

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS RECEPTORES A
ESTRÓGENOS EN EL OVIDUCTO DE LA CONEJA DURANTE
LOS PRIMEROS DÍAS DE LA GESTACIÓN**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MILTON ENRIQUE CARDOSO RANGEL

Asesores:

**Dr. Santiago René Anzaldúa Arce
MVZ Héctor Villaseñor Gaona
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes**

México D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Dedico este logro a Dios, la principal fuerza motriz del universo, que colocando cada pieza en su lugar, me permitió vivir en un contexto maravilloso donde puedo honrarle y agradecerle.

A mi madre María Elena Rangel Moreno por dedicarme su vida, su cariño, por la comunicación tan especial que guardamos y porque junto con ella he soñado alcanzar este momento, a ti mamá, pues soy el producto de tu esfuerzo y amor.

A mi padre, el profesor Enrique Cardoso Hernández porque en su vocación me enseñó el amor al conocimiento, porque me educó con todos los valores y principios que me sitúan ahora en este gran momento de mi vida y por el gran respeto y cariño que te tengo.

A mi hermana Tania Elena Cardoso Rangel, por ser mi compañera y cómplice en las buenas y en las malas y por darme un sobrino maravilloso a quien también le dedico este trabajo: Jesús Emiliano Rangel Cardoso.

A mis abuelas Teodora Hernández y en especial a mi Mami Luchita (Q.E.P.D.) cuya presencia siento en cada día de mi vida cuidándome con ese inmenso cariño que me demostraba y que lo sigue haciendo desde donde se encuentra.

A mis padrinos Miguel Ángel Solano Moreno y Luz María Rangel Moreno por ser también mis papás, por quererme y apoyarme siempre en todas mis decisiones.

A la familia Bazán Estrada, por ser también mi familia en todos estos años, pues con su invaluable apoyo, consejos, y grandes conversaciones han contribuido que termine esta etapa. Gracias Lic. Guadalupe Estrada, Avril, Inés, María José, Ignacio, Luis, y en especial Álvaro Bazán Estrada mi mejor amigo, siempre voy agradecer todo lo que has compartido conmigo, el tiempo y cosas que hemos hecho, la música, las imágenes, la cultura, el arte. (Tool).

Y con especial cariño a la Doctora Noemí Baranda Ávila que desde el principio aportó sus conocimientos y compartió su experiencia en la realización experimental de este trabajo, pero sobre todo por aceptar unir su futuro al mío, por dejarme entrar en tu vida y otorgarme la oportunidad de ser feliz a tu lado. Por todos los mágicos momentos que hemos vivido y por los que vendrán, por siempre, para toda la eternidad... Te amo.

AGRADECIMENTOS

El autor desea expresar su sincera gratitud a las siguientes personas que con su apoyo en todas las circunstancias y en su momento aportaron para que este trabajo fuera concluido:

A mis asesores:

Dr. Santiago René Anzaldúa Arce. Gracias por todos tus consejos y tu tiempo, por ponerme en el camino correcto y guiarme en él.

Al MVZ Héctor Villaseñor Gaona quien además de compartir su experiencia también me brindó su amistad y confianza.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes sin cuyo invaluable apoyo científico, económico y logístico no hubiera sido posible la realización de este trabajo, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Lourdes Juárez Mosqueda que siempre tuvo un sabio consejo y una crítica altamente constructiva.

Al M en C. Jorge Hernández Espinoza que me admitió en el departamento de Morfología de la Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia para la realización de este trabajo.

Al Dr. Oscar Gutiérrez Pérez por su apoyo en el manejo de reactivos y técnicas en el laboratorio del departamento de morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A los miembros del jurado Dr. Miguel Angel Martínez Castillo, MVZ Luis David Zepeda Domínguez y MVZ Verónica Graullera Rivera por sus puntuales observaciones y atenciones.

Al MVZ Arturo Jorge Cortés Iracheta por haberme instruído y formado en la práctica clínica que ahora ejerzo.

Al laboratorista del departamento de morfología Francisco López López por su invaluable apoyo en el procedimiento de la obtención de los cortes histológicos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme un lugar en su seno y darme la oportunidad de desarrollarme en el campo biomédico.

And you run and you run to catch up with the sun, but it's sinking
And racing around to come up behind you again
The sun is the same in the relative way, but you're older
Shorter of breath and one day closer to death.

-Roger Waters-

Pure intention juxtaposed will set two lovers souls in motion.

-Maynard J. Keenan-

And one to one
Let the power run
Feed the mouth
That's hungry...open
Feed the mind
That wonders why.

-I mother earth-

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Morfología del oviducto	5
1.2. El Receptor a Estrógenos alfa (RE α).....	7
2. ANTECEDENTES	9
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVO GENERAL.....	14
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
7. MATERIAL Y MÉTODOS	15
7.1. Animales de Experimentación	15
7.2. Procesamiento de Tejidos	15
7.3. Inmunohistoquímica	16
7.4. Análisis Estadístico	18
8. RESULTADOS	18
8.1. Ámpula	18
8.2. Istmo	18
9. DISCUSIÓN	19
10. CONCLUSIONES	26
10.1. Perspectivas	27
11. REFERENCIAS	28
12. . FIGURAS	35

RESUMEN

CARDOSO RANGEL MILTON ENRIQUE. Estudio inmunohistoquímico de los receptores a estrógenos en el oviducto de la coneja durante los primeros días de la gestación. (Bajo la dirección de: Dr. Santiago René Anzaldúa Arce, MVZ Héctor Villaseñor Gaona y Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes).

El oviducto es un órgano del aparato reproductivo de la hembra que durante la gestación temprana 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, desarrollo embrionario inicial, entre otros. Estas modificaciones, que en la coneja ocurren en los días 1 a 4 de la gestación, son reguladas por los esteroides sexuales a través de sus receptores. En este trabajo se estudió la expresión del receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$) por inmunohistoquímica (puntaje histológico: HSCORE) en dos porciones del oviducto: ámpula e istmo, durante los primeros 4 días de gestación. En el ámpula se observó un aumento significativo en el HSCORE de los $RE\alpha$ ($P < 0.001$) de las células inmunopositivas del tejido epitelial, estroma y muscular durante los días 2 y 3 de la gestación, en comparación con los animales no gestantes (NG) y los días 1 y 4 de la gestación, además no se observaron diferencias en el número de células inmunopositivas entre estos 3 últimos grupos. En el istmo se observó un incremento significativo ($P < 0.001$) en el HSCORE de los $ER\alpha$ de las células epiteliales inmunopositivas en los días 1 y 2 de la gestación en comparación con el grupo de animales NG y el de

los días 3 y 4 de la gestación. De manera similar se observó un incremento significativo en el HSCORE de las células inmunopositivas tanto del estroma como del músculo durante los días 1 y 2 de la gestación, en comparación con los animales NG y los días 3 y 4. Durante estos últimos se observó una disminución significativa en el HSCORE de los ER α de las células inmunopositivas en relación con el grupo NG tanto en el estroma (P< 0.01) como en el músculo (P< 0.001). Estos resultados sugieren que existen diferencias en la expresión de los RE α , determinada por inmunohistoquímica, en las diversas capas histológicas del ámpula e istmo durante los 4 primeros días de la gestación en el oviducto de la coneja, lo que podría estar relacionado con diferentes funciones de estos receptores en las diferentes porciones de este órgano. Estas evidencias sugieren que los mecanismos de regulación y expresión de los RE α durante la gestación temprana de la coneja, varían dependiendo de la región anatómica, el día de la gestación y la presencia o ausencia del embrión.

ABSTRACT

The oviduct is an organ of the female reproductive tract which during early pregnancy undergoes important functional and structural modifications, for example: ciliogenesis and secretory activity which are relevant for reproductive functions that take place in it such as: fertilization, gamete transport, spermatocapacitation and initial embryo development, among others. In the rabbit these modifications occur in days 1 to 4 and are regulated by sex steroids through their receptors. The aim of this research was to study the estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) expression by immunohistochemistry (histological score: HSCORE) in two parts of the oviduct, ampullae and isthmus, during the first 4 days of pregnancy. There is a HSCORE significant increase of $ER\alpha$ ($P < 0.001$) in immunopositive cells (epithelial, stromal and muscular tissue) in days 2 and 3 of pregnancy, in comparison with non-pregnant animals (NP) and days 1 and 4 of pregnancy. There was no difference among these last 3 groups in the number of immunopositive cells. In the isthmus a significant increase ($P < 0.001$) in HSCORE of $ER\alpha$ of epithelial immunopositive cells in days 1 and 2 of pregnancy was observed in comparison with the NP group and days 3 and 4 of pregnancy. Similarly, a significant increase was observed in HSCORE of immunopositive cells equally in stroma and muscle in days 1 and 2 of pregnancy, in comparison with NP animals and days 3 and 4 of pregnancy. During these latter days a significant decrease was observed in HSCORE of $ER\alpha$ in immunopositive cells in relation to NP animals both for stroma ($P < 0.01$) and muscle ($P < 0.01$). These results suggest that there are differences in $ER\alpha$ expression determined by immunohistochemistry in the distinct histological layers of ampullae and isthmus during the first 4 days of pregnancy in rabbits,

which could have a relation with the different functions of these receptors on the distinct portions of the oviduct. The evidence also suggests that the molecular mechanisms of regulation and expression of ER α during early pregnancy in rabbits are different, depending on anatomical region, day of pregnancy and the presence or absence of the embryo.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 MORFOLOGÍA DEL OVIDUCTO

Los oviductos (trompas de Falopio, trompas uterinas o tubas uterinas [TU]) son órganos pares del tracto reproductor femenino, fundamentales para la supervivencia de las especies pues en ellos se realizan: el transporte de los gametos, capacitación espermática, reacción acrosomal, fecundación, inicio del desarrollo embrionario y el transporte del embrión hacia el útero. ⁽¹⁾.

El oviducto consta de cuatro regiones anatómicas:

a) La fimbria: es la porción adyacente al ovario, tiene forma de embudo y prolongaciones en forma de flecos que le ayudan a captar el óvulo.

b) El infundíbulo: corresponde al tercio distal del órgano, es la continuación tubular de la fimbria, donde se realiza el transporte de los óvulos, desde el punto de vista histológico es indistinguible del ampulla localizada en el tercio medio.

c) El ampulla: se extiende desde la unión con el infundíbulo hasta la unión istmo-ampular, en esta región los huevos se transportan rápidamente y se produce una importante cantidad de fluido. En diversas especies, entre ellas el conejo, la fecundación ocurre en la unión istmo-ampular.

d) El istmo, que forma el tercio proximal, adyacente al útero y se relaciona con él mediante la unión útero-tubárica, en la que existe una porción intramural denominada región intersticial. Esta región se caracteriza por presentar una mucosa menos plegada que las porciones anteriores y también por tener una capa muscular muy gruesa ⁽²⁾.

Desde el punto de vista histológico los oviductos están conformados por una mucosa con epitelio de revestimiento cilíndrico simple, el cual presenta

fundamentalmente dos tipos de células: ciliadas (sin actividad secretora o glandular) y células secretoras no ciliadas. Debajo del epitelio existe una lámina 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 reciben el nombre de miosalpinx. Finalmente, el miosalpinx está recubierto por una serosa proveniente de un repliegue del peritoneo que forma parte del ligamento ancho del útero y que para el caso del oviducto se llama mesosalpinx ⁽³⁾ ⁽⁴⁾.

Una vez que el óvulo entra en la luz del infundíbulo, la contracción muscular provee la fuerza principal para su transporte a través de las demás regiones del oviducto, lo cual ocurre en la mayor parte de los mamíferos exceptuando a los primates y la gata en donde la actividad de la musculatura lisa es muy pequeña, por lo que en estas especies, la actividad ciliar es el factor determinante en el transporte ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾.

En diversas especies se ha mostrado, el papel de las hormonas esteroides ováricas (estrógenos y progesterona) en la regulación del crecimiento, proliferación, diferenciación y actividad secretora del epitelio de los oviductos durante el ciclo estral ⁽⁶⁾.

En las conejas, los estrógenos (E_2) incrementan la contracción de la musculatura lisa del oviducto e igualmente aceleran la velocidad del transporte del huevo, pues inducen un aumento en el número de células ciliadas ⁽⁷⁾, mientras que la progesterona (P_4) tiene un efecto antagónico ⁽¹⁾.

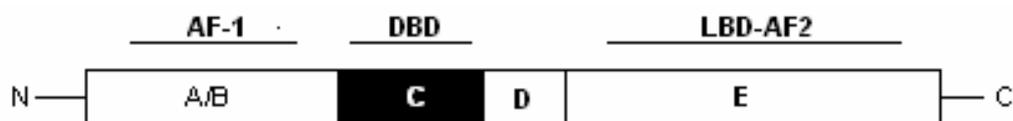
1.2. El Receptor a Estrógenos alfa ($RE\alpha$)

Las hormonas esteroides son moléculas derivadas del colesterol sintetizadas

en corteza adrenal, testículos, ovarios y placenta, son secretadas a la sangre y transportadas mediante proteínas específicas hasta llegar a los órganos blanco. Debido a su naturaleza lipídica pueden atravesar la membrana plasmática de las células blanco por difusión simple.

La mayoría de las funciones de las hormonas esteroideas como E_2 y P_4 se ejercen a través de su interacción con receptores nucleares específicos. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. La unión del ligando al receptor ocasiona la liberación de proteínas chaperonas como la proteína de choque térmico Hsp90, favoreciendo la activación del complejo ligando receptor para que pueda unirse a secuencias específicas del DNA llamadas elementos de respuesta hormonal, esta unión provoca una remodelación de la cromatina que puede activar o reprimir señales que influyen sobre la maquinaria de transcripción de los genes dependientes de la hormona ⁽⁸⁾.

En forma breve se puede decir que a lo largo del receptor se encuentran diferentes funciones:



En la región amino terminal (dominio A/B) se encuentra la función de activación AF-1; en la región central (C) se encuentra el dominio de unión al ADN (DNA Binding Domain – DBD), así como una región de charnela o bisagra (D), que participa en el cambio conformacional; y en la región carboxilo terminal (E) se

encuentra el dominio de unión al ligando (LBD), que además tiene otras funciones.⁽⁹⁾

En estudios recientes se ha demostrado que no todos los efectos de E_2 y P_4 son ejercidos por acción directa sobre la expresión génica, sino que existe también un efecto rápido de estimulación mediado por moléculas de señalización transduccional las cuales parecen tener un origen de cascada provenientes de una subfamilia de receptores localizados en la membrana plasmática⁽¹⁰⁾.

Existen dos subtipos del receptor a estrógenos: alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$), en la coneja ambos son los receptores de unión a estrógenos mas abundantes en el útero⁽¹¹⁾, por lo que es probable que estén presentes en el oviducto. El $RE\alpha$ es el que se encuentra en mayor cantidad en los órganos blanco y el que media las funciones que tradicionalmente se adjudican a los estrógenos, por lo que en este trabajo nos avocamos principalmente a este tipo de receptor, además el subtipo β aparentemente cumple funciones reguladoras de las acciones del subtipo α , como se ha señalado en otras especies⁽¹²⁾.

Los niveles plasmáticos de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) que obedecen a las fases folicular y lútea respectivamente en todas las hembras mamíferas ejercen una retroalimentación sobre el sistema neuroendócrino (eje hipotálamo – hipófisis – gónada) que aumenta y/o disminuye la concentración plasmática de E_2 y P_4 resultando un aumento en la expresión del receptor correspondiente denominado regulación a la alta, y regulación a la baja cuando existe una disminución.⁽¹³⁾

En el útero de primates han sido ampliamente documentados, los procesos de

regulación y función de los receptores a estrógenos (RE) y receptores a progesterona (RP). En otras especies, se ha demostrado que los RE presentan regulación a la baja cuando son tratadas con E₂, mientras que para los RP se presenta regulación a la alta. La P₄ ocasiona regulación a la baja de los RP. ⁽¹⁴⁾

Por otra parte la regulación de los receptores a hormonas esteroides esta bajo control hormonal órgano-específico ⁽¹⁵⁾, por lo que en el útero y oviducto a pesar de estar adyacentes anatómicamente, pueden tener diferentes mecanismos reguladores para la expresión de los genes de los RE y RP ⁽¹⁶⁾.

2. ANTECEDENTES

Debido a que la coneja es un animal de ovulación inducida o refleja ⁽¹⁷⁾, constituye un modelo animal muy útil para el estudio de los cambios morfológicos del tracto reproductor femenino inducidos por E_2 y P_4 ⁽¹⁸⁾. En esta especie, antes de la ovulación la influencia es predominantemente estrogénica, una vez que esta ocurre, hay un incremento progresivo en la concentración plasmática de P_4 a partir del día 3 post coito (pc), hasta alcanzar una máxima concentración el día 15 pc ^{(19) (20)}.

El óvulo es capturado por la fimbria y para su transporte en esta región las células ciliadas juegan un papel muy importante. En la coneja la fimbria pierde su capacidad de transporte cuando el porcentaje de células ciliadas en el epitelio es menor al 44%, mientras que el transporte es normal cuando el porcentaje de células ciliadas es del 61% aproximadamente. ⁽²¹⁾

En especies como la perra, la gata ^{(22) (23) (24) (25)} y la coneja ^{(26) (27) (28) (29)} se han realizado estudios bioquímicos de afinidad para E_2 y P_4 empleando el homogenizado de todo el oviducto para demostrar la presencia de los receptores a estas hormonas, sin embargo, se desconoce la localización histológica y los tipos celulares que expresan dichos receptores.

En otros estudios durante la gestación temprana se ha descrito regulación a la baja de estos receptores en el útero de la cabra ⁽³⁰⁾, mientras que en el oviducto de la rata y perra existe una regulación a la alta ^{(31) (32)}.

En conejas ovariectomizadas se ha observado que el epitelio del oviducto se atrofia después de 4-6 meses, pero el tratamiento con estrógenos por 10 días induce la reciliación ^{(21) (33) (6)}.

Karbowski y colaboradores describen en conejas pseudogestantes la expresión

inmunohistoquímica de los RE en el oviducto (ámpula e istmo) y en el útero, refiriéndose principalmente a las variaciones en el miosalpinx y miometrio respectivamente ⁽³⁴⁾.

Recientemente Anzaldúa caracterizó la expresión del RP mediante la Retrotranscripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y la distribución inmunohistoquímica de los RP en el útero, ámpula e istmo de la coneja durante la gestación temprana, en donde se demuestra que existe una expresión del receptor distinta en las diferentes regiones anatómicas del oviducto⁽³⁵⁾. Adicionalmente, en otros estudios inmunohistoquímicos del oviducto de la coneja, se han descrito células inmunopositivas al RE ⁽³⁶⁾, sin embargo, no se especifican los tipos celulares positivos y no existe una caracterización de la expresión de los RE durante los primeros 4 días de la gestación.

3. JUSTIFICACIÓN

El oviducto cumple funciones reproductivas importantes como fertilización, desarrollo, transporte y mantenimiento del embrión en etapas tempranas de la gestación en la coneja, sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios que muestren los mecanismos de regulación hormonal de este órgano durante este periodo. Debido a que la coneja presenta diversas ventajas en cuanto a las concentraciones hormonales de estrógenos y progesterona por ser un animal de ovulación refleja, en relación con otras especies de ovulación espontánea, se consideró de gran importancia realizar estudios que permitan aportar conocimientos sobre los mecanismos de regulación mencionados.

No existen estudios que describan las modificaciones en la expresión de los RE α durante la gestación temprana de la coneja, ni estudios que muestren la respuesta hormonal del oviducto después de la ovulación, por lo que la determinación de los RE α puede ayudar a entender la participación hormonal en las diversas porciones de este órgano.

Además, este trabajo permitirá comprender mejor los mecanismos de acción sobre el oviducto de diversos compuestos hormonales utilizados en medicina veterinaria con fines reproductivos como pueden ser diversas progestinas sintéticas (medroxiprogesterona, noretisterona), FSH, LH, factor liberador de gonadotropinas (GnRH), así como compuestos antagonistas hormonales (tamoxifen).

4. HIPÓTESIS

Si durante los 4 primeros días de la gestación existen variaciones en la concentración plasmática de estrógenos y progesterona, y la regulación de los receptores a hormonas esteroides en la tuba uterina de la coneja esta bajo control hormonal órgano y región específica, entonces la localización, distribución y cantidad del $RE\alpha$ es diferente en las capas histológicas del ámpula en relación con las del istmo durante los primeros días de la gestación.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión y localización del receptor a estrógenos en el ámpula e istmo del oviducto de la coneja durante la gestación temprana (días 1 a 4 de la gestación), mediante el estudio inmunohistoquímico de los RE α .

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la localización y distribución inmunohistoquímica de los RE α del ámpula e istmo de los oviductos de conejas durante los primeros cuatro días de la gestación.

Determinar la cantidad de células inmunopositivas al RE α y correlacionarla con la intensidad de la marca mediante el método del Puntaje inmunohistoquímico (HSCORE), en las diferentes capas histológicas del ámpula e istmo de los oviductos de conejas durante los primeros cuatro días de la gestación.

Comparar los resultados del estudio inmunohistoquímico (HSCORE) de conejas gestantes durante los 4 primeros días de la gestación, con los de conejas adultas no gestantes (NG), en el ámpula e istmo del oviducto.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Animales de experimentación

Se emplearon 15 conejas adultas Nueva Zelanda blancas (3.5 – 4.5 Kg.). Los animales se alojaron en jaulas metálicas individuales cuyas dimensiones fueron de 130 cm. de largo, 75 cm. de ancho y 60 cm. de alto con agua y comida disponible ad libitum. Un grupo de animales (n=12) fueron montadas dos veces el mismo día con dos machos experimentados con un intervalo de 1 hora entre cada uno. El día de la monta fue designado como el día 0. Estos animales se dividieron en 4 grupos (n=3), el primero se sacrificó 24 hrs. (día 1 de la gestación), el segundo 48 hrs. (día 2), el tercero 72 hrs. (día 3) y el cuarto 96 hrs. posteriores a la cruce. Otro grupo de conejas adultas no gestantes (n=3) se utilizaron como grupo control. Los animales se sacrificaron por inyección IV de pentobarbital (90 mg/Kg.) después de una anestesia profunda con ketamina por vía IM (40 mg/Kg.). Los experimentos de este estudio fueron realizados de acuerdo con la ley para la protección de los animales (México) y a la Norma NOM-062-ZOO-1999. ⁽³⁷⁾

7.2 Procesamiento de tejidos

De cada uno de los grupos (tanto experimental como control, (n=3) se obtuvieron los oviductos y se disecaron las regiones correspondientes al ámpula y al istmo e inmediatamente se fijaron durante 8 horas en una solución de ácido Pícrico (15%) y paraformaldehído (4%) en un amortiguador de fosfatos PBS 0.1 M, pH 7.4 ⁽³⁸⁾

7.3 Inmunohistoquímica

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. ⁽³⁹⁾

Las muestras se procesaron por el método de inclusión en parafina y se obtuvieron cortes seriados de cada órgano con un grosor de 5 μm , posteriormente se montaron en laminillas cubiertas previamente con poly-L-lisina (Sigma). Se desparafinaron y rehidrataron a través de concentraciones crecientes de alcohol a agua destilada, se transfirieron a una solución amortiguada de citrato de sodio (pH 6.0) y se calentaron dos veces por 10 min. en un horno de microondas (LG, modelo MS-0745V) de 800 W, dejando enfriarlas por 5 min. entre cada irradiación con microondas. Después de este procedimiento, las laminillas se lavaron dos veces con 10 mM PBS (pH 7.4) y se incubaron sucesivamente en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS por 30 min. a temperatura ambiente; para inactivar los sitios inespecíficos se les colocaron gotas de suero normal de cabra al 1% más 1% de peróxido de hidrógeno en PB por 30 min.; después para su permeabilización se colocaron en una solución de Triton X-100 al 0.05% en PB por 30 min. Para la detección del receptor se aplicó el anticuerpo primario monoclonal desarrollado en ratón contra el RE α NCL-ER-6F11 Novocastra IgG1 1.0-8.0 g/L diluido 1:40 preparado en PBS conteniendo 0.3% de Triton X-100, para ello las muestras

fueron colocadas en una cámara húmeda por 48 horas a 4°C. Después los cortes se incubaron con el apropiado anticuerpo secundario biotinilado por dos horas a temperatura ambiente y con un conjugado de estreptoavidina-peroxidasa durante una hora. Las secciones se lavaron dos veces entre cada incubación, con PB por 10 minutos cada una. La actividad de la peroxidasa se evidenció mediante una solución cromógena de 3,3'-diaminobencidina en presencia de peróxido de hidrógeno por 10 minutos. Después del lavado las secciones se deshidrataron y montaron con medio de montaje (Permount). Algunas secciones fueron contrastadas con Hematoxilina de Mayer. Se utilizaron cortes como testigo en los cuales el primer anticuerpo se sustituyó por suero normal de cabra (1:2000). 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, estroma y músculo se realizó en un total de 12 campos microscópicos, lo que representó un área total de 1mm². Se analizaron todos los núcleos de cada sección. Se utilizaron 3 cortes histológicos por animal (3 animales por día). Para determinar 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: $HSCORE = \sum P_i (i + 1)$, donde $i = 1, 2$ o 3 , P_i corresponde al porcentaje de cada intensidad, determinado en el rango de 0 a 100% ⁽⁴⁰⁾.

7.4 Análisis Estadístico

Se realizó un Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA), seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias significativas de los datos obtenidos en número de células inmunopositivas al receptor a estrógenos α (ER α). Se utilizó el Programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA, USA) para calcular los valores de probabilidad.

8. RESULTADOS

El marcaje inmunohistoquímico para el receptor a estrógenos se observó de manera exclusiva en el núcleo de las células.

8.1 Ámpula

Se observó un aumento significativo en el HSCORE de los ER α ($P < 0.001$) de las células inmunopositivas del tejido epitelial, del estroma y del tejido muscular durante los días 2 y 3 de la gestación, en comparación con los animales NG y los días 1 y 4 de la gestación, además no se observaron diferencias en el número de células inmunopositivas entre estos 3 últimos grupos (Figura 1 A, B y C; Figura 3 A, B, C, D y E; Figura 4 A, B, C, D y E).

8.2 Istmo

En el istmo se observó un incremento significativo ($P < 0.001$) en el HSCORE de los ER α de las células epiteliales inmunopositivas en los días 1 y 2 de la gestación en comparación con el grupo de animales NG y el de los días 3 y 4 de la gestación (Figura 2 A,; Figura 3 G, H, I, J y K). De manera similar se observó un incremento significativo en el HSCORE de las células

inmunopositivas tanto del estroma como del músculo durante los días 1 y 2 de la gestación, en comparación con los animales NG y los demás días de la gestación (Figura 2 B y C). Durante los días 3 y 4 de la gestación se observó una disminución significativa en el HSCORE de los $ER\alpha$ de las células inmunopositivas en relación con el grupo NG tanto en el estroma ($P < 0.01$) como en el músculo ($P < 0.001$) (Figura 2 B y C; Figura 3 G, H, I, J y K; Figura 4 G, H, I, J y K).

9. DISCUSIÓN

Durante los primeros días de la gestación la concentración del RE y de progesterona presentes en las distintas porciones del oviducto se ven influidas por el transporte del huevo durante la gestación temprana ⁽²⁶⁾.

De manera clásica, los estrógenos se unen a receptores específicos presentes en el núcleo de las células blanco ⁽¹⁰⁾, estos receptores corresponden mayormente al subtipo α ($ER\alpha$), sin embargo se ha descrito un segundo subtipo denominado β ($ER\beta$) que es codificado por un segundo gen para el receptor a estrógenos ⁽⁴¹⁾. En este estudio únicamente se determinó el subtipo α , por ser el responsable de inducir las respuestas características de esta hormona en los órganos del aparato reproductor femenino de los mamíferos ⁽¹²⁾. En el útero de conejas adultas no gestantes, se ha descrito la presencia de ambos subtipos, en compartimientos subcelulares ⁽¹¹⁾, lo que sugiere que también se encuentren en las tubas uterinas.

En este trabajo, el estudio inmunohistoquímico del $RE\alpha$ mostró marca inmunopositiva en las células secretoras y en las células ciliadas del epitelio, lo cual coincide con los hallazgos de otros autores ⁽⁴²⁾ ⁽³⁴⁾ que muestran la coexistencia de los RE y RP en las células secretoras y células ciliadas del

endosalpinx (del ámpula e istmo), así como en las células de músculo liso de conejas pseudogestantes, a diferencia de los primates en la que los RP y RE es exclusiva de las células epiteliales secretoras del oviducto, en esta especie el incremento en el número de células ciliadas (ciliogénesis), proceso estrógeno-dependiente, posiblemente es mediado por las células del estroma o bien por las células secretoras, ya que únicamente en ellas se detectan los RE.

(43)

En el ámpula se observó un aumento significativo en el HSCORE de las 3 capas histológicas estudiadas durante los días 2 y 3 en relación con los demás grupos, este hallazgo concuerda con los estudios de afinidad ⁽²⁷⁾ donde describen en el ámpula un incremento paulatino en la unión de los E2 (presumiblemente debido a la presencia del receptor), de tal forma que cuando el huevo se localiza en la unión istmo-ampular (24 horas pc) se incrementa, hasta alcanzar un máximo 72 h pc (día 3 de la gestación) y después declina en los días posteriores (hasta las 120h del estudio). Sin embargo, la función específica que puedan realizar los estrógenos en la región istmo-ampular durante el periodo antes mencionado se desconoce.

En estudios previos, Anzaldúa reporta que donde se observó la mayor cantidad de células PAS negativas fue en el ámpula y que en su mayor parte correspondieron a células ciliadas durante el día 3 de la gestación ⁽⁴⁴⁾, de la misma manera se sabe que el tratamiento con E2 provoca un aumento en el número de células ciliadas en la fimbria y el ámpula de la coneja ⁽³³⁾, estos hallazgos se correlacionan con el aumento observado del HSCORE del RE α , en los días 2 y 3 por lo que se confirma que el incremento en las células ciliadas se debe a un efecto directo de los estrógenos.

En la coneja, el transporte rápido del ovocito a través del ámpula está influenciado de manera preponderante por las células ciliadas, que son estrógeno dependientes, ya que se ha determinado que el movimiento ciliar es más relevante que la contracción muscular ⁽⁴⁵⁾

En la coneja la ovulación ocurre 10-12 horas pc y el transporte de los ovocitos en el ámpula lleva alrededor de 4 a 15 minutos, de tal forma que pocos minutos después de la ovulación, existe una gran cantidad de huevos en la unión istmo-ampular ⁽⁴⁶⁾ ⁽⁴⁷⁾. Resulta interesante que en el ámpula de los animales NG no se observaron células inmunopositivas en los días 1 y 4 de la gestación, encontrándose también la menor cantidad del HSCORE del RE α (Figura 1 A, B y C y Figura 3 A,), de tal manera que en los momentos en los que los ovocitos son transportados a lo largo del ámpula (día 1) la cantidad de RE α es nula o mínima.

En el istmo se observó un aumento significativo del HSCORE para el RE α en las 3 capas histológicas durante los días 1 y 2 de la gestación en relación con los animales NG, esto correlaciona con el hecho de que el huevo es retenido en la unión istmo-ampular por 24 horas después de la ovulación ⁽⁴⁸⁾, es decir 36 horas PC (día 2 de la gestación) para que en este sitio ocurra la fecundación.

Puri y Roy proponen que una disminución en el nivel de E₂ puede ser necesaria para la liberación de los embriones de la unión istmo-ampular, esto puede relacionarse con la disminución del RE α en las 3 capas histológicas los días 3 y 4 de la gestación ⁽⁴⁹⁾.

El huevo fertilizado es transportado a lo largo del istmo aproximadamente por 36 horas (días 2-3 de la gestación) ⁽⁴⁶⁾⁽⁵⁰⁾, esto correlaciona con la disminución significativa en el HSCORE del RE α en las células del estroma y músculo de

los días 3 y 4 de la gestación, en relación con los animales NG y con los 2 primeros días de gestación. La mayor parte de los huevos pasan del oviducto al útero entre las 60 y 72 h pc ⁽⁵¹⁾ ⁽⁵²⁾, es decir, en el transcurso del día 3 y 4 de la gestación.

Las variaciones en la presencia de receptores a hormonas esteroideas en el miosalpinx pueden tener relevancia fisiológica en el transporte del huevo ⁽³⁴⁾. El E₂ potencializa la motilidad del miosalpinx, mientras la P₄ la inhibe ⁽⁴⁵⁾, la influencia antagónica de los E₂ y P₄ sobre el oviducto para modular el transporte del huevo pueden ser facilitados por las variaciones de la actividad de los receptores a esteroideas por el miosalpinx ⁽³⁴⁾; la disminución en el HSCORE de RE α en el músculo del istmo durante los días 3 y 4 pueden influir en la disminución de la velocidad del transporte de los embriones y su permanencia en esta región; la mayor parte de los efectos de los esteroideas se da a través de la acción de mediadores simpáticos y prostaglandinas, sin embargo, existen indicios que señalan que los esteroideas pueden actuar directamente para modular la contractilidad de éste órgano ⁽⁵³⁾ ⁽⁵⁴⁾.

En el istmo de los animales NG no se observaron diferencias en el HSCORE del RE α del epitelio en relación con los días 3 y 4 de la gestación, esto se relaciona con el hecho de que estudios previos ⁽⁴⁴⁾ muestran una menor cantidad de células PAS- (ciliadas), que son dependientes de estrógenos, durante la gestación temprana, y por ende existe una mayor cantidad de células PAS+ (secretoras), además de un incremento en la altura del epitelio, lo cual implica un aumento en la actividad secretora de las células epiteliales, que coincide con el mayor tiempo de permanencia del huevo en el istmo. Se ha informado, también que el transporte mediado por el líquido oviductal hacia el

útero disminuye en el istmo ⁽⁵²⁾. De manera interesante, se ha observado un aumento en la concentración de las proteínas del líquido oviductal de la coneja el día 3 de la gestación ⁽⁵⁵⁾. Estas observaciones sugieren la posible relevancia fisiológica del líquido oviductal del istmo, ya que el embrión permanece en íntimo contacto con él por varias horas antes de pasar al útero.

En muchos mamíferos incluyendo el conejo, después de la cópula los espermatozoides entran a las TU y permanecen en su mayor parte en el istmo, por lo que esta región forma un reservorio de espermatozoides viables, el cual puede estar influido por el moco oviductal y en particular los carbohidratos de las glicoproteínas de las células epiteliales. Las posibles funciones que cumple este reservorio, es actuar como un filtro que selecciona de manera natural a los espermatozoides más aptos para participar en el proceso de fertilización, y proporciona una protección adicional contra la polispermia, al ir liberando gradualmente los espermatozoides a partir del reservorio ⁽⁵⁶⁾.

La presencia del reservorio de espermatozoides en el istmo esta correlacionada con un incremento en el HSCORE que observamos en las 3 capas histológicas durante los días 1 y 2 de la gestación, igualmente se correlaciona con un incremento en la cantidad de células PAS+ y en la altura del epitelio observada en los tres primeros días como lo reporta Anzaldúa. ⁽⁴⁴⁾

El incremento en los RE puede estar relacionado con un posible aumento en la actividad contráctil del miosalpinx que contribuya al almacenamiento de los espermatozoides, del mismo modo llama el incremento de la actividad secretora del istmo puede estar relacionada con la interacción que establecen los espermatozoides con el tejido epitelial, los posibles efectos estrogénicos sobre este epitelio se desconocen sin embargo pueden suponerse con base en el

notable incremento del HSCORE en los dos primeros días de la gestación, momentos en los que el reservorio de espermatozoides es funcional.

Estos hallazgos sugieren que en los sitios en donde existen altos niveles del RE α en las diferentes capas histológicas de las TU, los ovocitos o embriones no están presentes, lo cual puede indicar que los efectos estrogénicos pueden ser perjudiciales para el transporte y desarrollo embrionario temprano, como son, entre otros, el descenso rápido evitando la maduración del endometrio y su actividad secretora necesaria para la supervivencia de los embriones antes de la implantación; igualmente los embriones arribarían al útero en un estadio del desarrollo no adecuado para establecer el diálogo molecular con el endometrio y poder coordinar los eventos de la implantación .

Resulta interesante que al comparar la expresión inmunohistoquímica del RE α en relación con hallazgos previos con el RP ⁽³⁵⁾ tengan una presentación antagónica tanto en el ampolla como en el istmo; de tal forma que mientras en el ampolla se observó una mayor expresión de RE α los días 2 y 3 de la gestación, en estos mismos días existió la menor cantidad del RP en esta misma región anatómica según lo descrito por Anzaldúa *et al.* ⁽³⁵⁾ En el caso del istmo la mayor expresión fue los días 1 y 2 que corresponden con la menor expresión del RP ⁽³⁵⁾.

En un estudio inmunohistoquímico en el que se describen los cambios ultraestructurales del epitelio oviductal en conejas pseudogestantes tratadas con hCG, observaron un incremento significativo de los RE 48 horas post-tratamiento⁽⁵⁷⁾ (día 2 de la pseudogestación), de manera similar al incremento observado en este estudio los días 2 y 3 de la gestación; igualmente Karbowski señala un incremento del RE 24 horas post-hCG⁽³⁴⁾ (día 1 de la

pseudogestación) en el istmo, que corresponde con el incremento en el HSCORE los días 1 y 2 del presente estudio. Lo anterior sugiere que posiblemente los mecanismos de regulación de los receptores a estrógenos puedan ser similares en conejas gestantes y pseudogestantes, a pesar de las posibles interacciones que se establecen entre los embriones y las TU.

Estas evidencias sugieren que el oviducto debe ser considerado como un órgano heterogéneo en estudios endocrinos, ya que los mecanismos de regulación y expresión de los RE α durante la gestación temprana de la coneja, son distintos dependiendo de la región anatómica, el día de la gestación y la presencia o ausencia del embrión, ya que se sabe que existe una interacción y un diálogo molecular entre las TU y los embriones ⁽⁵⁸⁾.

10. CONCLUSIONES

Los receptores a estrógenos se regulan diferencialmente en el ámpula y el istmo durante la gestación temprana en el oviducto de la coneja

Los cambios observados en la expresión y localización del RE en las porciones estudiadas del oviducto sugieren que los estrógenos ejercen distintos efectos sobre las diferentes regiones anatómicas de este órgano

Este trabajo es el primero que describe de manera completa el comportamiento *in situ* de los RE en las TU de las conejas durante la gestación temprana en condiciones fisiológicas, por lo que constituye un material de referencia relevante para múltiples investigaciones futuras relacionadas con el funcionamiento de este órgano, o bien el efecto de diversos compuestos relacionados con la regulación de procesos reproductivos.

10.1 PERSPECTIVAS

Este experimento permitirá conformar un marco teórico- experimental para la utilización de diversas estrategias productivas en el ámbito de la explotación cunícola, como viabilidad y supervivencia de los gametos y los embriones, optimización de la fertilización, implementación de tratamientos superovulatorios, entre otros, que puedan influir positivamente en mejorar los parámetros zootécnicos.

Es importante correlacionar los hallazgos del presente trabajo con los tipos celulares específicos que expresan los RE, determinar las moléculas secretadas en las distintas regiones anatómicas de la TU, conocer los mecanismos de interacción específicos entre los espermatozoides y el epitelio, viabilidad de los embriones y su interacción con el endosalpinx durante su estadía en este órgano.

11. REFERENCIAS

1. Hafez ESE. Reproduction in farm animals. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1980.
2. Knobil E, and Neill JD, editors. The Physiology of Reproduction. 2nd ed. New York, New York: Raven, 1994.
3. Fawcett DW. Sistema reproductor femenino en Tratado de Histología Bloom-Fawcett. 11^a ed. México D.F: Interamericana McGraw-hill, 1988.
4. Banks JW. Histología Veterinaria Aplicada. México, D.F: El Manual Moderno, 1991.
5. Blandau RJ. Gamete transport in the female mammal. In: Greep RO and Astwood EB. editors. Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology Vol. II, Female Reproductive System. (Pt 2) Washington, D.C: American Physiology Society, 1973: 153-163.
6. Brenner RM and West NB. Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. Annual Review of Physiology 1975; 37: 273-303.
7. Odor DL. Estrogen and ciliogenesis in the infundibulum of the rabbit oviduct. Anat. Rec 1969; 163: 236.
8. Beato M, Klug J. Steroid hormones receptors: an update. Hum Reprod Update 2000; 6 (3): 225-236.
9. Mendoza RC, Arrieta CI, Rodríguez DM, Camacho AI, Cerbón M. Regulación de la transcripción por hormonas esteroides sexuales. Mensaje Bioquímico. UNAM 2001; 25: 129-147.
10. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. Annual Rev of Physiology 2005 67; 335-376
11. Monje P and Boland R. Subcellular distribution of native estrogen receptor

alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J. Cell Biochem* 2001; 82: 467-479.

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

13. Randall D, Warren B, French K. *Eckert animal physiology: mechanisms and adaptations*. 5a ed. USA: Freeman and Company, 2002.

14. Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 1993; 132: 2371-2379.

15. Brenner RM, West NB, Norman RL, Sandow BA, Verhage HG. Progesterone suppression of the estradiol receptor in the reproductive tract of macaques, cats and hamsters. *Adv Exp Med Biol* 1979; 117:173-196.

16. Iwai T, Funjii S, Nanbu Y, Nonogaki H, Konishi I, Mori T, Okamura H. Effect of human chorionic gonadotropin on then expression of progesterone receptor and estrogen receptor in rabbit ovarian granulose cells and the uterus. *Endocrinology* 1991; 129: 1840-1848.

17. Ramírez VD and Soufi WL. The neuroendocrine control of the rabbit ovarian cycle. In: Knobil E and Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press, Ltd, 1994: 585-611.

18. Spilman CH and Wilks JW. Peripheral plasma progesterone during egg transport in the rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1976; 151:726-729.

19. Challis JR, Davies J, Ryan KJ. The concentrations of progesterone, estrone and estradiol-17 beta in the plasma of pregnant rabbits. *Endocrinology* 1973;

93: 971-976.

20. Browning JY, Keyes PL and Woli RC. Comparison of serum progesterone, 20 α -dihydroprogesterone and estradiol-17 β in pregnant and pseudopregnant rabbits: evidence for postimplantation recognition of pregnancy. *Biol Reprod* 1980; 23: 1014-1019.

21. Odor DL, Blandau RJ. Egg transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. *Fertil Steril* 1973; 24: 292-300.

22. West NB, Verhage HG and Brenner RM. Suppression of estrogen receptor system by progesterone in the oviduct and uterus of the cat. *Endocrinology* 1976; 99: 1010-1016.

23. Lessey BA and Gorell TA. Analysis of the progesterone receptor in the beagle uterus and oviduct. *J. Steroid. Biochem* 1979; 13: 1173-1180.

24. Verhage HG, Akbar M, and Jaffe RC. Cytosol and nuclear progesterone receptor cat uterus and oviduct. *J. Steroid Biochem* (1979 a); 11:1121-1128.

25. Verhage HG, Murray MK, Boomsma RA, Rehfeldt PA, Jaffe RC. The postovulatory cat oviduct and uterus: correlation of morphological features with progesterone receptor levels. *Anat. Rec.* 1984; 208: 521-531.

26. Muechler EK, Flickinger GL, Mastroianni L Jr., Mikhail G. Progesterone binding in rabbit oviduct and uterus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1976; 151: 275-279.

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

28. Puri RK and Roy SK. Progesterone nuclear receptors in different parts of rabbit fallopian tube and uterus during ovum transport. *Ind. J, Exp. Biol.*

(1980a); 18: 553-555.

29. Puri RK and Roy S.K. The cytosol receptors for progesterone in the different parts of rabbit fallopian tube and uterus during ovum transport. *J. Biosci.*

(1980b); 2: 355-360.

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

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

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

33. Rumery RE and Eddy EM. Scanning electron microscopy of the fimbriae and ampullae of rabbit oviducts. *Anat. Rec.* 1974; 178: 83-103.

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

35. 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.

36. King W and Greene G. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in

the nuclei of target cells. *Nature* 1984; 307: 745-7.

37. Aluja AS. Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica de México*. 2002^a 138: 295-298.

38. Stefanine E. Fijation of ejaculated spermatozoa for E.M. *Nature*. 1967; 216:173-174.

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

40. 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.

41. Kuiper G, Enmark E, et al. Cloning a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 5925-5930.

42. West NB, Hess DL, Brenner RM. Differential supression of progesterone receptor by progesterone on the reproductive tract of macaques. *J. Steroid. Biochem.* 1986; 25: 497-503.

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

44. 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

45. Halbert SA, Tam PY y Blandau RJ. Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. *Science*. 1976; 191: 1052-1053.

46. Harper MJK. Gamet and zygote transport. In: Knobil E, and Neill JD, editors. The physiology of reproduction 2nd ed. New York: Raven Press, 1994: 123-187.
47. Boling JL, Blandau RJ. Egg transport through the ampulla of the oviducts of rabbits under various experimental conditions. Biol. Reprod. 1971; 4: 174-184.
48. Halsbert SA, et al. Anatomical basis of a passive mechanism for ovum retention at the ampulloisthmic junction. Anat. Rec. 1988; 221: 841-845
49. Puri RK and Roy SK. Estradiol binding in different parts of the rabbit oviduct during egg transport. Endokrinologie. 1981; 78: 12-20.
50. Greenwald GS. A study of the transport of ova through the rabbit oviduct. Fertil Steril. 1961; 12: 80-95.
51. Black DL and Asdell SA. Transport through the rabbit oviduct. Am. J. Physiol. 1958; 192: 63-68.
52. Osada H, Tsunoda I, Matsuura M, Satoh K, Kanayama K, Nakayama Y. Investigation of ovum transport in the oviduct: the dynamics of oviductal fluids in domestic rabbits. J. Int. Med. Res. 1999; 27: 176-180.
53. Hodgson BJ, Sullivan KB, Pauerstein CJ. The role of sympathetic nerves in the response of uterus and oviduct to field stimulation. Europ. J. Pharmacol. 1973; 23: 107-110.
54. Kennedy DR and Marshall JM. Effect of adrenergic nerve stimulation on the rabbit oviduct: correlation with norepinephrine content and turnover rate. Bio. Reprod. 1977; 16: 200-211.
55. Tucker EB and Schultz GA. Temporal changes in proteins of oviduct and uterine fluids during the preimplantation period in the rabbit. Biol. Reprod. 1977;17: 749-759.

56. Suarez S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 455-462.
57. Bondi AM, Gabrielli MG, Marchetti L, Materazzi G.. Cytomorphological changes in the rabbit oviductal epithelium after chorionic gonadotropin treatment. *Histol. Histopathol.* 1997; 12:135-146.
58. Gandolfi F, Brevini TA, Modina S, Passoni L. Early embryonic signals embryo-maternal interactions before implantation. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28: 269-276.

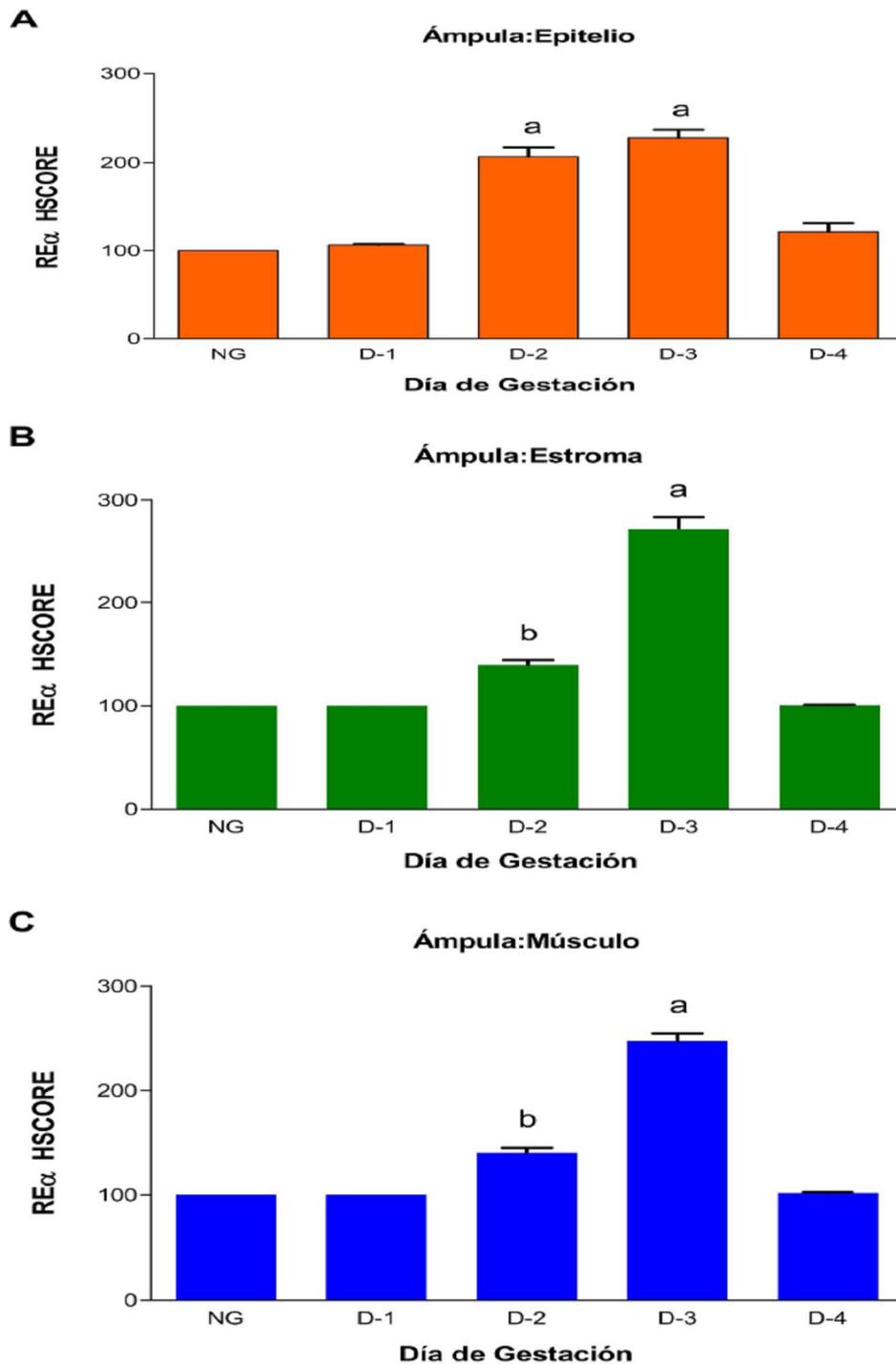


Fig. 1: Expresión in situ de RE α en el ámpula: epitelio (A), estroma (B) y músculo (C). El estudio inmunohistoquímico fue realizado en tres animales diferentes de conejas no gestantes (NG) y durante la gestación temprana (días 1 a 4 de la gestación). Se calculó el HSCORE como se describe en materiales y métodos. Los resultados son expresados como la media \pm DS. En (A), (B) y (C) ^aP<0.001 VS LOS DEMÁS GRUPOS y ^bP<0.001 VS LOS DEMÁS GRUPOS,

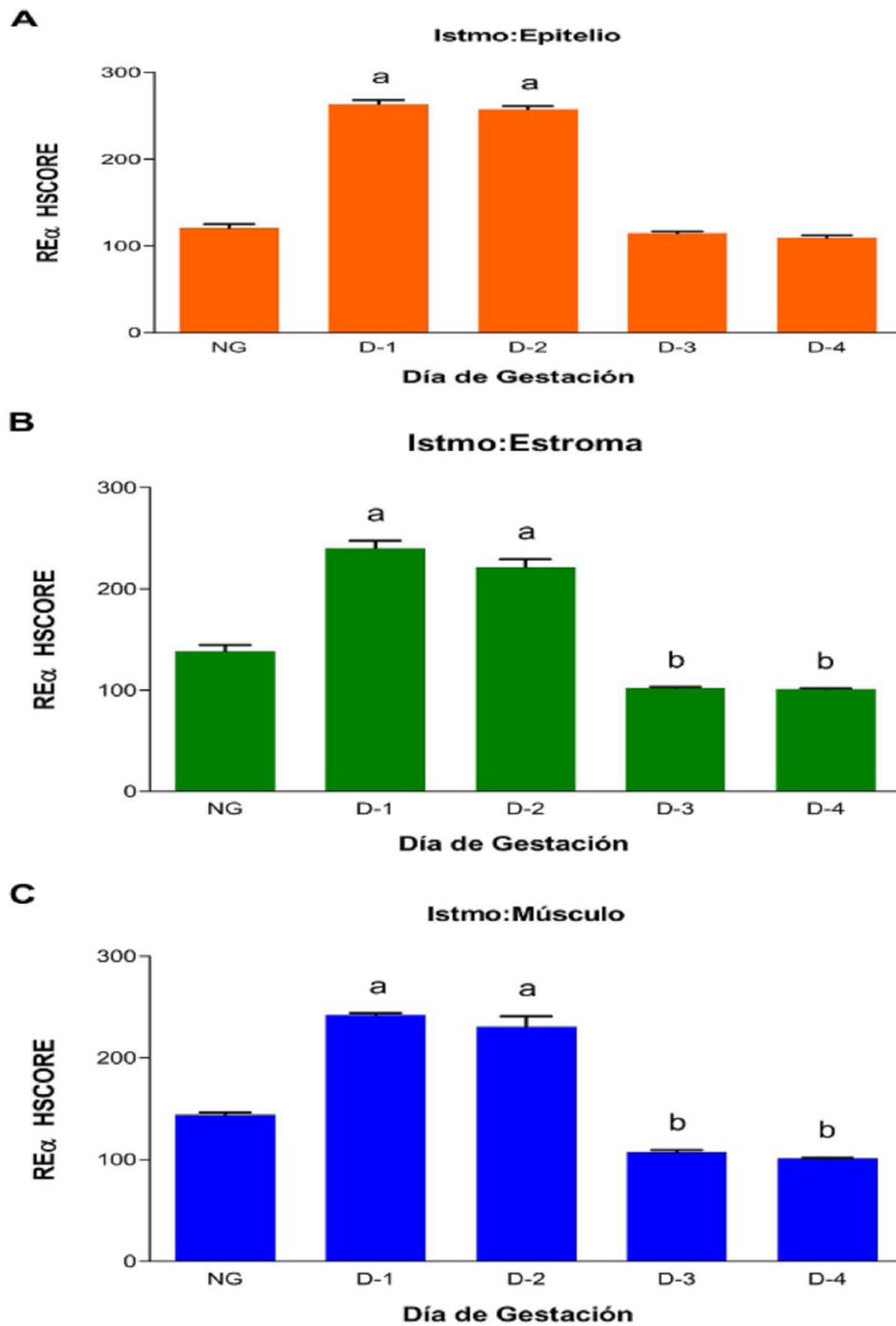


Fig. 2: Expresión in situ de RE α en el istmo: epitelio (A), estroma (B) y músculo (C). El estudio inmunohistoquímico fue realizado en tres animales diferentes de conejas no gestantes (NG) y durante la gestación temprana (días 1 a 4 de la gestación). Se calculó el HSCORE como se describe en materiales y métodos. Los resultados son expresados como la media \pm DS. En (A) ^aP<0.001 VS LOS DEMÁS GRUPOS, En (B) ^aP<0.001 VS LOS DEMÁS GRUPOS, ^bP<0.001 VS D-1 Y D-2 y P<0.01 VS NG, En (C) ^aP<0.001 VS LOS DEMÁS GRUPOS y ^bP<0.001 VS LOS DEMÁS GRUPOS

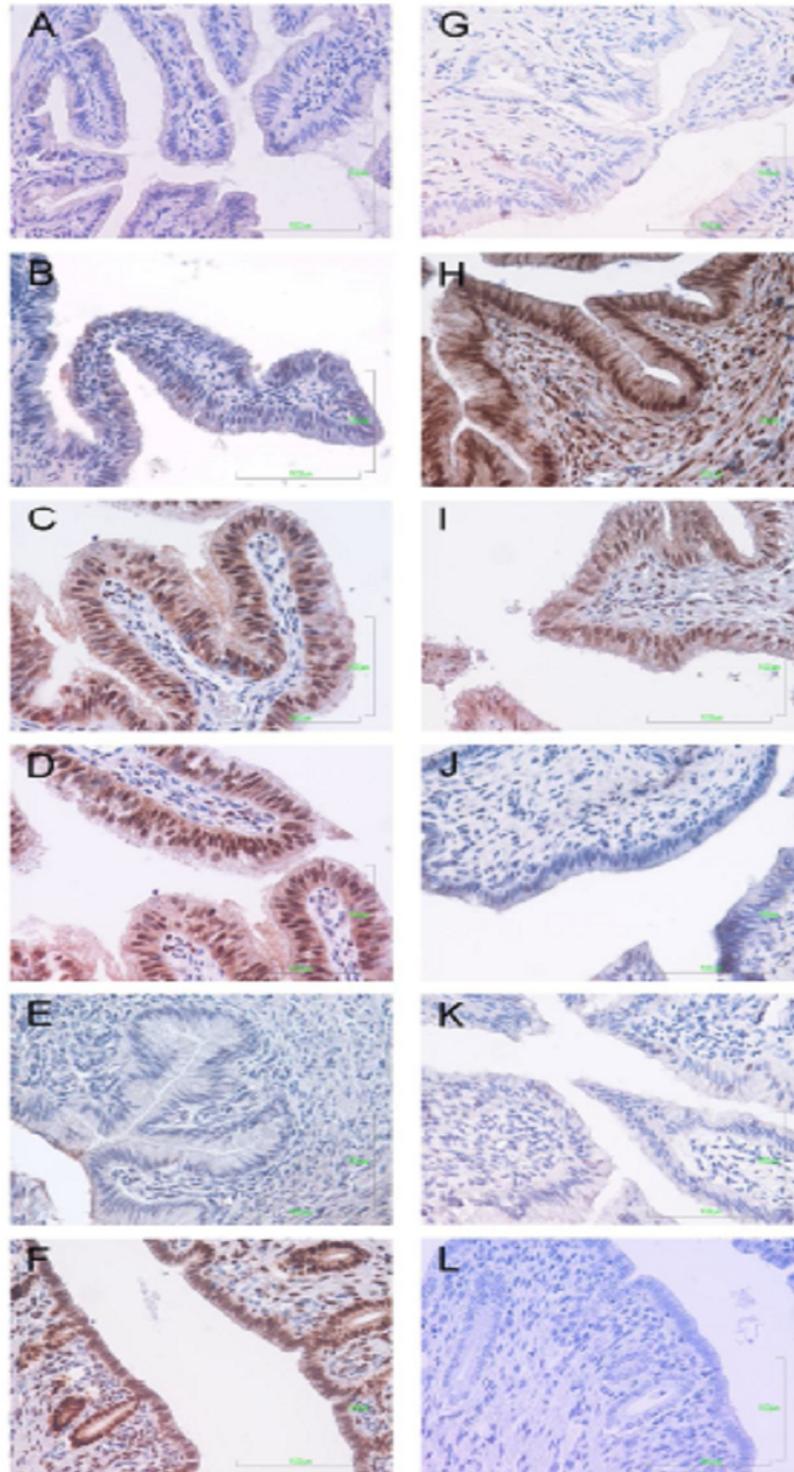


Fig 3: Localización inmunohistoquímica del RE α en el endosalpinx del oviducto: Ampula NG (A), ámpula día 1 (B), ámpula día 2 (C), ámpula día 3 (D), ámpula día 4 (E); istmo NG (G), istmo día 1(H), istmo día 2 (I); istmo día 3 (J); Istmo día 4 (K) de la gestación. El control positivo corresponde a un corte de útero NG (F) y el control negativo corresponde a un corte seriado de útero NG en el que el anticuerpo primario fue omitido (L).

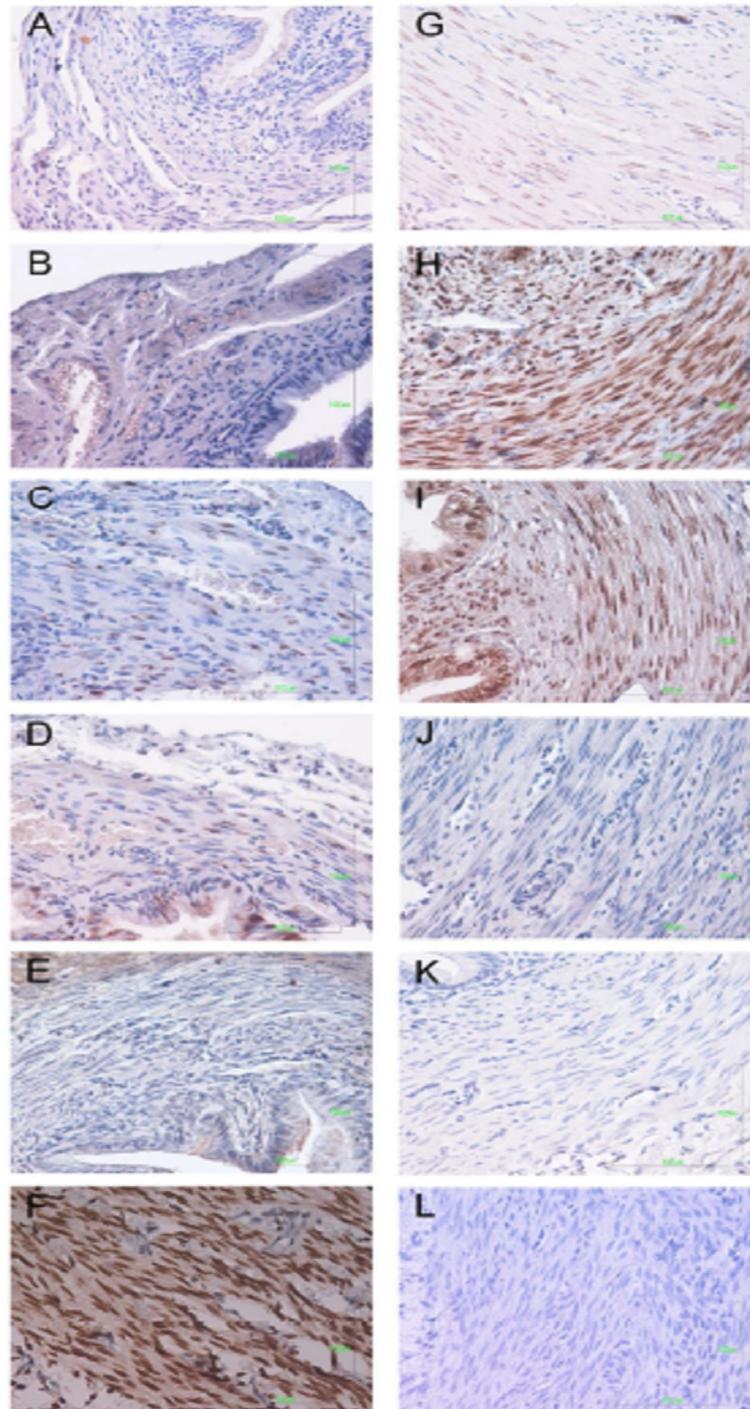


Fig. 4 Localización inmunohistoquímica del RE α en el miosalpinx del oviducto: ámpula NG (A); ámpula día 1 (B); ámpula día 2 (C); ámpula día 3 (D); ámpula día 4 (E); istmo NG (G); istmo día 1 (H); istmo día 2 (I); istmo día 3 (J); istmo día 4 (K) de la gestación. El control positivo corresponde a un corte de útero NG (F) y el control negativo a un corte seriado de útero NG en el que el anticuerpo primario fue omitido (L).