funcional.....</b>	<b>48</b>
b) <b>Principales cambios en la expresión de los receptores     a progesterona en el ámpula e istmo del oviducto de     conejas durante los primero cuatro días de     la gestación.....</b>	<b>52</b>
<b>X. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>XI. REFERENCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>XII. ANEXO .....</b>	<b>72</b>
<b>Lámina 1</b>	
<b>Lámina 2</b>	
<b>Lámina 3</b>	

## I. RESUMEN

El oviducto de la coneja (*Oryctolagus cuniculus*) es un órgano en el que durante la gestación temprana (días 1–4 de la gestación) ocurren importantes modificaciones estructurales y funcionales que son relevantes para las funciones reproductoras que se realizan en él: fecundación, transporte de gametos, capacitación espermática, desarrollo embrionario inicial, entre otros. En este estudio analizamos los cambios histomorfológicos (altura del epitelio, número de células PAS positivas y PAS negativas) en las diferentes regiones del oviducto (fimbria, infundíbulo, ámpula e istmo). También estudiamos la expresión de los receptores a progesterona (RP) por RT-PCR e inmunohistoquímica (puntaje histológico: HSCORE) en dos porciones del oviducto: ámpula e istmo, durante los primeros 4 días de gestación.

El número de las células secretoras (células PAS-positivas) disminuyó en la fimbria durante los primeros cuatro días, mientras el número de las células no secretoras (células PAS-negativas) se incrementó en este mismo periodo. En contraste, hubo un aumento en el número de células PAS-positivas en el istmo durante la gestación temprana. En el infundíbulo y ámpula el número de células PAS-positivas aumentó en el día 3. Se observó una disminución significativa de la altura del epitelio en la fimbria, mientras en el istmo la altura aumentó de manera significativa durante los primeros tres días de la gestación. En el infundíbulo se observó una ligera disminución de la altura del epitelio en el día 4, mientras en el ámpula se incrementó notablemente en los días 1 y 3.

Los resultados histomorfológicos indican que durante la gestación temprana existen modificaciones selectivas en las diversas regiones del oviducto de la coneja.

En el ámpula no existieron cambios significativos en la expresión relativa del RNAm del RP, mientras que la expresión de la proteína en el epitelio y células de estroma mostró una disminución significativa del HSCORE en los 3 primeros días, seguido de un incremento significativo el día 4.

En el caso del istmo, la expresión relativa del RNAm de RP fue significativamente mayor en el día 2 de la gestación, y menor en los días 3 y 4, mientras que el HSCORE del RP del epitelio y estroma disminuyó significativamente en los 4 primeros días de la gestación en comparación con los animales no gestantes (NG). Sin embargo en el día 3 se observó un incremento del HSCORE del epitelio en relación con los días 1, 2 y 4.

Todos estos resultados nos llevan a sugerir que existen modificaciones selectivas en las características histológicas de las diversas regiones anatómicas del oviducto, y que los RP presentan una regulación diferencial en el ámpula e istmo durante los 4 primeros días de la gestación de la coneja, lo que podría estar relacionado con diferentes funciones de estos receptores en las distintas porciones del oviducto.



## II. ABSTRACT

Oviduct of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is an organ in which during the early pregnancy (days 1 –4 of the pregnancy) important structural and functional modifications happen in it that are relevant for the reproductive functions: fertilization, gamete transport, spermiatic capacitation, initial embryonic development, among others. In this study we determined the histomorphological changes in different regions of the oviduct (fimbriae, infundibulum, ampullae and isthmus) during early pregnancy (days 1-4) of the rabbit. We also studied the expression of progesterone receptors (PR) by RT-PCR and immunohistochemistry (histological score: HSCORE) in two portions of oviduct: ampullae and isthmus, during the first 4 days of pregnancy. It was observed that the number of secretory cells (PAS-positive cells) diminished in the fimbriae during the first four days of pregnancy with the corresponding increase in the number of nonsecretory cells (PAS-negative cells). In contrast, there was an increase in the number of PAS-positive cells in the isthmus during early pregnancy. In the infundibulum and the ampullae the number of PAS-positive cells was increased on day 3. A significant decrease in the height of the epithelium was observed in the fimbriae during early pregnancy. On the contrary, a significant increase in this parameter was observed in the isthmus during the first 3 days of pregnancy. A slight decrease in the height of the epithelium was observed in the infundibulum on day 4 of pregnancy, while in the ampullae it was significantly increased on days 1 and 3.

In the ampullae did not exist significant changes in the relative expression of PR mRNA, whereas the expression of the protein in epithelium and the stroma cells showed a significant decrease of the histological score (HSCORE) in the 3 first days of pregnancy, followed by a significant increased on day 4.

In the case of the isthmus the relative expression of PR mRNA was significantly increased on days 2 of pregnancy and diminished on day 3 and 4, whereas the HSCORE of PR in epithelium and stroma decreased significantly during the 4 first days of pregnancy in comparison with non pregnant animals (NP), nevertheless on day 3 it was observed an increase in the HSCORE of epithelium in relation to days 1, 2 and 4.

The overall results indicate that during early pregnancy there is a selective modification in the histological characteristics of the different regions of the rabbit oviduct, and that PR showed a different regulation in ampullae and isthmus during the first 4 days of

pregnancy. These differences may be related with different functions of steroid receptors in the oviduct.

### III: INTRODUCCIÓN

Los oviductos (trompas de Falopio, trompas uterinas, tubas uterinas) son órganos pares del tracto reproductor femenino, fundamentales para la supervivencia de las especies pues en ellos se realizan: el transporte de los gametos, la capacitación espermática, reacción acrosomal, fecundación, el inicio del desarrollo embrionario y transporte del huevo hacia el útero. (Hafez, 1980; Hafez, 1972).

El oviducto consta de cuatro regiones anatómicas: a) la fimbria, es la porción adyacente al ovario, tiene forma de embudo y prolongaciones en forma de flecos que le ayudan a captar el óvulo, b) el infundíbulo que corresponde al tercio distal del órgano, es la continuación tubular de la fimbria, donde se realiza el transporte de los gametos, desde el punto de vista histológico es indistinguible del tercio medio, el ampulla, c) el ampulla se extiende desde la unión con el infundíbulo hasta la unión istmo-ampular, es una porción donde los óvulos se transportan rápidamente y se produce una importante cantidad de fluido. En diversas especies, entre ellas el conejo, la fecundación ocurre en la unión istmo-ampular, y finalmente, d) el istmo, que forma el tercio proximal, adyacente al útero y se relaciona con él mediante la unión útero-tubárica, en la que existe una porción intramural denominada región intersticial. Esta región se caracteriza por presentar una mucosa menos plegada que las porciones anteriores y tener una capa muscular muy gruesa (Harper, 1994).

Desde el punto de vista histológico los oviductos están conformados por una mucosa con epitelio de revestimiento cilíndrico simple, el cual presenta fundamentalmente dos tipos de células: ciliadas (sin actividad secretora o glandular) y células secretoras no ciliadas. Debajo del epitelio existe una membrana basal y tejido conjuntivo laxo areolar que constituye la lámina propia. En conjunto la lámina epitelial y la lámina propia recibe el nombre de endosalpinx. Adyacente a la lámina propia se encuentran dos capas de músculo liso, la primera es circular y la segunda es longitudinal, las que reciben el nombre de miosalpinx. Finalmente, el miosalpinx está recubierto por una serosa proveniente de un repliegue del peritoneo que forma parte del ligamento ancho del útero y que para el caso del oviducto se llama mesosalpinx (Fawcett, 1988; Banks, 1991).

La coneja (*Oryctolagus cuniculus*) es un mamífero politoco, de ciclo reproductor corto que, a diferencia de la mayoría de los mamíferos placentados subprimates, no presenta ciclo estral, aunque parece existir una cierta periodicidad sexual, ya que la ovulación ocurre

en forma habitual únicamente como consecuencia de la estimulación coital que desencadena un proceso neuroendocrino complejo que termina con la ovulación de 10 a 12 horas posteriores al coito (García- Ximénez, 1991; Ramírez y Soufi, 1994).

Debido a que la coneja es un animal de ovulación inducida o refleja (Ramírez y Soufi, 1994), constituye un modelo animal muy útil para el estudio de los cambios morfológicos del tracto reproductor femenino inducidos por estrógenos ( $E_2$ ) y progesterona ( $P_4$ ) (Spilman y Wilks, 1976). En esta especie, antes de la ovulación la influencia es predominantemente estrogénica, una vez que esta ocurre, hay un incremento progresivo en la concentración plasmática de  $P_4$  a partir del día 3 post coito (pc), hasta alcanzar una máxima concentración el día 15 pc (Challis et al., 1973; Browning et al., 1980)

El óvulo es capturado por la fimbria y para su transporte en esta región las células ciliadas juegan un papel muy importante. En la coneja la fimbria pierde su capacidad de transporte cuando el porcentaje de células ciliadas en el epitelio es menor al 44%, mientras que el transporte es normal cuando el porcentaje de células ciliadas es del 61% o más (Odor y Blandau, 1973).

Una vez que el óvulo entra en la luz del infundíbulo, la contracción muscular provee la principal fuerza para su transporte a través de las demás regiones del oviducto, lo cual ocurre en la mayor parte de los mamíferos exceptuando a los primates y las gatas en donde la actividad de la musculatura lisa es muy pequeña, por lo que en estas especies, la actividad ciliar es el factor determinante en el transporte (Blandau, 1973; Brenner y West, 1975).

En las conejas, los  $E_2$  incrementan la contracción de la musculatura lisa del oviducto e igualmente aceleran la velocidad del transporte del huevo, pues inducen un aumento en el número de células ciliadas (Odor, 1969), mientras que la  $P_4$  tiene un efecto antagónico (Hafez , 1980).

El transporte del óvulo en el infundíbulo y ámpula de *O. cuniculus*, se lleva a cabo de 4 a 15 minutos (Harper, 1961; Harper, 1965; Ishijima, 1967; Boling y Blandau, 1971), de tal forma que pocos minutos después de la ovulación existe una gran cantidad de óvulos en la unión istmo-ampular (Harper, 1966; Boling y Bandau, 1971), en donde además ocurre la fecundación, posteriormente, los huevos son retenidos en esta porción durante aproximadamente 24 h (Harper y col. 1960; Greenwald, 1961); el huevo es transportado a través del istmo durante 24 h más (Harper, 1994) y finalmente pasa al útero entre las 66 y las

78 h pc en forma de mórula (Tsutsumi y Hafez, 1974; Hodgson y Pauerstein, 1976). Se ha postulado que la velocidad de transporte en el istmo es mucho menor debido a que es mayor la inervación adrenérgica de la capa circular del miosalpinx (Hafez, 1980), debido a que en el istmo predominan los receptores adrenérgicos  $\beta$  (Brundin, 1965), se sugiere que la estimulación adrenérgica ocasione relajación de la musculatura, lo cual hace que el huevo en esta porción avance lentamente y que se mantenga en contacto con las secreciones del istmo, por lo que la actividad secretora puede ser importante para el huevo.

En diversas especies se ha mostrado, el papel de las hormonas esteroides ováricas en la regulación del crecimiento, la proliferación, diferenciación y actividad secretora del epitelio de los oviductos durante el ciclo estral de primates y roedores (Brenner and West, 1975). Los cambios morfológicos de este epitelio han sido investigados durante el período postnatal del criceto dorado (Abe y Oikawa, 1993) y en particular durante el ciclo estral de primates (Odor y Blandau 1973; Brenner y Slayden, 1994; Odor et al., 1980;). Las células secretoras presentan gránulos que se tiñen específicamente por la técnica del ácido peryódico- reactivo de Schiff (PAS) por lo que suelen denominarse como células PAS positivas (PAS+), mientras que las células ciliadas (no secretoras) son células PAS negativas (PAS-) (Greenwald, 1958; Lambert et al. 1973). En bovinos y ovinos se ha mostrado la proporción de células secretoras y no secretoras depende de la acción las hormonas esteroides (Eriksen et al., 1994; Murray, 1997), por lo que la proporción de células PAS+ y PAS- permiten inferir diversas influencias hormonales (Hanscom y Oliphant, 1976; Oliphant y Ross, 1982; Erickson-Lawrence y col., 1989). Las células secretoras generalmente no presentan cilios y predominan en las etapas luteínicas, mientras que las células ciliadas son mayoritarias en las etapas foliculares o estrogénicas. El incremento en el número de células ciliadas del endosalpinx se conoce con el nombre de ciliogénesis (Patek, 1974; Brenner y West, 1975; Fawcett, 1988). El estudio del predominio de estas dos poblaciones celulares, así como la determinación de las variaciones en la altura del epitelio, permite inferir algunos efectos hormonales sobre este órgano. Por ejemplo, en los primates los estrógenos ocasionan hipertrofia, ciliogénesis y un aumento en la secreción producida por las células epiteliales, mientras que en la fase luteínica o progestacional del ciclo la atrofia celular es evidente. Cambios similares se han observado en animales ovariectomizados (Brenner y Maslar, 1988).

En conejas ovariectomizadas se ha observado que el epitelio del oviducto se atrofia después de 4-6 meses, pero el tratamiento con los estrógenos por 10 días induce la reciliación (Odor y Blandau, 1973; Rumery y Eddy, 1974; Brenner y West, 1975;).

La mayoría de las funciones del E<sub>2</sub> y de la P<sub>4</sub> se ejercen a través de su interacción con los receptores nucleares específicos. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares; estas moléculas actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. En el útero de primates han sido ampliamente documentados, los procesos de regulación y función de los receptores a estrógenos (RE) y receptores a progesterona (RP). En la coneja, los RE presentan regulación a la baja cuando son tratadas con E<sub>2</sub>, mientras que para los RP se presenta regulación a la alta. La P<sub>4</sub> ocasiona regulación a la baja de los RP.

En la perra, gata (West et al. 1976; Lessey y Gorell, 1979, Verhage et al. 1979 a, Verhage et al. 1984) y coneja (Muechler et al., 1976; El Banna y Sacher 1977; Puri y Roy, 1980a; Puri y Roy 1980b) se han realizado estudios bioquímicos de afinidad para E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> que tratan de mostrar la presencia de los receptores a estas hormonas. En esos estudios se realizó la homogenización de todo el tejido, por lo que se desconoce la localización histológica y los tipos celulares que expresan dichos receptores.

Se han descrito regulación a la baja de los RP en el endometrio de la cabra (Spencer y Bazer, 1995) y el oviducto de perra (Vermeirsch-Hilde, et al. 2002) y rata (Fuentealba et al. 1988) durante la gestación temprana.

La regulación de los receptores a hormonas esteroides esta bajo control hormonal órgano-específico (Brenner et al.,1979), por lo que en el útero y oviducto a pesar de estar adyacentes anatómicamente, pueden tener diferentes mecanismos reguladores para la expresión de los genes de los RE y RP (Iwai y col., 1991).

En estudios realizados en las trompas de Falopio de humanos, muestran que existe gran cantidad de estos receptores en la región del ampulla (tanto en el epitelio como en el tejido conjuntivo o lámina propia), en comparación con el infundíbulo y el istmo. En estas últimas porciones los receptores se localizan principalmente en el músculo (Pollow y col., 1981; Punnonen y Lukola, 1981).

Perrot-Applanat et al. (1985) estudiaron la distribución de los RP únicamente en el istmo de conejas inmaduras tratadas con E<sub>2</sub>, mientras que Hyde et al. (1989) estudiaron la

presencia de células inmunopositivas al RP en el ámpula e istmo de conejas ovariectomizadas (OVX) tratadas con E<sub>2</sub>, o con el vehículo. En este estudio se muestra la existencia de una regulación diferente de los RP entre el ámpula y el istmo, ya que al administrar 17-β-estradiol en animales OVX se incrementa el número de células inmunopositivas en el conjuntivo y tejido muscular del ámpula e istmo, pero no en el epitelio; en contraste, en ausencia de estradiol (animales OVX sin tratamiento) se observaron células epiteliales inmunopositivas exclusivamente en el istmo (Hyde, Blaustein y Black 1989); por último Karbowski y col. (1992) describen en conejas pseudogestantes la expresión inmunohistoquímica de los RE y RP en el oviducto (ámpula e istmo) y en el útero, refiriéndose principalmente a las variaciones en el miosalpinx y miometrio respectivamente. No existen estudios que describan las modificaciones en la expresión de los RP durante la gestación temprana de la coneja, ni estudios que caractericen la respuesta hormonal de los oviductos después de la ovulación, por lo que el uso de diversos parámetros histológicos y la determinación de los RP pueden ayudar a generar una caracterización de la regulación hormonal de las diversas porciones de este órgano.

El número total de células en el epitelio de revestimiento de órganos del tracto reproductor femenino de diversos mamíferos como primates y felinos, está regulado por procesos de proliferación y muerte celular programada (apoptosis), los cuales a su vez están influidos por P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>; tal como se ha mostrado en el oviducto de monos (Odor, 1978) y gatas (especie de ovulación refleja al igual que la coneja) (Verhage et al. 1984). En ambos casos la P<sub>4</sub> induce procesos de apoptosis, ocasionando además deciliación y atrofia del epitelio luminal; mientras que los E<sub>2</sub> favorecen los procesos de mitosis (Bariether et al. 1981).

En el útero de la coneja la P<sub>4</sub> suprime o previene la apoptosis, ya que en animales OVX, en los que está ausente la P<sub>4</sub>, el índice de apoptosis se incrementa hasta en 124 veces en relación con los animales testigo (Nawaz et al. 1987). En conejas pseudogestantes tratadas con el antiprogéstágeno RU-486 la apoptosis se eleva de manera similar al de las conejas OVX (Rotello et al. 1992); en los experimentos de Nawaz et al. (1987) y Rotello et al. (1992) se mostró que la apoptosis se suprime al aplicar P<sub>4</sub>.

Estos experimentos muestran que la P<sub>4</sub> puede tener efectos antagónicos en el útero y oviducto dependiendo de la especie, ya que en el útero de la coneja previene la apoptosis en conejas y en el oviducto de primates y gatas favorece la apoptosis.

Se desconoce la forma en que la  $P_4$  y  $E_2$  influyen en los cambios morfológicos del oviducto de la coneja durante la gestación temprana.



## **V. ARTÍCULOS**

### **Histomorphological Changes in the Oviduct Epithelium of the Rabbit During Early Pregnancy**

**S. R. Anzaldúa<sup>1</sup>, I. Camacho-Arroyo<sup>2</sup> and M.A. Cerbón<sup>2</sup>**

**Publicado en la revista: Anat. Histol. Embryol. 31:308-312 (2002)**

# Histomorphological Changes in the Oviduct Epithelium of the Rabbit During Early Pregnancy

S. R. Anzaldúa<sup>1</sup>, I. Camacho-Arroyo<sup>2</sup> and M.A. Cerbón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sección de Histología y Biología Celular, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, and <sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

With 5 figures.

Correspondence:

Dr. Marco A. Cerbón  
Facultad de Química,  
Ciudad Universitaria  
Coyoacán 04510, México, D. F.  
MEXICO.  
Tel. 5255 5622 3098  
Fax. 5255 5616 2010

e-mail. mcerbon85@hotmail.com

## Summary

In this study we determined the histomorphological changes in different regions of the oviduct (fimbriae, infundibulum, ampullae and isthmus) during early pregnancy (days 1-4) of the rabbit. It was observed that the number of secretory cells (PAS-positive cells) diminished in the fimbriae during the first four days of pregnancy with the corresponding increase in the number of nonsecretory cells (PAS-negative cells). In contrast, there was an increase in the number of PAS-positive cells in the isthmus during early pregnancy. In both the infundibulum and the ampullae the number of PAS-positive cells was increased on day 3. A significant decrease in the height of the epithelium was observed in the fimbriae during early pregnancy. On the contrary, a significant increase in this parameter was observed in the isthmus during the first three days of pregnancy. A slight decrease in the height of the epithelium was observed in the infundibulum on day 4 of pregnancy, while in the ampullae it was significantly increased on days 1 and 3. The overall results indicate that during early pregnancy there is a selective modification in the histomorphological characteristics of the different regions of the rabbit oviduct.

Key words: rabbit, oviduct, early pregnancy, secretory cells, non secretory cells, epithelium.

## Introduction

The rabbit reproductive tract has been largely studied to determine estrogen and progesterone mechanisms of action due to the fact that rabbits present reflex ovulation when changes in estradiol and progesterone concentration are predictable (Challis et al., 1973; Spilman and Wilks, 1976).

Two epithelial cell types have been recognized in the rabbit oviduct: secretory (PAS-positive cells) and nonsecretory cells (PAS-negative cells) (Harper, 1994). The secretory cells contain acidic glycoproteins confined to intracellular granules specifically stained with peryodic acid (PAS+) (Oliphant and Ross, 1982; Erickson-Lawrence et al., 1989; Hanscom and Oliphant, 1976).

The endocrine regulation of histological changes in the rabbit oviductal epithelium has been described by several groups (Greenwald, 1958; Lambert et al.; 1973). It has been determined that in several species the proportion of secretory and nonsecretory cells depends on steroid hormone action (Donnez et al. 1985; Crow et al.; 1994; Murray, 1997; Eriksen et al., 1994). Six months after ovariectomy the rabbit oviduct epithelium atrophies and has fewer ciliated cells than that of ovulatory controls, but the treatment with estrogens for 10 days induces reciliation (Odor and Blandau, 1973; Brenner and West, 1975).

Estrogen treatment also increases the number of ciliated cells (Rumery and Eddy, 1974). Bondi et al., (1997) described the ultrastructural changes that occurred in the rabbit oviductal epithelium after human chorionic gonadotropin (hCG) administration. It has been documented that secretory and nonsecretory cells of the oviduct are modified after progestins treatment in adult rabbits (Anzaldúa et al., 1998).

During the first days of pregnancy the rabbit oviduct provides the adequate environment for gamete transport and maturation, fertilization, and embryonic development. However, the proportion of secretory and nonsecretory cells that participate in these functions in the different regions of the rabbit oviduct during early pregnancy is unknown. In this study we determined the histomorphological changes in the rabbit oviduct during early pregnancy.

## Materials and Methods

Fifteen adult female New Zealand white rabbits (Harlan, México) (3.5-4.5 kg) were used throughout the study. Animals were housed in individual cages with food and water available ad libitum. A group of animals (n=12) were mated twice on the same day with two experienced bucks. The day of mating was designated as day 0. Animals were sacrificed after deep anesthesia with ketamine (Rhône, Mérieux, Qro. México) on days 1-4 of pregnancy. Non-pregnant animals (n=3) were used as controls. The fimbriae, the infundibulum, the ampullae and the isthmus of the oviduct were immediately dissected and fixed in 15% picric acid and 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (PBS), pH 7.4.

Pregnancy was confirmed by the observation of zygotes and morula under a stereoscopic microscope after washing the oviduct with PBS. The experiments carried out in this study were performed according to the "Mexican Law for Animals Protection".

## Histological Studies

All fixed tissues were dehydrated and embedded in paraffin (Technicon, Paracut). Sections from each tissue were cut at 5 µm in thickness and stained with haematoxylin-eosin. The presence of glycoproteins was demonstrated by periodic acid-Schiff (PAS) reaction. Histological analysis in the oviduct was carried out in fimbriae, infundibulum, ampullae and isthmus. In these four regions, the number of secretory cells (PAS-positive) and nonsecretory cells (PAS-negative) in 30 random fields/each animal was analyzed at 400X magnification with a Zeiss microscope.

Epithelium cell height was determined by using the Hamamatsu Argus-20 Imagine Processor (Hamamatsu, Japan). For this measurement 150 cells per region were selected only if the plane of section clearly passed through the cell nucleus, and the section was parallel to the longitudinal axis of the cell (Verhage et al., 1979). Analysis of variance followed by Tukey's test was used for statistical evaluation. Probability values were calculated by using the Prism 2.01 Program (Graph Pad, CA).

## Results

Secretory cells (PAS-positive), nonsecretory cells (PAS-negative) as well as the epithelial height were analyzed in the different regions of the oviduct during early pregnancy in the rabbit. It was observed that the number of PAS positive cells diminished in the fimbriae during the first four days of pregnancy with the corresponding increase in the number of PAS-negative cells (Figs 1 and 2A). A significant decrease was observed in the height of the epithelium in the fimbriae during early pregnancy (Fig. 2B). In contrast, there was an increase in the number of PAS-positive cells in the isthmus during early pregnancy (Figs. 1 and 3A). An increase was also observed in the height of the epithelium in this oviduct region during the first three days of pregnancy (Fig. 3B).

In both the infundibulum and the ampullae the number of PAS-positive cells was significantly increased on day 3 (Figs. 4A and 5A). A slight decrease in the height of the epithelium was observed in the infundibulum on day 4 of pregnancy, but in the ampullae it was significantly increased on days 1 and 3 (Figs. 4B and 5B).

## Discussion

In this study we demonstrated significant histomorphological changes in the different regions of the rabbit oviduct during early pregnancy. The reduction in the number of PAS-positive cells with the corresponding increase in the number of PAS-negative cells in the fimbriae during the first four days of pregnancy could be associated to the ovum pick up (Land et al., 1987) which is a nonsecretory process that mainly depends on the ciliated nonsecretory cells. Interestingly, most PAS-negative cells observed in the first days of pregnancy in the fimbriae presented cilia (Fig. 1). It has been observed that fimbriae of pregnant rabbits with less than 44% of ciliated cells fails to transport ova, but with 61% or a higher percentage of

ciliated nonsecretory cells the fimbriae can transport eggs to the ampullae at a normal rate (Odor and Blandau, 1973).

We have found that the number of ciliated nonsecretory cells in the fimbriae was significantly increased since the first day of pregnancy. An increase in ciliary activity has also been observed in the oviduct of early pregnant rabbits (Borell et al., 1957). In contrast, cell height decreased during early pregnancy in the fimbriae (Fig. 2B). This result is in line with the decrease in secretory activity during this period in the fimbriae.

The change in the number of secretory cells during early pregnancy was similar in the infundibulum and the ampullae. In both of them a significant increase in these cells was observed on day 3 (Figs. 4A and 5A). It is possible that these regions act as a functional unit, in fact it is difficult to distinguish them by histological features (Ascher et al., 1986). Erickson-Lawrence et al. (1989) have observed a maximum secretion of acid sulfated glycoproteins on day 3 in rabbit ampullae explants *in vitro* after a combined treatment of estradiol and progesterone. This increase in secretory activity may be related to the supply of some factors secreted by oviductal epithelium that participate in the development and growth of embryos during early pregnancy of the rabbit (Harper, 1994).

The number of nonsecretory cells was increased on day 1 in the ampullae (Fig. 5A). This change may be related to early events during the first subsequent hours after mating such as ovulation, that occurs 10-12 hours after coitus, and fecundation that is accomplished in the ampullae on day 1 of pregnancy (Jansen and Bajpai, 1982; Harper, 1994). It has been reported that ovum transportation is mediated by nonsecretory cells. In addition, the secretion in the ampullae is more watery compared to other portions of the oviduct due to the fact that it presents a greater transudation caused by a larger epithelium surface (Jensen, 1984). Thus contributing to the rapid transportation of the ovum through the oviduct during early pregnancy. The ovum usually enters the uterus 60 to 72 hours after mating (Black and Asdell, 1958; Osada et al., 1999).

An increase in the number of secretory cells and in the height of the epithelium was observed during early pregnancy in the isthmus (Fig. 3). This may be related to the fact that the egg is held in the isthmus-ampullae junction by 24

hours after ovulation (Halbert et al., 1988). The fertilized ovum stays for approximately 36 hours in the isthmus (days 2-3 of pregnancy) (Greenwald, 1961; Harper, 1994). It has been reported that the medial transport of the fluid towards the uterus diminishes in the isthmus (Osada et al., 1999). Interestingly, an increase in proteins concentration of oviductal fluids in the rabbit on day 3 of pregnancy has been observed (Tucker and Schultz, 1977).

Although an increase in apoptosis process in the oviduct epithelium of the early pregnant cat, another reflex ovulator, has been shown (Verhage et al., 1984), we observed neither morphologic apoptosis nor mitosis (data not shown) in the pregnant rabbit, suggesting that the variations in the number of secretory cells in the rabbit oviduct during early pregnancy are related to a transformation of PAS-positive cells into PAS-negative cells and vice versa. This has been supported by the presence of "mixed cells" in the oviduct of pregnant and pseudopregnant rabbits (Merchant, 1969; Abe and Oikawa, 1993; Bondi et al., 1997).

The histological changes observed in the oviduct of early pregnant rabbits could be due to the fetomaternal cross-talk since in pseudopregnancy (rabbits treated with 100 iu HCG) we did not observe the changes in the number of secretory cells as in the case of pregnant animals (data not shown).

The overall results indicate that there is a selective modification in the histomorphological characteristics of the different regions of the oviduct related to the pick-up, transport and permanency of the ovum in this tissue during early pregnancy of the rabbit.



## Acknowledgements

This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica of DGAPA (IN212101) UNAM:

We thank Emilio Francisco López López for his technical assistance, M.V.Z. Luis Miguel Berjón Macias for all the facilities to carry out this study. We also thank Flora García-Formentí from CELE, Universidad Nacional Autónoma de México, for the revision of the English manuscript.

## References

Abe, H., and T. Oikawa, 1993: Effects of estradiol and progesterone on the cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the newborn golden hamster. *Anat. Rec.* 235,390-395.

Anzaldúa, S. R., I. Camacho-Arroyo, G. A. García, and M. A. Cerbón, 1998: Differential effects of 5 $\alpha$  norethisterone on the histomorphology of the oviduct and uterus of the pregnant rabbit. *Contraception* 57,349-355.

Ascher, E., P. Madelenat, and D. Rose, 1986: Tubal physiology: structures and functions. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod (Paris)*. 15,717-729.

Black, D. L., and S. A. Asdell, 1958: Transport through the rabbit oviduct. *Am. J. Physiol.* 192,63-68.

Bondi, A. M., M. G. Gabrielli, L. Marchetti, G. Materazzi, and G. Menghi, 1997: Cytomorphological changes in the rabbit oviductal epithelium after human chorionic gonadotropin treatment. *Histol. Histopathol.* 12,135-146.

Borell, U., O. Nilsson, and A. Westman, 1957: Ciliary activity in the rabbit fallopian tube during oestrus and after copulation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 36,22-28.

Brenner, R. M., and N. B. West, 1975: Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. *Ann. Rev. Physiol.* 37,273-302.

Crow, J. N., Amso, J., and R. W. Lewin-Shaw, 1994: Morphology and ultrastructure of Fallopian tube epithelium at different stages of the menstrual cycle and menopause. *Hum. Reprod.* 9, 2224-2233.

Challis, J. R., I. J. Davies, and K. J. Ryan, 1973: The concentrations of progesterone, estrone and estradiol 17- $\beta$  in the plasma of pregnant rabbits. *Endocrinology* 93,971-976.

Donnez, J. F., J. Casanas-Roux, J. Caprasse, J. Ferin, and K. Thomas, 1985: Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human epithelium during reproductive life. *Fertil. Steril.* 43,554-559.

Erickson-Lawrence, M. F., T. T. Turner, T. S. Thomas, and G. Oliphant, 1989: Effect of steroid hormones on sulfated oviductal glycoprotein secretion by oviductal explants *in vitro*. *Biol. Reprod.* 40, 1311-1319.

Eriksen, T. G., P. Terkelsen, Hyttel, and T. Greve, 1994: Ultrastructural features of secretory cells in the bovine oviduct epithelium. *Anat. Embryol. (Berl)* 190, 583-590.

Greenwald, G. S., 1958: Endocrine regulation of the secretion of mucin in the tubal epithelium of the rabbit. *Anat. Rec.* 130,477-495.

Greenwald, G. S., 1961: A study of the transport of ova through the rabbit oviduct. *Fert. Steril.* 12,80-95.

Halbert, S. A., S. E. Szal, and S. H. Broderson, 1988: Anatomical basis of a passive mechanism for ovum retention at the ampulloisthmic junction. *Anat. Rec.* 221,841-845.

Hanscom, D., and G. Oliphant, 1976: Hormonal regulation of incorporation of <sup>35</sup>S into macromolecules of oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 14,599-604.

Harper, M. K., 1994: Gamete and Zygote Transport. in Knobil, E., and J.D. Niel. *The Physiology of Reproduction. Second Edition, New York* p.123-187.

Jansen, R. P. S., and V. K. Bajpai, 1982: Oviduct acid mucus in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biol. Reprod.* 26,155-168.

Jensen, R. P., 1984: Endocrine response in fallopian tube. *Endocr. Rev.* 5,525-551.

Lambert, J. C., C. E. Hamner, and G. L. Gemmili, 1973: Ultrastructural study of secretion in the rabbit oviduct under different hormonal influences. *Fed. Proc.* 32,13.

Land, J. A., J. L. Evers, W. D. Boeckx, and L. A. Brosens, 1987: Ovum transport after microsurgical anastomosis of the rabbit oviduct. *J. Reprod. Med.* 32,103-106.

Merchant, H., 1969: Secretory granules in ciliated cells of the rabbit oviduct. *Exp. Cell. Res.* 56,171-172.

Murray, M. K., 1997: Morphological features of epithelial cells in the sheep isthmus oviduct during early pregnancy. *Anat. Rec.* 47,368-378.

Odor, D. L., and R. J. Blandau, 1973: Egg transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. *Fertil. Steril.* 24,292-300.

Oliphant, G., and P. R. Ross, 1982: Demonstration of production and isolation of three sulfated glycoproteins from the rabbit oviduct. *Biol. Reprod.* 26,537-544.

Osada, H., I. Tsunoda, M. Matsuura, K. Satoh, K. Kanayama, and Y. Nakayama, 1999: Investigation of ovum transport in the oviduct: the dynamics of oviductal fluids in domestic rabbits. *J. Int. Med. Res.* 27,176-180.

Rumery, R. E., and E. M. Eddy, 1974: Scanning electron microscopy of the fimbriae and ampullae of rabbit oviducts. *Anat. Rec.* 178,83-103.

Spilman, C. H., and J.W. Wilks, 1976: Peripheral plasma progesterone during egg transport in the rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151,726-729.

Tucker, E. B., and G. A. Schultz, 1977: Temporal changes in proteins of oviduct and uterine fluids during the preimplantation period in the rabbit. *Biol. Reprod.* 17,749-759.

Verhage, H. G., M. L. Bareither, R. C. Jaffe, and M. Akbar, 1979: Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am. J. Anat.* 156,505-522.

Verhage, H. G., M. K. Murray, R. A. Boomsma R. A., Rehfeldt P. A, and R. C. Jaffe.,1984: The postovulatory cat oviduct and uterus: correlation of morphological features with progesterone receptor levels. *Anat. Rec.* 208,521-531.

## Figure Legends

Fig. 1. Secretory and nonsecretory cells in the rabbit oviduct during early pregnancy. Secretory cells (PAS-positive) (arrows) and nonsecretory cells (PAS-negative) are shown in the fimbriae (A) and the isthmus (B) of a non-pregnant rabbit; and in the fimbriae (C) and the isthmus (D) on day 2 of pregnancy. Scale bar: 20  $\mu$ m.

Fig. 2. Secretory and nonsecretory cells in the fimbriae epithelium during early pregnancy. Epithelial cells of the fimbriae oviduct of early pregnant (days 1-4) and non pregnant (NG) rabbits were characterized by PAS staining (A). Cell height of epithelial cells was also analyzed in the same tissues (B). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0.05 vs all the other groups.

Fig. 3. Secretory and nonsecretory cells in the isthmus epithelium during early pregnancy. Epithelial cells of the isthmus oviduct of early pregnant (days 1-4) and non pregnant (NG) rabbits were characterized by PAS staining (A). Cell height of epithelial cells was also analyzed in the same tissues (B). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0.05 vs all the other groups. \*\* $p$ <0.05 vs days 1, 2, and 3.

Fig. 4. Secretory and nonsecretory cells in the infundibulum epithelium during early pregnancy. Epithelial cells of the infundibulum oviduct of early pregnant (days 1-4) and non pregnant (NG) rabbits were characterized by PAS staining (A). Cell height of epithelial cells was also analyzed in the same tissues (B). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  vs all the other groups. \*\* $p < 0.05$  vs NG and day 1.

Fig. 5. Secretory and nonsecretory cells in the ampullae epithelium during early pregnancy. Epithelial cells of the ampullae oviduct of early pregnant (days 1-4) and non pregnant (NG) rabbits were characterized by PAS staining (A). Cell height of epithelial cells was also analyzed in the same tissues (B). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  vs NG, days 1 and 2. \*\* $p < 0.05$  vs days 2 and 3. \*\*\* $p < 0.05$  vs NG. \*\*\*\* $p < 0.05$  vs NG, days 2 and 4.

**Regional differences in the expression of progesterone receptor in the oviduct and the uterus of the rabbit during early pregnancy**

**Santiago René Anzaldúa<sup>1</sup>, Ignacio Camacho-Arroyo<sup>2</sup>, Andrea Reyna-Neyra<sup>2</sup>, Mario Pérez-Martínez<sup>1</sup> and Marco Cerbón<sup>2</sup>**

**El presente artículo ha sido enviado para su revisión y publicación a:  
“Latin American Comparative Biochemistry and Physiology” (CBP  
LatAm)**

# **Regional differences in the expression of progesterone receptor in the oviduct and the uterus of the rabbit during early pregnancy**

Santiago René Anzaldúa <sup>1</sup>, Ignacio Camacho-Arroyo<sup>2</sup>, Andrea Reyna-Neyra<sup>2</sup>,  
Mario Pérez-Martínez<sup>1</sup> and Marco Cerbón<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Tisular de la Reproducción, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, <sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México. D. F., México*

Running title: progesterone receptors in pregnant rabbit oviduct

Corresponding author:

Dr. Marco Cerbón  
Facultad de Química,  
Ciudad Universitaria  
Coyoacán 04510, México, D. F.

Tel. 5255-5622-3098  
Fax. 5255-5616-2010  
e-mail: mcerbon85@yahoo.com



## **Abstract**

In this study we characterized the expression pattern of progesterone receptor (PR) in two regions of the oviduct (ampullae and isthmus), and the uterus (epithelium and stroma) of the rabbit during early pregnancy (1-4 days) by RT-PCR and immunohistochemistry. We observed a significant increase in the expression of PR at mRNA level in the uterus on days 1 and 2 of pregnancy that was followed by a decrease on days 3 and 4. These changes were also observed at protein level in the uterine epithelium. Interestingly, PR immunoreactivity decreased in stromal cells in all days of pregnancy as compared with non pregnant rabbits (NG). In the isthmus PR mRNA expression significantly increased on day 2 of pregnancy and diminished on days 3 and 4 whereas no significant changes were observed in the ampullae. In epithelial and stromal cells of the isthmus PR immunostaining was reduced through pregnancy as compared with NG group. In contrast, a reduction in PR immunostaining was observed on days 1-3 with an increase on day 4 in epithelial and stromal cells of the ampullae. The overall results suggest that PR exhibit a differential expression pattern in the oviduct and the uterus during the early pregnancy of the rabbit, and that these differences are related with different functions of PR in the reproductive tract during early pregnancy of the rabbit.

*Keywords:* oviduct, uterus, progesterone receptors, rabbit, early pregnancy.

## 1. Introduction

Progesterone ( $P_4$ ) participates in the regulation of the structure and function of the oviduct and uterus. The mammalian oviduct is involved in the transport and stability of sperm, fertilization and early embryo development, while uterus participates in sperm capacitation, implantation and delayed development of the embryo (Harper, 1994).

Most  $P_4$  functions are exerted through its interaction with specific nuclear receptors. These receptors belong to the nuclear receptor superfamily which are ligand dependent transcription factors. In the rabbit uterus, progesterone receptor (PR), is up-regulated by estradiol ( $E_2$ ) and down-regulated by  $P_4$  (Brenner et al., 1990; Camacho-Arroyo et al., 1996). The regulation of PR in the rabbit oviduct has not been completely elucidated.

PR regulation is under tissue-specific hormonal control (Brenner et al., 1979; Iwai et al., 1991). It has been reported that during pregnancy PR diminishes in the uterus of the rat, ewe and bitch (Fuentealba et al. 1988; Spencer and Bazer, 1995; Vermeirsch-Hilde, et al. 2002). In the rabbit reproductive tract PR amount has been studied using biochemical assays particularly, hormonal binding studies (El Banna and Sacher 1977; Puri and Roy, 1981; Muechler et al., 1976) without the description of the histological localization of PR. Our group has reported that in the uterus of rabbits, PR expression, analyzed by Northern and Western blot, is reduced after day 2 of pregnancy (Gutierrez-Sagal et al., 1993).

Perrot-Appianat (1985) studied the distribution of PR in the isthmus of the oviduct in estrogen-primed immature rabbits, and Hyde et al. (1989) studied cellular distribution of PR immunoreactivity in the ampullae and the isthmus of ovariectomized rabbits after  $E_2$  treatment; finally Karbowski et al. (1992) described PR expression in both the ampullae and the isthmus of the oviduct and the uterus of pseudopregnant rabbits. In these animals PR showed marked variations, characterized by an increase of immunopositive cells in myosalpinx of the isthmus and a decrease in myometrium. However, the expression and anatomical

distribution of PR during early pregnancy before implantation (1-4 days) in the oviduct and the uterus of the rabbit have not been described.

It has been reported that there are selective modifications in the histomorphological characteristics of the different regions of the rabbit oviduct during early pregnancy (Anzaldúa et al., 2002). In order to contribute in the understanding of the molecular mechanisms involved in P<sub>4</sub> actions during the pre-implantation period in the oviduct, we investigated the expression pattern of PR in the ampullae and the isthmus of the oviduct, as well as in the uterus of rabbits during the first four days of pregnancy.

## **2. Experimental**

### *2.1. Animals*

Fifteen adult female New Zealand white rabbits (Harlan Mexico) (3.5-4.5 kg) were used throughout the study. Animals were housed in individual cages with food and water available *ad libitum*. A group of animals ( $n= 12$ ) were mated with two experienced bucks. The day of mating was designated as day 0. Non-pregnant animals (NG) ( $n=3$ ) were used as control. Animals were sacrificed by iv pentobarbital injection (90 mg/ kg) after deep anesthesia with ketamine (Rhône, Mérieux, Qro. México) on days 1-4 of pregnancy. The experiments carried out in this study were followed according to the Mexican Law for the Protection of Animals (México), and NOM-062-200-1999 (Aluja, 2002).

### *2.2. Total RNA Extraction and Reverse Transcriptase PCR*

Total RNA was isolated from endometrium and two anatomical region of the oviduct : ampulla and isthmus, with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent (Gibco-BRL, Inc) (Chomczynski and Sacchi, 1987). RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1 % denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA as previously described

(Camacho-Arroyo y col. 1996). Ten microliters of reverse transcriptase (RT) reaction were subjected to PCR in order to simultaneously amplify PR, and the gene for an internal control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. This was used as. The sequences of the specific primers unique for PR amplification segment (from +579 to +819 relative to the start site of transcription) which corresponds to part of the N-terminal PR domain were 5'-[CGGGTCCAGCCAAACCCACACCC]-3' in the sense primer and 5' - [CCTGGAAGGGGCCAGGGTCCGGGC]-3' in the antisense (Camacho- Arroyo y col.1996). The PCR reaction (50µl) included 10µl previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. After an initial denaturation step at 95°C for 5 min , the PCR reaction was performed for 25 cycles. The cycle profile for PR and GAPDH genes amplification was: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72 °C, 1 min. A final extension cycle was performed at 72°C, 5 min. The number of performed cycles, previously determined was within the exponential phase of the amplification process. All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. PCR products (25 µl) were separated on 2 % agarose gel and stained with ethidium bromide. The image was captured under a u.v. transilluminator with a Type 665 negative films (Polaroid Co., Cambridge, MA). The intensity of PR, or GAPDH bands was quantified by densitometry using a Scan jet 3C apparatus (Hewlett Packard). PR expression level was normalized to that of GAPDH. The data were analyzed by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's *t*-test. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values.

### **2.3. Immunohistochemistry**

Serial sections from each organ were cut at 5 µm thickness and mounted on slides coated with poly-L-lysine (Sigma). They were deparaffinized, rehydrated through graded concentrations of alcohol to distilled water, transferred to sodium citrate buffer (pH 6.0), and heated two times for 10 min in a microwave oven

(Mabe, Hot Point) set at 800 W. Slides were cooled between microwave irradiation for 5 min. After this procedure, slides were washed twice with 10 mM PBS, pH 7.4, and incubated successively in: 3% hydrogen peroxide in PBS for 30 min at room temperature, 1% normal goat serum plus 1% hydrogen peroxide in PB for 30 min; 0.05% Triton X-100 in PB for 30 min; mouse monoclonal antibody against the ligand-binding domain of the PR (Mi 60-10; 10 µg IgG/ml, Perrot-Applanat et al., 1985) prepared in PB containing 0.3% Triton X-100 for 48 h at 4 °C in a humid chamber. Immunostaining was visualized by using the Leica DMLS digital camera. Briefly, slides were incubated with the biotinylated secondary antibody for 2 h at room temperature and with conjugated streptavidin-peroxidase for 1 h. Sections were washed twice with PB among incubations, Peroxidase activity was evidenced by using by using 3,3'-diaminobenzidine chromogen solution in the presence of hydrogen peroxidase for 10 min. After washing, sections were dehydrated and coverslipped with a mounting medium (Permount). Some sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. Control sections were incubated with preimmune goat serum (1:2000) in place of the primary antibody.

The number of immunopositive nuclei and staining intensity in the epithelium and stroma were determined using Metamorph Imaging System (Westchester, PA). All the nuclei from the epithelium and stroma were analyzed in each section. Three sections by animal were analyzed. n=3 animals per day. The staining intensity of the cell nuclei was assigned the following scores: 0, absent; 1, weak; 2, moderate and 3, intense. The histologic score (HSCORE) was calculated as follows:  $HSCORE = \sum P_i(i+1)$ , where  $i = 1, 2$  or  $3$ , and  $P_i$  is the percentage of each intensity, from 0 to 100% (Lessey et al., 1988).

#### *2.4. Data analysis:*

A tow-way ANOVA, followed by a test of individual differences between means, was used to determine statistical significance. The Prism 2.01 program (Graph Pad, CA, USA) was used for calculating probability values.

### 3. Results

In all amplifications single bands of 241 (PR), and 454 bp corresponding to the expected size fragments of PR, and GAPDH respectively were obtained. No bands were observed in the negative controls. The identity of each PCR product was confirmed by nucleotide sequencing (data not shown).

The relative expression of PR mRNA in the uterus was higher on the first two days of pregnancy as compared with that of NG animals. PR expression significantly diminished on the third and fourth days of pregnancy (Fig. 1A).

In the ampullae, PR expression did not present significant differences during the first four days of pregnancy as compared with the NG group. Nevertheless a non-significant increase in PR expression was observed on day 3 (Fig. 1B); In the isthmus PR mRNA expression was increased on days 1 and 2 followed by a significant diminution on days 3 and 4 of pregnancy (Fig. 1C).

PR immunostaining was observed in the nucleus of several cell types of the uterus and the oviduct (Fig. 2). Although the number of PR immunopositive cells as well as the intensity of the immunostaining in uterine epithelium was increased during the 4 days of pregnancy as compared with NG rabbits, the highest HSCORE was observed on the first two days of pregnancy with a significant diminution on days 3 and 4 ( (Fig. 2a and 2c; Fig. 3A). On the opposite manner, a progressive diminution in PR HSCORE during the four days of the pregnancy was observed in stromal cells (Fig. 3B).

Both in epithelial and stromal cells of the ampullae PR HSCORE diminished from day 1 to day 3 as compared with NG group, but a significant increase in H score was observed on day 4 of pregnancy (Fig. 3C and D).

In the isthmus, a diminution in PR HSCORE in epithelial and stromal cells was observed during first four days of the pregnancy in comparison with NG group (Fig. 3E and F). However, an increase in HSCORE was noticed on day 3 in epithelial cells (Fig. 3E).

#### 4. Discussion

In this study, we demonstrated a clear variation in PR gene expression in the oviduct and uterus of rabbits during early pregnancy as well as a tissue-specific pattern of PR gene expression in the reproductive tract.

The diminution of PR expression on day 3 of pregnancy in the uterus has been previously informed by our laboratory by Western and Northern blot in the endometrium of the rabbit (Gutiérrez-Sagal et al., 1993). Our results indicate that PR regulation in the uterus occurs both in epithelial and stromal cells during early pregnancy, and suggest that PR expression in the epithelium is mainly regulated at transcriptional level since the PR HSCORE in this tissue reflects the changes observed at mRNA level (Figs. 1 and 3).

The diminution of PR expression in the uterus on days 3 and 4 of pregnancy could be related to the increase in  $P_4$  levels (Camacho-Arroyo et al., 1998). The highest PR mRNA content was observed on day one of pregnancy when plasma  $P_4$  levels are low (Challis et al., 1973; Hilliard and Eaton, 1971). PR mRNA contents diminishes when  $P_4$  levels are increased PR down-regulation in the reproductive and urinary tract of the rabbit has been described in  $P_4$  treated rabbits (Batra and Josif 1989). A diminution in PR immunoreactive cells has observed in the uterine glandular epithelium from day 3 in pseudopregnant rabbits (Iwai et al., 1989). In contrast to our results, these authors reported a constant immunopositive stromal cells in pseudopregnant rabbits, while we observed a diminution since day 1 of pregnancy. El-Banna and Sacher (1977) reported a diminution of  $P_4$  binding in the rabbit uterus from day 4 of pregnancy.

In the rabbit, egg reaches the uterus on day 3 of pregnancy, between 60 and 72 h post coitus (Black and Asdell, 1958; Osada 1999). In this study we found a diminution in PR HSCORE in stromal cells on this day, this suggest that PR participates in stromal changes preceding egg implantation.

In the rat, unlike the rabbit, an increase in PR expression has been observed in the uterus after mating and until ovulation (Zhang-Yuan et al., 1997), whereas in the goat uterus exists a correlation between PR expression and cell

proliferation during the peri-implantation period (Flores J et al., 2001), which implies that the regulation of PR expression is not only tissue-specific but also species-specific.

During the first days of pregnancy the concentration of PR in the different portions of the oviduct is influenced by the transport of the egg. Muechler and coworkers (1976) determined that in the rabbit uterus PR concentration declines steadily from 3 h to 144 h after mating; however, the decline in oviductal receptor was significant until the sixth day of pregnancy. Interestingly, in ovariectomized rabbits treated with E<sub>2</sub> the nuclear concentration of PR varies in the different regions of the oviduct (Hyde et al., 1989). This observation agree with our results of a tissue-specific variations of PR expression in the oviduct.

In the present study, an increase in PR mRNA relative expression in the ampullae was observed on day 3 (Fig. 1B). This increase was reflected in a significant increase at protein level detected by immunohistochemistry on day 4, 24 hours after of the maximal PR mRNA level (Fig. 1; Fig. 3C and D ), thus indicating that the main control of PR expression is at transcriptional level, in a similar manner as we observed in the uterus.

We observed PR immunopositive cells in secretory and ciliated cells in the ampullae and isthmus of the rabbit oviduct. These data agree with previous results by Karbowski et al. (1992) which showed the presence of PR in the secretory and ciliated cells of endosalpinx (in ampullae and isthmus), and in the smooth muscle cells of pseudopregnant rabbits.

It has been reported that in contrast to PR regulation by estrogens in uterine luminal epithelial cells, in the ampullae estrogen regulation of PR was not observed. The absence of estrogen PR regulation in the ampullae is surprising since E<sub>2</sub> is required for the induction of PR synthesis in female reproductive tract (Milgrom et al., 1973, Camacho-Arroyo et al., 1996; Yacoub et al., 2000).

In the isthmus PR mRNA expression was significantly lower on days 3 and 4 in relation to day 2 of pregnancy (Fig. 1C), whereas PR protein (HSCORE) in epithelium and stromal cells in the isthmus showed a significant diminution during all early pregnancy with an increase on day 3 as compared with days 1 and 2.



These suggest that PR expression in the isthmus is regulated both at mRNA and at protein levels.

Previous report of our laboratory indicates that morphological changes induced by steroid hormones occurred in the oviduct during early pregnancy, such as: height, proportion of PAS + and PAS – cells in the different regions of the rabbit oviduct (Anzaldúa et al., 2002) that could be related to the changes observed in PR expression in the different cell types of the oviduct.

In conclusion, the expression of PR in the ampullae, isthmus and uterus exhibits a differential pattern during early pregnancy, before eggs implantation, in the rabbit, suggesting that there exist different regulatory mechanisms of steroid receptors expression in the different regions of the reproductive tract.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Francisco López López for his technical assistance, and M.Sc. America Vanoye and Luciano Mendoza for the preparation of arts material. This work was supported in part by grant from DGAPA-UNAM ES212101, and PAPIIT IN 05

## References

- Aluja, A.S. de, 2002<sup>a</sup>. Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Gaceta Médica de México. 138, 295-298.
- Anzaldúa, S.R., Camacho-Arroyo, I., Cerbón, M.A., 2002. Histomorphological changes in the oviduct epithelium of the rabbit during early pregnancy. Anat. Histol. Embryol. 31, 308-312.
- Batra, S., losif, C.S., 1989. Tissue specific effects of progesterone on progesterone and estrogen receptors in the female urogenital tract. J. Steroid. Biochem. 32, 35-39.
- Black, D.L., Asdell, S.A., 1958. Transport through the rabbit oviduct. Am. J. Physiol. 192, 63-68.
- Blondeau, J.P., Baulieu, E.E., 1984. Progesterone receptor characterized by photoaffinity labeling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. Biochem. J. 219, 785-792.
- Boling, J.L., Blandau, R.J., 1971. Egg transport through the ampulla of the oviducts of rabbits under various experimental conditions. Biol. Reprod. 4, 174-184.
- Brenner, R.M., West, N.B., Norman, R.L., Sandow, B.A., Verhage, H.G., 1979. Progesterone suppression of the estradiol receptor in the reproductive tract of macaques, cats and hamsters. Adv. Exp. Med. Biol. 117, 173-196.
- Brenner, R.M, N.B, West, and M.C. McClellan, 1990: Estrogen and progesterone receptors in the reproductive tract of male and female primates. Biol. Reprod. 42, 11-19.

- Camacho-Arroyo, I., Pasapera A.M., Cerbón M.A., 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci. Lett.* 214, 25-28.
- Camacho-Arroyo I, Mendez-Cruz ST, Guerra-Araiza C, Cerbon MA. 1998. Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J Endocrinol.* 157,71-74.
- Cato, A.C., Geisse, S., Wenz, M., Westphal, H.M., Beato, M., 1984. The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located far upstream from the initiation of transcription. *EMBO J.* 3, 2771-2778.
- Challis JR, Davies J, Ryan KJ. 1973. The concentrations of progesterone, estrone and estradiol-17 beta in the plasma of pregnant rabbits. *Endocrinology.* 93; 971-976.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate -phenol-chlorophormextraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Dannhorn, D.R., Krichner, C., 1990. Uptake of triated uteroglobin by the endometrium of the rabbit during peri-implantation. *Cell. Tissue Res.* 259, 519-528.
- González, M., García, C., Nieto, A., 1996. Regional differences in uteroglobin biosynthesis along the rabbit oviduct: immunohistochemical and biochemical studies. *Histichem. J.* 28, 209-215.
- Gutiérrez-Sagal, R., Pérez-Palacios, G., Langley, E., Pasapera, A.M., Castro, I., Cerbón, M.A., 1993. Endometrial expresión of progesterone receptor and

uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 244-249.

El-Banna, A.A., Sacher, B., 1977. A study steroid hormone receptors in the rabbit oviduct and uterus during first few days after coitus and during egg transport. *Biol. Reprod.* 17, 1-8.

Flores, J., Sánchez, M.A., Nieto, A., Sánchez, B., Gonzalez, M., Garcia, P., 2001. Detection of estrogen alpha and progesterone receptors and cell proliferation in the uterus during early pregnancy in the goat. *Theriogenology* 56, 341-355.

Fuentealba, B., Nieto, M., Croxatto, H.B., 1988. Estrogen and progesterone receptors in the oviduct during egg transport in cyclic and pregnant rats. *Biol. Reprod.* 39, 751-757.

Hafez, E. S., Tsutsumi, T., 1966. Changes in the endometrial vascularity during implantation and pregnancy in the rabbit. *Am. J. Anat.* 118, 249-282.

Harper, M.J.K., 1966. Hormonal control of transport of eggs in cumulus through the ampulla of the rabbit oviduct. *Endocrinology* 78, 568-574.

Harper, M.J. K., 1994. *The Physiology of Reproduction*. Second Edition, Knobil E. and J.D. Neil., New York.

Hewitt, S.C., Goulding, E.H., Eddy, E.M., Korach, K.S., 2002. Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol. Reprod.* 67, 1268-1277.

Hilliard J, Eaton LW Jr. 1971. Estradiol-17 beta, progesterone and 20-alpha-hydroxypregn-4-en-3-one in rabbit ovarian venous plasma. II. From mating through implantation. *Endocrinology.* 89, 522-527.

- Hodgson, B.J., Sullivan, K.B., Pauerstein, C.J., 1973. The role of sympathetic nerves in the response of uterus and oviduct to field stimulation. *Europ. J. Pharmacol.*, 23, 107-110.
- Hodgson, B.J., Paurstein, C.J., 1976. Comparison of oviductal transport of fertilized and unfertilized ova after HCG or coitus-induced ovulation in rabbits. *Biol. Reprod.* 14, 377-380.
- Hyde, B.A., Blaustein, J.D., Black, D.L., 1989. Differential regulation of progesterin receptor immunoreactivity in the rabbit oviduct. *Endocrinology* 125, 1479-1483.
- Ing, N.H., Tornesi, M.B., 1995. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol. Reprod.* 56, 1205-1215.
- Ishijima, Y., Ito, M., Hirabayashi, T., Sakuma, Y., 1967. Effect of the estrogen pretreatment on the induced superovulation by PMS in rabbits. II Experiments on the speed of ova descending the genital tract and cleavage-rate of ova. *Jap. J. Anim. Reprod.* 13, 71-75.
- Iwai, T., Funjii, S., Nanbu, Y., Nonogaki, H., Konishi, I., Mori, T., Okamura, H., 1991. Effect of human chorionic gonadotropin on then expression of progesterone receptor and estrogen receptor in rabbit ovarian granulose cells and the uterus. *Endocrinology* 129, 1840-1848.
- Jansen, R.P.S., 1984. Endocrine response in the fallopian tube. *Endocr. Rev.* 5, 525-551.
- Kaluz, S., Kaluzova, M., Flint, A.P.F. 1987. Sequencing variability in the A/B region of the estrogen receptor . *Anim. Biotechnol.* 8, 221-226.

- Karbowski, B., Vollmer, E., Schneider, P.G. 1992. Steroid receptors in the fallopian tube – morphological and functional investigation in rabbits. *Prog. Histo. Cytochem.* 26, 140-144.
- Kennedy, D.R., Marshall, J. M. 1977. Effect of adrenergic nerve stimulation on the rabbit on the rabbit oviduct : correlation with norepinephrine content and turnover rate. *Bio. Reprod.* 16, 200-211.
- Kim, S.H., Cho, K.W., Kim, S.Z., Koh, G.Y., 1997. Characterization of the atrial natriuretic peptide system in the oviduct. *Endocrinology* 138, 2410-2416.
- King, W., Greene, G., 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307,745.
- Krishnan, R.S., Jr. Daniel, J.C. 1967. "Blastokinin": inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus .*Science* 158, 490-492.
- Krusche, C., Beier, H.M., 1993. Localization of uteroglobin mRNA during early pregnancy in the uterus and oviduct of the rabbit. *J. Reprod. Fertil. Abstracts series 12, Abst 77, p.44.*
- Kuiper, G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J., 1996. Cloning a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5925-5930.
- Kurita, T., Lee-KiJun, Cooke, P.S., Taylor, J.A., Lubahn, D.B., Cunha, G.R., Lee, K.J., 2000. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol. Reprod.* 62, 821-830.
- Lessey, B.A., Killam, A.P., Metzger, D.A., Haney, A.F., Greene, G.L., Jr. McCarty,

- K.S., 1988: Immunohistochemical analysis of the human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 334-340 .
- McCarthy, S.M., Foote, R.H., Maurer, R.R., 1977. Embryo mortality and altered uterine luminal proteins in the progesterone-treated rabbits. *Fertil. Steril.* 28, 101-107.
- Miele L., Cordella-Miele, E., Murkherje, B., 1987. Uteroglobin: Structure, Molecular Biology and New perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor . *Endocrinol. Rev.* 8, 474-490.
- Milgrom E., Thi, L., Atger, M., Baulieu, E.E., 1973. Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor (s) in the uterus. *J. Bol. Chem.* 248, 6366-6374.
- Misrahi, M., Loosfelt, H., Atger, M., Meriel, C., Zerah, V., Desse, P., Milgrom E., 1988. Organization of the entire rabbit progesterone receptor mRNA and the promoter and 5' flanking region of the gene. *Nucleic. Acids. Res.* 16, 5459-5472.
- Monje P., Boland,R., 2001. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J. Cell. Biochem.* 82, 467-479.
- Muechler, E.K., Flickinger, G.L., Jr. Mastroianni, L., Mikhail, G., 1976. Progesterone binding in rabbit oviduct and uterus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151, 275-279.
- Osada, H., Tsunoda, I., Matsuura, M., Satoh, K., Kanayama, K., Nakayama, Y., 1999. Investigation of ovum transport in the oviduct: the dynamics of oviductal fluids in domestic rabbits. *J. Int. Med. Res.* 27, 176-180.

- Perrot-Applanat M, Logeat, F., Groyer-Picard, M.T., Milgrom, E., 1985. Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. *Endocrinology* 116, 1473-1484.
- Pollow K., Inthraphuvasak, J., Manz, B., Grill, H.J., Pollow, B, 1981. A comparison of cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human fallopian tube and endometrial tissue. *Fertil. Steril.* 36, 615-622.
- Pino A.M., Devoto, L., Soto, E., Castro, O., Sierralta, W., 1982. Changes in cytosolic and nuclear estradiol receptors of normal fallopian tube throughout the menstrual cycle. *J. Steroid. Biochem.* 16, 193-197.
- Puri R., Roy S., 1980. Progesterone nuclear receptors in different parts of rabbit fallopian tube and uterus during ovum transport. *Indian J. Exp. Biol.* 18, 553-556.
- Puri R.K., Roy, S.K., 1981. Estradiol binding in different parts of the rabbit oviduct during egg transport. *Endokrinologie* 78, 12-20.
- Spencer, T.E., Bazer, F.W., 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.* 53, 1527-1543.
- Spilman C.H., Harper, M.J.K., 1974. Comparison of the effects of adrenergic drugs and prostaglandins on rabbit oviduct motility. *Biol. Reprod.* 10, 549-554.
- Tucker E.B., Schultz, G.A., 1977. Temporal changes in proteins of oviduct and uterine fluids during the preimplantation period in the rabbit. *Biol. Reprod.* 17, 749-759.



- Vermeirsch H., Van-den-Broeck, W., Coryn, M., Simoens, P., 2002. Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in the canine uterine tube and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reprod. Fertil. Devel.* 14, 241-250.
- WeiHua, Z., Saji, S., Makinen, S., Cheng, G., Jensen, E.V., Warner, M., Gustafsson, J.A., Zhang, W.H., 2000. Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ER alpha in the uterus. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S. A.* 97, 5936-5941.
- West N.B., Hess, D.L., Brenner, R.M., 1986. Differential suppression of progesterone receptor by progesterone on the reproductive tract of primate macaques. *J. Steroid. Biochem.* 25, 497-503.
- Yacoub, D., Chan-Kay, Y. D., Greenstein, B. D., de-Fougerolles-Nunn, E., Khamashta-Munther, A., Hughes-Graham, R.V., 2000. Impaired estrogen priming of progesterone receptors in uterus of MRL/MP-lpr/lpr mice, a model of systemic lupus erythematosus (SLE). *Int. J. Immunopharm.* 22, 537-545.
- Zhang-WeiHua, Z., Saji-S., Makinen,S., Cheng, G., Jensen, E.V., Warner, M., Gustafsson J.A., Zhang, W.H., 2000. Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.A.* 97, 5936-5941
- Zhang-Yuan., GuoZhang, Z., YouDuan, Z., YongLian, Z., Zhang,Y., Zhu, G.Z., Zhang, Y.D., Zhang, Y.L., 1997. Studies of the expression of progesterone receptor gene in the rat uterus during early pregnancy by RT-PCR. *Acta Biochim. Biophys. Sinica.* 29, 221-228.

## LEGENDS

**Fig. 1.** Densitometric analysis of PR gene expression in the uterus and two regions of the rabbit oviduct (ampullae and isthmus). RT-PCR was performed using total RNA isolated from (A) uterus, (B) ampullae and (C) isthmus of non pregnant rabbits (NG) and the first four days of the pregnancy (D-1 –D-4). PR gene expression was corrected for that of GAPDH. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n=3). In A\*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$  compared with D-3 and D-4, \*\*\* $P < 0.01$  and  $P < 0.05$  compared with D-3 , compared with D-4 respectively. In C \* $P < 0.05$  compared with D-3 and D-4.

**Fig. 2** Immunohistochemical localization of PR protein in the uterus: NG (a, b) and day 4 of the pregnancy (c); ampullae: NG (d), day 2(e) and day 3(f) of pregnancy; isthmus: NG (g), day 3 (h) and day 4(i) of pregnancy. Negative control was a serial section of the tissue in NG in which primary antibody was omitted (b). Immunopositive cells for PR (arrows) was observed in epithelium (E), glandular epithelium (GE), stroma (S) and smooth muscle. Bar = 50 $\mu$ m.

**Fig. 3.** PR protein expression level in uterine, ampullae and isthmus epithelium (A, C and E respectively) and stromal cells (B, D and F respectively). Immunohistochemistry was performed in the uterus and oviduct of three different animals in NG and each day of the early pregnancy (from D-1 to D-4) to determine PR protein content. The HSCORE was calculated, as described in Materials and Methods. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. In (A) \* $P < 0.001$  vs. days 1 and 2 ,  $P < 0.01$  days 3 and 4, \*\* $P < 0.001$  vs. days 2, 3 and 4, \*\*\* $P < 0.001$  vs. days 3 and 4. In (B) \* $P < 0.001$  vs. all other groups, \*\*  $P < 0.001$  vs. days 3 and 4. In (C) \* $P < 0.001$  vs. all other groups, \*\* $P < 0.001$  days 1, 2 and 3. In (D) \* $P < 0.01$  vs. day 1,  $P < 0.001$  vs. days 2, 3 and 4, \*\* $P < 0.001$  vs. days 2, 3 and 4, \*\*\* $P < 0.001$  days 2 and 3. In (E) \* $P < 0.001$  vs. all other groups, \*\* $P < 0.001$  days 1, 2 and 4, \*\*\* $P < 0.001$  vs. day 2. In (F) \* $P < 0.001$  vs. all other groups, \*\* $P < 0.05$  vs. day 2,  $P < 0.001$  vs. day 3 and  $P < 0.01$  vs. day 4.

Fig. 1

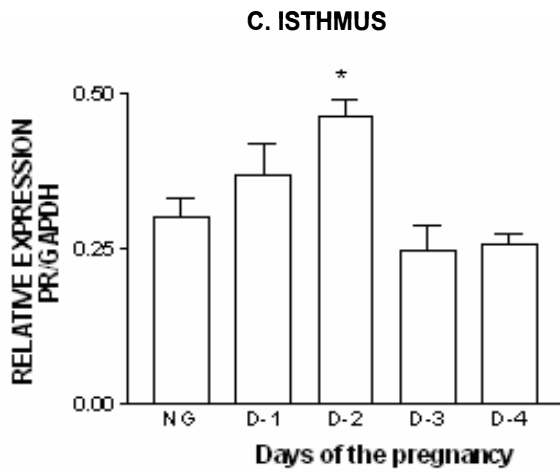
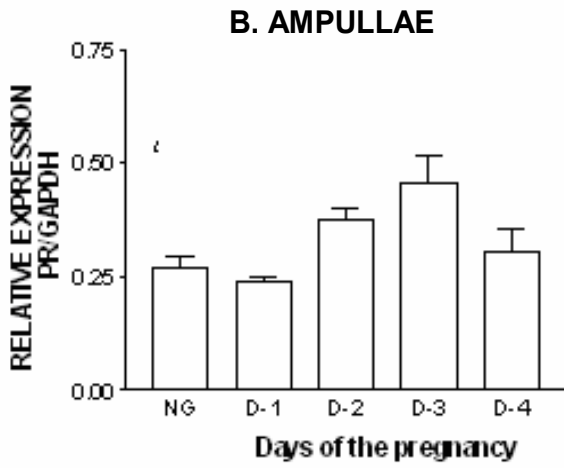
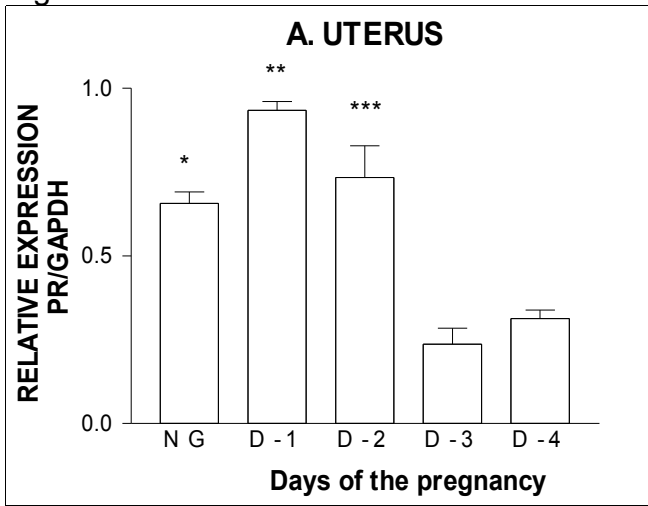


Fig. 2

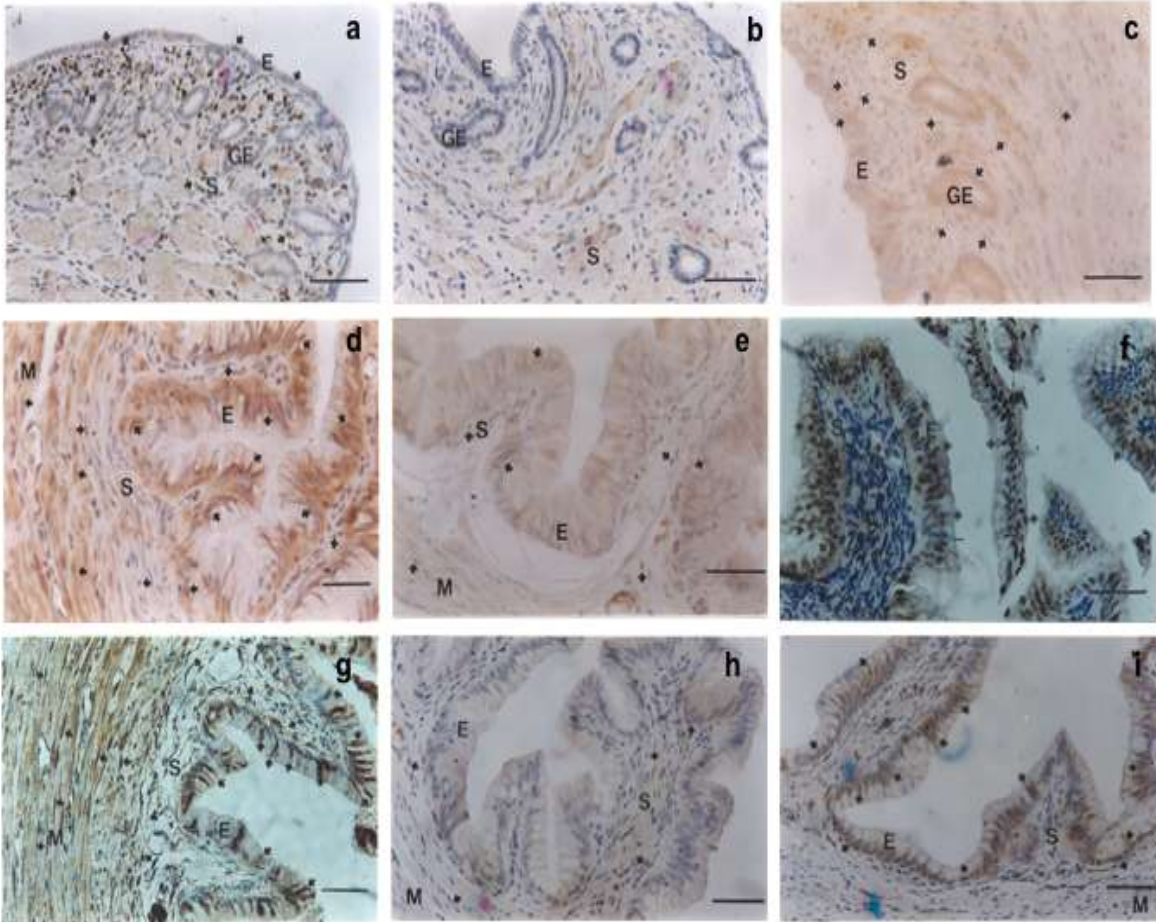
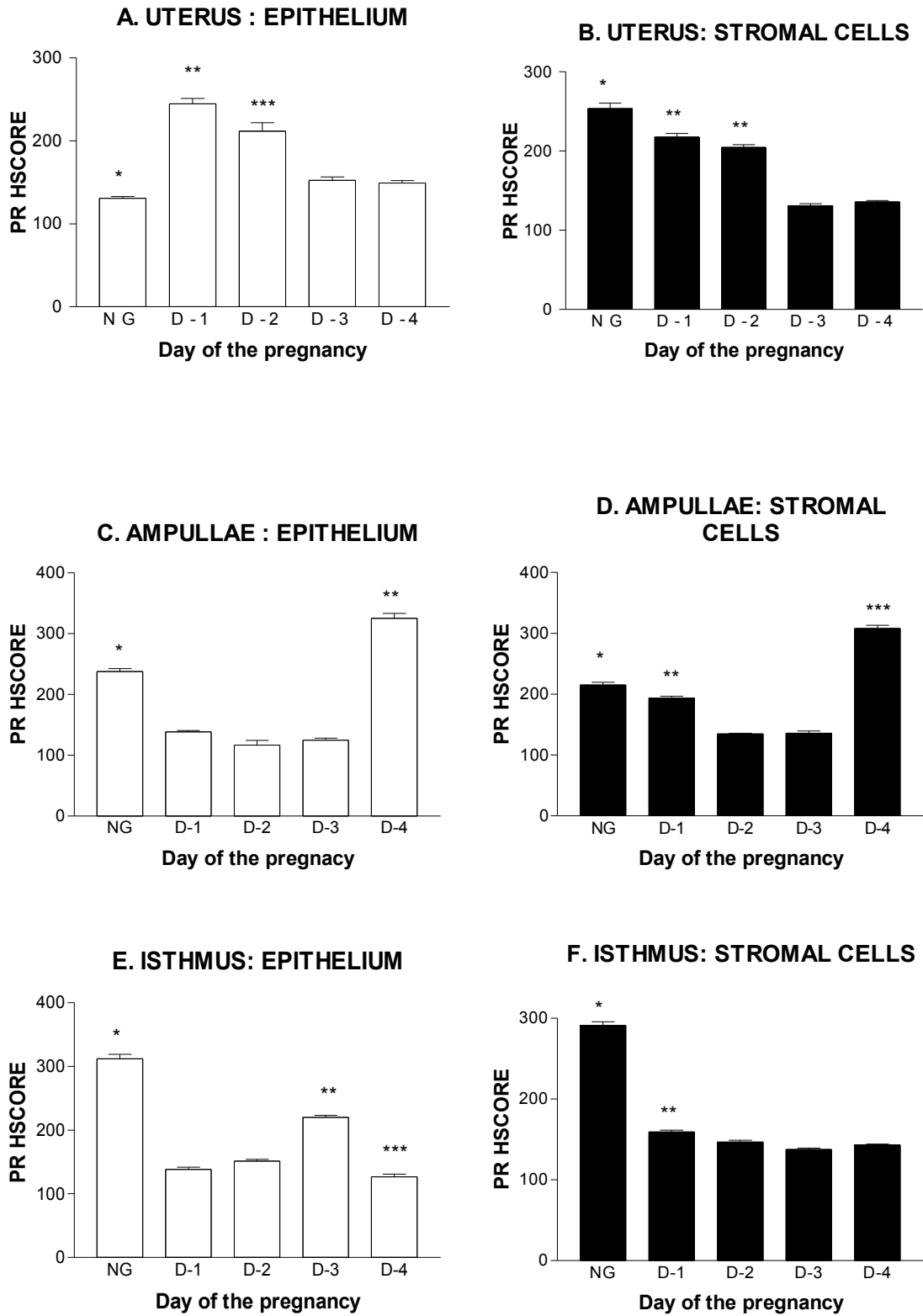


Fig. 3



# **ANTECEDENTES**

## **ACTIVIDAD SECRETORA DEL OVIDUCTO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS DURANTE LA FERTILIZACIÓN Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO**

**Santiago René Anzaldúa Arce**

**Mario Pérez Martínez**

*Departamento de Morfología, Sección de Histología y Biología Celular. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.*

**Marco Antonio Cerbón Cervantes**

**Ignacio Camacho-Arroyo**

*Departamento de Biología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.*

- I. Introducción**
- II. Procesos celulares y tisulares en el oviducto.**
- III. Interacción entre los espermatozoides y el oviducto.**
- III. Desarrollo embrionario temprano y moléculas de secreción del oviducto.**
  - 1. Oviductina**
  - 2. Uteroglobina**
  - 3. Proteína asociada a estrógenos (EGP)**
  - 4. Factores de crecimiento**
  - 5. Prostaglandinas**
  - 6. Catecolaminas**
  - 7. Iones.**

## **V Discusión**

## **VI Conclusiones**

## **VII Abstract**

## **Referencias**

### **I. Introducción**

En los mamíferos domésticos los oviductos (o tubas uterinas) son órganos pares del tracto reproductor femenino en los que se se llevan a cabo funciones esenciales para la reproducción como son: el transporte de los gametos, la capacitación espermática, la segmentación embrionaria y el transporte sincronizado del embrión hacia el útero para su posterior anidación. Todos estos eventos son posibles debido a que el oviducto provee condiciones microambientales favorables para que éstos ocurran, sin embargo, se sabe poco acerca de los mecanismos de regulación de la secreción del oviducto, en particular durante los procesos de fertilización y el desarrollo embrionario temprano, igualmente se conoce poco acerca de las interacciones celulares y moleculares entre este órgano y el producto.

Anatómicamente el oviducto presenta 4 regiones conocidas como: fimbria, infundíbulo, ampulla e istmo. La fimbria tiene forma de embudo y consta de prolongaciones digitiformes adyacentes al ovario que permiten la captación del óvulo. Esta porción también brinda una comunicación entre la cavidad peritoneal y el exterior (1). El infundíbulo es la continuación tubular de la fimbria y constituye el tercio distal del órgano. Este componente del oviducto tiene como finalidad el transporte de los gametos e histológicamente no puede distinguirse del ampulla. El ampulla es la porción media del oviducto, se extiende desde la unión istmo-ampular hasta el infundíbulo, en ella ocurre preferentemente la fecundación, en particular en la unión istmo-ampular. Se ha postulado que la región del ampulla tenga un mayor grado de secreción (en relación con el istmo) debido a que presenta un mayor número de pliegues y mayor superficie epitelial lo que favorece los procesos de extravasación de sustancias a partir del plasma sanguíneo. El endosalpinx (epitelio de revestimiento) del ampulla es altamente plegado por lo que prácticamente ocluye la luz del órgano.

El istmo forma el tercio proximal del oviducto y está adyacente al útero. El sitio de unión con el útero se llama unión útero-tubárica, en la que se incluye una porción intramural llamada región intersticial. Histológicamente el istmo se caracteriza por un mayor grosor del órgano, debido particularmente a que la capa muscular (miosalpinx) presenta un más capas; la mucosa presenta pocos pliegues y el epitelio es secretor predominantemente. La unión istmo-ampular actúa como un esfínter funcional, que controla el transporte del óvulo hacia el útero. En el caso de la coneja, el incremento en el grosor de la pared y la menor distensibilidad del istmo en comparación con el ampulla, explican por sí mismos la retención pasiva del embrión y no sólo de manera específica en la unión istmo-ampular, por lo que en esta especie, aparentemente la acción de esfínter no es un mecanismo activo sino que corresponde a razones anatómicas (2). En el istmo también ocurre la capacitación de los espermatozoides. En los equinos únicamente los óvulos fertilizados podrán pasar al interior de los cuernos uterinos, y en otras especies como la coneja la unión utero-tubárica se abre de manera exclusiva los días 3, 4 de la gestación (3), que corresponde con el paso del huevo hacia el útero.

## **II. Procesos celulares y tisulares en el oviducto**

El epitelio de revestimiento del oviducto es un epitelio cilíndrico simple ciliado que consta de dos tipos celulares principales: las células secretoras no ciliadas y las células ciliadas.

La población celular del oviducto varía a lo largo del ciclo estral debido a la influencia de las hormonas esteroideas de origen ovárico (estrógenos y progesterona); las células ciliadas son mayoritarias en las etapas foliculares o estrogénicas, mientras que las células secretoras (no ciliadas generalmente) predominan en las etapas luteínicas; el primer proceso se conoce con el nombre de ciliogénesis (4, 5). El estudio del predominio de estas dos poblaciones celulares así como la determinación de las variaciones en la altura del epitelio permite inferir algunos efectos hormonales sobre este órgano. En los primates los estrógenos ocasionan hipertrofia, ciliogénesis y secreción en las células epiteliales, mientras que la atrofia celular es evidente durante la fase luteínica (o progestacional) del ciclo (6). El proceso de ciliogénesis ha sido estudiado en diversas especies de animales domésticos como la coneja (7), la cerda (8), la perra (9) y la gata (10). Durante la gestación temprana de la gata se observa deciliación y atrofia (entre los días 2 y 4), así como disminución en la



altura del epitelio entre los días 8 y 40 de la gestación (11). También se han estudiado la altura del epitelio del ampulla y el istmo del oviducto de la oveja (12), se observó que es mayor en los 3 primeros días de la gestación en relación con hembras ovariectomizadas, y disminuye a partir del día 4, sin embargo a diferencia de otras especies, el tipo celular predominante en ambas porciones corresponde a las células ciliadas, mientras que las no ciliadas producen una proteína dependiente de la acción estrogénica (13, 14, 15). Durante el puerperio las modificaciones celulares en los oviductos de ovinos son mínimas (16).

Las secreciones del oviducto presentan dos componentes principales; el primero es un trasudado de moléculas extravasadas del plasma sanguíneo, siendo las más relevantes de este grupo la albúmina, transferrina e inmunoglobulinas. El segundo es un componente secretor propiamente dicho, sintetizado y liberado activamente hacia la luz del órgano por las células epiteliales (secretoras). Este componente es en general heterogéneo, sin embargo algunas moléculas presente en el fluido parecen ser comunes para diversas especies de mamíferos domésticos, como son: proteínas dependientes de estrógenos, factores de crecimiento, mucinas específicas del oviducto, prostaglandinas, entre otras. Algunas de estas moléculas interactúan con los gametos o bien con los cigotos o embriones (17).

### **III. Interacción funcional entre los espermatozoides y el oviducto.**

Una vez que los espermatozoides entran en el oviducto, permanecen en su mayor parte en el istmo hasta momentos antes de la ovulación, esta congregación de espermatozoides se ha observado en ovinos (18, 19), bovinos (20) y cerdos (21, 22). En los ovinos y bovinos se requiere de un mínimo de 6 a 8 horas para que exista acumulación suficiente de espermatozoides para que se lleve a cabo la fertilización (23), por lo que aparentemente el istmo actúa como un reservorio de espermatozoides; en los ovinos esta acumulación ocurre en el oviducto ipsilateral del ovario en el cual se presenta la ovulación (24). En opinión de algunos investigadores, el istmo actúa como un filtro que selecciona los espermatozoides más aptos para permitirles el paso hacia el sitio de la fertilización. Actualmente se ha postulado que la presencia del moco oviductal y en particular los carbohidratos de las glucoproteínas son los mediadores de la formación del reservorio de espermatozoides en mamíferos (25, 26).

Análisis bioquímicos efectuados en las secreciones oviductales de cerdas (27) y vacas (28) muestran diversas bandas mayores de polipéptidos que se unen a los espermatozoides (29). En el caso de los bovinos ocurre en el istmo y se ha postulado que esta unión aparentemente contribuye a evitar la polispermia debido a que permite la retención efectiva de gametos masculinos en esta región y evita un exceso de espermatozoides en el ampulla y unión istmo-ampular, que son los sitios de la fertilización. Estudios realizados *in vitro* con glucoproteínas específicas del oviducto de cerdas han demostrado efectos sobre los procesos de fertilización, incrementando la penetración de los espermatozoides, en la inhibición de la polispermia y favoreciendo el desarrollo embrionario temprano en esta especie (30, 31).

Se ha demostrado que los espermatozoides de bovinos pueden mantener su capacidad fertilizante por más de 48 horas (*in vitro*) siempre y cuando permanezcan unidos por su porción rostral del acrosoma al endosalpinx, lo que no ocurre si se unen a otros epitelios ciliados como el de la tráquea o bien en ausencia de células (32).

Se ha estudiado la motilidad de espermatozoides de conejo en el ampulla e istmo y se ha observado que se adhieren con los cilios de las células epiteliales; esta asociación está relacionada con la presencia de moco oviductal (33, 34, 35). En el hamster los espermatozoides también permanecen unidos firmemente a las células epiteliales del oviducto y se liberan alrededor del momento de la ovulación (36). Tales mecanismos pueden ser importantes en el mantenimiento de la capacidad fertilizante *in vitro* durante el periodo de almacenamiento del esperma en el istmo (37).

Los espermatozoides de mamíferos maduran en el epidídimo, sin embargo una vez que son eyaculados no son capaces de fertilizar el óvulo, los espermatozoides requieren cambios funcionales que se realizan en el tracto reproductor femenino, estos cambios que permiten la capacidad fertilizante del espermatozoide son denominados colectivamente como capacitación espermática. La capacitación involucra procesos en los que se remueven o alteran sustancias que son adsorbidas o integradas por la membrana plasmática de los espermatozoides durante su maduración en el epidídimo, la remoción o alteración de la cubierta protectora sensibiliza a la membrana espermática para poder llevar a cabo la fertilización (38). La capacitación espermática involucra una desestabilización de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide sin cambios morfológicos visibles (39); se sabe que en las etapas iniciales de la capacitación existe una salida de colesterol

proveniente de la bicapa lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides de los mamíferos. Se sabe que en las vacas durante el estro existe un incremento en la concentración de lipoproteínas de alta densidad en el fluido del oviducto y se ha propuesto que sirva como un posible aceptor del colesterol proveniente del esperma para promover de esta manera la capacitación y la reacción acrosomal (40). En el conejo aparentemente la capacitación espermática es un proceso que en condiciones óptimas requiere del paso secuencial por el útero y del oviducto (41).

Experimentos realizados *in vitro* en caninos muestran que la capacitación espermática es posible en presencia de células de revestimiento del oviducto (42) y que el fluido del oviducto proveniente de hembras en estro mantiene la motilidad espermática e induce la capacitación espermática (43).

La reacción acrosomal es un proceso posterior a la capacitación espermática que involucra la fusión de la membrana acrosomal del espermatozoide y su membrana plasmática, para formar poros que permiten la salida de enzimas involucradas con la fertilización como son principalmente, la hialuronidasa y la acrosina. Los espermatozoides no capacitados son incapaces de unirse a la zona pelúcida y mucho menos penetran la capa celular del *cumulus ooforus*; en contraste los espermatozoides capacitados pero sin reacción acrosomal, penetran la capa del *cúmulus* pero no así al interior de la corona radiada (44). Existen evidencias de que la reacción acrosomal ocurre en la vecindad de la zona pelúcida y frecuentemente en el ámpula del oviducto en diversas especies de mamíferos.

En experimentos efectuados en porcinos (45) y lagomorfos (46) en los que se eliminó el istmo, la fertilización y las divisiones tempranas del huevo ocurren normalmente, sin embargo se observó un incremento en la polispermia, ocasionada presumiblemente por la pérdida de la función de filtro que lleva a cabo esta región anatómica.

#### **IV. Desarrollo embrionario temprano y proteínas de secreción del oviducto.**

Las secreciones de la mucosa del oviducto juegan un papel trascendente en el desarrollo embrionario. En la coneja se añade al ovocito una cubierta albuminoide externa, mientras que en los monotremas y marsupiales se forma una especie de cáscara alrededor de la cubierta albuminoide, como rasgos filogenéticos de la función del oviducto en las aves (37). La importancia de estas secreciones se ha evaluado en diversos experimentos *in vitro*

en la que los embriones se colocan en cultivos de células epiteliales del oviducto y se determina su efecto sobre la viabilidad de los primeros (47, 48).

En una serie de experimentos en los que se evaluó la influencia del medio de cultivo de tejidos del oviducto sobre el desarrollo de embriones de gato de mórula a blastocisto, se concluyó que el medio de cultivo tuvo pocos efectos negativos sobre la transformación de mórula a blastocisto, proceso que normalmente ocurre en el útero (49).

Existen evidencias que sugieren que algunos factores secretados por el oviducto pueden estimular el crecimiento embrionario. Así, por ejemplo la fertilización puede ocurrir en el útero de la coneja, sin embargo, si el producto no es transferido al oviducto en las 6 primeras horas sufre de procesos detrimentales (50). Se sabe que en diversas especies los ovocitos y posteriormente el cigoto toman diversas sustancias del fluido del oviducto; en el ratón por ejemplo, una glucoproteína es secuestrada a partir del fluido del ámpula y se almacena posteriormente en el espacio perivitelino, mientras que otros compuestos derivados de la extravasación del plasma, como la albúmina sérica no es secuestrada (51). En el cerdo también se han identificado dos glucoproteínas secretadas inicialmente en el fluido oviductal que posteriormente se detectan en la zona pelúcida de los ovocitos. En el estado de 2 a 4 blastómeras se pueden identificar 4 glucoproteínas más en la zona pelúcida y en la membrana de las blastómeras, pero no en su interior (52). En mandriles (53) y en ovinos (52) diversos antígenos del oviducto se observan no sólo dentro de la zona pelúcida, sino en asociación con el espacio perivitelino, la membrana vitelina e incluso en el citoplasma del embrión.

La función de todas estas proteínas no se conoce completamente, pero el hecho de provenir de las secreciones oviductales y de ser selectivamente incorporadas a regiones específicas del producto puede indicar un papel importante en el desarrollo y crecimiento del embrión. En ovinos y bovinos los productos de secreción del oviducto tienen una actividad mitogénica importante sobre el embrión. Esta actividad sinergiza con la insulina, ya que esta hormona y otras moléculas relacionadas como el factor de crecimiento derivado de la insulina (IGF), tienen aparentemente un papel relevante en el desarrollo embrionario previo a la implantación

Entre las moléculas de secreción específicas del oviducto que han sido bien estudiadas se encuentran: la uteroglobina, la proteína asociada a estrógenos (EGP), los factores de crecimiento, prostaglandina, catecolaminas y los iones.

### *1. Oviductina*

Las mucosas de diversos órganos sintetizan y se encuentran íntimamente asociadas con un grupo de proteínas con una gran cantidad de oligosacáridos unidos a -O de residuos de treoninas y serinas, estas glucoproteínas se denominan mucinas; entre las múltiples funciones que se han sugerido para este grupo de moléculas están: la lubricación e hidratación tisular, la protección de proteínas y células contra la proteólisis, la inhibición de la adherencia celular, o bien la promoción de dicha adherencia, según el caso, y la inhibición de la inmunidad celular (54).

En el hamster existe una mucina específica de la mucosa del oviducto, denominada oviductina, es una glucoproteína de secreción que se une a la zona pelúcida (55); la oviductina es una molécula con residuos de N-acetil C galactosamina que forman parte de las secreciones oviductales en el istmo y posteriormente se asocian a la matriz de la zona pelúcida durante el transporte del óvulo (56, 57, 58). Actualmente la oviductina está presente en diversas especies de mamíferos además del hamster, como son: el ratón, el mandril y los humanos, esta glucoproteína se expresa de manera exclusiva en el epitelio del oviducto a diferencia de otros genes de mucinas que son expresados en diversos tejidos (59, 54). La función específica de esta molécula aún está en estudio.

### *2. Uteroglobina*

La uteroglobina es la principal proteína de secreción uterina de la coneja durante el inicio de la gestación. Actualmente se conoce su estructura y la del gen que la codifica (60). Esta proteína es dependiente de la progesterona, por lo que se ha utilizado como un marcador de acción progestacional; además se ha estudiado su relación con la expresión de los receptores a progesterona en el endometrio de conejas adultas durante la gestación temprana (61) y en conejas prepúberes (62, 63) y adultas (64, 65) tratadas con compuestos con actividad antiprogestacional, en particular durante el periodo de periimplantación. Debido a que la máxima secreción endometrial coincide con el momento de la

implantación, la uteroglobina se ha involucrado con diversos efectos tróficos sobre el embrión (66), en el enmascaramiento de antígenos de los espermatozoides (67). Esta proteína también se ha identificado en las células epiteliales y en el fluido del oviducto, se ha postulado que se sintetiza de manera constitutiva en el oviducto a diferencia del útero donde es regulado hormonalmente, en particular por la progesterona.

En estudios previos (68) sobre la uteroglobina se ha encontrado diferencia en el patrón de secreción de la uteroglobina y su capacidad de almacenamiento en las células de revestimiento del útero y del oviducto en conejas pseudogestantes. En el útero esta proteína es secretada hacia la luz del órgano casi en su totalidad, mientras que en el oviducto presenta una gran capacidad de almacenamiento y un menor rango de secreción (68). Existen estudios histológicos y ultraestructurales que sugieren una secreción activa de uteroglobina en el día 5 de la gestación (69) o pseudogestación (68). En estudios inmunohistoquímicos y bioquímicos de conejas en estro, se ha observado que el número de células inmunomarcadas y la cantidad de RNAm para uteroglobina es similar en la región distal y media del oviducto, mientras que en la región proximal (ístm) el número de células es menor y presenta de 3 a 4 veces menor cantidad de RNAm (70).

La uteroglobina no es exclusiva del tracto genital femenino de la coneja, también se ha identificado en otros tejidos como el pulmón, próstata y sistema digestivo (71, 72). Se han descrito la contraparte de uteroglobina o su gen en diversas especies como son: ratón, rata, hamster, cerdo, equino y humano (73), por lo que aún no se han determinado los papeles fisiológicos de esta molécula.

### *3. Proteína asociada a estrógenos (EGP).*

En general existe un grupo de proteínas sintetizadas en el oviducto de diversas especies de mamíferos que se incrementan bajo condiciones estrogénicas, esta mayor actividad secretora se ha demostrado en cerdas, hamsters, ratonas, ovejas (74) y vacas (75, 17). En estas especies existe aparentemente un gradiente de actividad secretora dependiendo de la porción anatómica, siendo la mayor en el ámpula, seguido del infundíbulo y por último en el ístm. Estas moléculas son glucoproteínas secretadas por el ámpula de los ovinos (76, 77) y bovinos (76) y se vierten hacia la luz del órgano en su

mayoría en el día 3 del ciclo ovárico. En ovinos la proteína asociada a estrógenos se conoce con las siglas oEGP y en bovinos bEGP, los genes de donde provienen estas proteínas tienen 95% de homología en estas especies y consisten en 1560 pares de bases que codifican a 519 aminoácidos que se distinguen bioquímicamente por los glucósidos terminales en las dos especies mencionadas.

Experimentos realizados *in vitro*, en los que se agregó EGP al medio de cultivo de cigotos de ovinos, se observó que estas moléculas se unen a la zona pelúcida y a la membrana plasmática de las blastómeras, por lo que aparentemente contribuye a regular la división celular en las primeras etapas del embrión y a la formación del blastocisto (78).

Los mecanismos de síntesis y secreción de las EGP y sus posibles efectos sobre la fertilización y el desarrollo embrionario son importantes para poder comprender las interacciones moleculares que tienen lugar en la gestación temprana (78).

#### *4. Factores de crecimiento*

En una revisión llevada a cabo por Simner y Simnen (79) se destaca el papel potencial de los factores de crecimiento y los protooncogenes en el desarrollo embrionario temprano de los mamíferos y durante la implantación. Se sabe de la existencia de múltiples interacciones celulares y moleculares entre el producto y el útero. En el oviducto existen claras evidencias de que diversos factores de crecimiento están involucradas en la embriogénesis. Las moléculas que participan en estas delicadas interacciones se han dividido en tres grupos (80): factores autocrinos, la mayoría de ellos generados por el embrión, para sustentar su propio desarrollo; factores paracrinos en los que se incluyen a los factores de crecimiento y proteínas específicas producidas por el oviducto y por último, los factores ambientales del oviducto entre los que destacan los substratos energéticos, vitaminas, iones y aminoácidos.

Entre los factores de crecimiento se encuentran: el factor de crecimiento unido a la heparina, factor de crecimiento transformante (TGF)  $\alpha$  y  $\beta$ , factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) I y II, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PAF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Diversos procesos celulares importantes se han involucrado con los factores de crecimiento, como son: la proliferación celular,

diferenciación, invasividad, angiogénesis, inducción del mesodermo en embriones tempranos de anfibios, entre otros (81).

Se han realizado diversos estudios *in vitro* en el embrión de ratón. El EGF favorece la transformación del embrión hasta el estadio de blastocisto; el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) causa un incremento en el número de células de la masa celular interna, no así del trofoectodermo (82, 83, 84) y estimula el metabolismo embrionario (85). También en embriones en cultivo se han identificado receptores a la insulina en embriones de 8 células, por lo que se ha propuesto que esta hormona estimula el metabolismo y crecimiento de los embriones que en estas etapas aún no han llegado al útero (81,83, 86, 87, 88). En el cerdo también se han descrito receptores para el IGF-I en el día 12 de la gestación, este hallazgo coincide con altas concentraciones de IGF-I en el fluido uterino (89), así mismo se identifican receptores en el endometrio y miometrio (90) por lo que es probable que estas moléculas puedan tener efectos paracrinos para mediar diversos cambios uterinos relacionadas con la implantación. En los embriones porcinos el IGF-I se ha involucrado en modificaciones metabólicas pues incrementa la actividad aromatasa de P-450 (91) sino también diversos efectos sobre el útero materno, como la proliferación dependiente de estrógenos (92). El IGF-I estimula el disco embrionario de cerdos y sintetiza diversas proteínas involucradas posiblemente con el reconocimiento materno de la gestación o en actividades inmunosupresoras (93). En conejas hay un incremento del IGF-I el día 3 de la gestación y se ha identificado en la cubierta del producto en esta especie y promueve la transformación de mórula a blastocisto (94).

En bovinos el factor inhibidor de leucemia humana (hLIF) adicionada a un fluido sintético de oviducto *in vitro*, aparentemente tiene un efecto significativo sobre el desarrollo del estadio de mórula al de blastocisto (95, 96).

Al inicio de la gestación debe establecerse un “diálogo” molecular entre la madre y el producto, este diálogo consiste en la secreción de diversas señales bioquímicas que contribuyen al transporte sincrónico del producto hacia el útero de tal forma que cuando llegue a él se encuentre en condiciones secretoras adecuadas para permitir la implantación. Entre las señales bioquímicas de origen embrionario tempranas se encuentra el factor activador de plaquetas derivado del embrión (EPAF).

En el oviducto de la coneja se ha descrito un incremento de los receptores al factor activador de plaquetas (PAF) durante los días 3 y 6 de la gestación, cuando los embriones



se pueden localizar en el oviducto y el útero, respectivamente (97), el PAF es capaz de modificar la permeabilidad vascular y causar la contracción de la musculatura lisa (98, 99), por lo que el PAF proveniente del embrión (EPAF) posiblemente pueda regular algunas funciones del oviducto, sin embargo no hay informes sobre su efecto en el transporte oviductal de cigotos.

El embrión de ratón sintetiza EPAF, el cual se ha involucrado con el establecimiento de la implantación ya que el bloqueo de EPAF a través de antagonistas evita la implantación de los embriones (100).

Existen hallazgos que indican que en el ratón y en el conejo el PAF tiene funciones autocrinas sobre el desarrollo embrionario (101, 102). El PAF parece ser una señal molecular temprana necesaria para inducir la primera señal materna denominada factor de gestación temprana (EPF) en todas las especies de mamíferos examinados incluyendo la vaca (76), el ratón (103) la cerda (104), la coneja (105), la rata (106), la oveja (107) y el humano (108). El PAF puede identificarse en el suero y orina de las hembras gestantes hasta la mitad de la gestación; está constituido por una glucoproteína que puede ser separada en dos componentes; una fracción activa y otra inactiva, la primera a su vez contiene dos partes el EPF-A y el EPF-B, las cuales estando en forma aislada pierden muchas de sus actividades, las que se restauran al unirse nuevamente. El EPF-A es secretada por el oviducto, mientras que el ovario produce el EPF-B en presencia de prolactina y en respuesta del EPAF. En el ratón cerca del día 7 es producido por el embrión (109), aunque se ha postulado que la función del EPF es la de regular el sistema inmune materno en la gestación ha sido cuestionada por diversos investigadores (110, 111), sin embargo queda claro que el sistema EPAF / EPF representa la interacción molecular inicial más caracterizada entre el embrión y la madre y es activa antes de que la transcripción embrionaria comience.

En otras especies como los bovinos y porcinos se han identificado diversos transcritos de RNAm maternos y embrionarios para el TGF  $\beta$ 2 y IGF-2, en la vaca (112) estos transcritos se producen durante diversas etapas del desarrollo embrionario, sin embargo no se tienen suficientes evidencias sobre su papel fisiológico.

Estudios bioquímicos en cerdas señalan que tanto el RNAm y la proteína denominada: activador-inhibidor del plasminógeno-1 (PAI-1) están en altas

concentraciones en las células epiteliales del oviducto durante el día 2 de la gestación, esta secreción es mayor en el istmo que en el ampulla y se ha propuesto que tenga como finalidad proteger al embrión de la posible degradación enzimática o bien de la remodelación de la matriz extracelular (113, 114)

Al parecer diversas proteínas secretadas por el oviducto tienen efectos benéficos sobre las primeras etapas del desarrollo embrionario en las diversas especies de mamíferos domésticos, sin embargo, es bien conocido que en las especies de mamíferos no primates las gestaciones ectópicas y en particular las tubáricas son muy poco comunes, estudios realizados con injertos del endosalpinx colocados en el útero de la coneja han permitido postular la existencia de factor (es) inhibidores de la gestación ectópica en el oviducto, ya que disminuyeron el número de sitios de implantación en los cuernos uterinos y ningún sitio de implantación coincidió con las porciones con los injertos de endosalpinx entre otras observaciones (115).

Entre los agentes que estimulan la relajación del miosalpinx están las catecolaminas (entre ellas la noradrenalina presente en las terminaciones nerviosas de este órgano), prostaglandinas (algunas de ellas secretadas por el embrión), por lo que el embrión aparentemente no se comporta como un objeto pasivo, sino que participa activamente en la regulación de su propio transporte y crecimiento (37).

En embriones de diversas edades y especies se ha demostrado la liberación de diversos compuestos como hormonas esteroideas, histamina, prostaglandinas las cuales pueden tener efectos sobre el miosalpinx; los estrógenos en embriones de conejo (116), caballos (117), vacas (118) y cerdos (119). Todas estas observaciones se han llevado a cabo en embriones en estadios de mórula y blastocisto etapas en la que *in vivo* el producto se encuentra también en el útero, por lo que probablemente la síntesis de estrógenos este ligada a otros procesos como espaciación, orientación e implantación en el útero.

##### *5. Prostaglandinas*

Los embriones de diversas especies de mamíferos como bovinos, ovinos conejos y porcinos son capaces de sintetizar prostaglandinas de las series E y F; estas sustancias se han involucrado en señales paracrinas para inducir modificaciones del endometrio necesarias para la implantación; en el caso del oviducto el estudio de las prostaglandinas

tiene como finalidad conocer la regulación del transporte del cigoto, ya que estos compuestos tienen efectos sobre la contracción del miosalpinx.

En equinos las prostaglandinas de tipo  $E_2$  han sido consideradas como la señal bioquímica que en esta especie es capaz de reconocer la gestación temprana ya que la secreción de prostaglandina  $E_2$  se ha involucrado en el transporte selectivo del producto hacia el útero, debido a que únicamente los embriones pasarán a la cavidad uterina 5 días después de la fertilización, ya que durante los días 5 y 6 de la gestación el embrión produce grandes cantidades de  $E_2$ . Los óvulos no fertilizados permanecen en el oviducto hasta que se degradan tiempo después (120, 121, 122). Si se administra parenteralmente prostaglandina  $E_2$  también activa el transporte oviductal de embriones equinos (123).

#### *6. Catecolaminas*

La noradrenalina es el mediador químico presente en las terminaciones de las fibras simpáticas que inervan el oviducto favoreciendo la relajación de la musculatura lisa del órgano. En la coneja no gestante, las concentraciones de noradrenalina son elevadas en el ámpula en relación con el istmo (124), en la porción distal del istmo (unión istmo-ampular) mostró una disminución 17 horas después de la inyección de un compuesto quelante. Un tratamiento con estrógenos en conejos causa la retención de los cigotos en la unión istmo-ampular, con un incremento de concentraciones de noradrenalina en el istmo distal, mientras que la progesterona aumenta el transporte y disminuye significativamente la concentración de noradrenalina en esta misma región (124). Estudios realizados en el fluido oviductal mostraron que la concentración de noradrenalina fue siempre menor en el ámpula que en el fluido del istmo, (125), lo cual no corresponde con las concentraciones tisulares (124). En la coneja las concentraciones de las aminas biógenas como noradrenalina, dopamina y adrenalina disminuyen en el fluido del oviducto entre el estro y la ovulación (125).

#### *7. Iones.*

Diversos iones se han identificado en el fluido del oviducto así como algunas enzimas involucradas en el transporte de los mismos como la K ATPasa que se ha identificado en las células epiteliales del oviducto de los roedores (126).

En el caso del calcio la concentración es máxima en el fluido del istmo de bovinos y ovinos en el momento del estro (127, 128).

El magnesio varía a lo largo del ciclo estral de los bovinos, sin embargo aparentemente no hay variaciones en las diversas regiones del oviducto, mientras que el potasio y el sodio no muestran variaciones tanto en el ciclo estral como en las distintas regiones del oviducto, resulta interesante el hecho que la concentración de potasio en el fluido es mayor que la del suero (128).

En conejas pseudogestantes (mediante la administración de hCG) existen variaciones en las proporciones de sodio /potasio y calcio / magnesio 48 horas posteriores a la inyección (129). En esta especie se ha identificado el factor natriurético atrial (130) el cual probablemente tenga algún efecto sobre el flujo sanguíneo y la extravasación de ciertos iones en el oviducto.

En bovinos los espermatozoides sometidos a diversos medios del tracto genital femenino, entre ellos el fluido del oviducto pueden afectar el secuestro del calcio por parte del espermatozoide sin afectar el rango de fertilización (131)

## **V Discusión**

En la actualidad se conoce un creciente número de moléculas e interacciones moleculares presentes en el oviducto de los diversos mamíferos domésticos durante la gestación temprana y durante el transporte de los gametos, a pesar de ello múltiples procedimientos de reproducción asistida en el campo veterinario no logran tener la eficiencia deseada porque se desconocen muchos de los factores que determinan una alta pérdida embrionaria durante esta etapa; en dos estudios realizados sobre este tema, uno realizado en la década de 1950 por Casida (132) y otro 40 años después (133) el porcentaje de muertes embrionarias en bovinos y porcinos se encontraba en la misma proporción (alrededor del 23%) , lo cual implica que en esos 40 años no se logró conocer a fondo las causas de la baja eficiencia reproductiva en este rublo y por lo que tampoco se logró incidir de manera positiva en este problema. En muchos casos no sólo se desconocen las causas reales de las pérdidas embrionarias sino que ni siquiera se sabe el momento preciso en el que ocurren, aunque se tiene documentado que es en los primeros días de la gestación por

lo que indudablemente el oviducto está involucrado de manera importante en la sobrevivencia de los embriones.

En la actualidad existe interés por conocer la participación de las citocinas endometriales en el desarrollo embrionario. En los rumiantes existen moléculas que participan en los mecanismos de reconocimiento de la gestación y dentro de ellas se cita al interferón tau que tiene efectos luteolíticos y metabólicos que contribuyen a la disminución de la mortalidad embrionaria. Por lo anterior en estas especies se ha planteado el uso de algunas citocinas y de proteínas séricas específicas de la gestación como un medio para monitorear la supervivencia embrionaria (134).

Un aspecto relevante en la investigación de las interacciones moleculares durante la gestación temprana en el oviducto es el conocer los efectos de diversas progestinas sintéticas y productos hormonales utilizados frecuentemente por el médico veterinario en la práctica cotidiana, ya que se ha observado que sus efectos histológicos pueden variar de manera significativa aún en el útero y en el oviducto del mismo animal (135).

Otro aspecto de gran importancia para ser analizado es la regulación local, endocrina, paracrina y autocrina de los sistemas inmunológicos locales del oviducto durante la gestación temprana y bajo la influencia de procesos infecciosos y patológicos.

## **VI Conclusiones**

- Los oviductos (tubas uterinas) de los mamíferos domésticos constan de cuatro regiones anatómicas y cada una de ellas participan en funciones específicas en los procesos reproductivos esenciales que realiza este órgano como son: el transporte de los gametos, la capacitación espermática, la reacción acrosomal, la fertilización y la dirección de las primeras multiplicaciones mitóticas del embrión, así como el transporte regulado de este hacia el útero para su posterior implantación.
- La composición del fluido oviductal consta de dos componentes principales: a) un trasudado selectivo de moléculas y de iones provenientes del suero; b) síntesis y secreción activa de un complejo de moléculas específicas que aparentemente varían en proporción y composición de acuerdo a la región anatómica donde se lleve a cabo.
- Las moléculas crean un microambiente específico que contribuyen, según la región a las diversas funciones específicas del órgano, mediante interacciones celulares y

moleculares ya sea con los gametos, o con el embrión en sus primeros estadios para regular su número, su transporte y su funcionamiento.

- En el caso de los espermatozoides las interacciones celulares y moleculares con el endosalpinx favorecen su almacenamiento en el istmo, para evitar la polispermia; contribuir a la capacitación espermática, la reacción acrosomal y finalmente la fertilización.
- Las diversas moléculas sintetizadas en el oviducto tienen efectos tróficos sobre los embriones y favorecen su crecimiento y multiplicación inicial, sin embargo los mecanismos de regulación endocrinos, paracrinos y autocrinos aún no se conocen con detalle, así como tampoco se conocen los efectos de los fármacos reguladores de la fertilidad utilizados en medicina veterinaria.

El estudio de la regulación endocrina y molecular de la histofisiología del oviducto abre un campo de investigación muy amplio que requiere ser abordado por grupos multidisciplinarios de las ciencias biológicas y de la salud para que de esta manera se puedan resolver problemas que afectan la capacidad reproductiva de diferentes especies. Uno de estos campos es la llamada reproducción asistida aplicado en especies que están en peligro de extinción.

## **VII Abstract**

In the present review we analyzed various molecular and cellular interactions in the oviduct during fertilization and early embryonic development. Several molecules involved in the spermatid maturation process, fertilizing capacity of the sperms, the interaction between the sperms and the epithelial cells of coating of the oviduct, as well as their possible implications in their initial development of the embryo in models *in vivo* and *in vitro* are described. It is emphasized the relevance of the study of the molecular interactions routed to optimize various assisted reproduction procedures, in order to know and to reduce embryonic mortality during early pregnancy. Basic investigation accomplishment during the employment of synthetic progestins of routine veterinary use and the study of immunologic system interactions in physiological conditions (as the early pregnancy) and pathological events are also reviewed.

## **Agradecimientos**

Los primeros autores agradecen a la D.G.A.P.A.de la U.N.A.M.el apoyo brindado para la realización de este trabajo dentro del Proyecto de PAPIIT (IN 212101).

## **Referencias**

1. **Mc Donald, L.E.**,: Reproducción y Endocrinología Veterinarias. Segunda Edición , *Nueva Editorial Interamericana*, México , D.F.,1986.
2. **Halbert, S.A., Szal, S.E., Broderson, S.H.**: Anatomical bass of a passive mechanism for ovum retention at the ampulloisthmic junction. *Anat. Rec.* 221:841-845,1988.
3. **Hafez, E.S, Tsutsumi T.**: Changes in the endometrial vascularuty during implantation and pregnancy in the rabbit. *Am. J. Anat.* 118:249-282,1966.
4. **Brenner, R.M., West, N.B.**: Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. *Annual Review of Physiology* 37:273-303. 1975.
5. **Fawset, D.W.**: Tratado de Histología . Bloom- Fawcett 11 ed. México D.F. *Interamericana McGraw-Hill* , México D.F.1989.
6. **Brenner, R.M., Maslar, I.A.**: The primate oviduct and endometrium. *Physiol. Reprod.* 1:303-329,1988.
7. **Rumery, R.E., Eddy E.M.**: Scanning electron microscopy of the fimbriae and ampullae of rabbit oviducts. *Anat. Rec.* 178:83-103,1974.
8. **Nayat R.K., Kassira W.N., Albert E.N.**: Light and electron microscopic studies of the porcne fetal uterine tube (oviduct). *Am. J. Vet. Res.* 38:775-786, 1977.

9. **Verhage, H.G., Abel, J.H., Tietz, W.J., Barau, M.D.:** Development and maintenance of the oviductalepithelium during estrous cycle in the bitch.*Biol. Reprod.* 9:460-474,1973.
10. **Verhage, H.G., Brenner, R.M.:** Supression of the oviduct and uterus of the cat. *Endocrinology* 99:101-116,1976.
11. **West, N.B., Verhage, H.G., Brenner, R.M.:** Changes in nuclear estradiol and cell structure during estrous cycles and pregnancy in the oviduct and uterus of cats. *Biol. Reprod.* 17: 138-143,1977.
12. **Murray, M.K.:** Changes in secretory status, cell height and percentage ciliation of epithelial lining of sheep fimbria oviduct during early pregnancy. *J Reprod Fertil.* 106:173-183,1996.
13. **Murray, M.K.:** An estrogen-dependent glycoprotein is synthesize and released from the oviduct in a temporal- and region-specific manner during early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.* 48: 446-453,1993.
14. **Murray, M.K.:** Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol. Reprod.* 53: 653-663,1995.
15. **Murray, M.K.:** Morphological features of epithelial cells in the sheep isthmus oviduct during early pregnancy. *Anatomical Record* 247: 368-378,1997.
16. **Krajnicakova, M., Bekeova, E., Lenhardt, L., Maracek, I., Cigankova, V.:** Evaluation of selected parameters in the oviduct and uterus during puerperal period of ewes. *Slovensky Veterinarsky Casopis.* 24:148-151,1999.



17. **Buhi, W.C., Alvarez, I.M., Kouba, A.J.:** Secreted proteins of the oviduct. *Cell. Tiss. Org.* 166:165-179,2000.
18. **Hunter, R.H.F., Barwse, L., King, R.:** Sperm transport, storage and release in the sheep oviduct in relation to the time of ovulation. *Br. Vet. J.* 138:225-232,1982.
19. **Hunter, R.H.F., Nichol, R.:**Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the cauda isthmus. *J. Exp. Zool.* 228:121-128,1983.
20. **Hunter, R.H.F., Wilmut, I.:** The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. *Anim. Reprod. Sci.* 5:167-173,1983.
21. **Hunter, R.H.F.:** Physiological aspects of sperm transport in the domestic pigs, *Sus scrofa* L. Regulation, survival and fate of cells. *Br. Vet. J.* 131:681-690,1975.
22. **Hunter, R.H.F.:** Pre-ovulatory arrest and pre-ovulatory redistribution of component spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 72:203-21,1984.
23. **Hunter, R.H.F.:** Human fertilization *in vivo*, with special reference to progression, storage and release of competent spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2:329-332,1987.
24. **Marinov, M.F., Petrov, Z.:** Sperm forward movement in female genital tract of sheep. *Vet Med. Nauki.*;20:28-33,1988.
25. **Suarez, S.S., Brockman, K., Lefebvre, R.:** Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod.* 56: 447-453, 1997.

26. **Suarez, S.S.:** Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cell. Tiss. Org.* 168:105-11,2001.
27. **Nagai, T., Moor R.M.:** Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 26:377-382,1990.
28. **Voplgamy, J.K., Sawyer, R.F.Jr.:** Surface transformation of ram spermatozoa in uterine, oviduct and cauda epididymal fluids *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 78: 315-325,1986.
29. **Hunter, R.H.F., Fléchon, J.E.:** Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct, before and after their ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell.* 23:641-656,1991.
30. **Kouba, A.J., Abeydeera, L.R., Alvarez, I.M., Day B.N., Buhi, W.C.:** Effects of porcine oviduct-specific glycoprotein (pOSP) on fertilization and polyspermy (abstract). *Biol. Reprod. (Suppl. 1)* 60:434, 1999.
31. **Kouba, A.J., Abeydeera, L.R., Alvarez, I.M., Day, B.N., Buhi, W.C.:** Effect of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy and embryonic development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 63:242-250,2000a.
32. **Pollard, J.W., Plante, C., King, W.A., Hansen, P.J., Betteridge, K.J., Suárez, S.:** Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol. Reprod.* 44:102-107,1991.
33. **Cooper, G.W., Overstreet, J.W., Kats, D.F.:** The motility of rabbit spermatozoa recovered from the female reproductive tract. *Gamete Res.* 2:35-42,1979.
34. **Jansen, R.P.S.:** Fallopian tube isthmic mucus and ovum transport. *Science* 201:349-351,1978.

35. **Jansen, R.P.S., Bajpai, V.K.:** Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biol. Reprod.* 26:155-168,1982.
36. **Smith, T.T., Yanagimachi, R.:** Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 91:567-572,1991.
37. **Harper MJK.:** Gamete and zygote transport. In *The Physiology of Reproduction*. Second Edition . E. Knobil and J.D. Nell editors. Raven Press N.Y. 1994.
38. **Yanagimachi R.:** Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*. First edition. E. Knobil and J.D. Nell editors. Raven Press N.Y. 1988.
39. **Chang MC, Austin CR, Bedford JM, Brackett BG, Hunter RHF, Yanagimachi R. :** Capacitation of spermatozoa and fertilization in mammals. In : Greep RO, Koblinski MA, eds. *Frontiers in Reproduction and Fertility Control. A Review of the Reproductive Sciences and Contraceptive Development*. Cambridge MA; MIT Press: 434-451,1977.
40. **Enherwald, E., Foote, R.H., Parks, J.E.:** Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol. Reprod. Dev.* 25:195-204,1990.
41. **Harper, M.J.K, Chang, M.C.:** Some aspects of the biology of mammalian eggs and spermatozoa. *Adv. Reprod. Physiol.* 5:167-218,1971.
42. **Ellington, J.E., Meyers-Wallen, V.N., Ball, B.A.:** Establishment of a coculture system for canine sperm and uterine tube epithelial cells. *Veterinary Record.* 136:542-543,1995.
43. **Kawakami, E., Hori, T., Tsutsumi, T.:** Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. *J. Vet. Med. Sc.* 60:197-202,1998.

44. **Corselli, J., Talbot, P.:** *In Vitro* penetration of hamster oocyte-cumulus complex using physiological numbers of sperm. *Dev. Biol.* 122:227-242,1987.
45. **Hunter, R.H.F., Léglise, P.C.:** Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus. *J. Reprod. Fertl.* 24:233-246, 1971a.
46. **Hunter, F.H.F., Léglise, P.C.:** Tubal surgery in the rabbit: fertilization and polyspermy after resection of the isthmus. *Am. J. Anat.* 132 : 145-152, 1971b.
47. **Gandolfi, F., Moor, R.M.:** Stimulation of early embryonic development in the sheep by coculture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertl.* 81:23-28,1987.
48. **Gandolfi, F., Brevini, T.A., Modina, S., Passoni, L.:** Early embryonic signals embryo-maternal interactions before implantation. *Anim. Reprod. Sci.* 28:269-276,1992.
49. **Swanson,W.F., Roth, T.L.:** Godke-RA Persistence of the developmental block of in vitro fertilized domestic cat embryos to temporal variations in culture conditions. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 298-305,1996.
50. **Glass, R.H.:** Fate of rabbit eggs fertilized in the uterus. *J. Reprod.Fertil.* 31: 139-141,1972.
51. **Kapur,R.P., Johnson,L.V.:** Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J. Exp. Zool.* 238:249-260,1986.
52. **Gandolfi, F.,Modina, S., Brevini, T.A., Galli.,C., Moor, R.M., Lauria, A.:** Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida

- perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eu. J. Basic. Appl. Histochem.* 35:383-392, 1991.
53. **Boice ML, McCarthy TJ, Mavrogianis PA, Fazleabas AT, Verhage HG.:** Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*Papio anubia*). *Biol. Reprod.* 1990;43:340-346, 1990.
54. **Lagow, E., DeSouza, M. M., Carson, D.D.:** Mammalian reproductive mucins. *Hum. Reprod. Up.* 5:280-292, 1999.
55. **Kan, F.W.K., St-Joques, S., Blew, G.:** Immunocytochemical evidence for the transfer of an oviductal antigen to the zona pellucida of hamster ova after ovulation. *Biol. Reprod.* 40:585-598, 1989.
56. **Léveillé, M.C., Roberts, K.D., Chevalier, S., Chapdelaine, A., Bleau, G.:** Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.* 36: 227-238, 1987.
57. **Kan, F.W., Roux, E., St-Jacques, Bleau, G.:** Demonstration by lectin-gold cytochemistry of transfer of glycoconjugates of oviductal origin to the zona pellucida of oocytes after ovulation in the hamster. *Anat Rec:* 226: 37-47, 1990.
58. **Abe, H., Oikawa, T.:** Immunocytochemical localization of an oviductal zona pellucida glycoprotein in the oviductal epithelium of the golden hamster. *Anat Rec.* 229:305-314, 1991.
59. **Malette, B., Paquette, Y., Bleau, G.:** Oviductins possess chitinase and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.* 41:384-397, 1995.

60. **Bailly A. Atger M. Atger P. Cerbón MA. Alizon M. Vu Hai MT. Logeat F. Milgrom E.** : The rabbit uteroglobin gene. Structure and interaction with the progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* 258:10384-9, 1983.
61. **Gutierrez-Sagal R. Perez-Palacios G. Langley E. Pasapera AM. Castro I. Cerbón MA.:** Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.* 34:244-9, 1993.
62. **Cerbón MA. Pasapera AM. Gutierrez-Sagal R. Garcia GA. Perez-Palacios G.:** Variable expression of the uteroglobin gene following the administration of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J. Ster. Biochem.* 36:1-6, 1990.
63. **Pasapera AM. Cerbón MA. Castro I. Gutierrez R. Camacho-Arroyo I. Garcia GA. Perez-Palacios G.:** Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. *Biol. Reprod.* 52:426-32, 1995.
64. **Perez-Palacios G. Cerbon MA. Pasapera AM. Castro JI. Enriquez J. Vilchis F. Garcia GA. Morali G. Lemus AE.:** Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 41:479-85, 1992
65. **Castro I. Cerbon MA. Pasapera AM. Gutierrez-Sagal R. Garcia GA. Orozco C. Camacho-Arroyo I. Anzaldúa R. Perez-Palacios G.:** Molecular mechanisms of the antihormonal and antiimplantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Mol. Reprod. Dev.* 40:157-63, 1995.
66. **Krishnan, R.S., Daniel, J.C.:** Blastokinin inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science* 158:490-492, 1967.

67. **García C, Regalado F, López de Haro MS, Nieto A.:** Ultrastructural localization of epididymal secretory proteins associated with the surface of spermatozoa from rabbit *causa epididymis*. *Histochem. J.* 20:708-714,1988.
68. **De la Torre J, López Haro MS, Nieto A.:** Ultrastructural and kinetic studies of uteroglobin secretion in the uterus and oviduct of the pseudopregnant rabbit. *Histochem J.*;19:572-578,1987.
69. **Krischner, C.:** Uteroglobin in the rabbit. Intracellular localization in the oviduct, uterus and preimplantation blastocyst. *Cell. Tissue Res.* 170:415-424,1976.
70. **González, M., García, C., Nieto, A.:** Regional differences in uteroglobin biosynthesis along the rabbit oviduct: immunohistochemical and biochemical studies. *Histochem. J.* 28:209-215,1996.
71. **Miele, L., Cordella-Miele, E., Murkherjee.:** Structure, molecular biology and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor. *Endocrinol. Rev.* 8:474-490, 1987.
72. **Beier, H.M.:** The discovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 923:9-24, 2000.
73. **Muller-Schottle, F., Classen-Linke, I., Alfer, J., Krusche, C., Beier-Hellwig, K., Sterzik, K., Beier, H.M.:** Expression of uteroglobin in the human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 5:1155-1161, 1999.
74. **Sutton R, Nancarrow CD, Wallace ALC, Rigby NW.:** Identification of an Oestrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 72:415-422,1984.

75. **Malayer, L.R., Hansen P.J., Buhi, W.C.:** Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J. Exp. Zool.* 248:345-353,1988.
76. **Nancarrow, C.D., Wallace, A.L., Grewal, A.S.:** The early pregnancy factor of sheep and cattle . *J. Reprod. Fertil.* .1981;30 Suppl.:191-199, 1981.
77. **DeSouza-MM; Murray-M.K.** An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology-Philadelphia.* 136:2485-2496,1995.
78. **Nancarrow, C.D., Hill J.L.:** Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. *J. Reprod. Fertilty Supp* 49: 3-13,1995.
79. **Simmen, F.A., Simmen, R.C.M.:** Peptide growth factors protoncogenesin mammalian conceptus development. *Biol. Reprod.* 44:1-5.1991.
80. **Gandolfi F.** Autocrine, paracrine and environmental factors influencing *embryonic* development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 41:95-100,1994.
81. **Werb, Z.:** Expression of EGF and TGF- $\alpha$  genes in early mammalian development. *Mol. Reprod. Dev.* 27:10-15,1990
82. **Gardner, H.G., Kaye, P.L.:** Insuline increases cell number and morphological development in mouse pre-implantation embryos in vitro *Reprod. Fertil. Dev.*3:79-91, 1991.
83. **Harvey , M.B., Kaye, P.L.:** Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stumulation by insulin and IGF-I through the insulin receptor. *Mol. Reprod. Dev.* 29:253-258, 1991a.



84. **Harvey, MB, Kaye, PL.** Insuline-like growth factor -1 stimulates of growth of mouse preimplantationembryos *in vitro*. *Mol Reprod Dev.* 31:195-199, 1992.
85. **Rappole, D.A., Brenner, C.A., Schultz, R., Mark, D., Werb, Z.:** Developmental expression of PDGF , TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 241:1823-1825,1988.
86. **Harvey, M.B., y Kaye, P.L.:** Visualizaton of insulin receptors on mouse pre-embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*3:9-15, 1991b.
87. **Harvey, M.B., Kaye, P.L.:** Insulin stimulates mitogenesis of the inner cell mass and morphological development of mouse blastocysts. *Development* 110:963-967,1990.
88. **Harvey, M.B., Kaye, P.L.:** IGF-2 receptors are first expressed a the tow-cells stage of mouse development. *Development* 111:1057-1060,1991c.
89. **Lechter, R., Simmen, R.C.M., Bazer, F.W., Simmen, F.A.:** Insuline -like growth factor I expression during early conceptus development in the pig. *Biol. Reprod.*41:1143-1151,1989.
90. **Hofig, A., Michel, F.J., Simmen, R.C.M.:** Constitutive expression of uterine receptors of insuline-like growth factor I during pre-implantation period in the pig. *Biol. Reprod.* 45:533-539,1991a.
91. **Hofig, A., Simmen, F.A., Bazer, F.W., Simmen, R.C.M.:** Effect of insuline-like growth factor -I on aromatase cytochrome P450 activity and estradiol biosynthesis in preimplantation pig conceptuses *in vitro*. *J. Endocrinol.* 130:245-250,1991b.

92. **Murphy, L.J., Ghahary, A.:** Uterine insuline-like growth factor-I: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferaton. *Endocrine Rev.* 11:443-453,1990.
93. **Estrada, J.L., Jones, E.E., Johnson, B.H., Petters, R.M.:** Effect of insulin-like growth factor-I on protein synthesis in porcine embryonic discs cultured in vitro. *Biol. Reprod.* 93:53-61,1991.
94. **Herrler, A., Einspanier, R., Beier, H.M.** Binding of IGF-I to preimplantation rabbit embryos and their coats. *Theriogenology* 47:1595-1607,1997.
95. **Fukui,-Y.; Saito,-T.; Miyamoto,-A.; Yamashina,-H.; Okamoto,-Y.:** Effect of human leukemia inhibitory factor on in vitro development of parthenogenetic bovine morulae. *Theriogenology* 42:1133-1139,1994 .
96. **Han, Y.M. Lee,E.S. Mogue,T., Lee, K.K., Fukui,Y.:** Effect of human leukemia inhibitory factor on in vitro development of IVF-derived bovine morulae and blastocysts. *Theriogenology.* 44:507-516, 1995.
97. **Yang, Y.Q., Kudolo, G.B., Harper, M.J.K.:** Binding of platelet activating factor to oviductal membranes during early pregnancy in the rabbit. *J. Lipid. Med.* 5:77-96, 1992.
98. **Braquet, P.,Touqui, L., Shen, T.Y., Vargafig, B.B.:** Perspectives in platelet-activating research.*Pharmacol. Rev.* 39: 97-145, 1987.
99. **Pinekard, R.N., McManus, L.M., Hanahan, D.J.:** Chemistry and biology of acetyl glyceril ether phosphoryleholine (platelet activating factor). *Ad.Inflammation Res.* 4:147-180, 1982.

100. **Spinks, N.R., Ryan, J.P., O'Neill, C.:** Antagonists of embryo-derived platelet-activating factor act by inhibiting the ability of the mouse embryo to implant. *J. Reprod. Fertil.* 88:241-248, 1990.
101. **Orozco, C., Perkins, T., Clarke, F.M.:** Platelet-activating factor induces the expression of early pregnancy factor in female mice. *J. Reprod. Fertil.* 78:549-555, 1986
102. **Sueoka, K., Dharmarajan, A.M., Myazaki, T., Atlas, S.J., Wallach, E.E.:** Platelet activating factor induced early pregnancy factor activity from the perfused rabbit ovary and oviduct. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159:1580-1584, 1988 a
103. **Morton, H., Hegh, V., Clunie, G.J.A.** Immunosuppression detected in pregnant mice by resette inhibition test. *Nature* 249:459-460, 1974
104. **Morton, H., Morton, D.J., Ellendorff, F.:** The appearance and characteristics of early pregnancy factor in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 68: 437-446, 1983.
105. **Sueoka, K., Dharmarajan, A.M., Michael, E., Atlas, S.J., Wallach, E.E.:** Detection of early pregnancy factor (EPF) using the rabbit ovary and oviduct perfused in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 84:325-331, 1988b.
106. **Koch, E., Morton, H., Ellendorf, F.:** Early pregnancy factor, biology and practical application *Br. Vet. J.* 139:52-58, 1983.
107. **Clarke, F.M., Morton, H., Rolfe, B.E., Gidley-Baird, A.A.:** Partial characterization of early pregnancy factor in the sheep. *J. Reprod. Immunol.* 2: 97-110, 1980.

108. **Rolfe, B.E., Cavanagh, A.C., Forde, C., Bastin, F., Chen, C., Morton, H.:** Modified rosette inhibition test with mouse lymphocytes for detection of early pregnancy factor in human pregnancy serum. *J. Immunol. Methods.* 70:1-11, 1984.
109. **Clarke, F.M., Morton, H., Clunie, G.J.A.,:** Detection and separation of two serum factors responsible for depression of lymphocyte activity in pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* 32:318-323, 1978.
110. **Cooper, D.W., Atken, R.J.:** Failure to detect altered rosette inhibition titres in human pregnancy serum. *J. Reprod. Fertil.* 61:241-245, 1981.
111. **White, A., Heap, R.B.:** Early pregnancy factor. *Nature* 304:121-122, 1983.
112. **Watson, A.J., Hogan, A., Hahnel, A., Wiemwr, K.E., Schultz, G.A.:** Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 87-95, 1992.
113. **Kouba, A.J.; Alvarez, I. M., Buhi, W.C.:** Identification and localization of plasminogen activator inhibitor-1 within the porcine oviduct. *Biol. Reprod.* 62: 501-510, 2000b.
114. **Kouba, A. J.A., Burkhardt, B. R., Alvarez, I. M., Goodenow, M. M., Buhi, W. C.:** Oviductal plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): mRNA, protein, and hormonal regulation during the estrous cycle and early pregnancy in the pig. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 378-386, 2000c.
115. **Pauerstein, C.J., Eddy, C.A., Koong, M.K., Moore, G.D.:** Rabbit endosalpinx suppresses ectopic implantation. *Fertil. Steril.* 54:522-526, 1990.

116. **Tanaka, T., Fujimoto, S., Sakuragi, N., Ichinoe, K.:** Estrogen formation from cholesterol in the rabbit preimplantation blastocysts and corpora lutea in vitro. *Int. J. Fertil.* 33:212-215, 1988.
117. **Heap, R.B., Hamon, M.H., Allen, W.R.:** Oestrogen production by the preimplantation donkey conceptus compared with that of the horse and effect of between-species embryo transfer. *J. Reprod. Fertil.* 93:141-147, 1991.
118. **Wilson, J.M., Zalesky, D.D., Looney, C.R., Bondioli, K.R., Magnes, R.R.:** Hormone secretion by preimplantation embryos in dynamic *in vitro* culture system. *Biol. Reprod.* 46:295-300, 1992.
119. **Chakraborti, C. Davis, D.L., Dey, S.K.:** Estradiol 15  $\alpha$ -hydroxylation a new avenue of estrogen metabolism in peri-implantation pig blastocysts. *J. Steroid. Biochem.* 35:209-219, 1990.
120. **Steffenhagen, W.P., Pineda, M.H., Gnther, O.J.:** Retention of unfertilized ova in uterine tubes of mares. *Am. J. Vet. Res.* 33:2391-2398, 1972.
121. **Betleridge, K.J., Mitchell, D.:** Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *J. Reprod. Fertil.* 39:145-148, 1974.
122. **Flood, P.F., Jong A., Betteridge, K.J.:** The location of eggs retained in the oviducts of mares. *J. Reprod. Fertil.* 57:291-294, 1979.
123. **Weber, J.A., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K., Woods, G.L.:** Prostaglandin E<sub>2</sub> hastens oviductal transport of equine embryos. *Biol. Reprod.* 45:544-546, 1991b.
124. **Bodkne, R.R., Harper, M.J.K.:** Mechanism of egg transport: changes in amount of adrenergic transmitter in the genital tract of normal and hormone treated rabbits. In Segal, S.J., Crozier, R., Corfman, P.A., Condiffe, P.G.

aditores. *The Regulation of Mammalian Reproduction*. NIH Symposium. Springfield, I.L.:364-374, 1973.

125. **Khatchadourian, C., Menezo, Y., Gerard, M., Thibault, T.:** Catecholamines within the rabbit oviduct at fertilization time. *Hum. Reprod.* 2:1-5, 1987.
126. **Ge, Z.H., Spicer, S.S.:** Immunocytochemistry of ion transport mediators in the genital tract of female rodents. *Biol. Reprod.* 38:439-452, 1988.
127. **Ward, J.P., Watson, P.F., Noakes, D.E.:** Chronic *in situ* monitoring of the free calcium ion concentration in the uterine tubes and horns of the sheep. *Comp. Biochem. Physiol.(A)*. 94:765-769, 1989.
128. **Grippio, A.A., Henault, M.A., Anderson, S.H., Killian, G.J.:** Cation concentration in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J. Dairy. Sci.* 75:58-65, 1992.
129. **Ebihara, T., Yoshimura, M.:** Role of endosalpinx in the oviductal environment. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 4:881-887, 1989.
130. **Kim, S.H., Cho, K.W., Kim, S.Z., Koh, G.Y.:** Characterization of the atrial natriuretic peptide system in the oviduct. *Endocrinology* 138:2410-2416, 1997.
131. **Lapointe S, Ahmad I, Buhr MM, Lambert RD, Sirard MA.:** Modulation of postthaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by female genital products. *J. Dairy. Sci.* 79:2155-2162, 1996.
132. **Casida, L.E.:** Fertilization failure and embryonic death in domestic animals. En Earle Eangle ed. *Pregnancy Wastage*, Springfield IL., 1953.

133. **Roberts, M.R., Shalue-Francis, T., Francis, H., Keisler, D.:** Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. *Theriogenology* 33:175-183,1990.
134. **Martal, J., Chene, N., Camous, S. Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P. L., Haridon, R., Charpigny, G., Charlier, .M; Chaouat-G.:** Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod. Fertil-Dev.* 9:355-380,1997.
135. **Anzaldúa-SR, Camacho-Arroyo-I; Garcia-GA; Cerbón-MA.** Differential effects of 5alpha-norethisterone on the histomorphology of the oviduct and uterus of the pregnant rabbit. *Contraception-Stoneham.* 57:349-355,1998.

## **V. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Si las diversas regiones anatómicas del oviducto de la coneja responden de manera distinta a los cambios de las hormonas esteroides de origen ovárico (estrógenos y progesterona) durante los 4 primeros días de la gestación entonces:

Las modificaciones en el número de células PAS+ y PAS-, la altura del epitelio y la expresión relativa del RNAm de los RP, así como su localización inmunohistoquímica, de igual modo las variaciones en los índices de mitosis y apoptosis será diferente en cada una de las regiones analizadas durante este periodo.

## **VI. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la participación de las hormonas esteroides de origen ovárico en las diferentes regiones anatómicas del oviducto de la coneja (fimbria, infundíbulo, ampulla e istmo) durante la gestación temprana (días 1 a 4 de la gestación), a través de correlacionar diversas características histológicas como: número de células PAS+ y células PAS-, altura del epitelio, índices de mitosis y apoptosis, así como la expresión de los RNAm de los receptores a progesterona (RP).

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar el número de células PAS+ y PAS-, del epitelio de revestimiento en las diferentes regiones anatómicas del oviducto: (fimbria, infundíbulo, ampulla e istmo) de los oviductos de conejas durante la gestación temprana
2. Determinar los cambios en la altura del epitelio de revestimiento en las diferentes regiones anatómicas del oviducto: (fimbria, infundíbulo, ampulla e istmo) durante la gestación temprana.
3. Determinar la expresión relativa del RNAm de los receptores a progesterona (RP) por RT-PCR en el ampulla e istmo de los oviductos de conejas durante la gestación temprana.



4. Determinar la localización y distribución inmunohistoquímica de los RP en las diferentes capas histológicas del ampulla e istmo de los oviductos de conejas durante la gestación temprana.
5. Determinar los índices de mitosis y apoptosis del epitelio en las diferentes regiones anatómicas de las conejas durante la gestación temprana.
6. Comparar los diversos parámetros antes mencionados de conejas gestantes durante los 4 primeros días de la gestación con los de conejas adultas no gestantes, en cada una de las regiones anatómicas del oviducto.

## VII. METODOLOGÍA

En las secciones de “Metodología y Resultados”, únicamente se muestran aquellos datos que no aparecen en los artículos correspondientes.

### **a) Animales.**

Todos los procedimientos utilizados se describen en la sección de Materiales y Métodos del artículo “Histomorphological Changes in the Oviduct Epithelium of the Rabbit During Early Pregnancy”.

### **b) Recolección de tejidos**

Todos los procedimientos utilizados se describen en la sección de Materiales y Métodos del artículo “Histomorphological Changes in the Oviduct Epithelium of the Rabbit During Early Pregnancy”.

### **c) Estudios Histológicos**

#### **Determinación de células PAS+ y PAS – y altura del epitelio:**

Todos los procedimientos utilizados se describen en la sección de Materiales y Métodos del artículo “Histomorphological Changes in the Oviduct Epithelium of the Rabbit During Early Pregnancy”.

#### **d) Obtención del RNA total.**

Se realizó la extracción del RNA total del endometrio y de dos regiones del oviducto: ámpula e istmo, de las conejas gestantes y en animales testigo. Por medio de la técnica de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol (Chomcynski, 1987). La concentración del RNA fue determinada por la absorbancia a 260 nm y su integridad fue verificada en geles de agarosa al 1.1% en condiciones desnaturalizantes (en presencia de formaldehído 2.2 M). Solamente se utilizaron las muestras en la que RNA estuviera en perfectas condiciones, es decir, donde se observaran claramente las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 18S y 28S y no se encontrara RNA degradado, ni presencia de DNA.

### **e) Estudio inmunohistoquímico**

Los procedimientos inmunohistoquímicos para el RP se describen en el artículo: “Regional differences in the expression of progesterone receptor in the oviduct and the uterus of the rabbit during early pregnancy”

### **f) Determinación del índice de apoptosis y mitosis:**

Con un microscopio fotónico, se contaron células del epitelio de revestimiento en apoptosis y mitosis. Para esto se evaluaron 10 campos microscópicos, utilizando un aumento total de 400X. En cada campo se contaron 1,000 células (Conti y col. 1981; Nawaz y col. 1987; Anzaldúa y col. 2001).

Los criterios morfológicos utilizados para la mitosis y apoptosis han sido publicados en trabajos previos (Anzaldúa y col. 2001). Se consideraron células en apoptosis cuando presentaron: citoplasma basófilo y condensado, núcleo fragmentado (cariorrhexis), disminución en el volumen citoplasmático, presencia de cuerpos apoptóticos globulares y acidófilos con o sin restos nucleares, que en ocasiones están rodeados por halos claros, según los criterios de Nawaz et al. (1987).

Las células en mitosis presentan forma esférica y cromatina condensada (profase o telofase) o bien la presencia de cromosomas visibles en diferentes fases (prometafase, metafase y anafase) (Alberts y col., 1999; Karp, 1998; Anzaldúa y col. 2001).

Se realizaron algunos ensayos para la determinación de la apoptosis *in situ* mediante el procedimiento de TUNEL en cortes de tejido incluidos en parafina como sigue:

Las muestras se sometieron a permeabilización celular, con una solución de Triton X-100 al 0.1 % en solución de citrato, durante 2 minutos sobre hielo (4 °C)

El siguiente paso consistió en realizar el marcaje, para lo cual las muestras se lavaron dos veces con PBS, se secó el área adyacente al corte y se agregan 50 µl de TUNEL (siglas de "Terminal deoxinucleotidyl transferase TdT dUTP nick end labeling").

El marcaje enzimático *in situ* de la apoptosis es inducido por la fragmentación del DNA. La DNA polimerasa es utilizada para determinar la incorporación de nucleótodos marcados (con fluorescencia) a los fragmentos de DNA *in situ*. La reacción que permite esta incorporación se conoce como reacción de TUNEL. Posteriormente se aplicaron anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina para la identificación celular, para agregar finalmente el

sustrato, como se describe a continuación: las muestras se lavaron 3 veces con PBS, se agregaron posteriormente 50 a 100  $\mu$ l de solución de sustrato para la fosfatasa alcalina. Las muestras se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS.

Finalmente se realizó el montaje y la observación al microscopio fotónico.

**g) Análisis de los datos.**

Se realizó un Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA), seguida de una prueba de t-de Student para determinar diferencias significativas de los datos obtenidos en: número de células PAS+ y PAS-, altura del epitelio, análisis densitométricos de los RP y RE $\alpha$  por RT-PCR y número de células inmunopositivas al RP y células en mitosis y apoptosis. Se utilizó el Programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA, USA) para calcular los valores de probabilidad.

## VIII. RESULTADOS

### **a) Altura y cuantificación de células PAS+ y PAS-:**

Los resultados de la determinación de la altura del epitelio y la cuantificación de las células PAS+ y PAS – se muestran en la sección correspondiente del artículo : “Histomorphological Changes in the Oviduct Epithelium of the Rabbit During Early Pregnancy”

### **a) Índices de mitosis y apoptosis en el epitelio del oviducto:**

Para determinar el índice de recambio del epitelio en las diversas porciones del oviducto, analizamos dos aspectos morfológicos mediante las técnicas descritas en la sección de material y métodos (Mitosis y Apoptosis). El análisis de cortes seriales histológicos de dos series de animales no mostró cambios morfológicos sugestivos de mitosis en el epitelio de las cuatro regiones anatómicas estudiadas.

Se efectuaron análisis de las muestras en paralelo mediante el procedimiento de TUNEL. Se observaron de manera esporádica células marcadas positivamente, sin embargo, debido a que el número de células fue menor del 1% en los días estudiados, no se realizaron más ensayos. Los datos en conjunto sugieren que el índice de recambio es muy bajo en este tejido.

### **c) Expresión de receptores a hormonas esteroides en el oviducto.**

Los resultados correspondientes a la expresión relativa del RNAm para el RP en el ámpula e istmo se encuentran en la sección correspondiente del artículo: “Regional differences in the expression of progesterone receptor in the oviduct and the uterus of the rabbit during early pregnancy”.

### **c) Inmunohistoquímica de los receptores a progesterona.**

Los resultados del estudio inmunohistoquímico de los RP se muestran en la sección correspondiente del artículo: “Regional differences in the expression of progesterone receptor in the oviduct and the uterus of the rabbit during early pregnancy”

## **IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.**

### **a) PRINCIPALES CAMBIOS HISTOMORFOLÓGICOS EN LAS DIVERSAS REGIONES ANATÓMICAS DEL OVIDUCTO DE CONEJAS GESTANTES Y SU POSIBLE PAPEL FUNCIONAL.**

En este estudio se describen por primera vez, las modificaciones histomorfológicas del epitelio de las distintas regiones anatómicas del oviducto de la coneja durante los 4 primeros días de la gestación, así como la expresión relativa del RNAm para el RP y la presencia *in situ* de los RP en el ámpula e istmo, así mismo, se hacen correlaciones funcionales de los hallazgos encontrados.

En este estudio mostramos la existencia de diversos cambios histomorfológicos en las distintas regiones anatómicas del oviducto de la coneja durante los cuatro primeros días de la gestación. La reducción en el número de células PAS+ y el aumento en el número de células PAS- en la fimbria durante este periodo podría asociarse con la captura del óvulo (Land y col., 1987) ya que se considera un proceso no secretor que depende principalmente de las células ciliadas. Esto coincide con el hecho de que la mayoría de las células PAS- de la fimbria en éstos días presentaron cilios. Se ha observado que en la fimbria de conejas gestantes con 61% o más de células ciliadas, los óvulos se transportan en un rango de tiempo normal hacia el ámpula, en cambio, cuando el porcentaje de células ciliadas es del 44% o menos, el óvulo no puede ser transportado (Odor y Bandau, 1973).

El número de células ciliadas no secretoras de la fimbria se incrementó significativamente desde el primer día de la gestación (Lámina 2 del Anexo), lo que coincide con el aumento en actividad ciliar observado en el oviducto de conejas durante la gestación temprana (Borell et al., 1957). En contraste, la altura de las células de la fimbria disminuyó durante este periodo, lo que concuerda con la disminución de la actividad secretora de la fimbria durante la gestación temprana.

Las modificaciones en el número de células secretoras durante el embarazo temprano fue similar en el infundíbulo y el ámpula, ya que en ambos se incrementó significativamente en el día 3. Probablemente estas dos regiones actúen como una misma unidad funcional, pues son indistinguibles desde el punto de vista histológico (Ascher et al., 1986). Erickson-Lawrence et al. (1989) en experimentos *in vitro*, utilizando explantes

provenientes del ámpula de conejas después de un tratamiento combinado de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, observaron una mayor secreción de glucoproteínas sulfatadas ácidas en el día 3 post tratamiento. Este aumento en la actividad secretora se puede relacionar con la producción de algunos factores secretados por el epitelio oviductal que pudieran participar en el desarrollo y crecimiento de los embriones durante la gestación temprana de la coneja (Harper, 1994).

El número de células no secretoras (PAS-) del ámpula se incrementó en el día 1, modificación que puede estar relacionada con los eventos que ocurren en las primeras horas después del coito, como la ovulación y la fecundación que se realiza en la unión istmo-ampular el día 1 de la gestación (Jansen y Bajpai, 1982, Harper, 1994). El transporte del óvulo está determinado por las células ciliadas (no secretoras); en el infundíbulo y ámpula de la coneja el transporte del óvulo es rápido, ya que una vez que ocurre la ovulación tarda entre 4 y 15 minutos en llegar a la región istmo-ampular (Harper, 1994), existen diversos factores que contribuyen a esto, por ejemplo, la secreción del ámpula es más acuosa si se compara con el istmo, debido a que la primera presenta muchos pliegues en la mucosa y por lo mismo una mayor superficie (Lámina 1 del Anexo), esto permite la formación de mayor cantidad de trasudado o extravasación de líquidos (Jansen, 1984), los cuales pueden transportar partículas extracelulares (como el óvulo) gracias al movimiento ciliar. De esta manera estas regiones contribuirían al transporte rápido de óvulo durante la gestación temprana.

Debe establecerse si el incremento de células ciliadas en el infundíbulo y ámpula observado por nosotros en el día 3 de la gestación, es un efecto estrogénico, ya que el tratamiento con estrógenos aumenta el número de células ciliadas del ámpula y la fimbria de la coneja (Rumery y Eddy, 1974), lo anterior puede realizarse mediante un estudio inmunohistoquímico de los receptores a estrógenos.

En la región del istmo observamos un incremento de la actividad secretora del epitelio durante la gestación temprana, a través de diversos parámetros histomorfológicos como son: el aumento en el número de células secretoras (PAS+) (Lámina 2 del Anexo) y el incremento en la altura del epitelio, esta última característica se ha relacionado con el aumento de la actividad secretora de las células epiteliales (Verhage et al., 1979 b, Dones et al., 1985). Este aumento en la actividad secretora coincide con una mayor tiempo de

permanencia de huevo en esta región del oviducto, pues el transporte del huevo mediado por el líquido oviductal hacia el útero disminuye en el istmo (Osada et al., 1999), primeramente es retenido en la unión istmo-ampular 24 horas después de la ovulación (Halsbert et al., 1988), para que en este sitio se lleve a cabo la fecundación, además el huevo fertilizado permanece en el istmo las siguientes 36 horas (Greenwald, 1961; Harper, 1994), para que finalmente entre al útero entre las 60 y 72 h pc (Black y Asdell, 1958; Osada et al., 1999).

Además, se ha mostrado un aumento en la concentración de las proteínas del líquido oviductal de la coneja el día 3 de la gestación (Tucker y Schultz, 1977). Estas observaciones sugieren la posible relevancia fisiológica del líquido oviductal del istmo para el embrión.

Al analizar la actividad mitótica y apoptótica del epitelio oviductal de conejas gestantes, no observamos modificaciones significativas en los índices de mitosis y apoptosis del epitelio oviductal de las distintas regiones anatómicas durante la gestación temprana, a pesar de haber realizado algunos ensayo de TUNEL en parafina, tampoco observamos características morfológicas de mitosis ni apoptosis. A diferencia de otras especies de ovulación inducida, como la gata, en la que durante la gestación temprana hay un aumento de la apoptosis en el epitelio del oviducto (Vergahe et al., 1984).

Nuestros datos sugieren que las variaciones en el número de células PAS+ y PAS- del epitelio de la coneja, no se deben a mecanismos de sustitución en los que primero un tipo celular muere por apoptosis, y después es reemplazado por el incremento por mitosis del otro tipo celular, sino que están relacionadas con una aparente transformación de células PAS+ en células PAS- y viceversa. Esta suposición es apoyada por otros autores (Merchant, 1969; Bondi et al., 1997) que describen la presencia transitoria de "células mixtas" en el epitelio del oviducto de conejas gestantes y pseudogestantes; las "células mixtas" se caracterizan por presentar de manera simultánea cilios y gránulos de secreción, además, Sandoz et al. (1976) y Abe y Oikawa (1993) describen células secretoras en procesos de ciliogénesis en el oviducto de otras especies, como el hámster dorado.

Los cambios histológicos observados en el oviducto de las conejas durante los primeros cuatro días de la gestación, podrías ser influidos por diversos factores, entre los que destacan: la velocidad de transporte del huevo y la actividad secretora en cada región



anat6mica. La presencia del huevo en la luz del oviducto parece ser un factor importante en los cambios histol6gicos, ya que observaciones que hemos realizado en conejas pseudogestantes (tratadas con 100 UI de hCG) no muestran los mismas modificaciones en el n6mero de c6lulas secretoras como en el caso de los animales gestantes, a este respecto Bondi et al., (1997) describen los cambios ultraestructurales del el epitelio oviductal de la coneja despu3s de la administraci3n de gonadotropina cori3nica humana (hCG) desde 9 h post-tratamiento hasta las 72 h post-tratamiento, se muestran evidencias ultraestructurales de una intensa actividad secretora despu3s de la ovulaci3n tanto en el 3mpula como en el istmo y la presencia de “c6lulas mixtas” inducidas por la aplicaci3n de hCG.

Los resultados en conjunto indican que hay una modificaci3n selectiva en las caracteristicas histomorfol6gicas de las distintas regiones anat6micas del oviducto, probablemente relacionadas con la captura, el transporte y la permanencia del 3vulo o del huevo en este 3rgano durante la gestaci3n temprana de la coneja.

#### **b) PRINCIPALES CAMBIOS EN LA EXPRESI3N DE LOS RECEPTORES A PROGESTERONA EN EL 3MPULA E ISTMO DEL OVIDUCTO DE CONEJAS DURANTE LOS PRIMEROS CUATRO D3AS DE LA GESTACI3N.**

En la mujer (Punnonen y Lukola, 1981; Pollow et al., 1981), perra (Lessey et al., 1981), gata (Verhage et al., 1984) y coneja (Puri y Roy 1980b) la concentraci3n de RP en el oviducto (detectados por procedimientos bioqu3micos) es elevada durante la fase folicular o bien durante el predominio estrog3nico, lo mismo ocurre cuando las concentraciones plasm3ticas de P<sub>4</sub> son bajas o incluso indetectables; mientras que disminuyen durante la fase l3tea o despu3s del coito, cuando las concentraciones de P<sub>4</sub> se elevan.

Durante los primeros d3as de la gestaci3n la concentraci3n de RE y RP en las distintas porciones del oviducto se ven influidas por el transporte del huevo durante la gestaci3n temprana (Puri and Roy 1980a; Hyde et al., 1989). Muechler et al. (1976) determinaron mediante procedimientos bioqu3micos que en *O. cuniculus* la concentraci3n de RP disminuye significativamente hasta el sexto d3a de la gestaci3n, pero la concentraci3n de RP nuclear var3a en las distintas regiones anat6micas del oviducto, estas variaciones pueden estar relacionadas con distintos grados de “sensibilidad” a la P<sub>4</sub> en cada regi3n del

órgano y posiblemente sea requerida para el transporte del huevo durante la gestación temprana (Puri and Roy 1980a; Hyde et al., 1989).

En nuestro caso, en el ámpula no observamos cambios significativos en la expresión relativa del RNAm de RP durante la gestación temprana, aunque hubo un ligero incremento en el día 3 de la gestación. Este incremento se reflejó en un incremento significativo del HSCORE del RP en el epitelio y el estroma el día 4 en relación con el grupo control (NG), estos datos sugieren que el control en la expresión de los RP se lleva a cabo principalmente a nivel transcripcional.

En el estudio inmunohistoquímico del RP observamos marca inmunopositiva en las células secretoras y en las células ciliadas del epitelio, lo cual coincide con los hallazgos de otros autores (West, Hess y Brenner 1986; Karbowski et al. 1992) que muestran la coexistencia de los RE y RP en las células secretoras y células ciliadas del endosalpinx (del ámpula e istmo), así como en las células de músculo liso de conejas pseudogestantes. En los primates la presencia de los RP y RE es exclusiva de las células epiteliales secretoras del oviducto y cuando se observa regulación a la baja parece ser mediado de manera paracrina a través de las células del estroma (Brenner, West and Mc Clellan, 1990). También en los primates el incremento en el número de células ciliadas (ciliogénesis), es mediado por las células del estroma o bien por las células secretoras, ya que únicamente en ellas se detectaron los RE (Brenner, West and Mc Clellan, 1990); esta regulación paracrina ha sido confirmada más recientemente en el ratón (Kurita et al. 2000).

Hyde et al. (1989) han informado en el ámpula de conejas OVX células inmunopositivas para los RP de manera escasa, sin embargo cuando estos animales se tratan con E<sub>2</sub> se incrementa notablemente el número de células positivas en células del estroma y músculo, además se observó marca inmunopositiva en algunas células epiteliales del útero, esto no es sorprendente, ya que se sabe que el E<sub>2</sub> induce la síntesis del RP en los tejidos del tracto reproductor (Milgrom et al., 1973; Yacoub et al., 2000).

La expresión relativa del RNAm del RP en el istmo fue significativamente menor los días 3 y 4 en relación con el día 2 de la gestación; la expresión del los RP en el epitelio y del estroma del istmo mostró una disminución significativa del HSCORE en los 4 primeros días de la gestación en comparación con la animales NG, sin embargo en el día 3 se observó un incremento del HSCORE del epitelio en relación con los días 1, 2 y 4. Estos

datos sugieren que en el istmo, la expresión de los RP son regulados en dos niveles: tanto a nivel del RNAm, como a nivel de la síntesis de la proteína. La máxima expresión relativa del RNAm del RP que se observa en el día 2 se refleja en un incremento en la presencia de la proteína *in situ* 24 horas después, es decir, en el día 3, puede concluirse que cuando se observa un incremento del RNAm para el RP, la presencia de la proteína puede identificarse por el HSCORE al día siguiente tanto en el ampulla como en el istmo.

La regulación de los RP en el epitelio del istmo parece ser diferente al de otras porciones del oviducto, ya que en conejas OVX los RP están presentes (Hyde, Blaustein y Black, 1989); cuando estos animales son tratados con E<sub>2</sub> disminuyen las células positivas al RP en el epitelio mientras se incrementa en las células del estroma y el miosalpinx del istmo, esto último también ha sido informado por Perrot-Applanat et. al. (1985), estos datos sugieren que el tratamiento con E<sub>2</sub> provoca regulación a la baja del RP en el epitelio del istmo (Hyde, Blaustein y Black1989). Los resultados de Hyde y col (1989) sugieren una regulación diferencial del RP en el ampulla y en el istmo. El tratamiento con E<sub>2</sub> incrementa el RP en el estroma y músculo del oviducto (ampulla e istmo), pero tiene poco efecto sobre el epitelio del ampulla y disminuye notablemente los RP del epitelio del istmo. El significado biológico de estas diferencias en la regulación del RP es desconocido.

Las variaciones en la presencia de receptores a hormonas esteroides en el miosalpinx y el miometrio pueden tener relevancia fisiológica en el transporte del huevo, aunque los mecanismos por medio de los cuales las hormonas modulan sus efectos en el oviducto son desconocidos (Karbowski et al., 1992). El E<sub>2</sub> potencializa la motilidad del miosalpinx, mientras la P<sub>4</sub> la inhibe (Spilman y Harper, 1974); los efectos de los esteroides es mediado por la acción de mediadores simpáticos y prostaglandinas, sin embargo existen indicios que señalan que los esteroides pueden actuar directamente para modular la contractilidad de éste órgano (Hodgson, Sullivan y Pauerstein , 1973; Kennedy y Marshall, 1977). Los datos de Karbowski pueden adaptarse al concepto de la existencia de una influencia antagónica de los E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> sobre el oviducto para modular el transporte del huevo y que tales efectos pueden ser facilitados por las variaciones de la actividad de los receptores a esteroides por el miosalpinx y el miometrio (Karbowski et al., 1992).

Estas evidencias sugieren que el oviducto debe ser considerado como un órgano heterogéneo en estudios endocrinos, así por ejemplo se sabe que las fimbrias es la porción

más sensible a los cambios morfológicos inducidos por esteroides como son: altura, proporción de células PAS+ y PAS- y presencia de gránulos secretorios, o la regulación de diversos compuestos como son: el péptido natriuretico atrial (y sus receptores) (Kim et al., 1997), la albúmina y la uteroglobina (UTG); en este último caso, se ha informado que no existen diferencias en las distintas regiones del oviducto durante la gestación temprana (Tucker y Schultz, 1977; Krusche y Beier, 1993), estos datos fueron corroborados por nosotros para el ámpula e istmo en ensayos por inmunohistoquímica (Lámina 3 del Anexo) y RT-PCR. Estos datos contrastan con los trabajos de González et al. (1996) quienes han informado diferencias regionales en la expresión de la UTG en conejas no gestantes.

Una importante conclusión de nuestro estudio es que durante la gestación temprana en la coneja la presencia del huevo en las diversas porciones anatómicas del oviducto y el útero coincide con una escasa expresión relativa del RNAm del RP y de su proteína, lo cual sugiere que la acción progestacional no se ejerce de manera directa a través de sus receptores, o bien se ejercen en momentos anteriores a la presencia de los huevos.

Los resultados de este estudio sugieren que en el oviducto de la coneja (*O. cuniculus*) existe diferencias en la expresión de los RP en el ámpula e istmo durante los 4 primeros días de la gestación en comparación con los animales NG, estas diferencias pueden reflejar mecanismos de regulación distintos para estos receptores, en las dos regiones anatómicas estudiadas.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo realizado en el oviducto de la coneja (*O. cuniculus*) podemos concluir lo siguiente:

1. Durante los cuatro primeros días de la gestación disminuyó el número de células epiteliales PAS+ y la altura del epitelio de la fimbria en relación con el oviducto de conejas no gestantes, estas disminuciones pueden estar relacionadas con la captura y el transporte del óvulo.
2. Durante los tres primeros días de la gestación se incrementó el número de células epiteliales PAS+ y la altura del epitelio del istmo en relación con el oviducto de conejas no gestantes, estas modificaciones se pueden indicar un incremento en la actividad secretora del istmo, que se correlaciona con una mayor permanencia del huevo en esta porción.
3. Durante la gestación temprana de la coneja las modificaciones en el número de células epiteliales PAS+ fueron similares en el ampulla e infundíbulo, esto sugiere que ambas porciones se comportan como una misma unidad morfofuncional, estos hallazgos correlacionan con el transporte rápido de huevo en estas porciones.
4. Durante la gestación temprana de la coneja. se observaron diferencias en la altura del epitelio del infundíbulo y el ampulla, lo que sugiere que entre ambas regiones la actividad secretora es diferente.
5. Durante los cuatro primeros días de la gestación de la coneja, no se observaron cambios significativos en los índices de mitosis y apoptosis morfológicos del epitelio, en las distintas regiones anatómicas del oviducto, por lo que las modificaciones observadas en el número de células epiteliales PAS+ y PAS- pueden deberse a procesos de Interconversión entre ambos tipos celulares.

6. Durante la gestación temprana de la coneja, la expresión relativa de los RNAm de los RP y el patrón de expresión inmunohistoquímico de los RP en el endosalpinx es diferente en el ampulla e istmo, lo que sugiere que existan mecanismos de regulación distinta en cada una de estas regiones del oviducto.

## **X. RECOMENDACIONES**

Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan información básica sobre diversas modificaciones morfológicas en las distintas regiones anatómicas del oviducto de la coneja durante la gestación temprana, sin embargo aún quedan por esclarecerse sus implicaciones funcionales y sus posibles interacciones con el huevo, esto último puede estudiarse mediante el empleo de conejas pseudogestantes, ya sea utilizando un modelo natural, mediante el empleo de machos vasectomizados, o bien con el empleo de un modelo farmacológico, induciendo la pseudogestación con hCG (Hegele- Hartung et al., 1992) o con GnRH (Boiti et al., 1999).

Si bien no observamos modificaciones morfológicas significativas en los índices de mitosis y apoptosis del epitelio oviductal de las distintas regiones anatómicas durante la gestación temprana, a pesar de haber realizado algunos ensayo de TUNEL en parafina, es conveniente realizar un mayor número de experimentos, empleando preferentemente dos o más técnicas a fin de conocer si estos procesos tienen una participación fisiológica relevante en los primeros días de la gestación.

Además de los cambios histomorfológicos evaluados en este estudio es conveniente llevar a cabo estudios ultraestructurales durante la gestación temprana, que puedan contribuir a confirmar la suposición respecto a la interconversión de células PAS+ y células PAS-, así como sus mecanismos de regulación en las diferentes porciones del oviducto.

Es de gran relevancia el estudio de los procesos inmunoendocrinos que se realizan en el oviducto, ya que es el sitio donde las condiciones microambientales determinan el éxito de la fecundación y del inicio del desarrollo embrionario, por lo que deben realizarse estudios sobre la dinámica migratoria de diversas células de interés inmunológico, como los linfocitos y sus subpoblaciones, ya que la información que se tiene al respecto es limitada (Oliphant et al., 1984; Otsuki et al., 1989; Pérez-Martínez et al., 2003).

Es conveniente el estudio de diversos compuestos de gran interés en el funcionamiento del oviducto de diversas especies (Nancarrow y Hill, 1995; Lagow et al., 1999; Buhi et al., 2000), como los son: factores de crecimiento, entre ellos el factor activador de plaquetas (PAF) (Sueoka et al., 1988a), el factor de gestación temprana (EPF) (Sueoka et al., 1988b), protoncogenes, el péptido natriurético atrial (Kim et al., 1997), mucinas específicas del oviducto como la MUC 9 (Arias et al., 1994), para correlacionarse con los hallazgos morfológicos del presente estudio, además de su posible participación con el desarrollo embrionario temprano. Cabe destacar el estudio de las cubiertas del embrión y su relación con las glucoproteínas sulfatadas secretadas por el epitelio del oviducto, descritas por diversos autores (Oliphant y Ross, 1982; Verhage et al., 1990), también es relevante el estudio de compuestos que posiblemente inhiban la polispermia en esta especie (Hunter y Léglise, 1971). Muchos de los compuestos antes mencionados describen con más detalle en la revisión titulada “Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano” en la sección titulada “Antecedentes” (Anzaldúa et al., 2003-2004), además pueden consultarse algunas otras revisiones (Pauerstein, 1978; Harper, 1994; ; Lagow et al., 1999; Buhi et al., 2000).

Deben realizarse estudios encaminados a dilucidar la naturaleza y regulación de factor (es) inhibidores de la gestación ectópica del oviducto en la coneja, ya que se sabe que en las especies de mamíferos no primates las gestaciones ectópicas y en particular las tubáricas son muy poco comunes. Pauerstein et al. (1990) utilizaron injertos del endosalpinx de coneja colocados en el útero, observaron que disminuyó el número de sitios de implantación en los cuernos uterinos y ningún sitio de implantación coincidió con las porciones donde se colocaron los injertos de endosalpinx; este tipo de investigaciones son de gran relevancia ya que desde el punto de vista ginecológico en humanos, las gestaciones ectópicas constituyen junto con los problemas de infertilidad, uno de los principales tópicos de interés clínico de las trompas de Falopio (Pauerstein,1978).

Deben realizarse estudios de las distintas isoformas de los RP (isoformas A y B) y confirmar si ambos tipos coexisten en los tejidos oviductales, ya que algunos autores (Vegeto et al., 1993) han postulado que en el caso de la coneja únicamente esta presente en el tracto reproductor femenino la isoforma B; además de conocer sus posibles mecanismos

de regulación. Lo mismo debe hacerse con las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de los RE, como se ha realizado en otros órganos de esta misma especie (Monje y Boland, 2001).

Para conocer de manera más precisa los procesos involucrados en la regulación de la expresión de los RP, se requieren hacer análisis de la concentración de las hormonas esteroides  $P_4$  y  $E_2$  en el fluido de oviducto, a este respecto existe un estudio realizado por Richardson y Oliphant (1981) en conejas pseudogestantes, en el que la concentración de  $P_4$  en el fluido del oviducto presenta un incremento en el día 2, este incremento no se detectó al analizar el suero; mientras que la concentración de  $E_2$  permanece relativamente constante; estudios de estas concentraciones pudieran ser importantes para comprender los mecanismos de regulación en las diferentes porciones histológicas, durante la gestación temprana.

Un campo poco estudiado lo constituye el estudio de compuestos reguladores de los procesos reproductores como son progestinas sintéticas, compuestos antihormonales como antiestrógenos o antiprogestinas, estos estudios pueden contribuir de manera relevante a comprender mejor la participación de las hormonas esteroides en el funcionamiento y morfología de los oviductos, a este respecto hemos documentado las modificaciones en el número de células secretoras y no secretoras del oviducto después del tratamiento con progestinas sintéticas en conejas adultas (Anzaldúa et al., 1998); sin embargo un estudio combinado de compuestos antihormonales durante la gestación temprana permitiría comprender mejor los alcances morfofisiológicos de las hormonas esteroides.



## XI. REFERENCIAS.

Abe H. and Oikawa T. : Effects of estradiol and progesterone on the cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the Newborn Golden hamster. **Anat. Rec.** **35**: 390 - 398 (1993).

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewin, M. Raff, K. Roberts and P. Walter: *Biología Molecular de la Célula*. 4a ed. **Omega**, Barcelona, (2004).

Anzaldúa, A. S.R., M. Pérez-Martínez, Catro, R. I.: Variación en los índices de mitosis y apoptosis del epitelio uterino de la coneja durante los días previos a la implantación. **Téc. Pecu. Méx.** **39**:59-68 (2001).

Anzaldúa, S. R., I. Camacho-Arroyo, G. A. García, and M. A. Cerbón,: Differential effects of 5 $\alpha$  norethisterone on the histomorphology of the oviduct and uterus of the pregnant rabbit. **Contraception** **57**:349-355 (1998).

Anzaldúa A.S.R.; Pérez M.M., Camacho-Arroyo I., Cerbón C.M. Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano” **Ciencia Veterinaria** **9**: 229-268 (2003-2004).

Arias, E. B., H.G. Verhage, and R.C. Jaffe.: Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. **Biol. Reprod.** **51**:685-694(1994).

Ascher, E., P. Madelenat, and D. Rose,: Tubal physiology: structures and functions. *J. Gynecol. Obstet.* **Biol. Reprod.** **15**:717-729 (1986).

Banks, J. W.: *Histología Veterinaria Aplicada. El Manual Moderno*, México, D.F., (1991).

Bereither, M. L. and Verhage H. G.: Control of secretory cell cycle in cat oviduct by estradiol and progesterone. **Am. J. Anat.** **162** : 107 (1981).

Black, D. L., and S. A. Asdell,: Transport through the rabbit oviduct. **Am. J. Physiol.** **192**:63-68 (1958).

Blandau, R.J.: Gamete transport in the female mammal. In *Handbook of Physiology*. Section 7: Endocrinology Vol. II, Female Reproduction System. Part 2 R.O. Greep and E.B. Astwood, eds. **American Physiology Society**, Washinton, D.C. , pp 153-163 (1973).

Boiti C., C. Canali, G. Brecchia, F. Zanon, and E. Faccchin.: Effects of induced endometritis on the life span of corpora lutes in pseudopregnant rabbits and incidence of spontaneous uterine infections related to fertility of breeding does. **Theriogenology** : **52**:1123-1132 (1999).

Boling and Balandau : Egg transport through the ampullae of oviducts of rabbits under various experimental conditions. **Biol Reprod.** **4** : 174-184 (1971).

Bondi, A. M., M. G. Gabrielli, L. Marchetti, G. Materazzi, and G. Menghi,: Cytomorphological changes in the rabbit oviductal epithelium after human chorionic gonadotropin treatment. **Histol. Histopathol.** **12**:135-146 (1997).

Borell, U., O. Nilsson, and A. Westman,: Ciliary activity in the rabbit fallopian tube during oestrus and after copulation. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.** **36**:22-28 (1957).

Brenner , R. M. and West N.B. : Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. **Annual Review of Physiology** **37**: 273-303 (1975).

Brenner R. M. and Maslar I. A. : The primate oviduct and endometrium. in *The Physiology of Reproduction Vol.1* : 303-329. Second edition. Knobil E. and J.D. Neill editors. **Raven Press** New York, (1988).

Brenner R.M., N.B. West, R.L.Norman, B.A. Sandow, and H.G. Verhage, : Progesterone suppression of the estradiol receptor in the reproductive tract of macaques, cats and hamsters. **Adv. Exp. Med. Biol.** **117**:173-196 (1979).

Brenner R.M, N.B, West, and M.C. McClellan,: Estrogen and progesterone receptors in the reproductive tract of male and female primates. **Biol. Reprod.** **42**:11-19 (1990).

Brenner R.M. and Slayden O.D.: Cyclic changes in the primate oviduct and endometrium. *The Physiology of Reproduction.* 541-569. Second Edition. Knobil and Neill editors. **Raven Press, Ltd, New York 1994.**

Browning J. Y.; Keyes P. L. and Woli R.C.: Comparison of serum progesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone and estradiol- 17 $\beta$  in pregnant and pseudopregnant rabbits: evidence for postimplantation recognition of pregnancy **Biol Reprod** **23**: 1014-1019 (1980).

Brundin J.: Distribution and function of adrenergic nerves in the rabbit fallopian tube. **Acta Physiol Scand** **66**: Suppl 259, 57pp (1965).

Buhi, W.C., I.M. Alvarez, and A.J. Kouba.: Secreted proteins of the oviduct. **Cell. Tiss. Org.** **166**:165-179 (2000).

Conti J., Giménez-Conti I.B., Zerbe, G.O., Gerschenson, D.E.: Differential effects of estradiol 17- beta and progesterone on the proliferation of glandular and luminal cells of rabbit uterine epithelium. **Biol Reprod** **24**:643-648 (1981).

Challis J.R., I. J. Davies and Ryan K. J.: The concentrations of progesterone, estrone and estradiol-17- $\beta$  in the plasma of pregnant rabbits **Endocrinology** **93**: 971-976 (1973).

Chomcyski, P., and N. Sacchi,: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. **Anal Biochem.** **162**:156-159 (1987).

Donnez J. , Casanas-Roux, F. , Caprasse J. , Ferin J. and Thomas K. : Cyclic changes in ciliation , cell height , and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. **Fertil. Steril.** **43** : 554 (1985).

El Bana A.A. ,Sacher B.: A study on steroid hormone receptors in the rabbit oviduct and uterus during first few days after coitus and during egg transport. **Biol. Reprod.** **17**:1-8 (1977).

Erickson-Lawrence, M. F., T. T. Turner, T. S. Thomas, and G. Oliphant,: Effect of steroid hormones on sulfated oviductal glycoprotein secretion by oviductal explants *in vitro*. **Biol. Reprod.** **40**:1311-1319 (1989).

Eriksen, T. G., P. Terkelsen, Hyttel, and T. Greve, 1994: Ultrastructural features of secretory cells in the bovine oviduct epithelium. **Anat. Embryol. (Berl)** **190**, 583-590 (1994).

Fawcett, D.W.: Sistema reproductor femenino en Tratado de Histología Bloom-Fawcett. 11<sup>a</sup> edición. Interamericana **McGraw-hill**, México D.F., (1988).

Fuentealba B., M. Nieto, H.B., Croxatto,: Estrogen and progesterone receptors in the oviduct during egg transport in cyclic and pregnant rats. **Biol. Reprod.** **39**,751-757(1988).

García-Ximénez F. Biología de la Reproducción en la hembra del coneja doméstico. **Universidad Politécnica de Valencia**, España, (1991).

González, M., C. García, and A. Nieto,: Regional differences in uteroglobin biosynthesis along the rabbit oviduct: immunohistochemical and biochemical studies. **Histichem. J.** **28**:209-215 (1996).

Greenwald, G. S. : Endocrine regulation of the secretion of mucin in the tubal epithelial of the rabbit. **Anat. Rec.** **130**:477-495 (1958).

Greenwald, G.S.: A study of the transport of ova through the rabbit oviduct. **Fertil Steril.** **12**:80-95 (1961).

Hafez E.S. E. : Reproduction in farm animals . 4 th edition **Lea & Febiger** , Philadelphia, (1980).

Hafez, E. S. E. : Endocrine control of the structure and function of the mammalian oviduct. **Handb. Physiol. Sect.** **7**:97-122 (1972).

Halsbert, S.A., S.E. Szal, and S.H. Broderson,: Anatomical basis of a passive mechanism for ovum retention at the ampulloisthmic junction. **Anat. Rec.** **221**: 841-845 (1988).

Hanscom, D., and G. Oliphant,: Hormonal regulation of incorporation of <sup>35</sup> S into macromolecules of oviduct fluid. **Biol. Reprod.** **14**:599-604 (1976).

Harper M.J. K., : Gamete and zygote transport. In *The Physiology of reproduction*. Second edition. Knobil E. and J.D. Nell editors. **Raven Press** New York, (1994).

Harper M.J. K.: The mechanisms involved in the movement of newly ovulated eggs through the ampulla of the rabbit fallopian tube. **J. Reprod. Fertil.** **2**: 522-524 (1961).

Harper M.J.K.: Hormonal control of transport of eggs in cumulus through the ampulla of the rabbit oviduct. **Endocrinology** **78**:568-574 (1966).

Harper M.J.K.: Transport of eggs in cumulus through the ampulla of the rabbit oviduct in relation to day of pseudopregnancy. **Endocrinology** **77**: 114-123 (1965).

Harper, M.J.K. : An autoradiographic method for the study of egg transport in the rabbit fallopian tube. **J. Reprod. Fertil.** **1**:249-267 (1960).

Hegele-Hartung C., K. Chwalisz, H.M. Beier: Distribution of estrogen and progesterone receptors in the uterus: an immunohistochemical study in the immature and adult pseudopregnant rabbit. **Histochemistry (Germany)** **97**:39-50 (1992).

Hodgson B. J., and C.J. Pauerstein.: Comparition of oviductal transport of fertilized and unfertilized ova after hCG or coitus-induced ovulation in rabbits. **Biol Rerprod** **14**:377-380 (1976).

Hodgson, B.J., K. B. Sullivan, and C. J. Pauerstein,: The role of sympathetic nerves in the response of uterus and oviduct to field stimulation. **Europ. J. Pharmacol.** **23**:107-110 (1973).

Hunter, F.H.F., Léglise, P.C.: Tubal surgery in the rabbit: fertilization and polyspermy after resection of the isthmus. **Am. J. Anat.** **132**:145-152 (1971).

Hyde B. A. , Blaustein J.D. and Black D.L.: Differential regulation of progestin receptor immunoreactivity in the rabbit oviduct. **Endocrinology** **125**:1479-1483 (1989).

Ishijima, Y., M.Ito, T. Hirabayashi, and Y.Sakuma,: Effect of the estrogen pretreatment on the induced superovulation by PMS in rabbits. II Experiments on the speed of ova descending the genital tract and cleavage-rate of ova. **Jap. J. Anim. Reprod.** **13**:71-75 (1967).

Iwai T., S. Funjii, Y. Nanbu, H. Nonogaki, I. Konishi, T. Mori, and H. Okamura,: Effect of human chorionic gonadotropin on then expression of progesterone receptor and estrogen

receptor in rabbit ovarian granulosa cells and the uterus. **Endocrinology** **129**:1840-1848 (1991).

Jansen, R. P. S., and V. K. Bajpai,: Oviduct acid mucus in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. **Biol. Reprod.** **26**:155-168 (1982).

Jansen, R.P.S.,: Endocrine response in the fallopian tube. **Endocr. Rev.** **5**:525-551 (1984).

Karbowski B., E. Vollmer and P.G. Schneider,: Steroid receptors in the fallopian tube – morphological and functional investigation in rabbits. **Prog. Histo. Cytochem.** **26**: 140-144 (1992).

Karp, G.: Biología Celular y Molecular. **Mc Graw Hill, Interamericana**, México D.F. (1998).

Kennedy D.R. and J.M. Marshall,: Effect of adrenergic nerve stimulation on the rabbit on the rabbit oviduct : correlation with norepinephrine content and turnover rate. **Bio. Reprod.** **16**:200-211 (1977).

Kim, S.H., K.W. Cho, S.Z. Kim, and G.Y. Koh.: Characterization of the atrial natriuretic peptide system in the oviduct. **Endocrinology** **138**:2410-2416 (1997).

Krusche, C., and H.M. Beier,: Localization of uteroglobin mRNA during early pregnancy in the uterus and oviduct of the rabbit. **J. Reprod. Fertil. Abstracts series** **12**. Abst 77, p.44 (1993).

Kurita T., Lee-KiJun, P.S. Cooke, J.A. Taylor, D.B. Lubahn, G.R. Cunha, and K.J. Lee,: Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. **Biol. Reprod.** **62**:821-830 (2000).

Lagow, E., M.M. DeSouza, and D.D. Carson.: Mammalian reproductive tract mucins. **Hum. Reprod. Up.** **5**:280-292(1999).

Lambert, J. C., C. E. Hamner, and G. L. Gemmili, 1973: Ultrastructural study of secretion in the rabbit oviduct under different hormonal influences. **Fed. Proc.** **32**,13 (1973).

Land, J. A., J. L. Evers, W. D. Boeckx, and L. A. Brosens,: Ovum transport after microsurgical anastomosis of the rabbit oviduct. **J. Reprod. Med.** **32**,103-106 (1987).

Lessey B. A. and Gorell T.A.: Analysis of the progesterone receptor in the beagle uterus and oviduct. **J. Steroid. Biochem.** **13**:1173-1180 (1979).

Lessey B.A, R. Wahawisan, and T.A. Gorell.: Hormonal regulation of cytoplasmic estrogen and progesterone receptor in the beagle uterus and oviduct. **Mol. Cell. Endocrinol.** **21**:171-180 (1981).

Merchant, H., 1969: Secretory granules in ciliated cells of the rabbit oviduct. **Exp. Cell. Res.** **56**:171-172 (1969).

Milgrom E., L. Thi, M. Atger, and E.E. Baulieu,: Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor (s) in the uterus. **J. Mol. Biol.** **248**:6366-6374 (1973).

Monje, P., and R. Boland: Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. **J. Cell. Biochem.** **82**:467-479 (2001).

Muechler, E.K., G.L. Flickinger, L.Jr. Mastroianni, and G. Mikhail,: Progesterone binding in rabbit oviduct and uterus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **151**:275-279 (1976).

Murray, M. K., 1997: Morphological features of epithelial cells in the sheep isthmus oviduct during early pregnancy. **Anat. Rec.** **47**:368-378 (1997).

Nancarrow, C.D. and J.L. Hill.: Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. **J. Reprod. Fertil. Supp.** **49**:3-13 (1995).

Nawaz, S., P.M. Lynch, P. Galand, and L.E. Gerschenson,: Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium. **Am. J. Pathol.** **127**:51-59 (1987).

Odor D.L.: Estrogen and ciliogenesis in the infundibulum of the rabbit oviduct. **Anat. Rec.** **163**:236 (1969).

Odor, D. L., and R. J. Blandau,: Egg transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. **Fertil. Steril.** **24**:292-300 (1973).

Odor, D.L.: Cyclic changes in ciliation of the oviductal epithelium in pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*). **Am. J. Anat.** **153**: 345-366 (1978).

Odor D. L., Gaddum-Rosse P. , Rumery R. E. , and Blandau R.J. : " Cyclic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual cycle and after estrogen treatment in the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*". **Anat Rec.** **198**:35 - 57 (1980).

Oliphant, G. Ch. Cabot, P. Ross, and J. Marta.: Control of the humoral immune system withing the rabbit oviduct. **Biol. Reprod.** **31**:205-212 (1984).

Oliphant, G., and P. R. Ross,: Demonstration of production and isolation of three sulfated glycoproteins from the rabbit oviduct. **Biol. Reprod.** **26**:537-544 (1982).

Osada, H., I. Tsunoda, M. Matsuura, K. Satoh, K. Kanayama, and Y. Nakayama,: Investigation of ovum transport in the oviduct: the dynamics of oviductal fluids in domestic rabbits. **J. Int. Med. Res.** **27**:176-180 (1999).

Otsuki, Y., Y. Maeda, S. Magari, and O. Sigimoto.: Lymphatics and lymphoid tissue of the fallopian tube: immunoelectronmicroscopic study. **Anat. Rec.** **225**: 288-296 (1989).

Patek, E.: The epithelium of the human fallopian tube. **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.** **53**: Suppl. 31 (1974).

Pauerstein, C.J.: From Fallopius to fantasy. **Fertil. Steril.** **30**:133-140 (1978).

Pauerstein, C.J., Eddy, C.A., Koong, M.K., Moore, G.D.: Rabbit endosalpinx suppresses ectopic implantation. **Fertil. Steril.** **54**:522-526 (1990).

Pérez-Martínez, M., M.C. Romano, and A. S. Anzaldúa : Migración regionalizada de los linfocitos totales en las tubas uterinas de la coneja en los primeros cuatro días de la gestación., Memorias C-20 p. 87, **XLVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas** Aguascalientes, México (2003).

Perrot-Appianat M, F. Logeat, M.T. Groyer-Picard and E. Milgrom,: Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. **Endocrinology** **116**:1473-1484 (1985).

Pollow K., Inthraphuvasak J., Manz B., Grili, H. and Pollow B.: A comparison of cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human fallopian tube and endometrial tissue. **Fertil. Steril.** **36**:615 - 622 (1981).

Punnonen, R. and Lukola , A.: Binding of estrogen and progestin in the human fallopian tube. **Fertil. Steril.** **36**: 610-614 (1981).

Puri R.K., and S.K. Roy, 1981: Estradiol binding in different parts of the rabbit oviduct during egg transport. **Endokrinologie** **78**:12-20 (1981).

Puri, R.K. and Roy S.K. : Progesterone nuclear receptors in different parts of rabbit fallopian tube and uterus during ovum transport. **Ind. J, Exp. Biol.** **18** : 553-555 (1980 a).

Puri R.K. and Roy S.K. : The cytosol receptors for progesterone in the different parts of rabbit fallopian tube and uterus during ovum transport. **J. Biosci.** **2**:355-360 (1980 b).

Ramírez, V. D., and W. L. Soufi. : The neuroendocrine control of the rabbit ovarian cycle. En *The Physiology of Reproduction*. Second Edition . Edited by E. Knobil and J. D. Neil. **Raven Press, Ltd.** New York, (1994).

Richardson, L.L., and G. Oliphant.: Steroid concentrations in rabbit oviductal fluid during oestrus and pseudopregnancy. **J. Reprod. Fert.** **62**:427-431 (1981).

Rotello, R.J., R.C. Liberman, R.B. Lepoff, and L.E. Gerschelson.: Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU-486. **Am. J. Pathol.** **140**:449-456 (1992).

- Rumery, R. E., and E. M. Eddy,: Scanning electron microscopy of the fimbriae and ampullae of rabbit oviducts. **Anat. Rec.** **178**:83-103 (1974).
- Sandoz, D., E. Boisvieux-Ulrich, C. Laugier, and E. Brad: Ciliogenese dans les cellules a mucus de l'oviducte de caille. II. Controle hormonal. **J. Cell. Biol.** **71**:460-471 (1976).
- Spencer,T.E., and F.W. Bazer. : Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biol. Reprod.** **53**:1527-1543 (1995).
- Spilman C.H., and M.J.K. Harper, 1974: Comparison of the effects of adrenergic drugs and prostaglandins on rabbit oviduct motility. **Biol. Reprod.** **10**:549-554.
- Spilman, C. H., and J.W. Wilks,: Peripheral plasma progesterone during egg transport in the rabbit. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **151**:726-729 (1976).
- Sueoka K., A.M. Dharmarajan, E. Michael, S. J. Atlas, and E.E. Wallach: Detection of early pregnancy factor (EPF) using rabbit ovary and oviduct perfused *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.** **84**:325-331(1988b).
- Sueoka K., A.M. Dharmarajan, T. Miyzaki, S. J. Atlas, and E.E., Wallach: Platelet activating factor activity from the perfused rabbit ovary and oviduct. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **159**:1580-1584(1988a).
- Tsutsumi Y., and E.S.E. Hafez,: Distribution patterns of rabbit embryos during preimplantation satge. **J. Morphol.** **144**:323-336 (1974).
- Tucker, E. B., and G. A. Schultz,: Temporal changes in proteins of oviduct and uterine fluids during the preimplantation period in the rabbit. **Biol. Reprod.** **17**:749-759 (1977).
- Vegeto E., M.M. Shabaz, D.X. Wen, M.E. Goldman, B.W. O'Malley, and D.P. Mc Donell: Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. **Mol. Endocrinol.** **7**:1244-1255 (1993).
- Verhage H. , Magrovianis P., Boice M. , Fazleabas A.: Oviductal epithelium of the baboon: hormonal control and the immuno-gold localization of oviduct-specific glycoproteins. **Am. J. Anat.** **187**:81-90 (1990).
- Verhage H.G. ; Murray M.K.; Boomsma R.A.; Rehfeldt P.A. and Jaffe R.C.: The postovulatory cat oviduct and uterus: correlation of morfological features with progesterone receptor levels. **Anat. Rec.** **208**:521-531 (1984).
- Verhage H.G., Akbar M. and Jaffe R.C. : Cytosol and nuclear progesterone receptor cat uterus and oviduct. **J. Steroid Biochem** **11**:1121-1128 (1979 a).



Verhage H.G., Bareither M.L. , Jaffe R.C. and Akbar M. : Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. **Am. J. Anat.** **156**:505-522 (1979 b).

Vermeirsch-Hilde, W. Van-den-Broeck, M. Coryn, and P. Simoens,: Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in the canine uterine tube and their relation to sex steroid hormone concentrations. **Reprod. Fertil. Devel.** **14**,241-250 (2002).

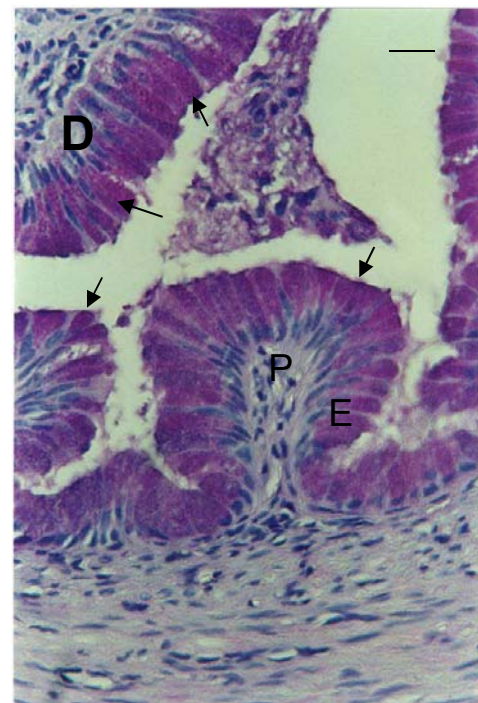
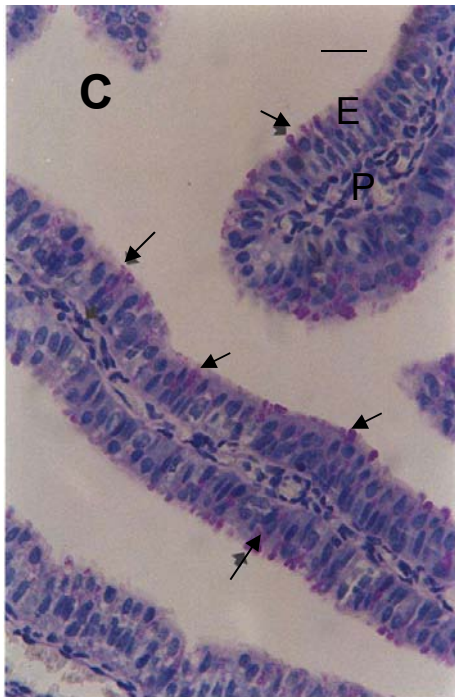
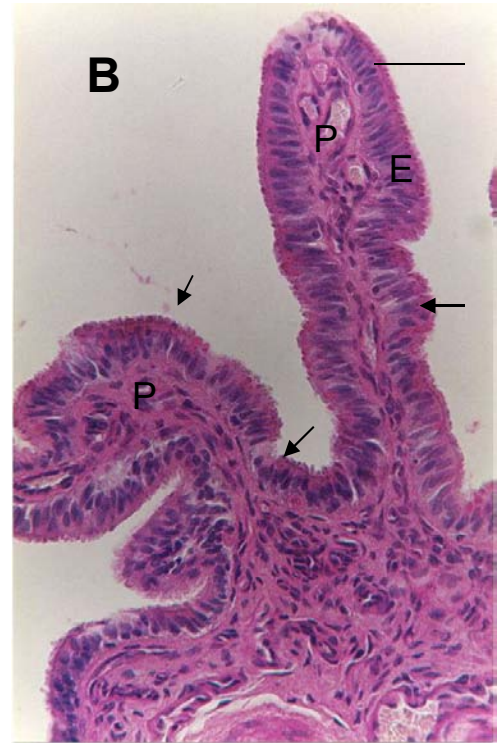
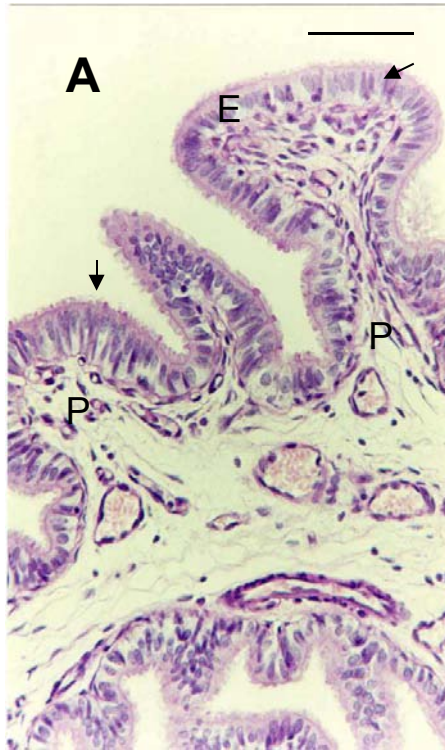
West , N.B. , Verhage H.G. and Brenner R. M.: Supreession of estrogen receptor system by progesterone in the oviduct and uterus of the cat. **Endocrinology** **99**:1010-1016 (1976).

West N.B., D.L. Hess, and R.M. Brenner,: Differential suppression of progesterone receptor by progesterone on the reproductive tract of primate macaques. **J. Steroid. Biochem.** **25**,497-503 (1986).

Yacoub, D., Y. D. Chan-Kay, B. D. Greenstein, E. de-Fougerolles-Nunn, A. Khamashta-Munther, and R.V. Hughes-Graham,: Impaired estrogen priming of progesterone receptors in uterus of MRL/MP-lpr/lpr mice, a model of systemic lupus erythematosus (SLE). **Int. J. Immunopharm** **22**:537-545 (2000).

Zhang-WeiHua; Saji-S; Makinen-S; Cheng-G; Jensen-EV; Warner-M; Gustafsson-JA; Zhang-WH,: Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. **Proc. Nat. Acad. Sc.U. S.A.** **97**:5936-5941 (2000).

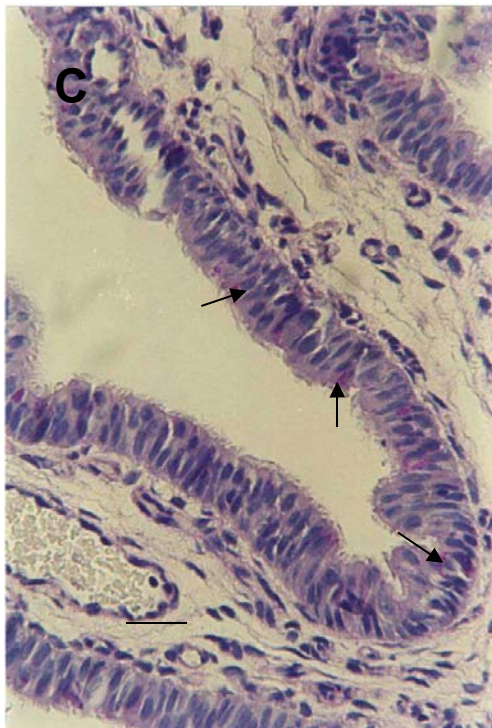
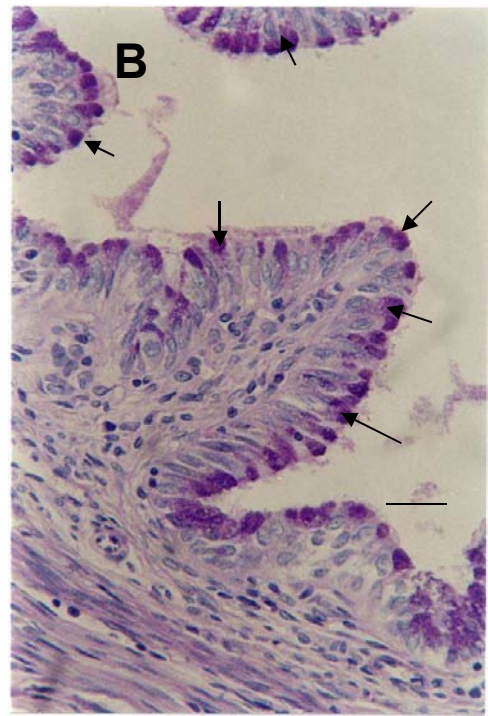
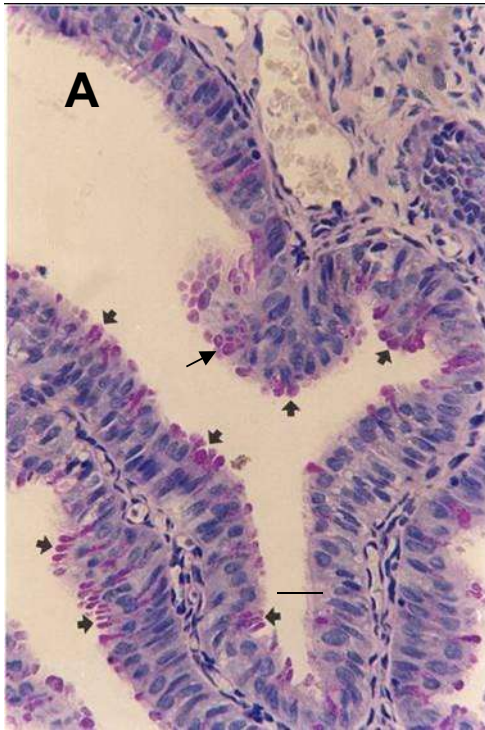
# LÁMINA 1: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LAS CUATRO REGIONES ANATÓMICAS DEL OVIDUCTO DE LA CONEJA



Endosalpinx de la Fimbria (A), Infundíbulo (B), Ámpula (C) e Istmio (D), Pueden distinguirse las células PAS+ (flechas) y PAS- en el epitelio (E), además de los Pliegues (P) en las diferentes regiones. Barras A y B: 50  $\mu$ m, C y D: 20  $\mu$ m.



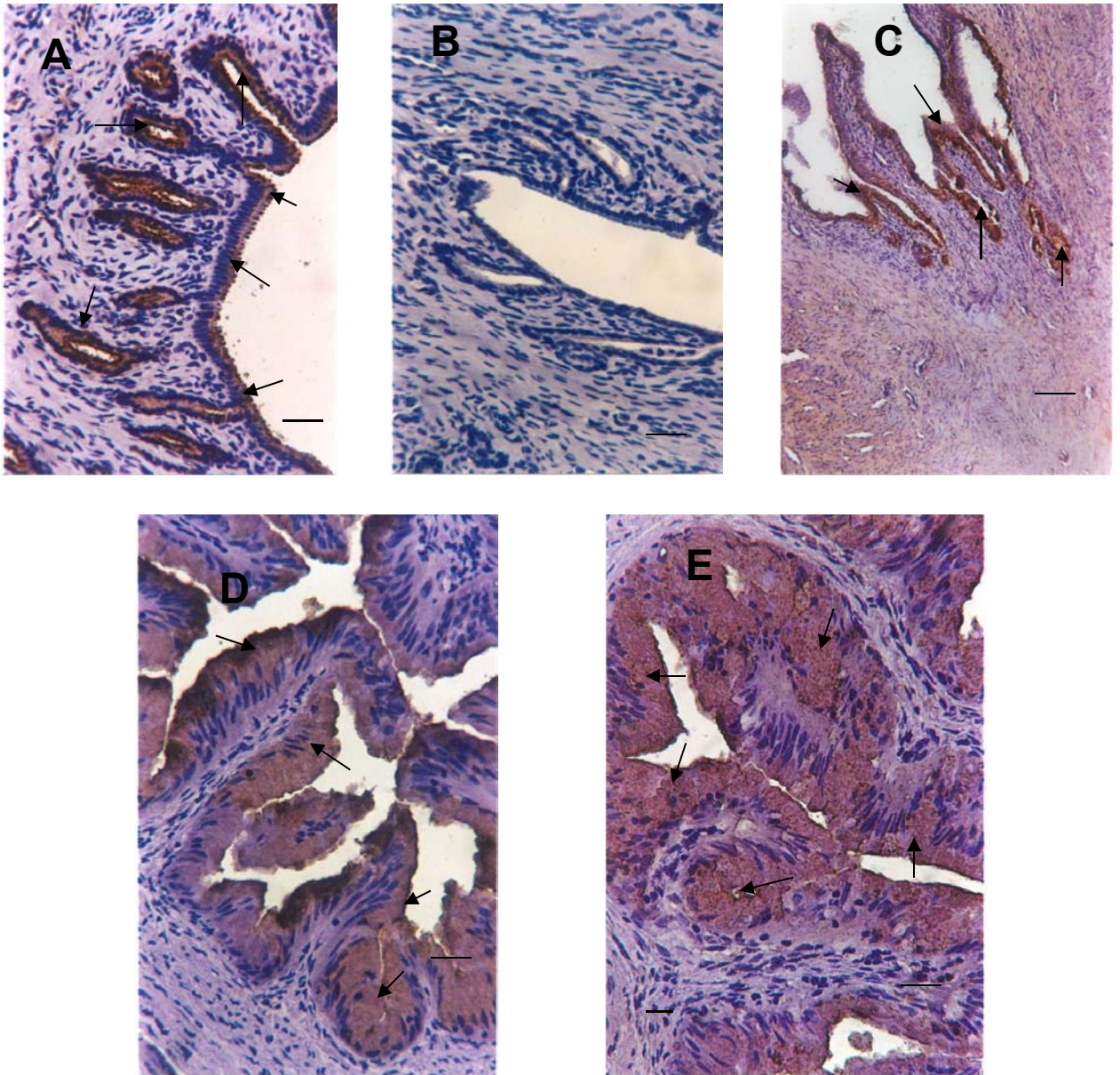
## LÁMINA 2: CELULAS PAS+ Y PAS- EN EL OVIDUCTO DE LA CONEJA DURANTE LA GESTACIÓN TEMPRANA



Células Pas+ (flechas) y PAS- en la Fimbria (A) e Istmo (B) de conejas no gestantes; así como Fimbria (C) e Istmo (D) de conejas en el día 2 de la gestación. Barra: 20  $\mu$ m



### LÁMINA 3: LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UTEROGLOBINA EN EL ÚTERO Y EN DOS REGIONES DEL OVIDUCTO: ÁMPULA E ISTMO.



Marca inmunopositiva de uteroglobina (flechas) en el endometrio de conejas no gestantes (A) y en el día 5 de la gestación (C), Ámpula e Istmo de conejas en el día 4 de la gestación (D y E). Control negativo de un corte seriado de útero (B). Barras: A, B, D y E 20  $\mu$ m, C 50  $\mu$ m.