

PRESENCIA DE CBG (CORTICOSTEROID BINDING GLOBULIN) Y RECEPTORES DE ESTRÓGENO (FRACCIÓN ALFA) Y PROGESTERONA EN EL SISTEMA REPRODUCTOR DE OVEJAS EN DISTINTOS ESTADIOS DEL CICLO REPRODUCTIVO. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Presence of CBG (Corticosteroid binding globulin) Estrogen Receptors Alpha and Progesterone Receptors Along the Reproductive Tract in Sheep During Different Stages of the Reproductive Cycle. Immunohistochemistry Study

Adriana Vasconcellos Costa¹, Patricio Peña Salazar¹, Néstor Sepúlveda Becker¹ y Werner Miska²

¹Centro Biotecnológico de la Reproducción (CEBIOR), Facultad de Medicina, Universidad de la Frontera. Temuco, Chile.

²Justus Liebig Universität Giessen, Alemania. E-mail: avascon@ufro.cl

RESUMEN

Las hormonas esteroidales sexuales actúan a través de sus receptores permitiendo el desarrollo del tracto genital y determinando su estado morfofuncional. El objetivo del presente estudio fue estudiar la presencia de CBG (corticosteroid binding globulin) y de los receptores de estrógenos alfa y progesterona en el útero, oviducto y ovario de ovejas cíclicas (n = 3), gestantes (n = 3), y en anestro (n = 3). La evaluación morfológica se realizó con tinción de hematoxilina - eosina (H-E) e inmunohistoquímica, según técnica de Sternberger. Los resultados revelaron para receptores de estrógenos en oveja cíclicas, inmunorreactividad positiva moderada en el epitelio glandular y estroma endometrial y en epitelio superficial y corión de la mucosa oviductal; siendo la inmunorreactividad leve en ovejas gestantes y anéstricas. Los receptores de progesterona mostraron en los 3 órganos inmunorreactividad positiva moderada en ovejas cíclicas e inmunorreactividad leve o negativa en animales acíclicos. La inmunorreactividad para CBG en endometrio fue marcada en ovejas cíclicas, y leves o negativa en gestantes y anéstricas. En ovario se observó en ovejas durante el ciclo, reacción inmunopositiva a la CBG en células foliculares, en el fluido folicular y en células estromales llenas de material granular inmunopositivo dispuestas en forma grupal o aislada. Se concluye que la presencia de los receptores de estrógenos alfa y de progesterona es siempre detectable en útero, oviduc-

to y ovario variando su concentración según el estadio. La presencia de CBG fue constante en los tres órganos durante el ciclo estral y variable en los otros estadios, siendo su participación dentro del proceso reproductivo tema de próximos estudios.

Palabras clave: Ovejas, receptores de estrógenos, receptores de progesterona, CBG.

ABSTRACT

The steroids hormones operate through their receptors in the development of the genital tract and determine its morphofunctional state. The objective of the present study was to investigate the presence of CBG (corticosteroid binding globulin), estrogens alpha and progesterone receptors in the uterus, oviduct and ovary of sheep during oestrous cycle (n = 3), pregnancy (n = 3), and in anoestrous (n = 3). Cross sections were stained with Hematoxylin-eosin and Immunohistochemical (ICQ) study was made according to the technique of Sternberger. The results showed for estrogens receptors in sheep on cycle estral, moderate positive immunoreaction in the estroma and on the epithelial cells of endometrial glands and in oviductal superficial epithelium and estroma; the immunoreaction in pregnant and anestricts sheep was low. The progesterone receptors had in the 3 organs moderate immunoreactivity in cycling sheep and immunoreactivity low or negative in acycling animals. The CBG endometrial immunoreaction was high in cycling sheep and low or negative in pregnant and anestricts.

The CBG in sheep during the cycle demonstrated a positive reaction at ovarian level in follicular cells, inside follicular liquid, and in stromal cells filled with granulate material disseminated in groups or isolated. In conclusion, the presence of estrogens alpha and progesterone receptors are always detectable in uterus, oviduct and ovary varying their concentration according to the stage. The presence of CBG was constant in the three organs during the oestral cycle and variable in the other stages, its participation in the reproductive process is topic for next studies.

Key words: Sheep, estrogens receptors, progesterone receptors, CBG.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroidales sexuales son indispensables en el desarrollo, la diferenciación sexual, el crecimiento y la reproducción de los mamíferos. Se unen a sus receptores específicos e inician la respuesta biológica. Los receptores presentan un complejo mecanismo de control en el cual es necesario tener varios factores en cuenta: su número y afinidad (tipos y subtipos de ellos), expresión selectiva en los distintos órganos, el estado hormonal, etapa del desarrollo, estadio reproductivo en que se encuentre el animal y las diferencias entre las diversas especies. Se ha observado la presencia de receptores de estrógenos y progesterona en altas concentraciones en el endometrio de las ovejas prepúberes antes de que comience su actividad ovárica cíclica [2]. Es además indiscutible la importancia de estos receptores durante el periodo reproductivo ya que intervienen en los cambios cíclicos que se producen en el endometrio durante el ciclo, para tinciones convencionales y la otra en Methacarn (Carnoy modificado), para inmunohistoquímica (IHQ). Las inclusiones se hicieron en paraplast, de las cuales se obtuvieron cortes seriados de 5-7 micras. Los análisis morfológicos se hicieron con Hematoxilina y Eosina. Merck (H-E).

Para IHQ los cortes histológicos obtenidos se procesaron siguiendo el método inmunohistoquímico de Peroxidasa anti peroxidasa (PAP) descrito por Sternberger [17], según técnica del segundo anticuerpo. En la serie para los receptores estrogénicos alfa se utilizó como Anticuepo primario o específico, un monoclonal (Dako, M7047), como Anticuepo secundario: (-)IgG ratón obtenido en conejo (Dako, Z0109) y el PAP fue PAP-ratón (Dako, P0850). En la serie para los receptores de progesterona se utilizó como anticuerpo primario, un policlonal (Dako, A0098), como anticuerpo secundario: (-) IgG conejo obtenido en cerdo (Dako, Z0196) y el complejo PAP desarrollado en conejo (Dako, Z0113). El revelado se hizo con 3,3'-diaminobenzidina (Dako, S-3000 ó Sigma) y H₂O₂ por 1-5 min, para luego ser deshidratados y montados en Entellan (Merck). Para CBG el anticuerpo específico fue un policlonal (-)h CBG, obtenido en conejo (Biogénesis Inc, USA; y de propia producción) anticuerpo secundario: Dako, Z0109 y PAP co-

nejo: Dako, Z0113. El revelado se hizo con 3,3'-diaminobenzidina (Dako, S-3000 ó Sigma) y H₂O₂ por 1-5 min, para luego ser deshidratados y montados en Entellan (Merck). Una vez finalizada la reacción, los preparados fueron teñidos con hematoxilina, por 10-30 segundos, como tinción de contraste.

Las incubaciones de los Anticuerpos primarios y PAP fueron de una hora y su dilución de 1/50. El de los Anticuerpos secundarios la incubación fue toda la noche y su dilución 1/50. Los lavados fueron de 10 minutos por tres veces.

Según la intensidad de la tinción se usó la clasificación de positividad fuerte o marcada (+++), moderada (++) , débil o leve (+) y negativa (-). La intensidad de reacción de las muestras fueron comparadas con controles negativos. Estos fueron evaluados con los mismos cortes de tejido pero con sueros no inmunes FIG. 1C, FIG. 2C, FIG. 3C.

El estudio morfológico (con H-E y la IHQ) y las fotografías se realizaron con un microscopio Carl Zeiss, Axiolab, cámara MC80 DX. Germany.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en ovejas Rommey Marsh de 3 años de edad. Inmediatamente después del sacrificio se tomaron muestras de pared uterina, oviducto y ovario de ovejas cíclicas (n = 3), gestantes (n = 3) y en anestro (n = 3). La condición de ovejas gestantes, cíclica y en anestro fueron determinadas por las concentraciones de progesterona en sangre medidas a través de radioinmunoensayo y examen postmortem de los ovarios para determinar presencia de folículos y/o cuerpos lúteos y de útero para determinar presencia del conceptus. Las muestras fueron divididas en dos una parte fue fijadas en Bouin acuoso, para tinciones convencionales y la otra en Methacarn (Carnoy modificado), para inmunohistoquímica (IHQ). Las inclusiones se hicieron en paraplast, de las cuales se obtuvieron cortes seriados de 5-7 micras. Los análisis morfológicos se hicieron con Hematoxilina y Eosina (H-E), Merck.

Para IHQ los cortes histológicos obtenidos se procesaron siguiendo el método inmunohistoquímico de Peroxidasa anti peroxidasa (PAP) descrito por Sternberger [17], según técnica del segundo anticuerpo. En la serie para los receptores estrogénicos alfa se utilizó como Anticuepo primario o específico, un monoclonal (Dako, M7047), como Anticuepo secundario: (-)IgG ratón obtenido en conejo (Dako, Z0109) y el PAP fue PAP-ratón (Dako, P0850). En la serie para los receptores de progesterona se utilizó como anticuerpo primario, un policlonal (Dako, A0098), como anticuepo secundario: (-) IgG conejo obtenido en cerdo (Dako, Z0196) y el complejo PAP desarrollado en conejo (Dako, Z0113). El revelado se hizo con 3,3'-diaminobenzidina (Dako, S-3000 ó Sigma) y H₂O₂ por 1-5 min, para luego ser deshidratados y montados en Entellan (Merck). Para CBG el anticuerpo específico fue un policlonal (-)h CBG, obtenido en conejo (Biogénesis Inc, USA; y de propia producción) anticuerpo secundario: Dako, Z0109 y PAP co-

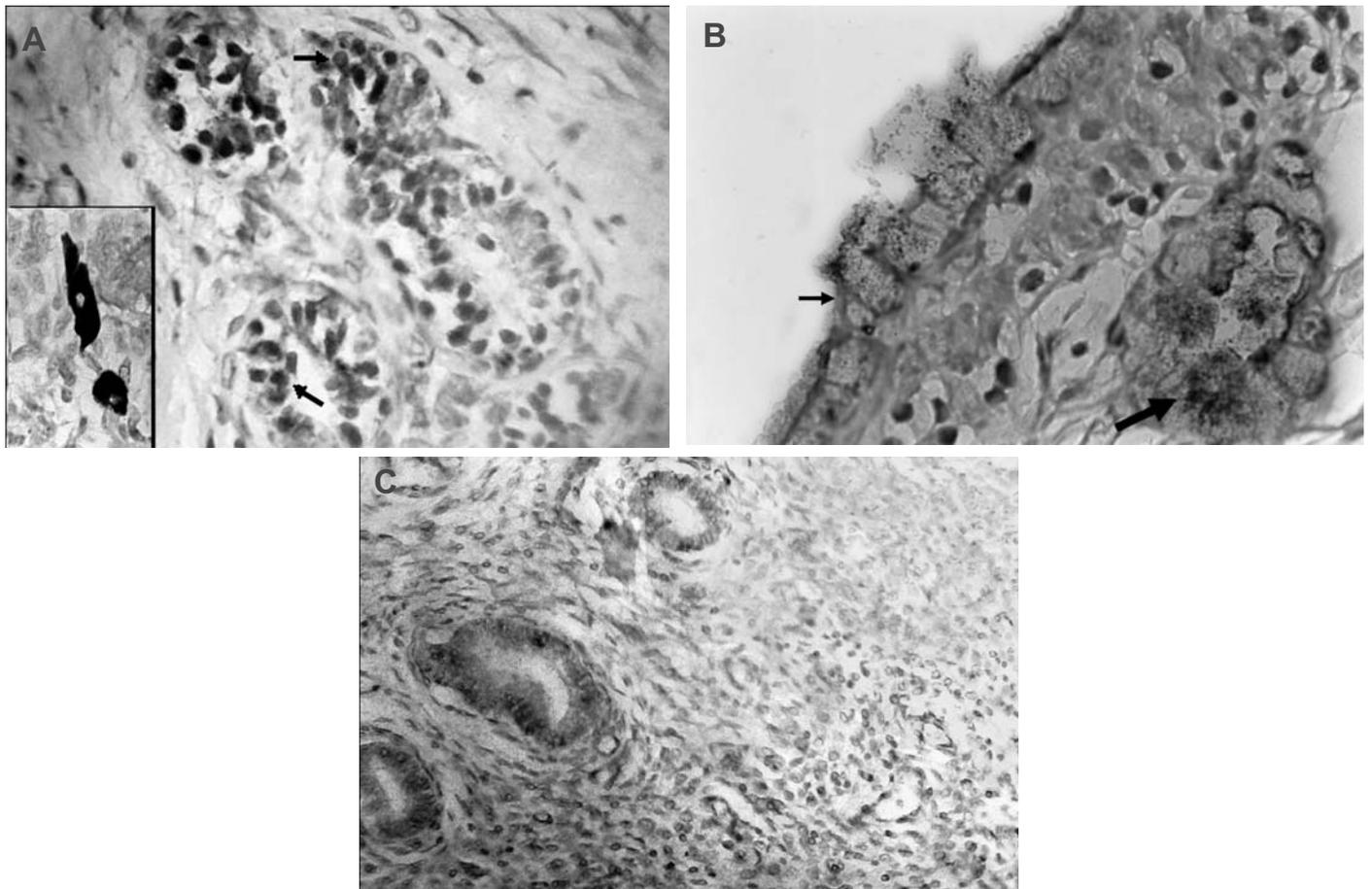


FIGURA 1. ENDOMETRIO DE OVEJA CICLÍCA: RECEPTORES DE ESTRÓGENO Y CBG. A: LOCALIZACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO GLANDULAR ENDOMETRIAL. DETALLE: NÓTESE LA INMUNOREACTIVIDAD (FLECHAS) QUE INDICA LA PRESENCIA DE RECEPTORES (100 X). RECUADRO: CÉLULAS INMUNOPOSITIVAS EN ESTROMA (400 X). B: INMUNOPOSITIVIDAD CBG EN EPITELIO SUPERFICIAL ENDOMETRIAL (FLECHA FINA) Y EN CÉLULAS DEL EPITELIO GLANDULAR (FLECHA GRUESA) (400X). C: CONTROL NEGATIVO (400X) / CYCLING EWE ENDOMETRIUM :ESTROGEN AND CBG RECEPTORS. A: INMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF RECEPTORS OF ESTROGEN IN CELLS OF THE GLANDULAR ENDOMETRIAL EPITHELIUM. DETAIL: NOTICE YOU THE INMUNOREACTIVITY (ARROWS) THAT INDICATES THE PRESENCE OF RECEPTORS (100 X). INSERT: INMUNOPOSITIVITY IN STROMAL CELLS (400 X). B: INMUNOPOSITIVITY CBG IN SUPERFICIAL ENDOMETRIAL EPITHELIUM (FINE ARROW) AND IN CELLS OF THE GLANDULAR EPITHELIUM (THICK ARROW) (400X). C: NEGATIVE CONTROL (400X).

nejo: Dako, Z0113. El revelado se hizo con 3,3'-diaminobenzidina (Dako, S-3000 ó Sigma) y H₂O₂ por 1-5 min, para luego ser deshidratados y montados en Entellan (Merck). Una vez finalizada la reacción, los preparados fueron teñidos con hematoxilina, por 10-30 segundos, como tinción de contraste.

Las incubaciones de los Anticuerpos primarios y PAP fueron de una hora y su dilución de 1/50. El de los Anticuerpos secundarios la incubación fue toda la noche y su dilución 1/50. Los lavados fueron de 10 minutos por tres veces.

Según la intensidad de la tinción se usó la clasificación de positividad fuerte o marcada (+++), moderada (++) , débil o leve (+) y negativa (-). La intensidad de reacción de las muestras fueron comparadas con controles negativos. Estos fueron evaluados con los mismos cortes de tejido pero con sueros no inmunes FIG. 1 C, FIG. 2 C, FIG. 3C.

El estudio morfológico (con H-E y la IHQ) y las fotografías se realizaron con un microscopio Carl Zeiss, Axiolab, cámara MC80 DX, Alemania.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los receptores esteroidales sexuales tienen primordial importancia en los mecanismos reproductivos. El tracto genital es muy sensible a la acción de las hormonas sexuales las que responden por medio de sus receptores específicos modificando sus características estructurales [4, 7-10, 15, 20, 21].

En la práctica veterinaria es importante la determinación de las hormonas esteroidales sexuales para el diagnóstico de problemas reproductivos en los animales domésticos incluyendo al bovino y ovino [6], siendo por lo tanto importante conocer

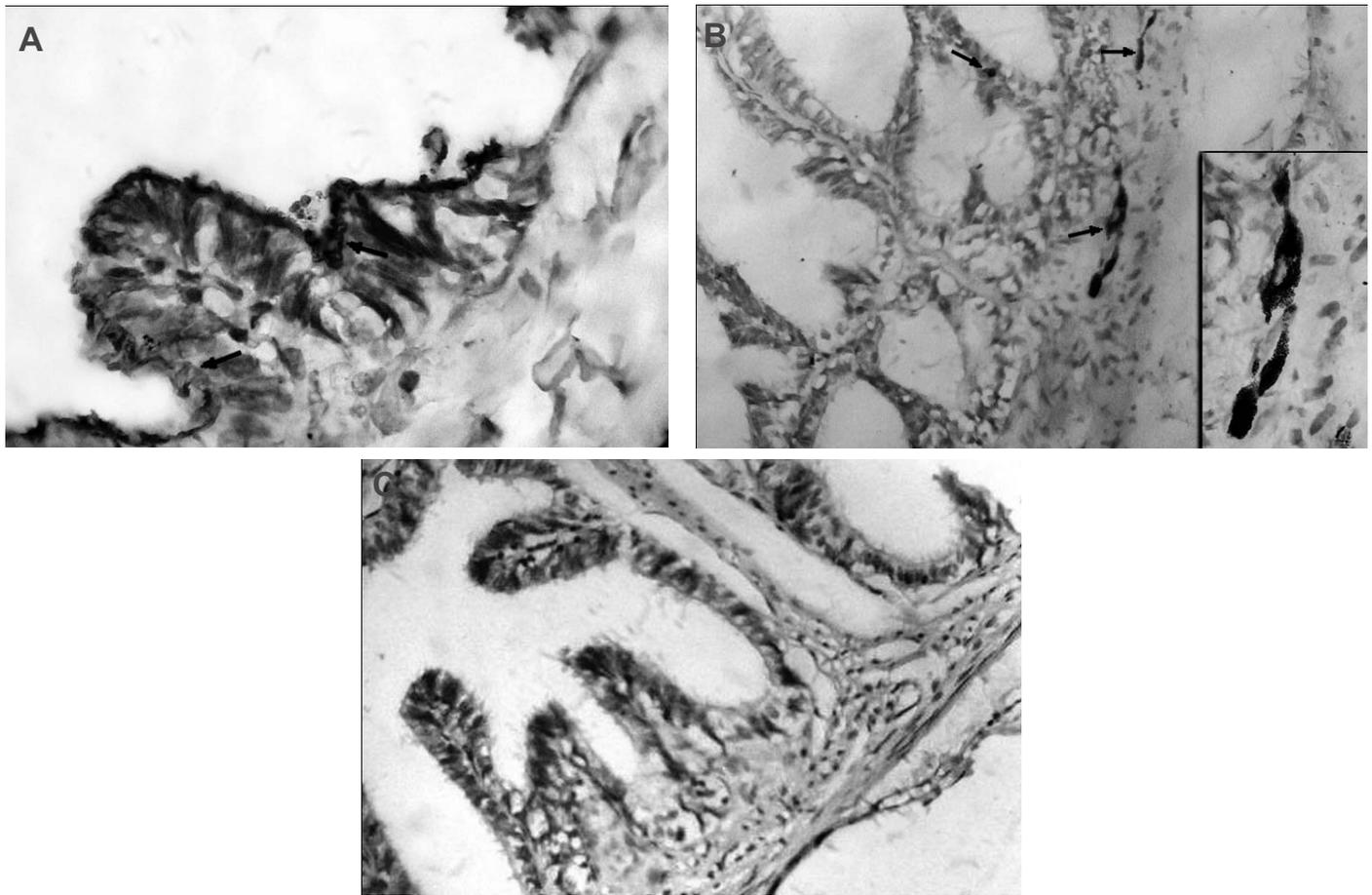


FIGURA 2. OVIDUCTO DE OVEJA CICLICA: RECEPTORES DE ESTRÓGENO Y CBG. A: RECEPTORES DE ESTRÓGENOS INMUNOPOSITIVIDAD EN CÉLULAS DEL EPITELIO OVIDUCTAL; DETALLE NÓTESE LA INMUNOREACTIVIDAD (FLECHAS) QUE INDICA LA PRESENCIA DE RECEPTORES (400 X). INMUNOPOSITIVIDAD CÉLULAS DEL ESTROMA (400 X). B: INMUNOPOSITIVIDAD CBG EN CÉLULAS DEL CORION DE LA MUCOSA DEL OVIDUCTO (FLECHAS) RECUADRO: CÉLULAS INMUNOPOSITIVAS AGRUPADAS (FLECHAS) (400 X Y 630X). C: CONTROL NEGATIVO / CYCLING EWE OVIDUCT: ESTROGEN AND CBG RECEPTORES. A: ESTROGEN RECEPTORS INMUNOPOSITIVITY IN EPITHELIUM OVIDUCTAL CELLS; DETAIL NOTICES YOU THE INMUNOREACTIVITY (ARROWS) THAT INDICATES THE PRESENCE OF RECEPTORS (400 X). INMUNOPOSITIVITY CELLS IN ESTROMA (400 X). B: INMUNOPOSITIVITY CBG IN CORION MUCOSA CELLS OF OF THE OVIDUCT (ARROWS) INSERT: GROUP OF INMUNOPOSITIVITY CELLS (ARROWS) (400 X AND 630X). C: NEGATIVE CONTROL (400X).

el estado de los receptores sobre las que ellas actúan. No se debe olvidar además que se ha generalizado el empleo de hormonas sexuales sintéticas para producir inducción del celo y sincronizaciones como método para mejorar la eficiencia reproductiva, estos fármacos podrían actuar sobre los receptores generando modificaciones en ellos [1].

Existen trabajos que demuestran la presencia y sensibilidad de receptores de estrógenos y progesterona en el endometrio de las ovejas aun antes del comienzo de su actividad cíclica ovárica [2]. Es además indiscutible la importancia de estos receptores durante el periodo reproductivo ya que intervienen en los cambios cíclicos que se producen en el endometrio durante el ciclo estral. Se ha detectado la presencia de receptores de estrógeno en sus dos isoformas alfa y beta en ovejas [2, 20]. y en vacas [15] se cree que el primero es el receptor proteico que media la clásica acción estrogénica en el tracto

reproductivo aunque se han identificado también receptores estrogénico isoforma beta en útero y ovarios.

Los receptores de estrógenos y progesterona durante el ciclo estral ovino en el endometrio muestran una elevación corta después del estro y declinan hasta hacerse indetectables en la mitad de la fase lútea [9].

En la oveja madura la presencia de receptores esteroidales en el oviducto es igual o ligeramente elevada con respecto a los del útero [18]. Su expresión es dependiente de las hormonas y la regulación de los receptores esteroidales sería similar a la del útero: los estrógenos los aumentan mientras que la progesterona los reducen.

Poco se sabe de los receptores durante la gestación y el postparto inmediato [10, 19]. A pesar del rápido crecimiento del tejido intercaruncular y de los cotiledones entre el primer y

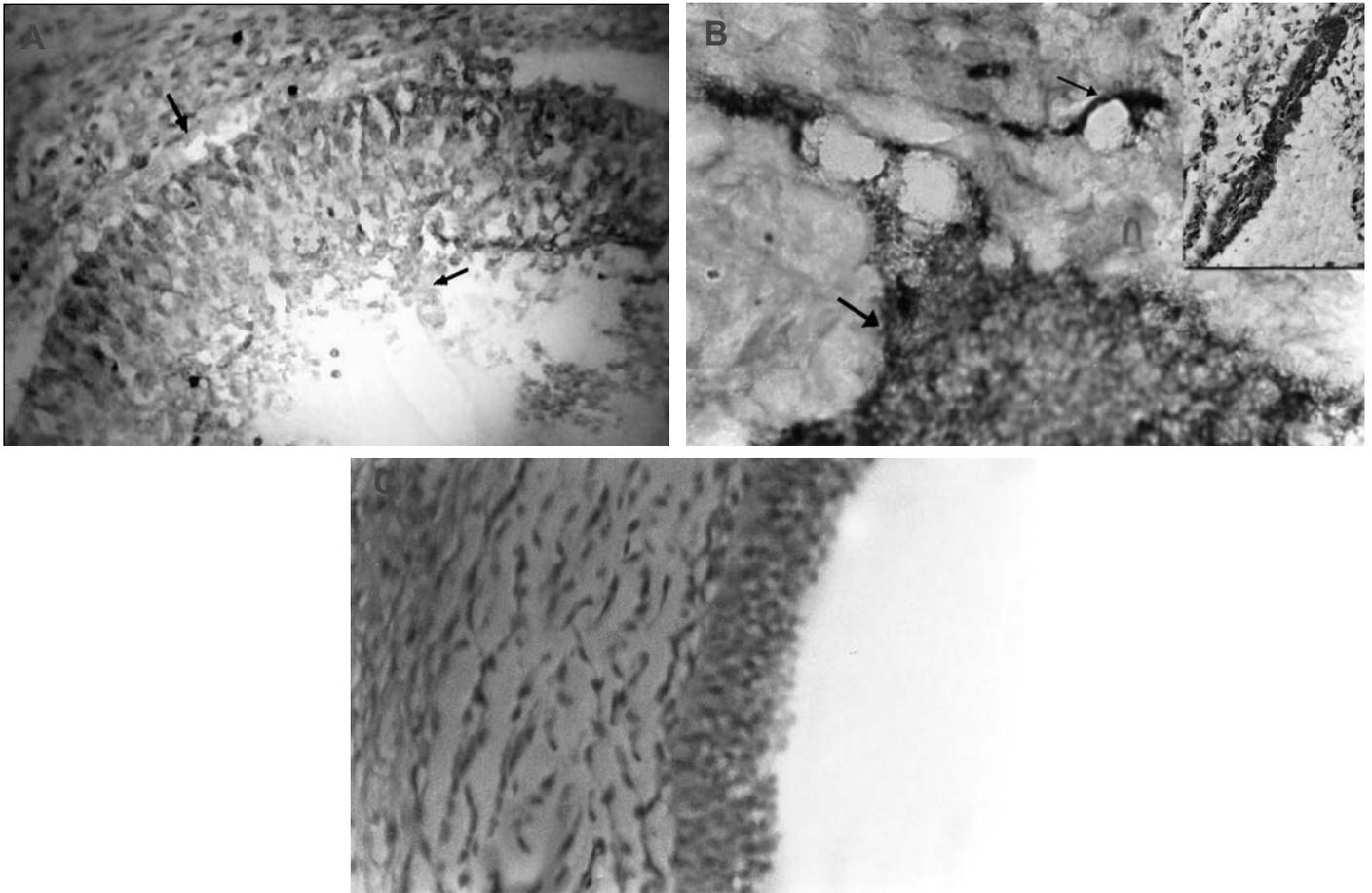


FIGURA 3. OVARIO DE OVEJA CICLICA: PRESENCIA DE CBG. A: INMUNOPOSITIVIDAD CBG EN CÉLULAS FOLICULARES Y EN EL FLUIDO FOLICULAR (FLECHAS) (100X). B: INMUNOPOSITIVIDAD CBG EN CÉLULAS DISTRIBUIDAS EN EL ESTROMA OVÁRICO. RECUADRO: CÉLULAS INMUNOPOSITIVAS ASOCIADAS A VASOS SANGUÍNEOS (FLECHAS) (400 X). C: CONTROL NEGATIVO (400 X) / CYCLING EWE OVARY: CBG PRESENCE. A: CBG INMUNOPOSITIVITY IN FOLICULARS CELLS AND IN THE FOLICULAR FLUID(ARROWS) (100X). B: INMUNOPOSITIVITY CBG IN CELLS DISTRIBUTED IN THE OVARIAN ESTROMA. INSERT: INMUNOPOSITIVITY CELLS ASSOCIATED TO SANGUINE VESSELS (ARROWS) (400 X). C: NEGATIVE CONTROL (400 X).

tercer mes de preñez los receptores de estrógeno y progesterona son bajos comparados con los del estro [11]. Así mismo los receptores de estrógenos son raramente detectables en placentotas desde los días 45 a 70 y los receptores de progesterona son indetectables después del día 45 de gestación.

En el presente estudio, los resultados evidenciaron en receptores de estrógenos (RE) en oveja en ciclo estral, inmunorreactividad positiva moderada en el estroma y el epitelio glandular endometrial (FIG.1 A) y en epitelio superficial y estroma del oviducto (FIG. 2A) e inmunorreactividad leve en las gestantes y anéstricas. Los receptores de progesterona (RP) mostraron en los 3 órganos inmunoposividad moderada en ovejas cíclicas e inmunorreactividad leve o negativa en animales acíclicos.

Las otras muestras analizadas no mostraron hallazgos relevantes. Para que se produzca el efecto de las hormonas sobre el receptor, estas son transportadas por una proteína que generalmente es una globulina. Entre estas, la CBG (corti-

teroid-binding protein) es una proteína de transporte, que une tanto a la progesterona como a los como corticoides [5]. En el hombre, se ha visto que la CBG asociada a la progesterona, induce la reacción acrosómica y sincronización de la capacitación espermática [13], además se ha descrito su presencia en tuba uterina (oviducto) y estroma del ovario [14].

Dado que existen escasas evidencias directas respecto a la presencia de la molécula de CBG en el sistema reproductor de la oveja, para su rastreo se utilizó anticuerpo policlonal comercial (y otro de producción propia) realizado contra CBG humana pura.

En los resultados obtenidos se apreció inmunorreactividad para CBG en endometrio (FIG. 1B) y en oviducto (FIG. 2B), fue marcada en ovejas en ciclo estral y leve o negativa en gestantes y anéstricas. En ovario se observó en ovejas durante el ciclo reacción inmunopositiva a la CBG en células foliculares, en el fluido folicular (FIG. 3A) y en células estromales llenas de material granular inmunopositivo diseminadas en

forma grupal o aislada, es llamativa su presencia asociada con vasos sanguíneos de alto intercambio (capilares y vénulas) (FIG. 3B).

Trabajos previos de los autores indican que la CBG humana es una molécula proteica (globina), de gran tamaño, del tipo de las serin-proteinasas y que, desde el punto de vista inmunológico, su estructura presenta un sin número de determinantes antigénicos, los cuales al ser usados para inducir respuesta inmune humoral, generan la producción de familias de anticuerpos (anticuerpos policlonales), cuyas especificidades podrían presentar reacción cruzada con estructuras moleculares de naturaleza estrechamente relacionadas. Este fundamento apoya los resultados obtenidos, en que si bien es un anticuerpo relacionado por la reactividad cruzada, tanto los sitios de reacción como la intensidad de las marcas son similares a los resultados obtenidos en la especie humana con anticuerpos mono y policlonales, y por lo tanto, constituye una buena aproximación al rastreo de esta molécula en otras especies mamíferas y por ende en las ovejas.

Otros antecedentes obtenidos por los autores señalan que la presencia de CBG en el oviducto crearía un ambiente adecuado para la fecundación. No se conoce aún la función que cumple en el ovario, sin embargo su relación con vasos sanguíneos sugiere que su secreción podría estar relacionada con la función ovárica misma, donde tendría una función endocrina integradora alcanzando su secreción el lecho vascular y de allí logrando otros objetivos situados en vecindad o a distancia como el transporte de esteroides en el sistema reproductor.

Se supone que si esta molécula está presente y participa en mecanismos que intervienen en la fecundación humana es posible suponer que tienen una participación similar en otras especies mamíferas con procesos reproductivos similares como es la oveja [22].

CONCLUSIONES

Los resultados observados en el estudio muestran que la presencia de los receptores de estrógenos alfa y de progesterona es siempre detectable en útero, oviducto y ovario variando su concentración según el estadio.

La presencia de CBG fue constante en los tres órganos estudiados durante el ciclo estral y variable en los otros estadios del ciclo reproductivo.

RECOMENDACIONES

Es necesario continuar con esta línea de investigación para estudiar la participación de la CBG dentro del proceso reproductivo de esta especie.

Se debe tratar de obtener CBG de oveja y su respectivo anticuerpo para observar y comparar resultados.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer a la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad de la Frontera. Proyecto N° 1203399.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DALL, A.C. Immunohistochemical localization endometrial of estrogen and progesterone receptors in the cow. *Anat. Histol. Embryol.* 28:375-377. 1999.
- [2] GAROFALO, E.G.; TASENDE, C. Uterine estrogen and progesterone receptors in prepuberal ewe: distribution in myometrium, endometrium, and caruncles. *Vet. Res.* 27:177-183. 1996.
- [3] ING, N.H.; OTT, T.L. Estradiol up-regulates estrogen receptor- α messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol. Reprod.* 60: 134-139. 1999.
- [4] KIMMINS, S.; MACLAREN, L. A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22:742-748. 2001.
- [5] KREITMANN, B.; DERACHE, B.; BAYARD, F. Measurement of the corticoid-binding globulin, progesterone, and progesterone "receptor" content in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47:350-353. 1978.
- [6] MATAMOROS, R.; GÓMEZ, C.; ANDAUR, M. Hormonas de Utilidad Diagnóstica en Medicina Veterinaria. *Arch. Med. Vet.* 34:5-27. 2002.
- [7] MEIKLE, A.; TASENDE, C.; RODRÍGUEZ, M.; GARÓFALO, E. G. Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenol.* 48: 1105-1113. 1997.
- [8] MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; SHALIN, L.; MASIRONI, B.; TASENDE, C.; RODRÍGUEZ-PIÑÓN, M.; GARÓFALO, E.G. A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor expression in the lamb uterus. *Reprod. Nutr. Dev.* 40: 283-293. 000.
- [9] MEIKLE, A.; GARÓFALO, E.G.; RODRÍGUEZ-PIÑÓN, M.; TASENDE, C.; SAHLIN, L. Regulation by gonadal steroids of estrogen and progesterone receptors along the reproductive tract in lambs. *Acta Vet. Scand.* 42: 131-139. 2001.
- [10] MEIKLE, A.; TASENDE, C.; SOSA, C.; GARÓFALO, E. G. The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod. Nutr. Dev.* 16:385-394. 2004.
- [11] MILLER, B.G.; TASSELL, R.; STONE, G.M. Growth of the endometrium and cotyledons during pregnancy in the

- ewe: rates of protein secretion and synthesis and nuclear and cytosol steroid hormone receptor level. **J. Endocrinol.** 96:137-146. 1983.
- [12] MISAO, R.; HORI, M.; ICHIGO, S.; FUJIMOTO, J.; TAMAYA, T. Corticosteroid-binding globulin mRNA levels in human uterine endometrium. **Steroids.** 59:603-7. 1994.
- [13] MISKA, W.; FEHL, P.; HENKEL, R. Biochemical and immunological characterization of the acrosome reaction-inducing substance (ARIS) of hFF. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 199 (1):125-129. 1994.
- [14] PEÑA, P.; VÁSQUEZ, B.; VEUTHEY, C.; RISOPATRÓN, J.; SÁNCHEZ, R.; MISKA, W. Evidencias inmunocitoquímicas sobre la presencia de la serpina CBG-símil en el sistema reproductor de la hembra en bovinos. **Rev. Chil. Anat.** 14: 97-203. 1999.
- [15] ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; WATHES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples through the oestrus cycle and early pregnancy in cows. **Reprod.** 122: 965-979. 2001.
- [16] SPENCER, T.E.; 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. Reprod.** 53: 1527-1543. 1995.
- [17] STERNBERGER, L.A. The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. **J. Histochem. Cytochem.** 27(12): 1657 -1665. 1979.
- [18] STONE, G.M.; MILLER, B.G. The isthmic oviduct of the ewe: What is the biological significance of high affinity cytosol receptors for estradiol and progesterone? **Biol. Reprod.** 19: 653-656. 1978.
- [19] TASENDE, C.; MEIKLE, A.; RUBIANES, E.; GARÓFALO, E.G. Restoration of estrogen and progesterone uterine receptors during the ovine postpartum period. **Theriogenol.** 45: 1545-1551. 1996.
- [20] VASCONCELLOS, A.; SEPÚLVEDA, N.; CASTILLO, J.; ROSAS, C. Presencia de receptores de Estrógeno y de Progesterona en el Endometrio de ovejas Prepúberes. Estudio inmunocitoquímico. **Int. J. Morphol.** 23 (4): 393-396. 2005.
- [21] VASCONCELLOS, A.; PEÑA, P.; SEPÚLVEDA, N. Estudio histomorfológico comparativo del endometrio de la oveja prepúber y en anestro bajo influencia hormonal cíclica. **Rev. Cient. FCV-LUZ .XV** (4): 334-337. 2005.
- [22] VASCONCELLOS, A.; SEPÚLVEDA, N.; PACHECO, C. Presencia de receptores de estrógeno, progesterona y de CBG en el tracto genital de ovejas y de perras. Estudio inmunocitoquímico comparativo. **Int. J. Morphol.** 24 (3): 457-462. 2006.