



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ESTUDIO HISTOMORFOLÓGICO Y ANÁLISIS
INMUNOHISTOQUIMICO DE LOS RECEPTORES A
PROGESTERONA Y ESTRÓGENOS DE LAS TUBAS UTERINAS
DE CERDAS SOMETIDAS A DIFERENTES TRATAMIENTOS
SUPEROVULATORIOS.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ILDEBERTO SÁNCHEZ HERRERA

Tutor:

María Elena Trujillo Ortega

Comité Tutoral:

María de Lourdes Juárez Mosqueda
Miguel Ángel Cornejo Cortés



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

A mi Tío, Juan Francisco Herrera Torres (Chico), por ayudarme cuando estaba en problemas, ¡algún día nos veremos!

A mis dos amores Alejandra Lugo, por apoyarme en todo lo que me propongo y darme lo más grande en mi vida a María Fernanda, mi nena, que llegaste a cambiar mi vida y que cada día que sonrío, le agradezco a Dios por sentir esa gran felicidad.

A mis padres que siempre han estado ahí, para darme sus consejos y su gran amor.

A mi hermano Isaías. ¡Qué puedo decir!, eres único y me da gusto ver que has superado problemas para estar donde estas, sabes lo mucho que te quiero.

A mi hermana Paola por ser tan linda y por su gran amistad.

A esos animales que dieron su vida para que pudiéramos realizar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Trujillo, por darme esa gran oportunidad de ser su tutorado, ya que el día que fui a tocar esa puerta, ella sin pensarlo la abrió. Y que con su gran paciencia, tranquilidad, me guio para terminar esto, mil gracias Dra.

A la Dra. Lourdes Juárez por darme sus comentarios oportunos, por su amistad y por ser como es.

Al Dr. Miguel Ángel por decirme algo muy importante -“No te preocupes, ocúpate, que tendrá que salir el experimento”. Gracias si funcionó.

A mi gran amigo, mi consejero, al Dr. Santiago “Chany”, que puedo decir, faltarían palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí.

Al Dr. Roberto Martínez, por darme la oportunidad de trabajar en Jilotepec, en el CEIEPP. Por su tiempo y su apoyo.

Al gran grupo de trabajo de Jilotepec, Levy, Alector, Lourdes “Chica”, Gaby, Habakuk, Carmen, Jaz, Félix, Mari, Lourdes “grande”, Rosa, Ernesto, David, Usiel, Mariana y Eunice, ya que sin ellos no hubiera podido continuar en el proyecto, gracias chavos, no lo olvidaré.

A Oscar Gutiérrez, maestro gracias por todas tus enseñanzas, por tus comentario puntuales.

A la Dra. Rosy Viguera y a su grupo de trabajo en pediatría, ya que me ayudaron en mi técnica.

A la Dra. Ícela, que apareciste en ese momento tan oportuno.

A Ángel Lozada, tú sabes el porqué amigo.

A Francisco López, mil gracias por todo tú apoyo en las técnicas, el procesamiento y corte. Ya que sin tú apoyo no hubiera continuado con mi trabajo.

A esa persona que me aconsejo hacer la maestría, ¡Qué bueno que te hice caso!

RESUMEN

ESTUDIO HISTOMORFOLÓGICO Y ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS RECEPTORES A PROGESTERONA Y ESTRÓGENOS DE LAS TUBAS UTERINAS DE CERDAS SOMETIDAS A DIFERENTES TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS. Sánchez-Herrera I, Trujillo OME, Juárez-Mosqueda ML, Cornejo CMA. El propósito de este trabajo, fue el investigar los cambios en la proporción de células secretoras y no secretoras y en la expresión de receptores a progesterona y estrógenos en el endosapinx de la cerda en respuesta a tratamientos superovulatorios con eCG y hCG. Durante la gestación temprana, el oviducto presenta modificaciones estructurales y funcionales como son ciliogénesis y actividad secretora, las cuales son relevantes para las funciones reproductivas en las que participa como fecundación, transporte de gametos, capacitación espermática y desarrollo embrionario inicial, que son parcialmente reguladas por los esteroides sexuales a través de sus receptores. Los animales se dividieron en los siguientes grupos de acuerdo con distintos tratamientos superovulatorios como sigue: 17 días después de haberse presentado el celo los animales se trataron con una inyección intramuscular (IM) de SSF (grupo 1), 400 UI de eCG + 200 UI de hCG (grupo 2), 1000 UI de eCG (grupo 3 y 4) respectivamente; 72 horas después de la primera aplicación, se aplicó IM SSF (grupo 1 y 2), 500 UI de hCG (grupo 3) y 1000UI de hCG (grupo 4) respectivamente. En este trabajo se estudió la proporción de células secretoras y no secretoras del epitelio del endosalpinx por medio de la técnica de PAS (Acido Peryodico de Shiff) también se determinó la expresión del receptor a progesterona (RP) y estrógenos alfa ($RE\alpha$) por inmunohistoquímica (puntaje histológico:

HSCORE) en dos porciones de la tuba uterina: ámpula e istmo,, estas cuantificaciones de las células PAS+ y PAS- y los resultados del HSCORE se sometieron a un análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA), seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los tratamientos superovulatorios modificaron el número de células PAS + y PAS- en las dos regiones anatómicas analizadas: en el ámpula produjeron una disminución en las células PAS (+) en el día 1 y un incremento de la células PAS (-) en el día 2; en el istmo del día 1 las dosis bajas de eCG y hCG provocaron una disminución de las células PAS (-) y dosis iguales o elevadas de estas hormonas provocaron un incremento de estas células. Existieron diferencias en la expresión regional y temporal de los RE y RP con los diferentes tratamientos superovulatorios; en el ámpula y en el istmo se observó mayor expresión en los receptores a estrógenos en las células epiteliales tanto en el grupo testigo después de la ovulación como en los diferentes tratamientos superovulatorios entre el día 1 y 2 Las dosis exógenas de eCG y hCG evaluadas tuvieron un mayor efecto sobre la expresión de los RE en comparación con las de los RP dichas variaciones fueron más notables en el ámpula que en el istmo. Al suministrar en diferente cantidad eCG y hCG exógena se modifican las poblaciones celulares del endosalpinx del ámpula y del istmo, por lo cual pueden alterarse diversos procesos reproductivos que dependen de ellas. Todas estas modificaciones morfológicas y la expresión diferencial de los RE y RP deben ser dilucidadas en cuanto a sus consecuencias reproductivas y funcionales.

Palabra clave: Inmunohistoquímica, Receptor a estrógeno, Receptor a progesterona, tuba uterina, hCG, eCG

ABSTRACT

HISTOMORPHOLOGICAL ASSESSMENT AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF PROGESTERONE AND ESTROGEN RECEPTORS OF UTERINE TUBES IN SOWS FOLLOWING DIFFERENT SUPEROVULATORY TREATMENTS. Sánchez-Herrera I, Trujillo OME, Juárez-Mosqueda ML, Cornejo CMA. The purpose of this study was to investigate morphological and immunohistochemical changes in the uterine tube of sows after different superovulatory treatments. The oviduct has structural and functional changes during early pregnancy such as formation of cilia and increase in secretory activity, which are relevant to reproductive functions such as fertilization, gamete transport, sperm capacitation and early embryonic development. These modifications are regulated by sex steroids via their receptors. In this study, the expression of progesterone (PR) and estrogen alpha (REA) receptors was assessed by Immunohistochemistry (histological score: HSCORE) in ampulla and isthmus during the first days after filing estrus, and the proportion of secretory and non-secretory cells was evaluated by PAS staining. Superovulatory treatments modified the number of PAS- and Pas + cells in the two anatomical regions analyzed. In addition, there were changes in regional and temporal expressions of RE and RP in the epithelium and *lamina propia*. In the ampulla and isthmus was a higher expression in the estrogen receptors on epithelial cells both in the control group and in the different

superovulatory treatments (up-regulation) between 1 and 2. Exogenous doses of eCG and hCG tested had a greater effect on the expression of ER than for RP and had a higher incidence in the ampulla than in the isthmus. All these morphological changes and the differential expression of ER and PR should be elucidated in terms of their reproductive and functional consequences.

Keywords: immunohistochemistry, estrogen receptor, progesterone receptor, uterine tube, hCG, eCG

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Secreción y composición del fluido oviductal... ..	10
2.2 Ciclo estral de la Cerda.....	12
2.2.1 Proestro.....	12
2.2.2 Estro.....	13
2.2.3 Metaestro.....	14
2.2.4 Diestro.....	15
2.3 Desarrollo Folicular.....	15
2.4 Receptor nucleares.....	17
2.5 Utilización de productos hormonales exógenos.....	19
2.5.1 Gonadotropinas.....	20
2.5.2 Rol de la GnRH en el control del ciclo estral.....	23
3 JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS GENERALES.....	26
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
8. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
10. METODOLOGÍA.....	29
10.1 Manejo de las Hembras.....	29
10.2 obtención de las muestras.....	29
10.3 Procesamiento de los tejidos.....	30
10.4 Técnica Inmunohistoquímica.....	31
10.5 Técnica de Ácido Peryodico de Schiff (PAS).....	33
11. RESULTADOS.....	34

11.1 Resultados de células PAS positivas y negativas.....	34
11.2 Resultados de la inmunohistoquímica.....	40
12. DISCUSIÓN.....	44
13. CONCLUSIONES.....	60
14. BIBLIOGRAFÍA.....	64

I. INTRODUCCIÓN

Las tubas uterinas (trompas de Falopio, trompas uterinas u oviductos) son órganos tubulares pares del tracto reproductor femenino que participan en el transporte de los gametos, la capacitación espermática, la reacción acrosomal, la fertilización, el inicio del desarrollo embrionario y el transporte del embrión hacia el útero **(Rodríguez-Martínez, 2007)**. Se dividen en las siguientes regiones anatómicas: **(Yaniz et al., 2006)**

1. Istmo: Es la porción adyacente al útero, que se conecta a los cuernos uterinos. mediante la unión útero-tubárica. Esta región se caracteriza por presentar una mucosa menos plegada que la del ampulla y el infundíbulo y por tener una capa muscular muy gruesa (Figura. 1) **(Harper, 1994)**.
2. Ampulla: Esta región forma el tercio medio de las tubas uterinas y se extiende desde la unión con el infundíbulo hasta la unión istmo-ampular. En este segmento los óvulos se transportan rápidamente y se produce una importante cantidad de fluido. En la cerda, la fertilización ocurre en la unión istmo-ampular (Figura 1) **(Rodríguez – Martínez H, 2001)**
3. Infundíbulo: Este segmento representa la continuación tubular de la fimbria y se extiende hasta la unión con el ampulla. (Figura 1). La fimbria es una porción adyacente al ovario, tiene forma de embudo y prolongaciones en forma de flecos que le ayudan a captar el óvulo (Figura 1) **(Harper, 1994; Rodríguez – Martínez H, 2001)**.

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 aglandulares) y no ciliadas con actividad secretora (o glandulares). 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 reciben 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 en conjunto 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 en esta región se denomina mesosalpinx (**Fawcett, 1988; Banks, 1991**).

La población celular del endosalpinx varía a lo largo del ciclo estral debido a la influencia de las hormonas esteroides de origen ovárico (estrógenos y progesterona); las células ciliadas son mayoritarias en las etapas foliculares o estrogénicas (proceso conocido como ciliogénesis), mientras que las células secretoras (no ciliadas) predominan en las etapas luteínicas. El estudio del predominio de estas dos poblaciones celulares permite inferir algunos efectos hormonales sobre este órgano y el proceso de ciliogénesis ha sido investigado en especies de animales domésticos como la cerda (**Steffl et al., 2004**).

Actualmente se ha postulado que la presencia del moco oviductal y, en particular los carbohidratos de las glucoproteínas que lo constituyen, media la formación del reservorio de espermatozoides en mamíferos (**Fawcett, 1988; Banks, 1991**). Es así que, 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.

Existen evidencias que indican que las células epiteliales de las tubas uterinas muestran marcadas variaciones estructurales, histoquímicas, bioquímicas y fisiológicas en los mamíferos (**Abe 1996**) tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones inducidas artificialmente (**Anzaldúa et al., 2002; 2007**).

En la cerda se ha visto que existe un incremento en la síntesis de progesterona (P4) más que de estradiol (E2), como consecuencia de la pérdida de la enzima aromatasa, por lo que el suministro sanguíneo de la tuba uterina es rico en P4 alrededor de la ovulación, con niveles de 20 a 200 veces más altos que en la circulación sistémica (**Barboni, 1995**). Un papel importante de la P4 es interaccionar con la pared de la tuba uterina y facilitar el transporte espermático, las prostaglandinas y hormonas peptídicas, así como la relaxina y la oxitocina también parecen estar implicadas, ya que se han encontrado receptores para estas hormonas en el istmo (**Hunter, 1995**).

Antes de la ovulación la tuba uterina produce grandes cantidades de una secreción viscosa, rica en glicoproteínas (**Demot et al., 1992**).

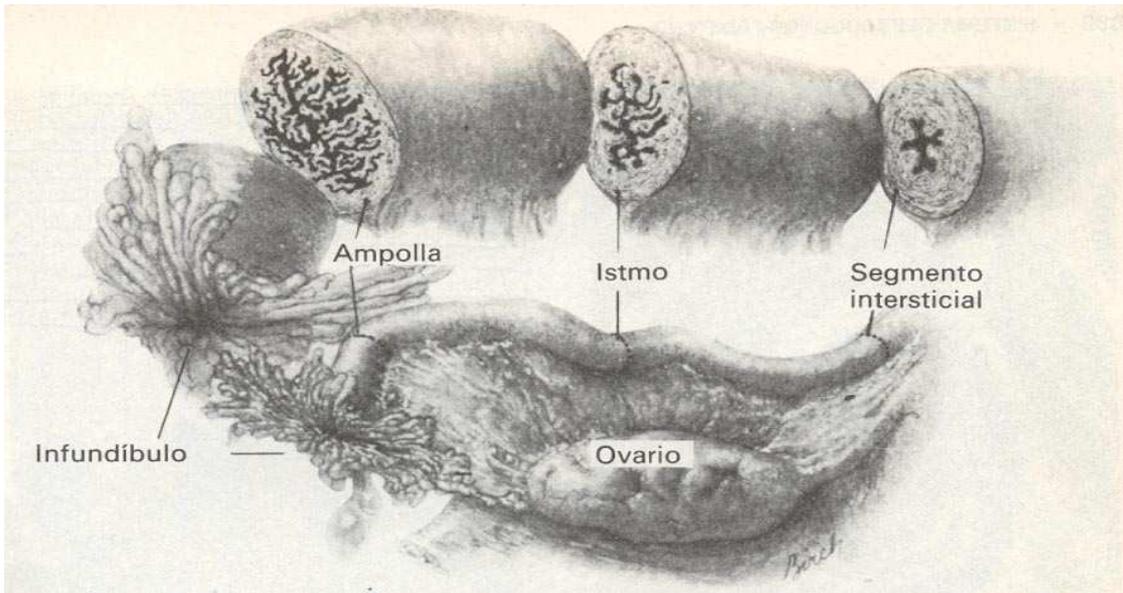


Figura 1. Esquema donde se muestran las diferentes regiones de la tuba uterina
(De Eastman, M.J, y L. M. Hellman, 1985)

I. HIPÓTESIS

Si el istmo y el ampulla de la tuba uterina de la cerda responden de manera distinta a los cambios en las concentraciones de las hormonas esteroides de origen ovárico (estrógenos y progesterona) secundarios a la administración exógena de hCG y eCG, entonces pueden esperarse modificaciones en el número de células PAS+ y PAS-, así como en la expresión, distribución histológica y localización anatómica de receptores a progesterona (RP) y a estrógenos (RE) en dichos segmentos.

II. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios morfológicos de las células secretoras y no secretoras, así como la expresión de los receptores a estrógenos y progesterona en las tubas uterinas de cerdas sometidas a distintos tratamientos superovulatorios.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el número de células PAS (+) y PAS (-) del epitelio de revestimiento del ámpula e istmo de cerdas sometidas a distintos tratamientos con superovulatorios.

2. Determinar la localización inmunohistoquímica de los receptores a Estrógenos alfa en las diferentes capas histológicas del Ámpula e Istmo de los oviductos de cerdas sometidas a tres tratamientos superovulatorios.

3. Determinar la localización inmunohistoquímica de los receptores a Progesterona en las diferentes capas histológicas del Ámpula e Istmo de los oviductos de cerdas tratadas a tres tratamientos superovulatorios.

2. ANTECEDENTES

2.1. Secreción y composición del fluido oviductal

Las secreciones de la tuba uterina 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 por las células epiteliales (secretoras) hacia la luz del órgano. Este último componente es en general heterogéneo, sin embargo algunas moléculas presentes 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 y prostaglandinas, entre otras. Algunas de estas moléculas interaccionan con los gametos o bien con los cigotos o embriones (**Killian GJ**).

La producción de las proteínas del fluido oviductal se ve afectada tanto cuantitativamente como cualitativamente por la concentración de las hormonas esteroides gonadales circulantes, las cuales actúan de forma directa sobre las células epiteliales o indirectamente por medio de una acción vascular (**Gandolfi, 1995; Killian, 2004**)

Existen diversos factores que pueden modificar las concentraciones séricas de las diferentes hormonas reproductivas, como el uso de las hormonas para el manejo reproductivo, sin embargo, el efecto de estas hormonas no es solo a nivel local, sino también tiene efectos secundarios en otras partes del organismo (**Sukjumlong et al., 2004**)

Se ha observado que existe una actividad diferencial en la tuba uterina en función a la etapa del ciclo estral, ya que la actividad gonadal regula y coordina la maduración y presentación de los gametos. Cerca de la ovulación, bajo la influencia de hormonas de origen folicular, mediante la transferencia contracorriente, tanto la tuba uterina como los espermatozoides son reprogramados justo antes de la liberación del huevo de forma que los espermatozoides se hiperactivan para llegar al sitio de fertilización (**Hunter, 1995**).

Las células del cumulus, que se desprenden junto con el ovocito, son capaces de secretar esteroides que permanecen durante 46-48h en la tuba uterina y que pueden influir en el proceso de la fertilización. Por este motivo las células foliculares extraováricas pueden ser vistas como un importante tejido paracrino en la tuba uterina (**Hunter, 2002**).

Para producir estradiol es necesario que las células que forman la teca interna de los folículos en desarrollo secreten andrógenos, los cuales pasan a las células de la granulosa, donde se transforman en estrógenos. Los estrógenos son los principales responsables de que la hembra acepte al macho durante el estro. Además, participan con otras hormonas en el crecimiento de los conductos de la glándula mamaria y favorecen el aumento del número de células ciliadas del oviducto (**Soede, 1994**).

El fluido intraluminal de la tuba uterina es en su mayoría producto de la trasudación y coincide considerablemente con la composición del plasma, sin embargo difiere en composición iónica, pH, osmolaridad y contenido de

macromoléculas, los cuales varían de acuerdo al ambiente hormonal (**Hunter, 2002**).

Las glicoproteínas y glucosaminoglicanos tienen la función de formar y dar viscosidad al fluido luminal. Posterior a la ovulación, la viscosidad disminuye debido a un aumento de la trasudación dentro del lumen y por lo tanto del volumen (**Rodríguez-Martínez et al., 2001; Hunter, 2002**).

El fluido de la tuba uterina está constituido por proteínas séricas que pasan a través de transporte pasivo y proteínas sintetizadas en el epitelio de la tuba uterina (**Hunter, 1998**). Las proteínas séricas incluyen albúmina, transferrinas e inmunoglobulinas, así como enzimas y otra gran cantidad de moléculas proteínicas, incluyendo citocinas, factores de crecimiento y proteínas de transporte. Por otra parte, las proteínas sintetizadas por las células epiteliales incluyen la oviductina, proteínas de secreción del oviducto (OSP), glicoproteínas específicas del oviducto asociadas a estrógenos (OSGP) y glicoproteínas estrógeno-dependientes específicas del oviducto (OGP). (**Buhi et al., 2003**).

2.2. CICLO ESTRAL DE LA CERDA

La cerda es una especie poliestrónica continua con un ciclo estral de una duración promedio de 21 días (variación de 18 a 24 días) en el que se pueden identificar cuatro etapas: **Proestro, Estro, Metaestro y Diestro (Brinkley 1981; Trujillo 1994)**.

2.2.1 Proestro

El proestro comienza cuando se inicia la regresión del cuerpo lúteo, y termina al iniciarse el estro. Dura de 2 a 3 días, sin embargo, su duración puede reducirse hasta 1 día en cerdas primerizas. En esta etapa inicia el crecimiento folicular y se comienzan a producir cantidades crecientes de estrógenos. Desde el punto de vista histológico, el número de estratos celulares que conforman el epitelio vaginal es de 10 o menos, y no se observa descamación o cornificación de las células. En el estroma subepitelial es posible observar algunos polimorfonucleares. Adicionalmente, esta etapa se caracteriza por un enrojecimiento y tumefacción de los labios vulvares, así como por una alteración en el comportamiento de la cerda, que se vuelve inquieta y ansiosa de montar a otras cerdas. (**Hafez 2003; Fuentes-Cintra et al 2006**).

La elevación en la concentración de los estrógenos que ocurre dentro del proestro desencadena el inicio del estro. Por otro lado, los estrógenos estimulan al hipotálamo para que produzca un pico de secreción de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), que a su vez, provoca una descarga hipofisiaria de LH (Hormona Luteinizante) (**Mc Donald 1991**)

2.2.2 Estro

Es la etapa durante la cual la cerda es sexualmente receptiva al macho. Ocurre la maduración final de los folículos, que alcanzan su máximo nivel esteroideogénico, produciendo un pico preovulatorio de estrógenos. La duración de

esta etapa es de 2 a 3 días, sin embargo, el periodo de aceptación al macho puede prolongarse, si hay contacto con sementales. (**Hughes 1984, Fuentes-Cintra M et al 2006**)

Como resultado de los efectos luteinizantes del pico preovulatorio de LH, se produce una caída en los niveles de estrógenos poco antes de la ovulación, mientras que los niveles plasmáticos de LH se mantienen elevados de 12 a 20 hrs. Adicionalmente, el aumento en las concentraciones de LH provoca un aumento en la producción folicular de las prostaglandinas E y F₂alfa dentro de las 10 a 12 hrs. previas a la ovulación. Esta producción de prostaglandinas alcanza su máximo nivel entre 2 y 3 hrs antes de la ruptura folicular, lo cual es importante ya que las prostaglandinas tienen un papel significativo en el proceso de la ovulación. El incremento en la concentración de prostaglandinas se produce solamente en los folículos que van a ovular (**Laing 1991, Hafez 2003**)

La ovulación en la cerda ocurre de forma espontánea, y se produce entre 38 y 40 hrs después del comienzo del estro. Las cerdas pueden ovular de 10 a 30 óvulos durante el mismo estro, transcurriendo unas 4 hrs. entre la primera y la última ovulación. (**Hunter 1996**).

La vagina de la cerda responde a los niveles elevados de estrógenos presentes en esta etapa del ciclo con un engrosamiento del epitelio, el cual alcanza un espesor de 12 o 13, e incluso hasta 20 capas celulares. En esta etapa la porción interna de la vulva está congestionada y húmeda por las secreciones de la vagina y de otros segmentos del aparato reproductivo (**Hafez 2003**).

2.2.3 Metaestro

Esta etapa dura de 7 a 8 días y en ella tiene lugar el desarrollo del cuerpo lúteo. En un frotis vaginal se puede observar en un inicio la cornificación de las capas superficiales del epitelio, seguida por la descamación del epitelio cornificado. Adicionalmente, se observan células leucocitarias intraepiteliales, organizadas de tal manera que forman estructuras denominadas cistos. El número de capas de células epiteliales declina hasta llegar a solo 3 a 6 durante esta etapa. **(Trujillo, 1998).**

2.2.4 Diestro

Esta etapa se caracteriza por la función plena del cuerpo lúteo (CL), con un aumento en las concentraciones de P4 a partir del segundo día después de la ovulación y alcanzando un nivel máximo entre el décimo y catorceavo día.

Tiene una duración de 6 a 10 días cuando no ha ocurrido la concepción, en cuyo caso los CL son destruidos al final del diestro por la liberación de PGF2alfa de origen uterino. Por el contrario, cuando ocurre la fecundación, los CL permanecen funcionales hasta el final de la gestación **(Trujillo 1998; Fuentes-Cintra *et al.*, 2006).**

En relación a la histología, el epitelio vaginal se encuentra constituido por 3 a 6 capas celulares, y no se observa infiltración linfofocitaria subepitelial ni intraepitelial. Los cuernos uterinos también presentan variaciones cíclicas; el

endometrio es más grueso durante la fase lutea, particularmente en el diestro **(Trujillo 1994; 1998)**.

Adicionalmente, la altura de las células epiteliales de las glándulas uterinas es significativamente mayor en el metaestro y diestro **(Hafez 2003)**

2.3 Desarrollo Folicular

Durante la proliferación folicular, existe un proceso continuo de crecimiento y atresia dentro de un grupo de folículos, sin embargo, es más grande el número de folículos que involucionan que el de los folículos que están destinados a la ovulación **(Coffey 1998)**

Las hormonas que actúan sobre el desarrollo folicular son la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona Luteinizante (LH), mismas que se conocen como gonadotropinas hipofisarias, ya que son producidas y liberadas por la hipófisis **(Hafez, 2003)**.

Cada día, un número de folículos primordiales comienzan a desarrollarse hasta convertirse en folículos primarios. Este desarrollo inicial es independiente de las gonadotropinas y los folículos continúan creciendo hasta llegar a un estado en el cual requieren de FSH para continuar su desarrollo **(Richard 1998; Hafez 2003)**

La FSH actúa sobre los folículos secundarios, promoviendo su desarrollo, crecimiento y formación del antro. La FSH induce la formación de receptores celulares para LH en las células de la granulosa, que, para cuando se elevan los niveles hormonales de LH antes de la ovulación, responden favoreciendo la

maduración final del folículo que es indispensable para que se realice la ovulación. **(Hughes, 1984; Hafez 2003).**

En respuesta a los cambios de concentración de FSH y LH durante el ciclo estral, los ovarios producen estrógenos y progesterona. Los estrógenos incluyen al estradiol, al estriol y a la estrona; siendo el primero el más abundante e importante en los procesos reproductivos.

En la cerda, en el día 16 después del ciclo estral existen una gran cantidad de folículos de entre 1 y 6 mm de diámetro en los ovarios. Posteriormente, entre los días 16 a 21, disminuye el número de folículos, pero los que permanecen aumentan de tamaño para llegar a medir entre 8 a 10.5 mm de diámetro poco antes de la ovulación **(Hafez 1987; MC Donald 1991)**

2.5 RECEPTORES NUCLEARES

La estructura de los receptores nucleares es modular, presentando de cuatro a cinco diferentes regiones o estructuras con función específica. (Figura 2).

Organización estructural de los receptores nucleares

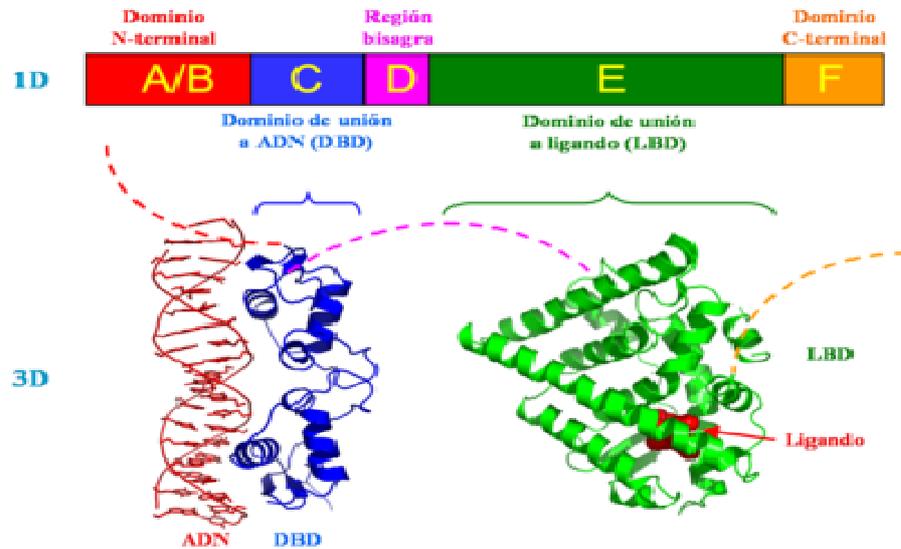


Figura 2: Organización estructural de los receptores nucleares.

Arriba: Esquema de las regiones o dominios de un receptor nuclear.

Abajo: Estructura 3D de las regiones DBD (de unión a ADN) y LBD (de unión a ligando) de un receptor nuclear. Las estructuras del dominio N-terminal (A/B), de la región bisagra (D) y del dominio C-terminal (F) aún no han sido determinadas, por lo que han sido representadas con líneas punteadas de color rojo, morado y naranja, respectivamente. (Nagy Laszlo, 2002)

La región amino terminal permite la interacción del ligando con los factores de transcripción que se encuentran en la región A/B. (Biserka *et al.*, 2004). Existen dos dominios de activación de la transcripción, en los receptores a estrógenos. El primero se encuentra en la región A/B y el segundo se presenta en la región E. (Bunone *et al.*, 1996; Pérez-Rivero, *et al.*, 2005)

Otras funciones atribuidas a las regiones A/B son el sinergismo de receptores y la selectividad de genes.

En la región C, se encuentra el dominio de unión del ADN (DBD) que está conservado estructuralmente en los receptores nucleares. El DBD está formado por dos sitios de unión de zinc que establecen enlaces covalentes coordinados con los pares de cisteína, separados por 10 a 15 pares de aminoácidos. La porción cercana al amino terminal interactúa con el surco mayor helicoidal para unirse a las secuencias específicas del DNA, mientras que la región cercana al carboxilo se continúa con la porción globular de la proteína. (**Freedman, 1992; Nagy and Schwabe, 2004**).

La región D constituye un componente del extremo carboxilo terminal, cuya función principal es actuar como bisagra, ya que se encuentra entre el dominio de unión al DNA o DBD y el dominio de unión ligando (LBD). En la región D se encuentra un segmento de aminoácido con características ácidas que es reconocido por proteínas transportadoras (NIF) que le permiten interactuar con los componentes del complejo del poro nuclear para permitir el transporte del complejo hormona-receptor hacia el interior del núcleo (**Black, 2001**).

En la región E se encuentra la secuencia de aminoácidos que permite la unión de la hormona o ligando al receptor en una forma estereo-específica. (**Bapat, 2003**). Dicha secuencia se conoce como dominio LBD, que ocupa la mayor parte del receptor.

Se han identificado dos isoformas de receptores estrogénicos: la alfa y la beta. Estas isoformas difieren en cuanto a la eficiencia con la que inducen la transcripción. (**Maniatis, 2002**).

2.4 UTILIZACIÓN DE PRODUCTOS HORMONALES EXÓGENOS

Es indiscutible la importancia de las hormonas esteroides durante el periodo reproductivo de la hembra, ya que intervienen en los cambios cíclicos que se producen en el tracto genital durante el ciclo estral (**Spencer & Bazer, 1995; Kimmins & Mac Laren, 2001 y Robinson *et al.*, 2001**). Los estrógenos y la progesterona se unen a sus receptores específicos para desencadenar una respuesta biológica (**Cunha, 2004**).

La acción de una hormona depende de la interacción con una proteína de unión específica. Esta puede estar situada en la membrana o en el interior de las células que componen los tejidos donde ejercen su efecto fisiológico. (**Pérez Rivero *et al.*, 2005**). Las hormonas liposolubles tienen acceso directo al interior de la célula, atravesando la membrana plasmática hasta alcanzar el núcleo celular. Los receptores estrogénicos son miembros de la superfamilia de receptores nucleares (Figura 3) (**Alberts, 2004**).

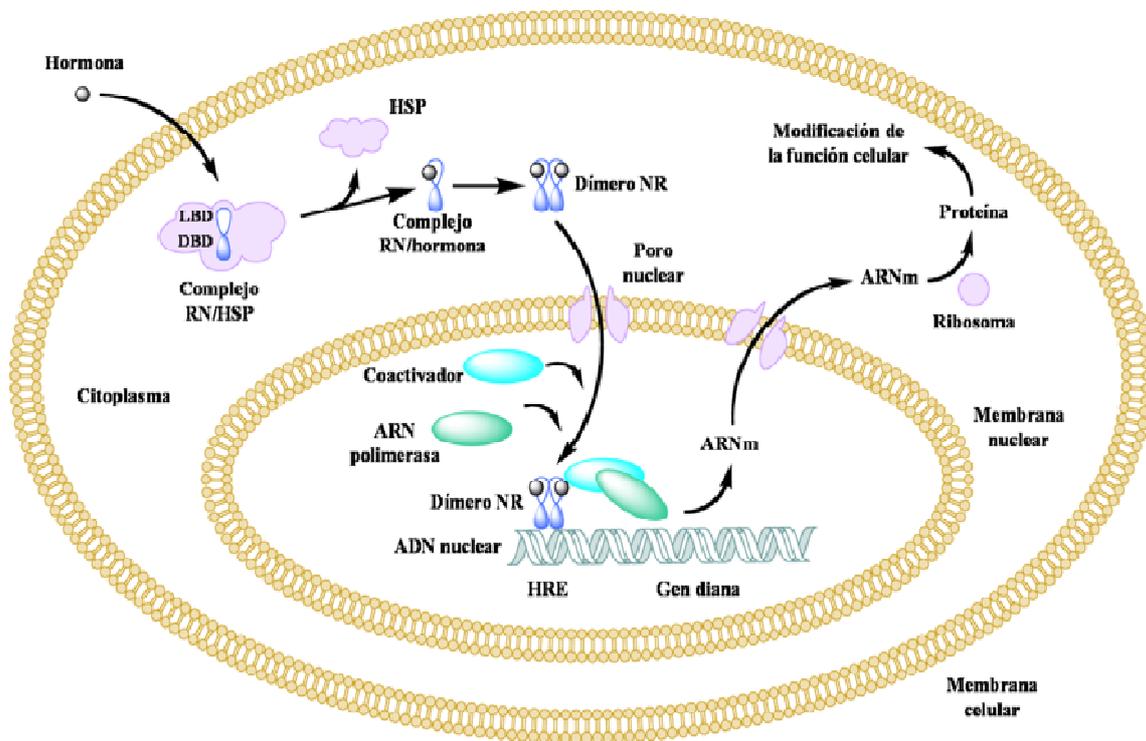


Figura 3. Se ejemplifica como una hormona atraviesa la membrana celular, hasta llegar al núcleo.

2.5.1 Gonadotropinas.

El uso de gonadotropinas exógenas para inducir o sincronizar el estro en cerdas de distintos estados fisiológicos es una práctica que se inicia hace unos 30 años en los países europeos, con el objeto de aumentar la productividad de las explotaciones porcinas y proveer métodos sencillos y de bajo costo sin provocar patologías reproductivas, fundamentalmente a nivel ovárico (**Schilling, 1972, Karalus, et al., 1990. Videla Dorna y Wüst, 1998,**). Los primeros productos incluían solo Gonadotrofina Coriónica Equina (PMSG o eCG), pero posteriormente

surgieron productos que contenían una combinación de la mencionada hormona mas Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG), lo que permitió reducir la dosis de eCG utilizada, evitándose la sobre-estimulación ovárica.(Guthrie, 1997)

La Gonadotrofina coriónica equina (eCG), es una hormona glicoproteica secretada en las copas endometriales de las yeguas gestantes, entre los días 40 y 120 de gestación aproximadamente. Desde el punto de vista endocrinológico es importante resaltar dos valiosas características de la eCG que la distinguen de otras hormonas glicoproteicas: la primera es el hecho de poseer actividad FSH (folículo estimulante) y LH (luteinizante) cuando es administrada en especies distintas al equino, y la segunda es su alto contenido en carbohidratos, lo que le confiere una vida media prolongada que favorece su uso en una sola dosis a diferencia de la FSH cuya vida media es extremadamente corta y requiere de aplicaciones múltiples. La utilización de la eCG en veterinaria se justifica en aquellas situaciones donde se requiera la terapia con gonadotrofinas exógenas, particularmente cuando se requiere un efecto FSH, es decir el estímulo de la foliculogénesis en ovarios con actividad reducida o nula.

La gonadotrofina coriónica humana (hCG) posee la acción biológica de la gonadotrofina hipofisaria luteinizante (LH) en los animales. La diferenciación de las células de la granulosa durante el crecimiento folicular incluye la adquisición (dependiente de FSH y estradiol), de receptores de LH/hCG, lo que prepara a las células de la granulosa para responder al pico preovulatorio de LH. Los receptores de LH/hCG se expresan en el ovario en las células de la teca, las intersticiales, las de la granulosa madura de folículos antrales y preovulatorios, y las luteínicas. En

el testículo, los receptores de LH/hCG se encuentran únicamente en las células de Leydig. El efecto general de la LH/hCG en el ovario es inducir la ovulación y estimular la síntesis de progesterona. Sobre las células de la Teca la LH/hCG estimula la síntesis de novo de andrógenos, los cuales pasan a la granulosa por difusión, donde son aromatizados convirtiéndose en estrógenos, que se liberan a circulación. Durante la foliculogénesis, normalmente sólo un folículo (el folículo dominante) se selecciona del grupo de folículos en crecimiento, para que siga creciendo hacia el folículo preovulatorio, o de Graff. La aplicación de LH/hCG en éste momento provoca la ruptura del folículo preovulatorio, y la liberación del óvulo. Durante la fase luteínica del ciclo estral, la LH/hCG estimula la producción de progesterona por el cuerpo lúteo o cuerpo amarillo. La Progesterona producida es fundamental en la preparación del útero para la implantación del óvulo fecundado (**Fields, 2004; Ziecik et al., 2007**).

En el caso de productos con gonadotropinas se tienen distintos protocolos. (**Trujillo 1994; Prieto-Gómez, 2002**):

a) Una inyección única de eCG (725 UI) es suficiente para inducir la pubertad en cerdas (**Trujillo 1998**).

b) Una Dosis única de eCG (1200 UI) administrada en cerdas después del destete es efectiva para conseguir la presentación del estro (**karalus et al., 1990**)

c) Una combinación de 400 UI de eCG y 200 UI de hCG después del destete es efectiva para la presentación del estro. (**Breen et al., 2006**).

d) Una dosis de 500 a 1500 UI de hCG el día 12 del ciclo estral, prolonga la duración del cuerpo lúteo (**Cuello 2004**)

e) Para lograr una superovulación, se utilizan 400 UI de eCG y 200 UI de hCG en el día 17 de después de haber presentado el celo. (**Coffey et al., 1997; Rozeboom et al., 2000**)

2.5.2 Rol de la Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH) en el control del ciclo estral

El GnRH es una hormona peptídica (decapéptido) sintetizada por el hipotálamo y que ejerce su acción biológica a nivel hipofisario, estimulando la secreción de LH y FSH. Estas hormonas tienen dos tipos de secreción, una tónica y una cíclica. La primera de ellas es basal, no muestra variación estacional dependiendo de la especie y tiene control endocrino ejercido por las hormonas esteroideas secretadas por el ovario (estradiol y progesterona). La secreción cíclica de LH es propia de la hembra, y muestra una importante variación durante el período preovulatorio. Esta oleada o pico preovulatorio es el responsable de la ovulación, y dura entre 6 y 12 horas en la mayoría de las especies domésticas. El pico preovulatorio de LH se inicia con un importante incremento en la concentración circulante de estrógenos, el cual tiene un efecto positivo sobre el eje hipotálamo-hipofisario induciendo la descarga de GnRH y como consecuencia la descarga de LH. El estrógeno actúa a dos niveles, a nivel hipotalámico, estimulando las áreas preópticas y supraquiasmáticas, aumentando la descarga de GnRH, y a nivel de hipófisis, aumentando la sensibilidad de las células gonadotrofas a la GnRH, lo que provoca

finalmente un aumento importante en la descarga de LH. Este pico de LH provoca la elevación rápida de esteroides gonadales (estradiol y progesterona), y de prostaglandina en el líquido folicular, desempeñando esta última un rol primordial en los mecanismos íntimos de la ovulación. (**Esbenshade et al., 1990**).

3. JUSTIFICACIÓN

El oviducto cumple funciones reproductivas importantes como fertilización, desarrollo, transporte y mantenimiento del embrión en etapas tempranas de la gestación en la cerda. Se pretende estudiar los cambios en la población de células secretoras y no secretoras en el ántrax e istmo, ocasionados por cambios en las concentraciones de progesterona y estrógenos, secundarios a la aplicación exógena de gonadotropinas coriónicas. Así mismo los receptores de estrógenos y progesterona que pudieran alterar el funcionamiento normal y el microambiente de la tuba uterina.

Este trabajo permitirá comprender mejor los mecanismos de acción de compuestos hormonales utilizados en medicina veterinaria con fines reproductivos, como pueden ser diversos hormonales exógenos hCG y eCG, sobre la tuba uterina.

I. MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Morfología y en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en Jilotepec, Estado de México.

Se utilizaron 12 cerdas prepúberes F1 (Landrace X Yorkshire), de aproximadamente 90 kg de peso que fueron alojadas en grupos de tres hembras por corral. Se utilizó también un cerdo celador.

II. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto de diferentes dosis para superovulación (eCG-hCG) en los receptores de P4 y estrógenos en la tuba uterina, se utilizaron 12 hembras prepúberes divididas aleatoriamente en 4 grupos:

Grupo testigo 1. Al día 17 post-detección del estro, las hembras recibieron un placebo por inyección intramuscular (IM), seguido de una segunda dosis 72 hrs después. El placebo se les administró con la finalidad de igualar la situación del estrés por la inyección en todos los grupos y fueron sacrificadas bajo el mismo protocolo que las hembras de los otros tres grupos.

Grupo 2. En el día 17 post-detección del estro natural, las hembras de este grupo recibieron 400 UI de eCG y 200 UI de hCG por vía IM, que corresponde a la dosis comercial de PG600®, seguido por 5 ml de SSF 72 hrs después.

Grupo 3. En el día 17 post-detección del estro las cerdas se les administró 1000 UI de eCG (Foligon®) y 72 hrs después se les administró 500 UI de hCG Chorulon®).

Grupo 4. En el día 17 post-detección del estro, las cerdas fueron tratadas con 1000 UI de eCG (Foligon®) y 72 hrs después, se administraron 1000 UI de hCG (Chorulon®).

VARIABLES DE ESTUDIO

1. Número de células PAS (+) y PAS (-) del epitelio de revestimiento del Ámpula e Istmo.
2. Localización inmunohistoquímica de los receptores a Estrógenos alfa en las diferentes capas histológicas del Ámpula e Istmo.
3. Determinar la localización inmunohistoquímica de los receptores a Progesterona

III. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA), seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias en el número de células inmunopositivas al receptor a estrógenos α (ER α) y al receptor a progesterona B (ERB). Se utilizó el Programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA, USA).

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Manejo de las hembras

Las cerdas incluidas en este estudio se alimentaron 2 veces al día (2.0 Kg/día) con concentrado comercial de engorda. Las hembras fueron divididas aleatoriamente en tres grupos, cada uno de ellos formado por 4 animales.

Las hembras fueron monitoreadas diariamente con la finalidad de detectar el primer estro natural en presencia de un macho celador, una vez que las hembras presentaron el primer estro se contaron 17 días a partir de ese momento, tomando en cuenta que el día 1 será el día en el cual se detecta el estro, se aplicó intramuscularmente (IM) la hormona eCG y 72 hrs después se aplicó la hormona hCG (día 20), esperando que de esta forma se presente la ovulación a las 36 horas post aplicación, en este momento, por medio de la prueba de cabalgue en presencia del macho celador, se comprobó que las hembras efectivamente se encuentren en estro.

IV.2 Obtención de las Muestras

Las tubas uterinas se colectaron después del sacrificio en el día 1 y dos después de haber detectado el celo.

Las cerdas fueron tranquilizadas y anestesiadas con la aplicación de 20 mg/kg de ketamina + 2 mg/kg de xilacina (tranquilizante IM) y 7 mg/kg de tiletamina-zolacepam (anestésico IM). Cuando la cerda se encuentra en plano quirúrgico el cual se confirmó por la ausencia del reflejo nasal, palpebral y podal, se realizará una incisión sobre la línea alba debajo de la cicatriz umbilical

y se obtuvo el aparato reproductor completo (ovarios, oviductos y útero). Las cerdas fueron sacrificadas por sobredosis de anestésico, utilizando una dosis de 20 mg/kg de tiletamina-zolacepam.

IV.3 PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

Una vez obtenido el aparato reproductor de las hembras, estas fueron fijadas en Paraformaldehído al 4%, durante 24 hrs, y se trasladó al Laboratorio del Departamento de Morfología de la FMVZ-UNAM. (Figura 4)

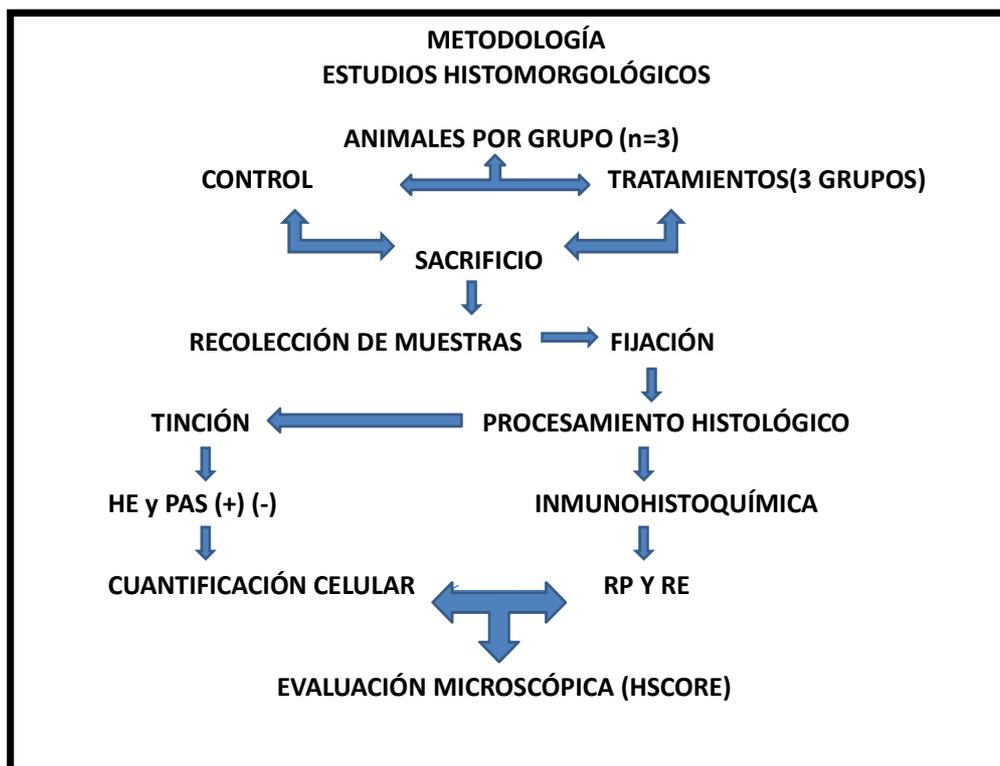


FIGURA 4. Cronograma donde se menciona el tratamiento, obtención de muestras y la metodología de trabajo en el laboratorio.

IV.4 TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA

La inmunohistoquímica hoy en día se usa de manera extensa y ha contribuido en forma significativa a importantes descubrimientos, tanto en biología celular y molecular, como en procedimientos de diagnóstico. Permite demostrar, caracterizar y cuantificar *in situ* las moléculas presentes en los tejidos mediante reacciones antígeno-anticuerpo que identifica a una molécula de interés al formar productos insolubles coloreados que pueden ser visualizados al microscopio fotónico (**Gonzalez-Moran, 2008**).

Las muestras se procesaron por el método de inclusión en parafina y se obtuvieron cortes seriados de cada órgano con un grosor de 4-5 μm , posteriormente se montaron en laminillas cubiertas previamente con poly-L-lisina (Sigma). Se desparafinaron y rehidrataron a través de concentraciones decrecientes de alcohol a agua destilada, se transfirieron a una solución amortiguada de citrato de sodio (pH 6.0) y se calentaron en un recipiente tapado 5 min. En una olla de presión, dejando enfriarlas por 5 min a temperatura ambiente. Después de este procedimiento, las laminillas se lavaron con agua destilada 5 min y posteriormente con PBS (pH 7.4) y se incubaron sucesivamente en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS por 10 min a temperatura ambiente. Para inactivar los sitios inespecíficos se les colocaron gotas de solución bloqueadora (BSA) en PB por 10 min.; después para su permeabilización se hicieron tres lavados con una solución PBS-Triton X-100 al 0.05% en PB, una vez realizado esto se aplicó una solución bloqueadora del kit Zymed®, esto por 10 min, finalmente se hicieron nuevamente 3 lavados con solución de PBS-Tritón X-100. Para la detección del

receptor se aplicó el anticuerpo primario monoclonal desarrollado en ratón contra el RE α Ab-11 (Clona 1D5) LabVision IgG1 y RP Ab-8 (Clona hPRa2+hPRa), diluido 1:50 preparado en PBS conteniendo 0.3% de Triton X-100, para ello las muestras fueron colocadas en una cámara húmeda por 24 horas a 4°C. Después los cortes se atemperaron a temperatura ambiente realizando posteriormente tres lavados con PBS, se hace un bloqueo con peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por 10 min, se realizó nuevamente los 3 lavados con PBS, se aplica una reacción antigénica del kit Zymed®, se realiza nuevamente los 3 lavados con PBS e inmediatamente se incuba con el apropiado anticuerpo secundario biotinilado por 10 minutos a temperatura ambiente, se realiza nuevamente tres lavados con PBS y se aplicó el reactivo "C" (enzima conjugada)(HPR-estreptoavidina) del kit Zymed® durante 10 min. Las secciones se lavaron dos veces con PBS. La actividad de la peroxidasa se evidenció mediante una solución cromógena de 3,3'-diaminobencidina en presencia de peróxido de hidrógeno por 3-5 minutos. Después del lavado las secciones se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y montaron con medio de montaje (Permount). Se utilizaron cortes como testigo en los cuales el primer anticuerpo se sustituyó por suero normal de bovino (BSA) **(García, 1993; Carel, 1994; Goulding et al., 1995)**

La inmunotinción se visualizó en un microscopio Carl Zeiss adaptado con una cámara digital (Leica DMLS). El número de núcleos inmunopositivos en el epitelio y en el estroma se determinó utilizando una retícula micrométrica (Carl Zeiss) con el objetivo de 40X, teniendo un aumento total de 400X. La intensidad de la inmunodetección se cuantificó y clasificó por grados de intensidad; la

totalidad de las células presentes en el epitelio y estroma se realizó en un total de 12 campos microscópicos, lo que representó un área total de 1mm^2 . Se analizaron todos los núcleos de cada sección. Se determinó la intensidad de la marca de los núcleos se asignaron los siguientes valores: 0, ausente; 1, ligera; 2, moderada y 3, intensa. Se calculó el puntaje histológico (HSCORE) de la siguiente manera: $\text{HSCORE} = \sum P_i (i + 1)$, donde $i = 1, 2$ o 3 , P_i corresponde al porcentaje de cada intensidad, determinado en el rango de 0 a 100% (Lessey, 1988).

IV.5 TÉCNICA DE ACIDO PERYODICO DE Schiff (PAS)

Las muestras se procesaron por el método de inclusión en parafina y se obtuvieron cortes seriados de cada órgano con un grosor de 4-5 μm , posteriormente se montaron en laminillas. Se desparafinaron y rehidrataron a través de concentraciones decrecientes de alcohol hasta agua destilada. Posteriormente se colocaron en un vaso de Coplin con ácido Peryodico, durante 15 minutos, se realizaron lavados con agua destilada, posteriormente con el reactivo de Schiff se tiñeron las secciones durante 30 min. Se realizó posteriormente, un lavado con agua caliente esto con el fin de que el reactivo vire de color, después del lavado las secciones se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y se les colocó el cubreobjetos utilizando como medio de montaje (Permunt®).

I. RESULTADOS

I.1 RESULTADOS DE CÉLULAS PAS POSITIVAS Y NEGATIVAS

La observación microscópica de los cortes histológicos teñidos con PAS y HE, mostró el epitelio de revestimiento y la lámina propia del endosalpinx con una morfología normal, es decir, no se observaron células anormales, ni alteraciones patológicas en las dos regiones estudiadas, las células PAS (+) correspondieron a células secretoras que conservaban sus gránulos citoplasmáticos, sin embargo, es probable que existieran células cuyo contenido haya sido vertido hacia el exterior, en este caso estas células fueron cuantificadas como PAS (-); las células ciliadas correspondieron en su mayoría a células PAS(-) que se caracterizaron por no presentar gránulos citoplasmáticos . Se ha descrito en la cerda la existencia de células mixtas con características ultraestructurales intermedias entre secretoras y ciliadas, sin embargo estas células no pudieron ser identificadas mediante las tinciones empleadas ya que se requiere ser observadas con el microscopio electrónico de transición (**Steffl, 2004**)

En el ámpula del día 1 se observó una disminución significativa de las células PAS (+) con los diferentes tratamientos en relación al grupo testigo, esta disminución fue más acentuada en los animales tratados con Gpo3 (1000/500 UI de eCG y hCG respectivamente) y Grupo 4 (1000/1000 UI) (Figura 5 A). En contraste, en este mismo día, en los animales del grupo 4 (1000/1000 UI) mostraron un incremento significativo de las células PAS (-) en relación con el grupo control y grupo 2 ($P < 0.05$) (Figura 5 A). Los demás tratamientos no mostraron diferencias con el testigo.

Cuando se cuantificaron las células PAS (+) del ámpula en el día 1, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($P > 0.05$).

En cuanto al número de células PAS (-) del ámpula, se observó un incremento significativo en el número de células en relación a los diferentes tratamientos en relación con el grupo control, este incremento fue más notable en el grupo de animales del GPU 3 (1000/500 UI), seguidos por el Grupo 4 (1000/1000UI) y el Gpo 2 (PG600: 400 y 200 UI de eCG y hCG respectivamente) (Figura 5 B).

Cuando se comparó el número de células PAS (+) del ámpula en el día 2 y 1, se observó que disminuyen de manera significativa en los animales testigo Grupo 1 (SSF) y Grupo 2 (PG600) (Figura 5 A y B).

En el istmo, en el día 1, se observó una disminución significativa de las células PAS (+) en el grupo de animales del grupo 3 (1000/500 UI) en los otros dos tratamientos mostraron una menor cantidad de células que el grupo testigo pero no mostraron diferencias significativas con este último ($P > 0.05$) (Figura 5 C).

El número de células PAS (-) en el istmo del día 1, fue similar en los animales testigo y el grupo 3 (1000/500 UI), mientras que los animales del grupo 2 (PG 600) mostraron un número significativamente menor, y en los animales tratados del grupo 4 (1000/1000UI) fue significativamente mayor en relación con los dos primeros tratamientos. (Figura 5 C)

En el istmo del día 2, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el número de células PAS (+) entre los diferentes tratamientos y el grupo testigo, sin embargo el grupo de animales del grupo 4 (1000/1000UI) mostró un mayor número de células que los del grupo 2 (PG600) y grupo 3 (1000/500UI). En cuanto a las células PAS (-) en este mismo día, se observó una menor cantidad en el grupo de animales del Grupo 3 (1000/500) en relación con el gpo 2

(PG600), con respecto a los demás tratamientos no se presentó ninguna diferencia (Figura 5 D).

En la región del ámpula al comparar el día 2 con el día 1 se observó que los diferentes tratamientos provocan un incremento en la población de células PAS (-), en relación con el testigo. Cuando se compararon las células PAS (+) entre el día 2 y 1, se observó que en los animales del grupo 3 (1000/500UI) se incrementa ligeramente y con el resto de los tratamientos el número de células PAS (+) se mantuvo constante, por lo que no se observaron diferencias significativas entre ellas ($P > 0.05$) (figura 5 A y B).

En la región del istmo el número de células PAS (-) se incrementó de manera significativa ($P < 0.05$) en los animales testigo y del grupo 2 (PG600) entre el día 2 y 1, mientras que el número de estas células de los grupos restantes permaneció constante (Figura 5 C y D).

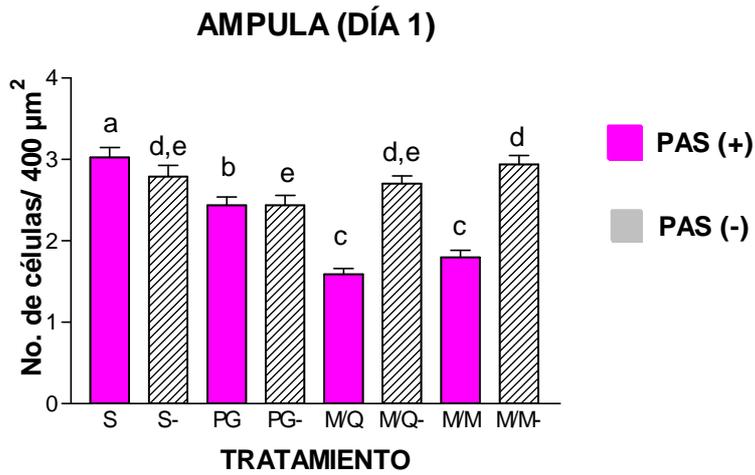


FIGURA 5 A. Número de células PAS+ y - observadas en el ámpula en el día 1

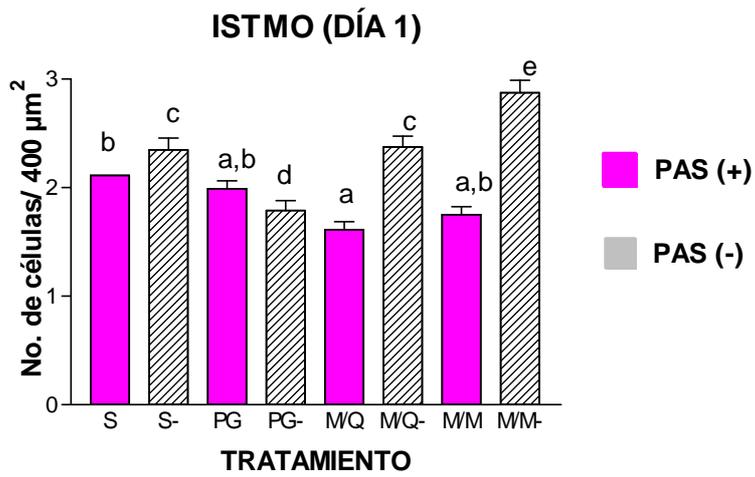


FIGURA 5 C. Número de células PAS+ y PAS- observadas en el itsmo en el día 1

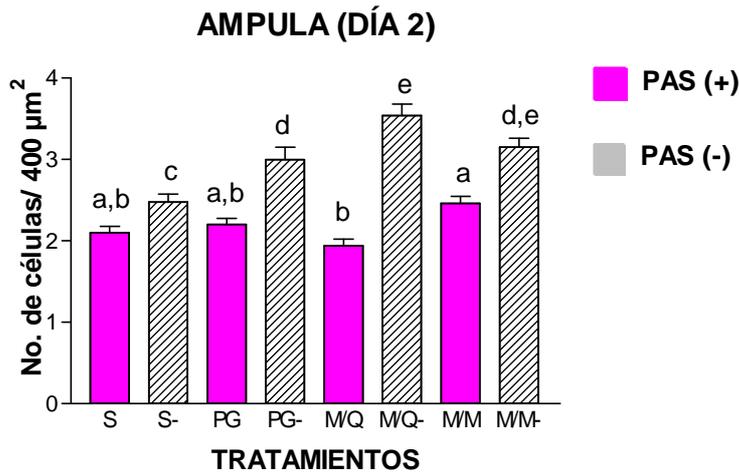


FIGURA 5 B. Número de células PAS+ y - observadas en el ámpula en el día 2

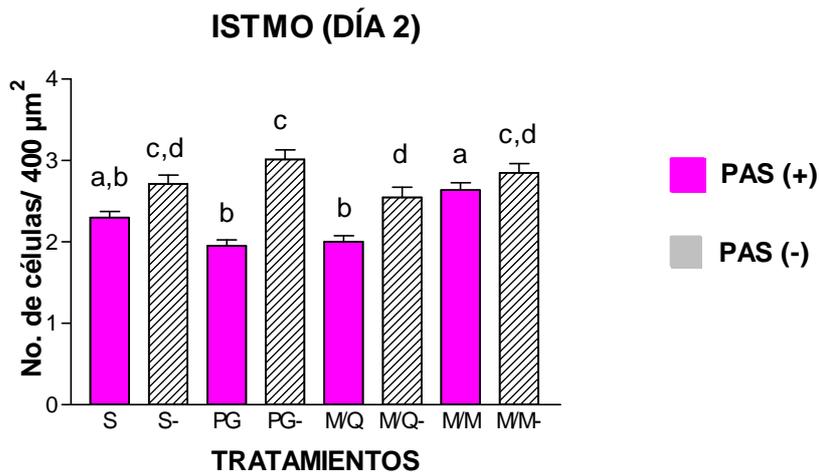


FIGURA 5 D. Número de células PAS+ y PAS- observadas en el istmo en el día 2

Figura 5. Distribución de las células PAS (+) y (-) en el epitelio (barras de color) y lámina propia (barras con líneas diagonales) del ámpula (A,B) e istmo (C,D) de las Tubas Uterinas de la cerda. **S:** animales del grupo testigo (gpo 1) a los que se les aplicó solución salina, **P:** animales (PG600), **MQ:** animales del grupo 3 (1000 UI de eCG y 500 UI de hCG), **MM:** animales del grupo 4 (1000 UI de eCG y 1000 UI de hCG). Las literales distintas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

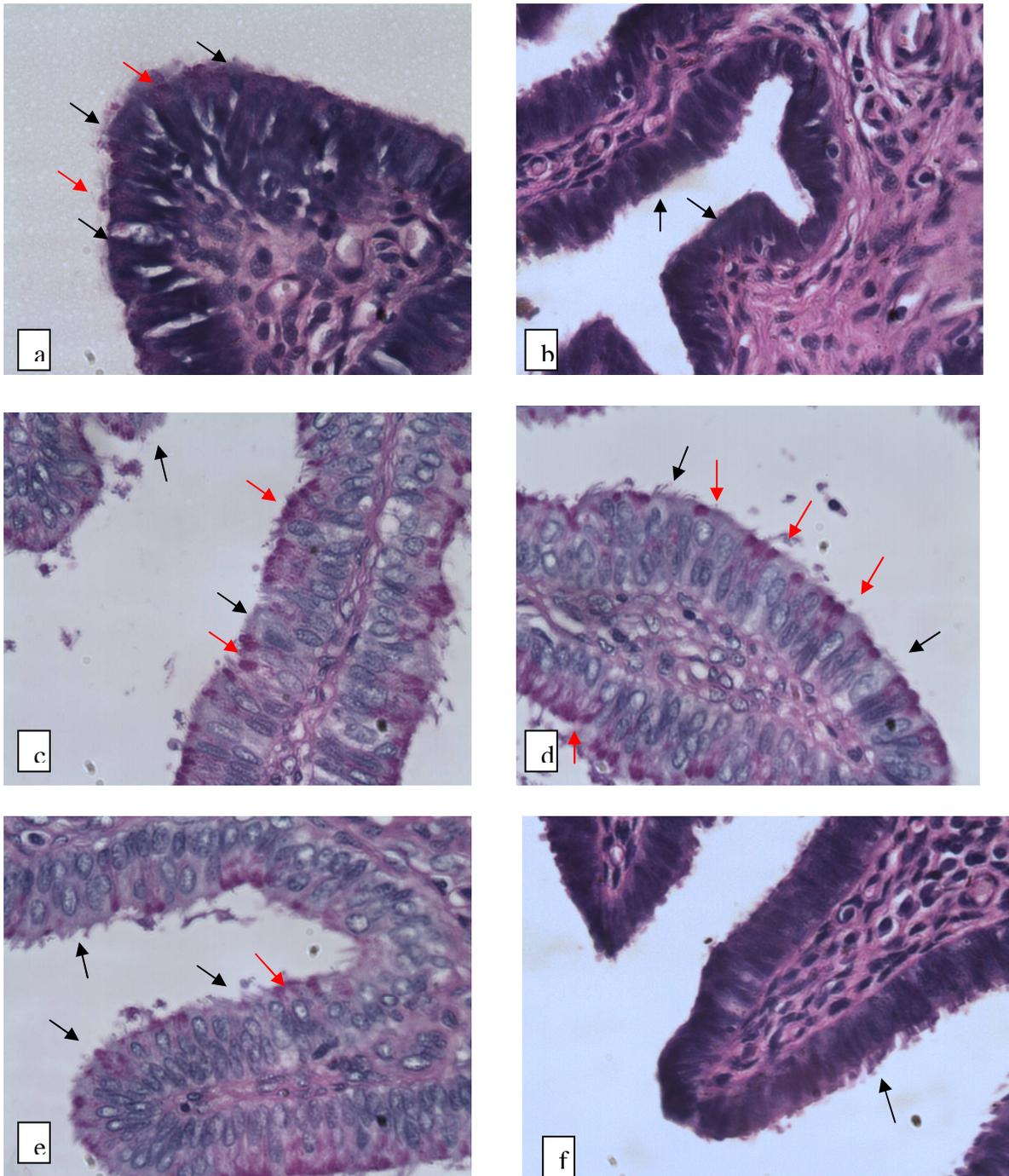


Figura 6. Micrografías de un corte histológico de ampulla (a, b y c) e istmo (d, e y f), donde se muestra la localización de las células PAS (+) secretoras (flechas en color rojo) y PAS (-) células ciliadas (flecha en color negro).

I.2 RESULTADOS DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

Se observaron células inmunopositivas para el RE α y RP tanto en el epitelio como en la lámina propia de las dos regiones estudiadas (ámpula e istmo), la marca se observó de manera exclusiva en el núcleo. No se observó marca inmunopositiva en los controles negativos en los que los anticuerpos monoclonales fueron sustituidos por PBS (Figura 8).

RECEPTOR A ESTRÓGENOS α (RE α)

Se observaron variaciones en la expresión de los RE α tanto en las células epiteliales como en las células de la lámina propia en las dos regiones analizadas y con los diferentes tratamientos utilizados.

Se observó marca inmuno positiva para el receptor a estrógeno exclusivamente en el núcleo de las células como se ha informado previamente (**Steffl et al., 2004**).

Se observaron que las células epiteliales inmuno positivas correspondieron de manera preferencial a las células secretoras, de tal manera que el RE α no se expresó en las células ciliadas de la cerda.

En el epitelio de la TU del ámpula del día 1 postratamiento, se observó un incremento en la expresión de los RE α (HSCORE) en todos los tratamientos en comparación con el grupo control. La mayor expresión se observó en el grupo 3 (1000/500 UI), seguido por el grupo 2 (PG600®) y el 4 (1000/1000UI) que tuvieron expresiones similares.

En la lámina propia se observó un incremento en el HSCORE del RE α del grupo de animales del grupo 3 (1000/500) en relación con el testigo; los demás grupos no mostraron diferencias en la expresión de este receptor (Figura 7 A).

Al comparar la expresión del RE α en las células epiteliales y la lámina propia del ámpula del día 1 se observó que fue similar en cada uno de los tratamientos (Figura 7 A).

En el tejido epitelial del ámpula de los animales del día 2 pos tratamiento se observó una disminución del HSCORE del receptor a estrógeno ($p < 0.05$) en el grupo 4 (1000/1000 UI) en comparación con los demás grupos. En la lámina propia se observó una disminución del HSCORE en el grupo 3 (1000/500 UI) en este mismo día en relación con el testigo, no se observaron diferencias entre los grupos restantes (figura 7 C).

En el ámpula de los animales del día 2, se observó en todos los casos que la expresión del RE α fue mayor en el tejido epitelial en relación con la lámina propia (Figura 7 A y C)

En el epitelio del istmo de los animales del día 1 pos tratamiento, se observó una disminución significativa del HSCORE para el RE α ($P < 0.05$) en el grupo 4 (1000/1000 UI) en relación con los demás grupos. En la lámina propia no se observaron diferencias en la expresión del RE α entre los diversos grupos y el testigo; del mismo modo no se observaron diferencias cuando se comparó el HSCORE para el RE α entre el tejido epitelial y la lámina propia de cada uno de los distintos grupos. (Figura 7 B)

En el epitelio del istmo del día 2 (24-48 hrs pos-tratamiento) se observó una disminución significativa del HSCORE para el RE α de los animales del grupo 4 (1000/1000 UI) en relación con el testigo y el grupo 3 (1000/500 UI) (Figura 7 D). En las células de la lámina propia del Istmo del día 2 se observó una disminución en la expresión del RE α en los animales del grupo 4 (1000/1000 UI) en relación únicamente con el de grupo 2 (PG600) (Figura 7 D). En relación con la expresión con el RE α entre las células epiteliales y las células de la lamina propia del istmo del día 2, se observó mayor expresión en las células epiteliales en todos los grupos excepto en el grupo 2 (PG600), en el que fue similar (Figura 7 D).

RECEPTOR A PROGESTERONA (RP):

Los RP se observaron exclusivamente en el núcleo de las células del ampulla como del istmo. A diferencia de lo que ocurrió con los RE α , los RP se observaron tanto en las células epiteliales ciliadas como en las secretoras. Se observó mayor expresión de los RP en epitelio en relación con las células de la lámina propia en el ampulla del día 1, excepto con el grupo 3 (1000/500 UI) en donde la expresión fue similar (figura 9 A). No se observaron diferencias en la expresión de los RP de las células epiteliales del ampulla del grupo testigo y los demás grupos en el día 1 (Figura 9 A). En las células de la lámina propia, la expresión del los RP del grupo testigo fue similar al de los animales del grupo 3 (1000/500 UI) y grupo 4 (1000/1000 UI), mientras que en el grupo 2 (PG 600) se observó la menor expresión del RP (Figura 9 A).

En el istmo del día 1 no se observaron diferencias en la expresión de los RP ni entre las células epiteliales ni entre las células de la lámina propia (Figura 9 B).

En el ámpula e istmo del día 2 no se observaron diferencias en la expresión de los RP de las células epiteliales del grupo testigo y los demás grupos, ni tampoco se observaron diferencias entre las células de la lámina propia cuando se compararon entre sí (Figura 9 C y D). Al comparar el HSCORE para el RP de las células epiteliales en relación con las del tejido conjuntivo (lámina propia), se observó que en ámpula existió mayor expresión en las células epiteliales del grupo 2 (PG600) y grupo 4 (1000/1000 UI) en relación con las células del conjuntivo (Figura 9. C), mientras que en el istmo las células epiteliales del grupo testigo fue mayor que las de la lámina propia (Figura 9 D).

I. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que la variación en los tratamientos con eCG y hCG exógenos provoca modificaciones en la población de células PAS (+) y PAS (-) del ampulla e istmo del oviducto de la cerda en los días 1 y 2 PT. Estas modificaciones pueden ser originadas ya sea de manera indirecta a través de las concentraciones plasmáticas de E2 y P4, o bien de manera directa a través de receptores a hCG /LH y FSH que han sido descritos previamente en la cerda (**Gawronska et al 1999**).

Las células ciliadas del epitelio de oviducto corresponden en su mayoría a las células PAS (-), estas células cumplen importantes funciones en mecanismos de transporte de ovocitos, embriones y posiblemente en la regulación de la progresión de espermatozoides (**Odor, Blandau, 1973, Hunter, et al., 1991**).

En los primates y en los carnívoros los procesos de ciliogénesis son dependientes de estrógenos. Hay estudios que demuestran que existen modificaciones de las células secretoras y cambios morfométricos y ultraestructurales en las células ciliadas de las diferentes regiones anatómicas de la tuba uterina de la cerda de la raza chinese Meishan (**Abe y Hoshi, 2007; 2008**). Estas modificaciones están asociadas con fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides de origen ovárico E2 y P4 (**Odor et al., 1980; Rumeri et al., 1998**).

Los diferentes tratamientos utilizados, provocan una disminución en la cantidad de células PAS (+) del ampulla durante el día 1 (0-24 hrs) PT en relación con los animales testigo (Figura 5 A). En este mismo día, también se observó una disminución significativa de células PAS (+) en el istmo de los

animales del grupo (1000/500 UI) en relación con el testigo (Figura 5 C); en estos grupos disminuyó la cantidad de células PAS (+) tanto en el ámpula como en el istmo, en el día 1 Post tratamiento. Las células PAS (+) corresponden a células secretoras por lo que puede suponerse que su disminución influya en la actividad secretora (**Abe 1996**) de la TU en este día, la posible disminución de la actividad secretora se desconoce; sin embargo se sabe que en las fases foliculares del ciclo estral aumenta la densidad de las células ciliadas y en las fases leuteínicas las células ciliadas disminuyen (**Jiwakanon et al., 2005**).

Se sabe que la actividad secretora del oviducto tiene lugar durante las etapas del ciclo estral en donde predomina los E2 (**Araki et al 1998**). Existen evidencias que indican que la tuba uterina de la cerda (**Buhi 1985, Buhi et al 1989**) es capaz de sintetizar de novo y liberar diversas glucoproteínas producidas durante la fase folicular es decir por la influencia de E2 endógenos o bien en animales ovariectomizados tratados con E2 (**Buhi et al 1990**). Esta secreción de glucoproteínas, como la oviductina se ha involucrado en eventos como la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (**Hunter 1994; Buhi et al 1996**)

Un posible indicador de la actividad secretora de la TU podría monitorearse a través de estas proteínas, tomado en cuenta que la secreción es diferente en el ámpula y en el istmo (**Buhi et al., 1996**). En el caso particular de la cerda, las glicoproteínas se asocian con la zona pelucida después de su paso a través de la tuba uterina (**Brown and Cheng, 1986; Hedrick et al 1987**). Se ha propuesto que en la zona pelucida pueden cumplir

la función de inhibir la actividad de proteasas (**Broeman et al 1989**). Resulta interesante que en el día 1 tanto del ámpula como del istmo la cantidad de células PAS (+) se asemejan en todos los tratamientos empleados. Esta observación es interesante debido a que el ámpula e istmo cumplen funciones reproductivas distintas; la primera se encarga del transporte del óvulo y la segunda actúa como un reservorio de espermatozoides. Las secreciones glucoproteicas en la porción caudal del istmo y en la unión Istmo-ampular pueden ayudar y generar un reservorio funcional de espermatozoides, ya que estas secreciones son viscosas (**Hunter 2002**), debido a la aparente disminución de la actividad secretora que observamos en el istmo, es razonable suponer que pueda alterarse la función del reservorio funcional de espermatozoides.

La homogeneidad observada en las células PAS (+) en el día 2 se debe a que disminuye el número de estas células en el grupo control y PG600 mientras que el número de células en los otros dos tratamientos permanece sin modificarse (Figura 5 A-D).

Al inicio del estro hasta que el ovulo llegue a la región istmo-ampular, sitio donde se presenta la fecundación, tarda aproximadamente en llegar 45 min (**Hunter 1974**), y los huevos permanecen en este sitio entre 60 a 75 hrs después del inicio del estro (**Hafez 2003**)

En el día 1 se observó mayor número de células PAS (-) (en su mayoría ciliadas) en los animales del grupo 4 (1000/1000 UI) en comparación con el testigo y el grupo 2 (PG600) en el ámpula; y entre el grupo 4 (1000/1000 UI) con los demás tratamientos del istmo (Figura 5A).

El movimiento ciliar es muy importante para la captación del ovulo por la fimbria pero una vez que esto ha sucedido, la contracción muscular es el factor más importante para su transporte para la mayor parte de las especies **(Hafez., 2002)**. Sin embargo también se sabe que la disminución en las células ciliadas o bien su incremento influyen de manera secundaria, en la velocidad del transporte de los óvulos acelerando o haciendo más lento el transporte, respectivamente; con base en nuestros resultados, podemos suponer que los tratamientos que provocaron un incremento en las células PAS (-) puedan presentar un incremento en la velocidad del transporte de los óvulos modificando la eficiencia reproductiva, ya que si este aumento de PAS (-) nuestros óvulos estarían más pronto en la región istmo-ampular y podría no darse la fertilización.

Mientras que en el ámpula de los animales testigo disminuye drásticamente el número de células epiteliales PAS (-) entre el día 2 y 1 (Figura 5 A y B), en los animales que tuvieron tratamientos con mayores dosis de eCG y menor dosis de hCG presentaron un mayor número de células PAS (-) con respecto al testigo (Figuras 5 A y B). Este predominio puede posiblemente incrementar la velocidad del transporte de los óvulos, como ya se ha descrito. Por lo cual el ovulo no se retardaría en la región istmo-ampular y no se llevaría la fertilización en este sitio.

En el istmo el número de células PAS (-) del día 2, presentaron menos variaciones que en el ámpula, sin embargo, en el testigo y el grupo 2 (PG600®) existió un incremento en el número de estas células permaneciendo similar en los otros dos tratamientos (Figura 5 D). En general la velocidad de transporte

en el istmo es menor en comparación con la del ámpula por lo que la mayor permanencia de los óvulos está relacionada con el contacto que debe existir con las secreciones de la tuba uterina (**Hafez, 2002**).

Las diversas combinaciones de eCG y hCG aplicadas exógenamente provocaron un incremento en las células PAS (+) y PAS (-) del ámpula; a diferencia de los animales testigo en donde las variaciones endógenas de FSH y LH provocaron una disminución de las células PAS (+), y no tuvieron efecto sobre el número de células PAS (-). En trabajos previos (**Steffl et al., 2004**), se ha observado que la proliferación celular, mediada a través de la identificación de la proteína Ki-67 (un marcador de proliferación celular), esta proteína se encuentra en esta etapa de replicación celular, cuando la célula está en mitosis, se correlaciona con células no ciliadas, es decir células secretoras; sin embargo aparentemente en el ámpula y en el istmo de los animales tratados el incremento fue de ambos tipos celulares, lo que puede considerarse un efecto estrógeno debido a que la ciliogénesis y el incremento de la actividad secretora del oviducto se ha observado en condiciones en la que aumenta las concentraciones plasmáticas de E2.

En el istmo los efectos que provocan el incremento de FSH y LH inducen un ligero incremento de las células epiteliales (PAS – y PAS+), mientras que los tratamientos superovulatorios exógenos del grupo 2 (PG600®), provocan un incremento en el número de células PAS (-) y un incremento de células PAS (+) en los animales del grupo 4 (1000/1000 UI).

El hecho de haber observado menores modificaciones en el istmo indica que los tratamientos exógenos de eCG y hCG tuvieron menor efecto que con respecto al ámpula.

En el istmo cuando se comparó el día 2 con el 1 en los animales del grupo 2 (PG600®) se observó un incremento de células PAS (-), que resultó significativo con respecto al grupo 3 (1000/500 UI) (Figura 5 C).

En el ámpula y el istmo de los animales control (aquellos que tuvieron un incremento pre-ovulatorio de FSH y LH endógena) los RE α tanto del epitelio como los de la lámina propia se incrementan entre el día 2 y 1. (Figura 7).

Estos datos concuerdan con el hecho de que en estas etapas del ciclo estral las concentraciones plasmáticas de E2 se mantienen elevadas y las concentraciones de progesterona bajas (**Stanchev et al, 1985; Rodríguez-Martínez, et al. 1988**).

Se ha demostrado que los E2 provocan regulación a la alza de los RE en diversas especies rata, oveja (**Zou and Ing, 1998**) y coneja (**Brenner 1975**).

Las células inmunopositivas para el RE α se observó de manera predominante en las células secretoras (PAS+).

Estos resultados concuerdan con estudios inmuno histoquímicos previos en cerdas (**Steffl et al., 2004**), primates y ratas (**Brenner et al., 1990, Okada et al., 2003**). En contraste con estas observaciones Comer y col. (1998) demuestra que los receptores a estrógenos pueden también observarse en el núcleo de las células ciliadas de las trompas de Falopio de la mujer; las razones de estas discrepancias no están bien establecidas, sin embargo, ha

sido demostrado que las células ciliadas del oviducto del humano difieren en diversas características de otras especies (**Nilsson and Reinius, 1969**), igualmente el uso de diferentes marcadores para el proceso de diferenciación celular de las células ciliadas puede explicar los resultados diferentes.

En el ámpula de los animales testigo y del grupo 2 (PG600®) se observó un incremento en la expresión de los RE α en las células epiteliales, en el día 2 en relación con el día 1, mientras que en los demás tratamientos la expresión fue similar (Figura 7 A y B). En las células de la lámina propia del ámpula se observó también un incremento de la expresión de los RE α en los animales testigo y una disminución en los animales del grupo 3 (1000/500 UI), los demás grupos no mostraron variaciones significativas (Figura 7 A y B). El incremento en la expresión de los RE α concuerdan con diversas observaciones en las que existe una regulación a la alza del RE α cuando los niveles de E2 son también elevados (**Peralta et al., 2005**). Por lo que se sugiere que el incremento observado en la expresión de los RE α corresponde a un efecto estrogénico.

El efecto estrogénico puede traducirse en el incremento de células PAS (-) que se observó en el ámpula con los diferentes tratamientos entre el día 2 y 1 en relación con el testigo (Figura 7). La mayor parte de las células PAS (-) corresponden a las células ciliadas por lo que se sabe en varias especies que el proceso de ciliogénesis es favorecida por los estrógenos (**Steffl et al., 2004**).

En el ámpula del día 1 PT se observó menor cantidad de células PAS (+) en los animales con los 3 diferentes tratamientos superovulatorios, mientras que la expresión (HSCORE) del RE α que ocurrió de manera preferencial (más

no exclusivo) en células PAS (+), las razones de esta aparente contradicción se desconoce, sin embargo puede plantearse distintas razones, para esta contradicción el HSCORE no es una medida directa de células PAS (+), si no que es un estimado de la expresión global de los RE α considerando no sólo el porcentaje de células inmunopositivas, sino también la intensidad de la marca; por lo que aunque la cantidad de células inmunopositivas fuera menor la intensidad de la marca pudiera ser máxima incrementando los valores del HSCORE; otra posibilidad es que como ha sido informado (**Araki, et al. 1998**) un efecto estrogénico en las TU es el incremento de la actividad secretora, lo cual pudiera provocar que un número de células inmunopositivas para el RE α , es decir células secretoras, hubieran vertido su material secretor al exterior de la células y los gránulos citoplasmáticos PAS (+) se hubieran agotado, por lo que estas células a pesar de seguir siendo secretoras no pudieran cuantificarse como células PAS (+) sino como PAS(-). Otra posibilidad es que células PAS (+) pudieran diferenciarse a PAS (-) reflejando también un efecto estrogénico como ha sido previamente postulado en la cerda (**Steffl et al 2004**)

En el istmo se observó un incremento de células PAS (-) en el grupo control y PG600, que coinciden con la mayor expresión de los RE α en estos mismos grupos, lo cual, pueden considerarse también como un posible efecto estrogénico en el istmo (Figura 7). Por lo que pueda darse un efecto de diferenciación similar al del ámpula (**Steffl M 2004**).

El RP se observó en el núcleo tanto de las células secretoras como las ciliadas, en los diferentes tratamientos empleados.

Los resultados de la Inmunohistoquímica para el RP se resumen en la Figura 9

De manera contraria al RE α , la expresión de los RP en el epitelio y lamina propia del ámpula (Figura 9 A y B) de los animales control (tratados con SSF) disminuye entre el día 2 y 1, esto correlaciona con la disminución del RP observada por Stanchev y col. (1985) en animales después del estro; sin embargo, observamos que en el istmo, de estos animales la expresión del RP se incrementó en el epitelio y lámina propia cuando se comparó el día 2 con el día 1 (Figura 9 C y D). Estos datos concuerdan con resultados previos en el útero de ovinos y caprinos, en los que concentraciones plasmáticas elevadas de estradiol incrementan la expresión de los RP en el útero, en la región del epitelio y en la lamina propia (**Spencer y Bazer, 1995; Ing, 1999**). Esta acción reguladora positiva de los E2 sobre RP ha sido observado en muchos otros tejidos, líneas celulares, excepto en el ovario en donde la regulación de estos receptores es independiente de los esteroides (**Miekle et al. 2000**).

En las células epiteliales del ámpula en el día 1 para el RP no se observaron diferencias significativas en el HSCORE entre los diferentes grupos de animales tratados; en las células de la lámina propia hubo una disminución del HSCORE en el grupo 2 (PG600®) en relación con todos los demás grupos, de manera similar en los animales del grupo 4 (1000/1000 UI) también se observó una disminución menos marcada del HSCORE, en relación con los demás grupos.

Cuando se comparó la expresión de los receptores de las células epiteliales en relación con las de la lámina propia para cada tratamiento se observó que la expresión de los RP en las células epiteliales fue mayor que la

de las células de la lámina propia de los distintos tratamientos, excepto en los animales del grupo 3 (1000/500 UI) en las que fue similar (Figura 9 A),

En el ámpula de los animales del día 2 PT no se observaron diferencias significativas en el HSCORE de los RP tanto de las células epiteliales como los de la lámina propia para los diferentes tratamientos. En los animales testigo y el grupo 2 (PG600®) y 4 (1000/1000 UI) se observó mayor expresión del RP en las células epiteliales en relación con las células de la lamina propia. Esta mayor expresión de los RP en las células epiteliales con respecto a los de la lámina propia del ámpula puede sugerir que existen bajas concentraciones plasmáticas de P4 en el día 1 y 2 (Coffey *et al.*, 1997).

En las células epiteliales y las células de la lámina propia del istmo de los animales del día 1 y 2 PT no se observaron diferencias significativas en el HSCORE del RP en los diferentes grupos, de igual forma no hubo diferencias cuando se comparó la expresión del epitelio y la lámina propia de todos los grupos estudiados. Esto implica que los diferentes tratamientos tuvieron poco efecto en la expresión de los RP en el día 1 o en el día 2; sin embargo cuando se comparó la expresión de los RP entre las células epiteliales y las de la lámina propia, para cada uno de los tratamientos, se observó una expresión similar en todos los grupos excepto en el grupo control, en que hubo mayor expresión en las células epiteliales (Figura 10 C y D). Esto indica que las diferentes dosis exógenas de eCG y hCG utilizadas disminuyen la mayor expresión de los RP en las células epiteliales produciendo una expresión similar al de las células de la lámina propia. Aunque se desconocen los efectos de estas modificaciones. En trabajos previos (Peralta *et al.*, 2005) demostraron

que en la cerda una menor expresión de los RP del endosalpinx del istmo y de la lámina propia del ampulla, durante las etapas estrogénicas del ciclo estral (inmediatamente antes o después de la ovulación), no se deben a una menor expresión del RNA mensajero del RP, ya que la expresión relativa de esta molécula fue siempre elevada y constante, sino a un control post-transcripcional diferencial; aunque se desconocen los mecanismos que regulan el control post-transcripcional, los resultados en nuestro estudio sugieren que tanto en los animales del grupo testigo como en los demás, estos mecanismos no se presenta o son inhibidos, lo que posiblemente originó que el RP se observara en niveles elevados en endosalpinx tanto en el istmo como del ampulla (**Peralta *et al.*, 2005**).

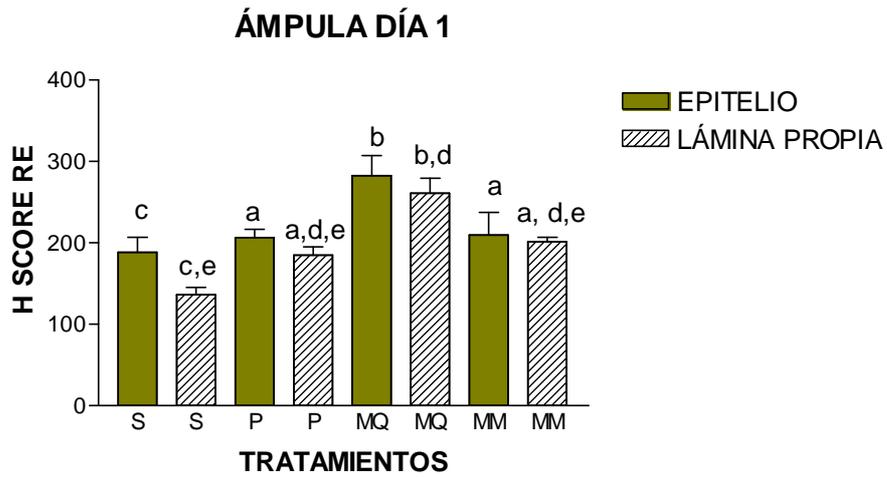
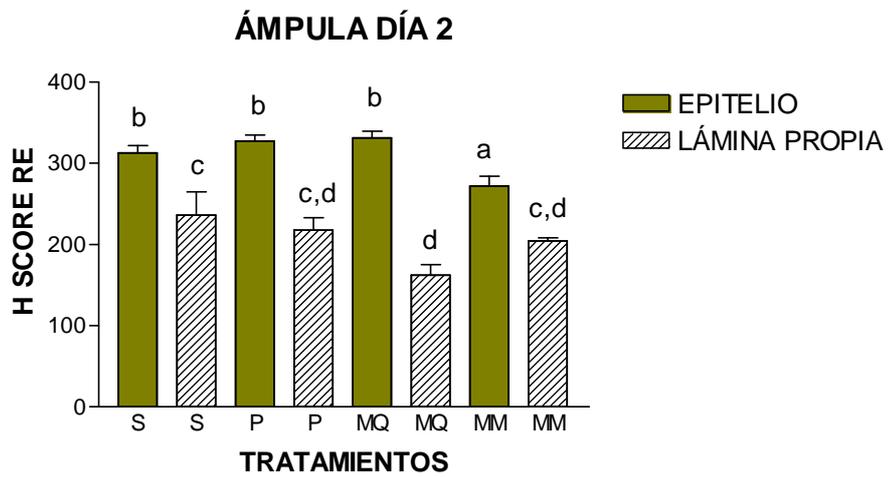


FIGURA 7 A. H SCORE de los RE α observadas en el ámpula en el día 1



a VS b $P < 0.05$
 d VS c $p < 0.05$

FIGURA 7 B. H SCORE de los RE α observadas en el ámpula en el día 2

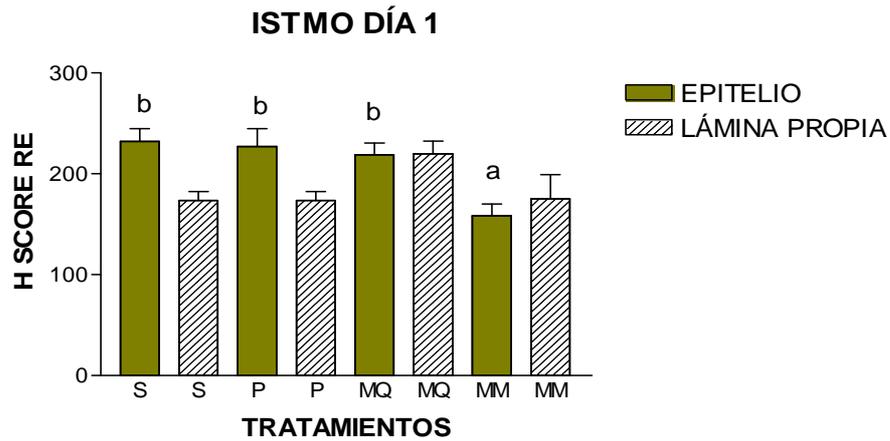


FIGURA 7 C. H SCORE de los RE α observadas en el istmo en el día 1

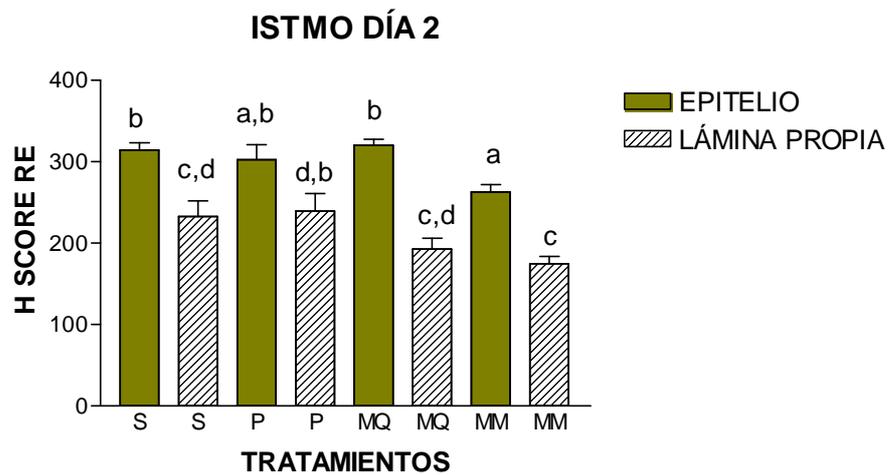


FIGURA 7 D. H SCORE de los RE α observadas en el istmo en el día 2

Figura 7. Distribución de los RE α en el epitelio (barras de color) y lámina propia (barras con líneas diagonales) del ampolla (A,B) e istmo (C,D) de las TU de la cerda. **S:** animales tratados con solución salina, **P:** animales tratados con PG600, **MQ:** animales tratados con mil UI de eCG y quinientas UI de hCG, **MM:** animales tratados con mil UI de eCG y mil UI de hCG. Las literales distintas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

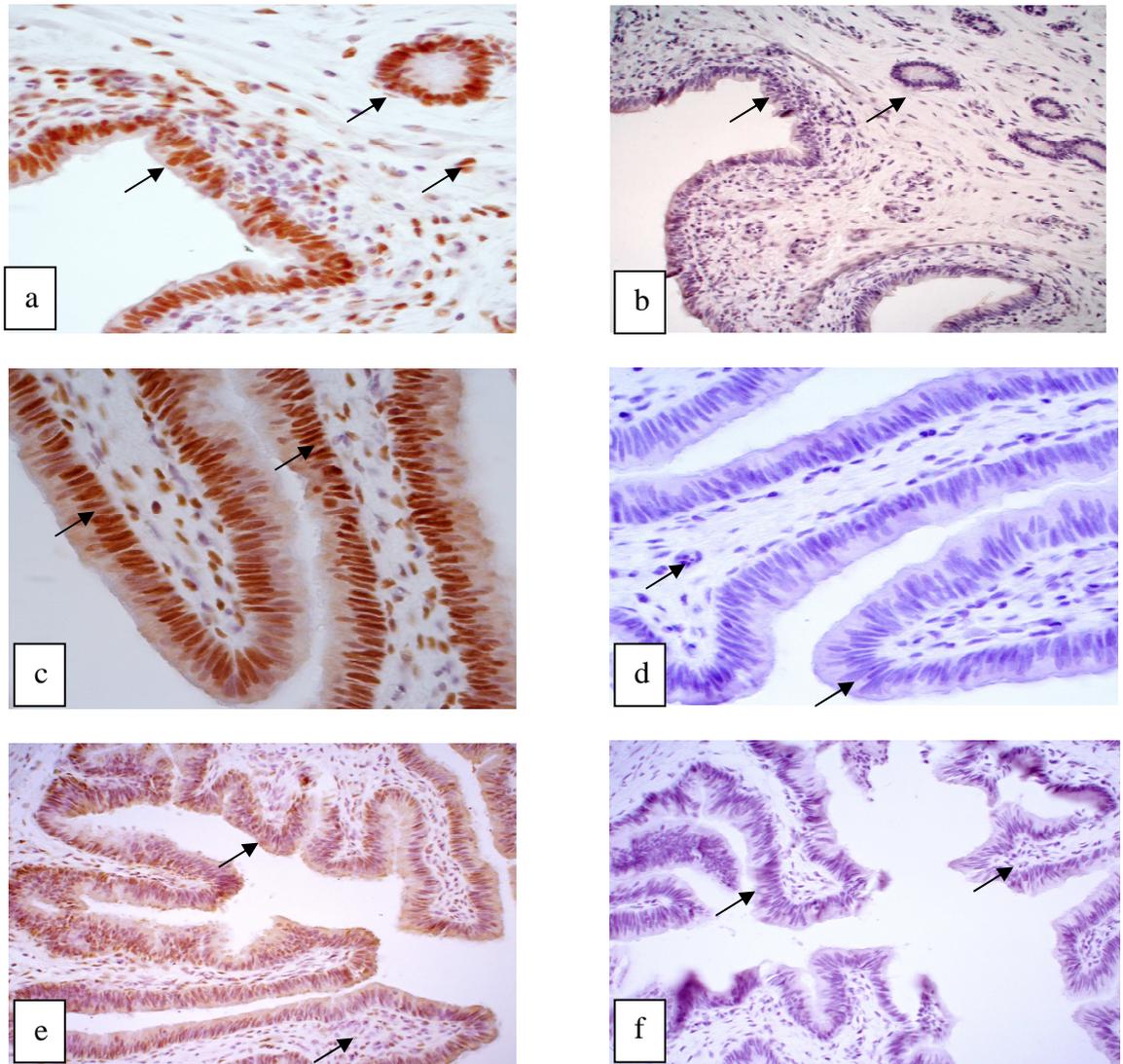
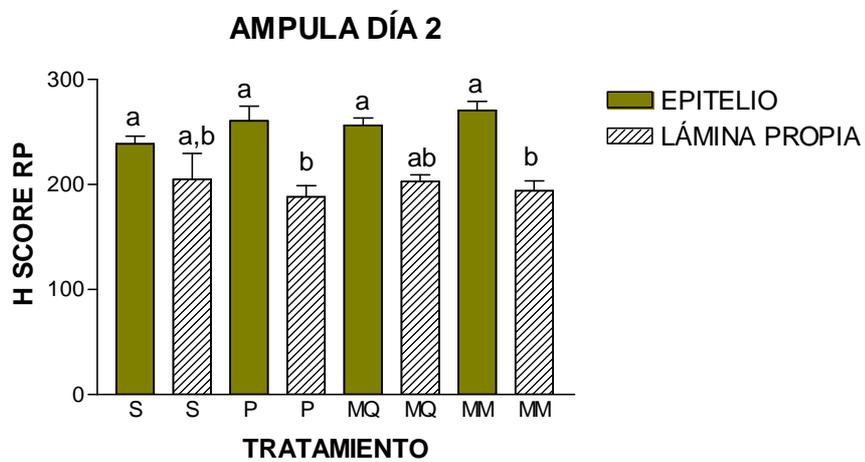


Figura 8. Micrografía de un corte histológico en donde se muestra la localización inmunohistoquímica del RP y RE, en un corte de tuba uterina donde presenta inmunoreactividad positiva y el control negativo en el epitelio y lámina propia. **Útero:** **a)** inmunoreactividad positiva al RE, **b)** control negativo; **Ámpula:** **c)** inmunoreactividad positiva al RP y **d)** control negativo; **Istmo:** **e)** inmunoreactividad al RE y **f)** control negativo. **40x.**



NO HAY VARIACION

FIGURA 9 A. H SCORE de los RP observadas en el ámpula en el día 2

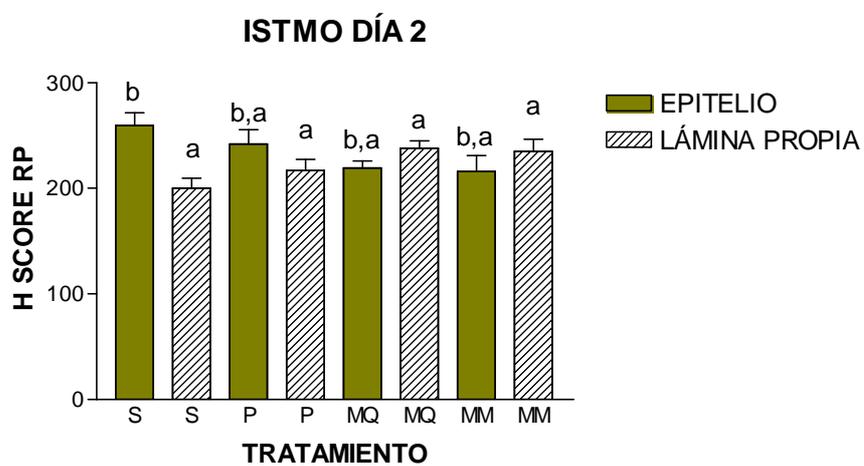


FIGURA 9 B. H SCORE de los RP observadas en el istmo en el día 2

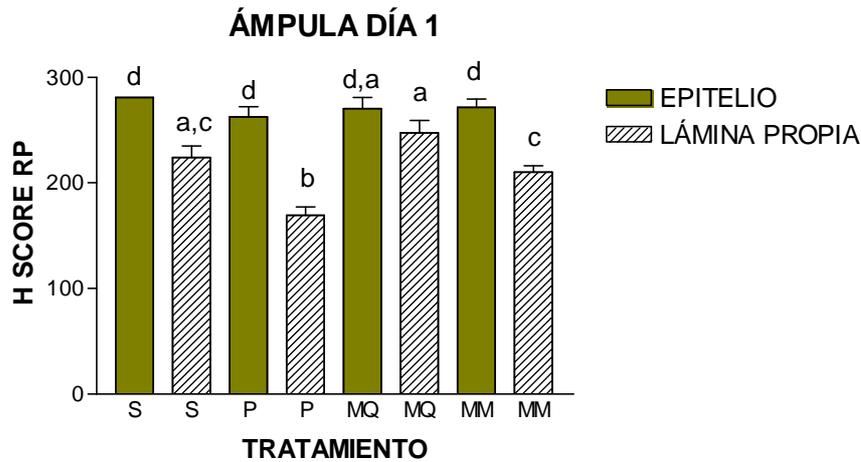


FIGURA 9 C. H SCORE de los RP observadas en el ámpula en el día 1

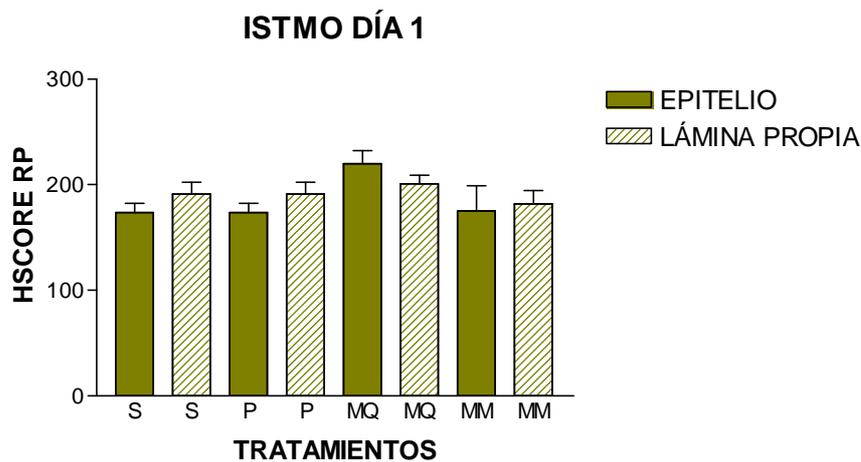


FIGURA 9 D. H SCORE de los RP observadas en el istmo en el día 1

FIGURA 9. Distribución de los RP en el epitelio (barras de color) y lámina propia (barras con líneas diagonales) del ámpula (A,B) e istmo (C,D) de las TU de la cerda. **S:** animales tratados con solución salina (gpo 1), **P:** animales del grupo 2 (PG600®), **MQ:** animales del grupo 3 tratados con 1000 UI de eCG y 500 UI de hCG, **MM:** animales del grupo 4, tratados con 1000 UI de eCG y 1000 UI de hCG. Las literales distintas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

I. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. Los diferentes tratamientos superovulatorios utilizados de eCG y hCG provocaron cambios regionales en el número de células PAS (+) y PAS (-) en relación con los animales testigo
2. En los animales testigo se observó una disminución en las células PAS (+) y (-) del ámpula, mientras que en el istmo permanecieron constantes.
3. Los diferentes tratamientos superovulatorios provocaron en el ámpula una disminución en las células PAS (+) en el día 1 y un incremento de las células PAS (-) en el día 2.
4. En el istmo del día 1 las dosis bajas de eCG y hCG provocaron una disminución de las células PAS (-) y dosis iguales o elevadas de estas hormonas provocaron un incremento de estas mismas células.
5. En el Istmo del día 2 se observó que en el grupo 2 (PG600®) provocó un incremento de las células PAS (-), mientras que en los animales del grupo 4 (1000/1000 UI) se provocó un incremento de las células PAS (+).
6. En el ámpula y en el istmo se observó una mayor expresión en los RE α de las células epiteliales tanto en el grupo testigo como en los diferentes tratamientos superovulatorios entre el día 1 y 2.
7. Las dosis exógenas de eCG y hCG evaluadas tuvieron un mayor efecto sobre la expresión de los RE α en relación con los RP y tuvieron mayor incidencia en el ámpula que en el istmo.

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan información básica sobre los cambios en el número de células PAS (+) Y PAS (-) y en la expresión de los RE y RP en las distintas regiones anatómicas de las TU de la cerda con diversos tratamientos superovulatorios, sin embargo queda sin ser esclarecido el mecanismo de acción de estos compuestos, así como sus efectos indirectos y directos sobre la TU.

Para lo cual se sugiere realizar estudios morfológicos más extensos para conocer las modificaciones que las tienen lugar tanto en las células ciliadas como en las secretoras, dichos estudios pueden llevarse a cabo mediante el microscopio electrónico de transmisión como el de barrido a fin de estudiar las modificaciones en la ciliogénesis y actividad secretora respectivamente. Debe determinarse la altura del epitelio, la cual se ha correlacionado de manera directa con la actividad secretora de las células (PAS (+) (**Verghage et al., 1984**). Deben hacerse estudios que empleen tanto marcadores de proliferación celular como marcadores de células epiteliales ciliadas, como lo es el Ki67 y anticromagranina A respectivamente (**Steffl y Schwieger, 2004**).

La identificación de modificaciones en la actividad secretora de las células puede hacerse mediante la determinación de glicoproteínas sulfatadas y proteínas dependientes de estrógenos, las cuales han sido descritas previamente en la TU de la cerda (**Nielsen et al., 2001**).

Una vía muy relevante de investigación es conocer los efectos extragonadales de LH y FSH, mediante anticuerpos monoclonales o identificación

de las hormonas in situ. También se pueden estudiar los efectos extrahipofisarios de GnRH, mediante la identificación de sus receptores (GnRH) en las TU de animales con diversos tratamientos superovulatorios como los aquí mostrados.

Debe también ampliarse el estudio a un mayor número de días post-ovulación con la finalidad de conocer las modificaciones morfológicas y la expresión diferencial del ámpula e istmo con variaciones en la cantidad de eCG y hCG durante todo el tiempo de permanencia de los óvulos (o embriones) en las TU; deberán incluirse otras regiones de interés fisiológico como son las fimbrias y la unión istmo-ampular, ya que la primera es la responsable de la captación de los óvulos, además de ser considerada la región más sensible desde el punto de vista endocrino, y la segunda, además de ser el sitio donde ocurre la fecundación es una región de permanencia de óvulos en las primeras horas pos-ovulación (**Fields et al., 2004**).

Deben realizarse estudios sobre el miosalpinx ya que en la mayor parte de las especies (excepto primates y gatas) constituye el principal mecanismo de transporte de óvulos y embriones a lo largo de las TU (**Hafez; Brenner y West, 1975**). A este respecto es conveniente el estudio inmunohistoquímico para los RE α y RP, pues se sabe que los E2 favorecen la contracción del miosalpinx y la P4 la inhibe; además de la determinación de los receptores a LH (LHR) y GnRH (GnRHR) para conocer como las variaciones en eCG y hCG pueden regular sus propios receptores, recientemente se ha involucrado a estos receptores en los proceso de inhibición de la contracción del miosalpinx (**Lei et al., 1993; Gawronska et al., 2000^a y b**)

Otros estudios complementarios que deben considerarse sobre las ventajas y desventajas sobre el uso de diversos tratamientos superovulatorios involucran conocer la calidad de los ovocitos, su viabilidad y número, así como su capacidad de ser fertilizados y los posibles efectos sobre su tasa de transporte, o bien si tienen efectos sobre el desarrollo embrionario, ya que el endosalpinx y el embrión establecen un diálogo molecular y regulatorio durante su tránsito a lo largo de las TU.

Es también importante desde el punto de vista reproductivo conocer las características del istmo y su interacción con los espermatozoides ya que constituye un reservorio natural de los mismos después de la cruce o inseminación artificial, debe saberse si los distintos tratamientos superovulatorios tienen efectos sobre estos gametos en diversos procesos reproductivos fundamentales como son: reacción acrosomal, capacitación espermática, viabilidad y capacidad fecundante (**Hafez, 2003**).

I. BIBLIOGRAFIA

Rodriguez-Martinez H. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*. 2007; 68S:138-146.

Yaniz JL, Lopez-Gatius F, Hunter RFH. Scanning electron microscopy of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Anat Histol Embryol* 2006,35:28-34.

Harper MJK. 1994. Gamete and zygote transport. In *The Physiology of Reproduction*. Second Edition. E. Knobil and J.D. Nell editors. Raven Press N.Y.

Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H and Johannissin A. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod Supp*. 2001;58:129-145.

Steffl M, Schweiger M, Amselgruber WM. Immunophenotype of porcine oviduct epithelial cells during the oestrus cycle: a double-labelling immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 2004; 121:239-244.

Abe H, Oikawa T. Effects of estradiol and progesterone on the cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the newborn golden hamster. *Ant Rec* 1993;235:390-398

Anzaldúa SR, Camacho-Arroyo I, Cerbón MA. Histomorphological changes in the oviduct epithelium of the Rabbit during early pregnancy. *Anat. Histol. Embryol*. 2002; 31 (5): 308-12

Anzaldúa SR, Camacho-Arroyo I, Reyna-Neyra A, Pérez-Martínez M, Cerbón M. Regional differences in expression of progesterone receptor of oviduct and uterus of rabbit during early pregnancy. *Comp Biochem Physiol A. Mol. Integr Physiol*. 2007; 147(3): 685-90

Barboni B, Mattiolo M and Seren E. Influence of progesterone one on boar sperm capacitation. J Endoc. 1995;144:13-18.

Hunter RHF. Ovarian endocrine control of sperm progression in the Fallopian tubes. Oxford Rev Reprod Biol 1995;17:85-125.

Demot RP and Suarez SS. Hiperactivated sperm progress in the mouse oviduct. Biol Reprod 1992.46:779-85.

Killian GJ. Evidence for the role of oviduct secession in sperm function, fertilization and embryo development. Animal Reprod Sci. 2004;;82:141-153.

Gandolfi F. Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. Mic Res Tech. 1995;32:1-12.

Sukjumlong S, Persson E, Kaeoket K, Dalin A-M. immunohistochemical studies on oestrogen receptor alpha (ER α) and the proliferative marker Ki-67 in the sow uterus at oestrus and early pregnancy. Reprod Dom Anim. 2004;39:361-369

Hunter RFH. Vital aspects of fallopian tube physiology in pigs. Reprod Dom Anim. 2002;37:186-190.

Hunter RFH, Huang WT and Holtz W. Regional influrnces of the fallopian tubes on the rates of boar sperm capacitation in surgicall inseminated gilts. J Reprod Fert. 1998;114:17-23.

Buhi WC. Secreted proteins of the oviduct. Cell Tissues Organs. 2000;166:165-179.

Buhi WC, Alvarez IM. Identification, characterization and localization of three proteins expressed by the porcine oviduct. Theriogenology. 2003;60:225-238.

Brinkley HJ. Endocrine signaling and female reproduction. Biology of reproduction. 1981;24:22

Trujillo OME. Sincronización del estro en cerdas nulípara y primíparas. Tesis para obtener el grado de maestría en producción animal: cerdos. Universidad Nacional Autónoma de México. Diciembre de 1994

Fuentes-Cintra M, Pèrez GL, Suárez HY, Soca PM. Características reproductivas de la cerda. Influencia de algunos factores ambientales y nutricionales. Revista electrónica de Veterinaria REDVET. 2006. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Hafez ESE, Féher de la Torre G. Reproducción e inseminación artificial en animales. 2003 Edit Mc Graw-Hill Interamericana.

Mc Donald LE, Pineda MH. Veterinary Endocrinology and Reproduction. 1991. Lea & Febiger

Hughes, PE. Reproducción del cerdo. 1984. Edit Acribia

Laing JA, Brinley WJ, Wagner WC. Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria. 1991. Interamericana-Mc Graw Hill.

Hunter MG, Picton HM, Biggs C, Mann GE, McNeilly AS, Foxcroft GR. Perioovulatory endocrinology in high ovulating Meishan sows. J Endocrinol 1996;150(1):141-147

Trujillo OME. Efecto del destete precoz sobre la eficiencia reproductiva de cerdas de diferentes números de partos. Tesis Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 1998.

Prieto-Gómez B, Velázquez-Paniagua M. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropina. Rev Fac Med UNAM, Vol. 45 No. 6 Nov-Dic, 2002.

Coffey RD, Parker GR, Laurent KM. Manipulation of the estrous cycle in swine. University of Kentucky. College of Agriculture. 1998. <http://uky.edu/Ag/AnimalSciences/farm/swinepub.html>

Hafeez ESA. Reproduction in farm animal. Lea & Febiger. 2000

Soede NM, Helmond FA, Kemp B. Perioovulatory profiles of estradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. J Reprod Fertil 1994;101(3):633-641

Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. Rev Arch Histol Cytol 2004;67 (5):417-434

Thomas E. Spencer and Bazer F W. Temporal and Spatial Alterations in Uterine Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression during the Estrous Cycle and Early Pregnancy in the Ewe Biol of Reprod. 1995;53; 1527-1543

Kimmins S and Mac Laren LA. Oestrus cycle and pregnancy effects on the distribution of estrogen and progesterone receptor in Bovine endometrium. 2001. 22 (8):742-748

Robinson, R.S. Mann GE, Lamming GE & Wathes DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples through the oestrus cycle and early pregnancy in cows. Reproduction 2001. 122:965-79.

Pérez-Rivero J-J., Aguilar-Setién, A., Martínez-Maya, J-J., Perez-Martínez, M., Serrano, H. Phytoestrogen Consumption and their Effects in Different Organs and Systems of Domestic Animals. Agricultura Técnica (Chile) 2007. 67(3):325-331

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la Célula*. Cuarta edición. Edit Omega. Barcelona España 2004

Biserka MJ. And Orla M C. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 2004. 128:139-146.

Bunone G., Briand P-A., Miksicek RJ., and Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J*. 1996.15. 2174-2183.

Pérez-Rivero JJ, Aguilar-Setien A, Villa-Godoy A, Serrano H. Relationship between structure and function of receptors for steroid hormones: Estrogen receptors. *Vet Mex*. 2005; 36(4) 43-52. Review

Nagy L, John Schweabe WR. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends in Biochem Sci*. 2004; 29 (6): 317-324.

Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 1992; 13: 129-145.

Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM. DNA binding domains in diverse nuclear receptor function as nuclear export signal. *Curr Biol* 2001; 11: 1749-1758

Bapat AR, Frail DE. Full-length estrogen receptor and its ligand-binding domain adopt different conformations upon binding ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86:143-149.

Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 2002; 416:499-506

Karalus U; B. Downey, y L. Ainsworth. Maintenance of ovulatory cycles and pregnancy in prepuberal gilts treated with PMSG and hCG Animal Reproduction Science. 1990. 22: 235-241.

Schilling, E. The effect of pregnant mare serum gonadotropin on follicle stimulating hormone and estradiol secretion in the prepuberal gilt. Animal Reprod Science. 1972. 21 (2):93-100. 1989

Videla Dorna I. y Wüst, A. R. Uso de la combinación de eCG - hCG (DUOGESTAL[®]) para la sincronización de celo en cerdas púberes nulíparas. Rev. Arg. de Prod. Animal, 1998, 18:1, 355-356.

Guthrie HD, Pursel VG, Wall RJ. Porcine follicle stimulating hormone treatment of gilt during an altrenogest-synchronized follicular phase: effects on follicle growth, hormone secretion, ovulation, and fertilization. J Anim Sci 1997; 75:3246-3254)

Adam J, Malgorzata BIALLOWICZ, Monika KACZMAREK, Wieslaw DEMIANOWICZ, Juan RIOPEREZ, Marta WASIELAK and Marek BOGACKI. Influence of Estrus Synchronization of Prepubertal Gilts on Embryo Quality. J Reprod Develp 2005; 51:379-384

Breen S.M., Rodriguez-Zas S.L., Knox R.V. Effect of altering dose of PG600 on reproductive performance responses in prepubertal gilts and weaned sows. Animal Reprod Science 2006; 95: 316-323

Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botté F, Guillouet P, Furstoss V, Boisseau C, Manceau P, Locatelli A, Martínez EA. Transfer of vitrified blastocysts from one or two superovulated large white hyperprolific donors to Meishan recipients: reproductive parameters at day 30 of pregnancy. Theriogenology 2004; 61:843-850

Coffey RD, Parker GR and Laurent KM. Manipulation of the estrous cycle in swine. University of Kentucky. College of Agriculture. 1997:1-6.

Rozeboom K, See T and Flower B. Swinw news. NC State. College of Agriculture and life sciences. 2000;23:4

Esbenshade KL, Ziecik AJ, Britt JH. Regulation and action of gonadotrophins in pigs. J. Reprod. Fert. Suppl. 1990; 40:19-32.

Fields MJ, Shemesh M. Extragonadal Luteinizing Hormone receptor in the tract reproductive tract of domestics animals. Biology of Reproduction 2004; 71:1412-1418

Ziecik AJ, Kaczmarek MM, Blitek A, Kowalczyk AE, Li X, Rahman NA. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. Molecular and cellular Endocrinology 2007; 269:51-60

González-Moran MG. Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular. México D.F.: AGT editor, S.A., 2008.

Goulding H, Pinder S, Cannon P, Pearson D, Nicholson R, Snead D, et al. A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. Hum Pthol 1995;26:291-294.

García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. 1993. Edit. Interamericana Mc Graw Hill.

Carel J, Marc H. Immunochemistry. 1994. Ed. Marcel Dekker. USA.

Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS. Immunohistochemical analysis of the human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. J Clin. Endocrinol. Metab. 1988; 67: 334-340

Steffl M, Schweiger M, Amselgruber WM. Immunophenotype of porcine oviduct epithelial cells during the oestrus cycle: a double-labelling immunohistochemical study. Histochem Cell Biol 2004; 121:239-244.

Brenner RM, West NB, McClellan MC. Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol Reprod* 1990; 42:11-19

Okada A, Ohta Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Iguchi T. Expression of estrogen, progesterone and androgen receptor in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats. *J Mol Endocrinol* 2003; 30:301-315.

Comer Mt, Leese HJ, Southgate. Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium. *Hum Reprod* 1998; 13:3114-3120

Nilsson O, Reinius S. Light and electron microscopic structure of the oviduct. In: Hafez ESE, Blandau RJ (eds) *The mammalian oviduct. Comparative biology and methodology*. University Press, Chicago 1969, 57-84.

Gawronska B, Pauku T, Huhtaniemi I, Wasowicz G, Ziecik J. Oestrogen-dependent expression of LH/hCG receptor in pig Fallopian tube and their role in relaxation of the oviduct. *J Reprod and Fertil*. 1999;115:293-301.

Odor DL, Gaddum P, Rumery RE, Blandau RJ. Cyclic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual cycle and after estrogen treatment in the pig-tailed monkey. *Macaca nemestrina. Anat rec* 1980. 198:35-57

Araki Y, Yoshida-Komiya H. Mammalian oviduct-specific glycoprotein: Characterization and potential role in fertilization process. *J reprod and Develp*. 1998.;44(3) review

Buhi Wc, Demonstration of the synthesis and release of polypeptide by estrous and early pregnant porcine oviduct tissue in culture. *Biol Reprod* 1985; 26(suppl1):537 (abstract 181).

Buhi WC, Vallet JL, Bazer FW. De novo synthesis of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explants culture. *J Exptl Zool* 1989.252:79-88.

Buhi WC, Alvarez IM, Sudhipong V, Dones-smith MM. Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. *Biology of Reproduction* 1990;43:929-938.

Brown CR, Cheng WKT, Changes in composition of the porcine zona pellucid during development of the oocyte to the 2 to 4 cell embryo. *J Embriol Exp Morph* 1986; 92:183-191

Hendrick JL, Warpdrrip NJ, Berger T. Differences in the macromolecular composition of the zona pellucid isolated from pig oocytes, eggs and zygotes. *J Exptl Zool* 1987;241:257-262.

Broermann DM, Xie S, Nephew KP, Pope WF. Effects of the oviduct and wheat germ agglutinin on enzymatic digestion of porcine zona pellucidae. *J Anim Sci* 1989; 67:1324-1329

Hunter RHF. Vital aspects of fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Dom Anim.* 2002; 37:186-190.

Stanchev P, Rodriguez Martinez H, Edqvist LE, Eriksson H. Oestradiol and progesterone receptor in the pig oviduct during the Oestrus cycle. *J Steroid Biochem* 1985; 22(1):115-20

Rodriguez Martinez H, Stanchev P and Eriksson H. Ultrastructure of the endosalpinx in relation to oestradiol and progesterone receptor during the porcine oestrus cycle. *Proc. 11th ICARA, Dublin. 1988 Vol 2, p 64*

Zou K, Ing NH. Oestradiol up-regulates oestrogen receptor, cyclophilin, and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase mRNA concentration in endometrium, but down-regulates them in liver. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 64(5-6):231-7

Brenner RM and West NB. Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. *Annual Review of Physiology* 1975; 37: 273-303.

Miekle A, Forsberg M, Sahlin L, Masironi B, Tasende C, Rodriguez-Pinon M, et al . A biphasic action of estradiol on estrógeno and progesterone receptor expression in the lamb uterus. *Reprod Nutr Dev* 2000; 40 (3): 283-293.

Spencer TE, Bazer FW. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the oestrus cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod*. 1995; 53:1527-1543.

Ing NH, Ott TL. Estradiol up-regulates estrogen receptor a messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol Reprod*. 1999 60;134-139.

Nielsen M, Bogh IB, Schmidt M, Greve T. immunohistochemical localization of estrogen receptor- α in sex ducts and gonads of newborn piglets. *Histochem Cell Biol* 2001;115:521-526.

Lei ZM, Tokt P, Rao ChV. Novel coexpression of human chorionic gonadotropin (hCG)/human luteinizing hormone receptors and their ligand hCG in human fallopian tubes. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:863-872.

Gawronska B, Stepień A, Zięcik AJ. Effect of estradiol and progesterone on oviductal LH-receptor and LH-depend relaxation of the porcine oviduct. *Theriogenology* 2000; 53:659-672.

Gawronska B, Stepień A, Zięcik AJ. Role of luteinizing hormone in control of oviduct function. *Reprod Domest Anim* 2000; 35:129-133.

Jiwakanon J, Persson E, Kaeoket K, Dalin A M. The sow endosalpinx at different stages of the oestrous cycle and at anoestrus studies of morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Reprod Dom Anim* 2005;40:28-39.

Peralta LE, Roldán-Olarte M, Argañaraz M, Ciocca D, Miceli DC. Progesterone receptor: their localization, binding activity and expression in the pig oviduct during follicular and luteal phases. *Dom Anim Endocrinol* 2005;28:74-84.