

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN VAGINA DURANTE EL PROESTRO Y  
PERÍODO PERIOVULATORIO EN CANINOS.**

por

**Ana Laura COSTAS MARTINEZ**



**TESIS DE GRADO** presentada como  
uno de los requisitos para obtener el  
título de Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Medicina Veterinaria

**MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL**



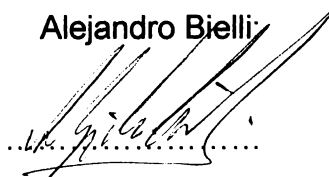
**MONTEVIDEO**  
**URUGUAY**  
**2011**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

TESIS DE GRADO aprobada por:

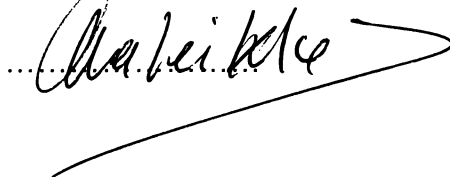
Presidente de mesa:

Alejandro Bielli:



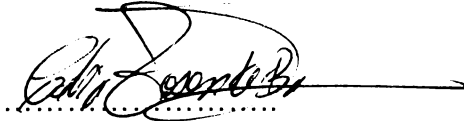
Segundo miembro (Tutor):

Ana Meikle



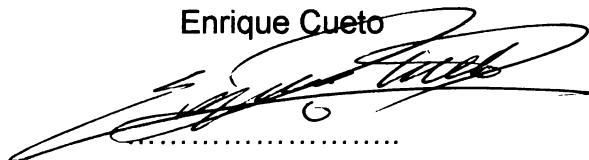
Tercer miembro:

Celia Tasende:



Cuarto miembro (Co tutor):

Enrique Cueto



Quinto miembro (Co tutor):

Javier Ithurralde



Fecha: 30 de septiembre, 2011.

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Aprobado con 12 (doce) votos

29255

## **DEDICATORIA**

A mis padres, sin ellos hubiese sido imposible este logro.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis adorados padres, mi querida hermana y abuela quienes sabían que desde muy pequeña mi vocación era la medicina veterinaria.

A mi esposo y amigo Javier Ithurralde, quien me dio dulcemente las armas para hacer este trabajo, haciendo junto a mí las evaluaciones inmunohistoquímicas.

A mi tutora y co-tutores por enseñarme la forma de hacer ciencia.

A todos los que contribuyeron directa o indirectamente en esta tesis; Isabel Sartore y Paula Pessina quienes trabajaron en parte del trabajo de laboratorio y a las autoridades del Plantel de Perros quienes facilitaron los animales para este trabajo.

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN.....</b>	<b>II</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>2. SUMMARY.....</b>	<b>9</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
<b>4.1. El ciclo estral en la hembra canina.....</b>	<b>11</b>
<b>4.2. Las hormonas esteroideas sexuales durante el ciclo estral     canino.....</b>	<b>13</b>
<b>4.3. Organización histológica de la vagina.....</b>	<b>15</b>
<b>4.4. Efectos de las hormonas sexuales femeninas sobre la     histofisiología vaginal.....</b>	<b>17</b>
<b>4.5. Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas     sexuales.....</b>	<b>18</b>
<b>4.6. Receptores esteroideos sexuales en el tracto reproductivo     femenino.....</b>	<b>19</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>5.1. Objetivo general.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2. Objetivos particulares.....</b>	<b>22</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>6.1. Ensayo experimental.....</b>	<b>22</b>
<b>6.2. Determinación de los niveles séricos de progesterona.....</b>	<b>23</b>
<b>6.3. Determinación de receptores de estrógenos (RE<math>\alpha</math>)     y de progesterona (RP).....</b>	<b>23</b>
<b>6.4. Definición de las fases del ciclo.....</b>	<b>24</b>
<b>6.5. Análisis estadístico.....</b>	<b>24</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>7.1. Concentraciones de progesterona.....</b>	<b>25</b>
<b>7.2. Receptores esteroideos.....</b>	<b>26</b>
<b><u>7.2.1. Observaciones generales.....</u></b>	<b>26</b>
<b><u>7.2.2. Diferencias según las fases del ciclo estral.....</u></b>	<b>27</b>
<b><u>7.2.3. Diferencias entre compartimentos histológicos.....</u></b>	<b>30</b>

8. DISCUSION.....	33
8.1. Concentraciones séricas de progesterona.....	33
8.2. Receptores sexuales durante las fases del ciclo estral.....	33
8.3. Diferencias entre compartimientos histológicos.....	35 <sup>c. y Bii</sup>
9. CONCLUSIONES.....	37
10. BIBLIOGRAFÍA.....	38

## **LISTA DE TABLAS Y FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Representación esquemática de los eventos endócrinos durante las diferentes etapas del ciclo estral de la perra (Modificado de Edens y Health, 2005)....	14
<b>Figura 2:</b> Representación esquemática del mecanismo de acción esteroidea en las células blanco.....	19
<b>Figura 3:</b> Concentraciones séricas de progesterona durante el experimento (0=estro).....	25
<b>Figura 4:</b> Índices de inmunopositividad al RE $\alpha$ (IIP RE) en los compartimientos histológicos epitelio superficial y conjuntivo denso durante las diferentes fases del ciclo.....	28
<b>Cuadro 1:</b> Concentraciones séricas de P4 en las diferentes fases del ciclo.....	26
<b>Cuadro 2:</b> Índices de inmunopositividad al RE $\alpha$ en los diferentes compartimientos histológicos durante las distintas fases del ciclo.....	28
<b>Cuadro 3:</b> Área de tinción para el RE $\alpha$ en los diferentes compartimientos histológicos durante las distintas fases del ciclo.....	30
<b>Cuadro 4:</b> Índices de inmunopositividad y Área de tinción al RE $\alpha$ en los diferentes compartimientos histológicos.....	31
<b>Imagen 1:</b> Corte histológico de la vagina de la rata en donde se hayan señalados los compartimientos histológicos que componen las diferentes túnicas.....	16
<b>Imagen 2:</b> Inmunolocalización del RE $\alpha$ en distintos compartimientos histológicos de la vagina canina.....	27
<b>Imagen 3:</b> Inmunolocalización del RE $\alpha$ en el epitelio superficial vaginal en las fases 1 (imagen de la izquierda) y 4 (imagen de la derecha) del ciclo.....	29
<b>Imagen 4:</b> Inmunolocalización del RE $\alpha$ en el epitelio vaginal.....	31
<b>Imagen 5:</b> Inmunolocalización del RE $\alpha$ en diferentes compartimientos histológicos de la vagina de la perra.....	32

## **1. RESUMEN**

El objetivo de este estudio fue describir la presencia de los receptores de estrógenos (RE $\alpha$ ) en diferentes compartimientos histológicos de la vagina de perras adultas sanas, en las fases de proestro, estro y período post ovulatorio, y correlacionarlas con la concentración sérica de progesterona (P4). Para dicho fin se utilizaron 4 perras, tomándoles muestras seriadas de sangre y biopsias vaginales cada 48hs a partir del inicio clínico del proestro, marcado por el comienzo de la secreción transvaginal serosanguinolenta. Las concentraciones séricas de P4 se determinaron mediante radioinmunoanálisis (RIA), al tiempo que la detección de los receptores esteroideos se realizó mediante inmunohistoquímica. Se llevó a cabo un análisis de imagen subjetivo por parte de dos observadores independientes en los compartimientos histológicos: epitelios superficial, intermedio y profundo; y tejidos conjuntivos laxo y denso, analizándose 10 campos para cada uno de los compartimientos y fases del ciclo en cada animal. Los efectos de las fases del ciclo estudiadas, del compartimiento histológico y sus interacciones fueron analizadas por análisis de varianza (Proc MIXED; SAS Institute inc., 2000). No se detectó la expresión del receptor de progesterona (RP) en ninguno de los compartimientos histológicos vaginales estudiados a lo largo de las distintas fases del ciclo estudiadas. Se detectó inmunopositividad al RE $\alpha$  a nivel nuclear en todos los compartimientos histológicos y fases del ciclo estral estudiadas. La expresión del RE $\alpha$  varió entre los distintos compartimientos histológicos, y durante las distintas fases del ciclo.

Los cambios cíclicos más relevantes se detectaron en el epitelio superficial y el tejido conjuntivo denso vaginal constatándose en ambos casos mayor contenido de RE $\alpha$  durante el período post ovulatorio, aunque comportándose de manera diferente en las demás etapas del ciclo. Esto sugiere que en la vagina de la perra, las hormonas esteroideas sexuales regulan de manera diferencial la expresión de los RE $\alpha$  según el compartimiento histológico involucrado.



## **2. SUMMARY**

The aim of this study was to describe the presence of oestrogen receptors (ER $\alpha$ ) in different vaginal histological compartments in healthy adult bitches, during proestrus, estrus, and post-ovulatory period, and to correlate them with serum progesterone (P4) concentrations. For this purpose, serial blood samples and vaginal biopsies were taken from 4 bitches every 48 hours, starting with the clinical onset of proestrus, marked by the beginning of the serosanguineous vaginal secretion. Serum P4 concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA), while detection of steroid receptors was carried out through immunohistochemistry. A subjective image analysis was conducted by two independent observers, in the following histological compartments: superficial, intermediate, and deep epithelium; and loose and dense connective tissues. Ten fields were analysed for each compartment and oestral cycle stage in each animal. The effects of the oestral cycle stage, histological compartment, and their interactions, were analyzed by variance analysis (Proc MIXED; SAS Institute inc., 2000). No progesterone receptor (PR) expression was detected in any vaginal histological compartment throughout the different oestral cycle stages. Nuclear ER $\alpha$  immunoreactivity was detected in every histological compartment and oestral cycle stage studied. ER $\alpha$  expression varied among the different histological compartments, and during the different stages of the cycle.

The most relevant cyclic changes were detected in the superficial epithelium and in the dense connective tissue. In both cases, the highest ER $\alpha$  expression was detected during the post-ovulatory period, although both compartments revealed a different pattern throughout the other cycle stages. This suggests that, in the bitch's vagina, sexual steroid hormones regulate ER $\alpha$  expression in different ways, according to the histological compartment involved.

### **3. INTRODUCCIÓN**

La perra posee características particulares en su ciclo estral, lo que dificulta la extrapolación de conceptos de la fisiología reproductiva desde otras especies hacia ella (Wanke y Gobello, 2006). La hembra canina es considerada la única especie doméstica monoéstrica, con largos ciclos estrales, lenta evolución de cada una de sus fases, e inclusive cierto grado de superposición entre las fases folicular y lútea, debido a la luteinización prematura de los folículos ováricos (Forsberg y col, 1993).

Las hormonas esteroideas sexuales son esenciales para el crecimiento y función del tracto reproductivo de la hembra. En la perra, al igual que en otros mamíferos, la vagina experimenta una serie de importantes cambios morfológicos y bioquímicos durante las distintas fases del ciclo estral, los cuales son principalmente el resultado de la acción de los estrógenos y la progesterona. Incluso, la detección de los cambios cíclicos en el epitelio vaginal, es frecuentemente empleada en la clínica como herramienta para la determinación del momento óptimo para la monta.

Los estrógenos y la progesterona actúan sobre las células blanco a través de proteínas específicas que los reconocen (receptores). La sensibilidad de un tejido a una hormona esta dada por la presencia y cantidad de receptores (Meikle y col. 2004). Tanto los estrógenos como la progesterona son capaces de regular los niveles de expresión de ambos tipos de receptores (Koligian y Stormshak, 1977; Evans y Leavitt, 1980; Batra y losif, 1989; Clarke, 1990) y dicha regulación varía en función de la especie (Spencer y Bazer, 1995; Johnston y col, 1985; Fernández y col, 1989), el órgano (Meikle y col, 2001; Dhaliwal y col, 1997; Vermeirsch y col, 2002) y el tejido o tipo celular en cuestión (Meikle y col, 2000).

En la especie canina los antecedentes de estudios que vinculen la distribución de los RE y RP con las concentraciones séricas de sus respectivos ligandos, se remiten mayoritariamente al útero (Lessey y col, 1981; Dhaliwal y col, 1997; Donnay y col, 1995; Fernández y col, 1989; Johnston y col, 1985; Vasconcellos y col, 2008). En lo que respecta a los tejidos vaginales, hemos encontrado dos artículos científicos, los cuales son contradictorios entre sí, ya que detectan o no diferencias en la expresión de los receptores esteroideos (RE $\alpha$  y RP) a lo largo del ciclo sexual canino (Prado de Brito y col, 2006; Vermeirsch, 2002). Además, en ambos estudios las muestras provenían de perras eutanasiadas, lo que los diferencia radicalmente de la presente tesis, en la cual nos propusimos trabajar con muestras seriadas tomadas in vivo de los mismos animales.

El objetivo de la presente tesis es aportar información acerca de la expresión de los receptores esteroideos en los tejidos vaginales de perras sanas durante las fases de proestro, estro y período post ovulatorio, y su asociación con los cambios cíclicos de la progesterona sérica.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1. EL CICLO ESTRAL EN LA HEMBRA CANINA**

El ciclo estral en la perra se define como una serie de eventos reproductivos predecibles, que comienzan en el estro y terminan en el estro siguiente; se continúan a lo largo de la vida adulta, y son interrumpidos por la gestación, la lactancia, la nutrición inadecuada, o cuando las condiciones ambientales son estresantes (Senger, 2005). Una vez alcanzada la pubertad, en el entorno de los 6 a 7 meses de edad, las perras comienzan a ciclar, y lo hacen durante toda su vida, pudiendo ver reducida su fertilidad a partir de los 7 años de edad (Concannon, 1989). Se ha estudiado la variabilidad de la edad con que las perras entran en la pubertad; es así que las razas pequeñas tienden a presentar el primer celo a los 6-10 meses, en tanto que las razas grandes comienzan a ciclar a los 18-20 meses de edad. Las perras de talla pequeña, además de entrar más tempranamente a la pubertad, tienen ciclos estrales de corta duración, por lo que poseen una probabilidad más alta de presentar mayor número de celos a lo largo de toda su vida reproductiva (Ortega, 2000).

La perra, en general, tiene un solo ciclo estral por estación reproductiva, por lo que se considera monoéstrica estacional, durante la primavera y el otoño (Feldman y Nelson, 1987), aunque varios estudios indican que las perras consideradas como grupo, ciclan uniformemente a lo largo de todo el año (Engle, 1946; Sokolowsky y col, 1977; Tsutsui, 1977).

La duración media del ciclo estral en la especie canina es de 180 días, aunque se ha estudiado que existen importantes diferencias raciales (Concannon, 1986; Concannon, 1993). En razas como el Ovejero Alemán y el Basset Hound la duración promedio del ciclo es de 180 días, en el Cocker Spaniel de 190 días, y en el Beagle de 240 días. Los casos más llamativos son los de las razas Basenji y Mastin Tibetano, las cuales presentan un solo ciclo estral por año, durante el otoño (Concannon, 1986; Concannon 1993), siendo estos casos considerados como los ciclos estrales más largos de la especie canina (Feldman y Nelson, 2001).

La larga duración del ciclo estral canino lo diferencia de los ciclos de otras especies domésticas, en las cuales la duración media del ciclo estral es considerablemente más corta (21 días para el caso de la vaca y la cerda; y 17 días para la oveja). A su vez, cada una de las etapas del ciclo estral de la perra, también resultan particularmente largas en comparación con las de otras especies. Las diferencias van desde etapas cuyas duraciones se miden en horas para las hembras bovinas, ovinas y suinas; a largas etapas que abarcan varios días en la hembra canina.

El ciclo estral de la perra puede dividirse en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y una época del año en donde no hay actividad sexual, el anestro. Actualmente, se considera al metaestro como diestro, por tratarse de una etapa en donde los niveles de progesterona se encuentran elevados durante 2 a 3 meses (Linde Fosberg, 1996).

El ciclo estral canino se inicia con el proestro, que tiene una duración promedio de 9 días, aunque oscila entre 2 y 27 días (Concannon, 1983).

El proestro se considera una fase de incremento de la actividad folicular ovárica que precede al estro. El inicio del proestro se define clínicamente cuando se observa por

primera vez una secreción transvaginal, normalmente serosanguinolenta, cuyo aspecto varía desde blanquecino a hemorrágico. Se observa edema e hipertrofia de la vagina y la vulva, aumento del tamaño uterino, con edematización del endometrio y desarrollo de las glándulas endometriales, los cuales se suscitan a partir del aumento de los estrógenos (Wildt y col, 1981). Durante esta etapa, la perra atrae al macho como consecuencia de la síntesis y liberación de una feromona sexual, aunque no presenta receptividad hacia el macho (Anisko, 1977; Goodwin y col, 1979). La metil p-hidroxibenzoato se ha identificado como la principal feromona de la hembra canina. Su componente principal es un derivado del ácido benzoico de bajo peso molecular y por tanto, muy volátil, presente en la orina y en las secreciones vaginales (Anisko, 1977; Goodwin y col, 1979). La producción de feromonas sexuales durante el proestro y estro canino está controlada por los estrógenos y se forma a partir de la acción de las bacterias vaginales y, a nivel de la piel perianal a partir de productos de la secreción o descamación. En condiciones normales, la feromonas solo se producen durante el proestro y el estro, aunque en condiciones patológicas también se ha evidenciado su producción en perras con vaginitis (Donovan, 1969).

La etapa que le sigue al proestro, es el estro (del latín, *oistros*, que significa deseo imperioso), vulgarmente llamado celo, es el período en el que la perra acepta la monta, con una postura característica: se inmoviliza con presentación del tren posterior al macho, levanta la cola y eleva la vulva, facilitando de esta manera el coito. El estro se inicia 2 días antes a 4 días después del pico preovulatorio de LH (Jones y col, 1973; Concannon y col, 1975; Nett y col, 1975), mostrando una duración media de 5 a 10 días con un rango de 3 a 21 días (Christie y Bell, 1972). Aproximadamente 48 horas luego del pico de LH, ya en la primera mitad del estro, se produce la dehiscencia del folículo y por consiguiente la ovulación espontánea de ovocitos inmaduros (Concannon y Hansel, 1977), los cuales no presentan capacidad para fertilizarse hasta completar la primera división meiótica y transformarse en ovocitos secundarios, lo cual ocurre alrededor de 60 horas después de la ovulación (Holst y Phemister, 1971; Phemister y col, 1973). Entre la primera y la última ovulación pueden transcurrir entre 24 y 96 horas, pudiendo indicar entonces, que el periodo de mayor fertilidad de la perra es aquel que abarca desde el segundo hasta el quinto día de iniciado el estro (Linde Forsberg, 1996). Clínicamente la vulva se mantiene aumentada de tamaño, edematosa y turgente; aunque en menor grado en relación con el proestro, a causa de un descenso de los estrógenos. El corrimiento vulvar disminuye en cantidad y deja de ser predominantemente hemorrágico, tornándose de un color más claro. Al igual que la vulva, la vagina pierde turgencia. El epitelio vaginal en esta etapa es todavía grueso, por lo cual el color de la mucosa vaginal es pálido (Lindsay, 1983). A nivel uterino, el órgano se prepara para la implantación y se completa el desarrollo glandular. En lo que respecta al comportamiento, la perra cambia de una actitud agresiva a mostrarse totalmente pasiva (Concannon, 1983; Lein, 1983; Linde Forsberg, 1996), presentando receptividad hacia al macho; acompañándose esta condición por valores decrecientes de estrógenos y crecientes de progesterona. Durante este periodo la perra orina con una frecuencia mayor a la normal dando lugar a la emisión de la feromona sexual, que a pesar de estar presente, no se secreta en niveles tan altos como lo hace durante el proestro.

Posteriormente al estro, la perra entra en la siguiente etapa del ciclo denominada diestro. El diestro puede durar de 50 a 100 días, aunque su duración media es de 70 días y se corresponde con el período de actividad lútea (Okkens, 1985), periodo en el cual, la perra rechaza la cópula y deja de ser atractiva para el macho, a consecuencia de la secreción lútea de progesterona (Holst, 1974). El diestro se puede dividir en dos fases: una

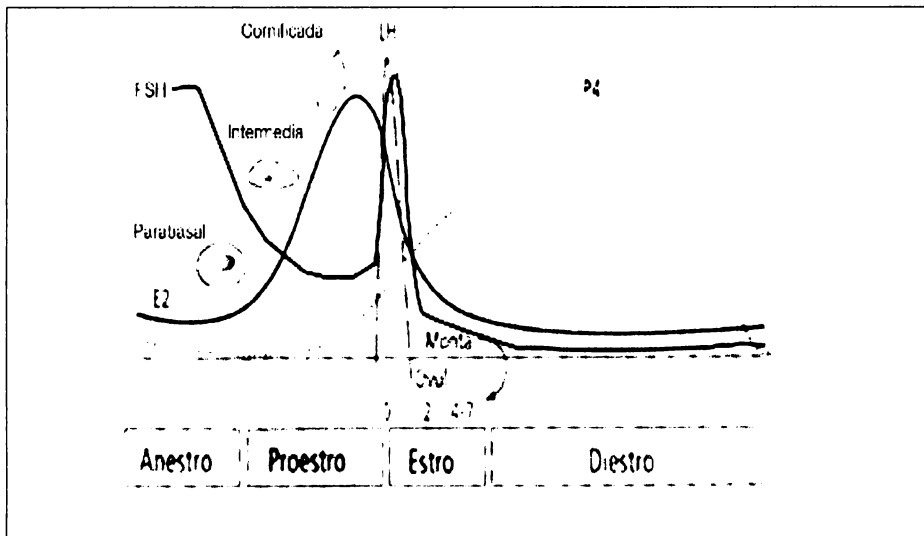
progresiva y una regresiva, relacionándose estos dos estadios con la función lútea. La fase progresiva es aquella en la cual ocurre el desarrollo lútea, y se extiende hasta aproximadamente 20 días luego del estro. La fase regresiva es aquella en donde se inicia la regresión del cuerpo lútea hasta el comienzo del anestro, aproximadamente 70 días más tarde. A nivel uterino; el endometrio presenta glándulas plenamente desarrolladas y activas, por acción de la progesterona, la cual es necesaria para el desarrollo endometrial, secreción de líquidos uterinos, inhibición de la motilidad uterina y eliminación de la sensibilidad leucocitaria dentro del útero (Cunningham, 1997). La vulva vuelve al aspecto típico que encontraremos durante el anestro, desapareciendo el edema típico de las etapas anteriores. Las paredes vaginales se adelgazan y desaparecen los pliegues. Se produce inicialmente una descamación brusca del epitelio vaginal en colgajos que hace que la mucosa aparezca moteada, aunque más adelante su aspecto comienza a asemejarse al que encontraremos en el anestro (Lindsay, 1983). A nivel clínico y comportamental, la perra rechaza la cópula, deja de ser atractiva para el macho y finalmente experimenta una reducción del tamaño de las glándulas mamarias (Holst, 1974).

Por último, el anestro es un intervalo cíclico, que representa la transición entre un ciclo estral y el siguiente. Es una etapa de reposo del aparato genital femenino, por lo que es el periodo ideal para la realización de intervenciones quirúrgicas de conveniencia como lo son la ovariectomía, ovario histerectomía, histerectomía, etc. A pesar de tratarse de una fase de reposo, desde el punto de vista endócrino, la actividad hormonal continúa, caracterizándose por concentraciones basales de progesterona, al tiempo que los estrógenos, fluctúan en gran parte del anestro para aumentar sus concentraciones un mes antes del pico de LH y luego descender previo al comienzo del nuevo proestro (Olson y col, 1982). Se debe tener en cuenta que la duración del anestro es muy variable, pudiendo durar de 2 a 10 meses, con un promedio de 5 meses (Bouchard y col 1991). Las razones de un anestro prolongado incluyen entre otras, el hipotiroidismo, la administración de progestágenos, un tratamiento prolongado con glucocorticoides, así como también etapas de desnutrición y malnutrición. Actualmente se divide al anestro en tres etapas: una etapa temprana, una media y una tardía (Vestegen y Onclin, 1999). Durante el anestro existe relativa quiescencia reproductiva, por lo que no habrá ni signos ni comportamiento reproductivo característico, pero la perra durante esta etapa puede presentar pequeñas descargas vaginales y reducido aumento en el tamaño de la vulva (Wildt y col, 1981)

## **4.2. LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SEXUALES DURANTE EL CICLO ESTRAL CANINO**

Las hormonas esteroideas se producen en células específicas de los testículos, la corteza adrenal, los ovarios y la placenta. La síntesis de estrógenos y progesterona ocurre principalmente a nivel de los ovarios. Todas las hormonas esteroideas están relacionadas estructuralmente y provienen bioquímicamente del colesterol que es cedido fundamentalmente de las lipoproteínas circulantes (LDL-colesterol). Su naturaleza lipídica hace que no se puedan almacenar y que cuando se encuentran libres penetren rápidamente en las células por difusión a través de la membrana. Por este motivo es necesario que circulen asociadas a proteínas plasmáticas para que puedan mantenerse un cierto tiempo en la sangre y aumente así la probabilidad de que alcancen los tejidos

diana. En general, solo un 5% de las hormonas circulan libremente (Edquist y Forsberg, 1997).



**Figura 1:** Representación esquemática de los eventos endócrinos durante las diferentes etapas del ciclo estral de la perra (Modificado de Edens y Health, 2005).

Los eventos endócrinos más salientes de la fisiología reproductiva de la hembra canina, se hayan esquematizados en la Figura 1. El aspecto endocrinológico que caracteriza al proestro es el aumento en los niveles de FSH. Ésta hormona estimula el crecimiento de los folículos ováricos y con esto se induce a una alta producción de estrógenos por parte de las células de la granulosa del folículo ovárico en desarrollo, que incluso durante esta etapa podrían producir también progesterona (Concannon y Hansel, 1977).

Las concentraciones séricas de estrógenos pasan de niveles basales de 2-10 pg/ml a niveles altos de 50-100 pg/ml antes del pico preovulatorio de LH, al alcanzar los últimos días del proestro (Jones y col, 1973; Concannon y col, 1975; Holst y Phemister, 1975; Concannon y Hansel, 1977; Wildt y col, 1979; Onclin y col, 2002). Dicho aumento de estrógenos da lugar al pasaje de eritrocitos por diapédesis al interior de la luz del útero, cervix y vagina, lo que se mezcla con las secreciones uterinas y vaginales también aumentadas por la acción estrogénica, produciendo la característica secreción mucosanguinolenta que define a esta etapa desde el punto de vista clínico. Los estrógenos alcanzan concentraciones máximas 24-48 horas antes del inicio del estro, niveles que ejercen una acción “feed-back” positiva sobre el hipotálamo e hipófisis, induciendo la secreción en pico de LH típica de la etapa de estro. Posteriormente, durante los primeros días del estro la concentración de estradiol se reduce (Olson y col, 1982). Al comienzo del estro, ocurre el pico preovulatorio de LH, alcanzando ésta hormona valores séricos de hasta 50 ng/ml y prolongándose dicho pico entre 24-40 horas, antes de retornar a niveles basales (Concannon y col, 1977; Wildt y col, 1979).

La presencia de una onda de LH alargada, con una duración de 48-96 horas (Concannon, 1977, Olson, 1982), ya en la primera mitad del estro, provoca la dehiscencia del folículo y por consiguiente la ovulación espontánea de ovocitos inmaduros (Concannon y col, 1977), los cuales requerirán 2-3 días para madurar a

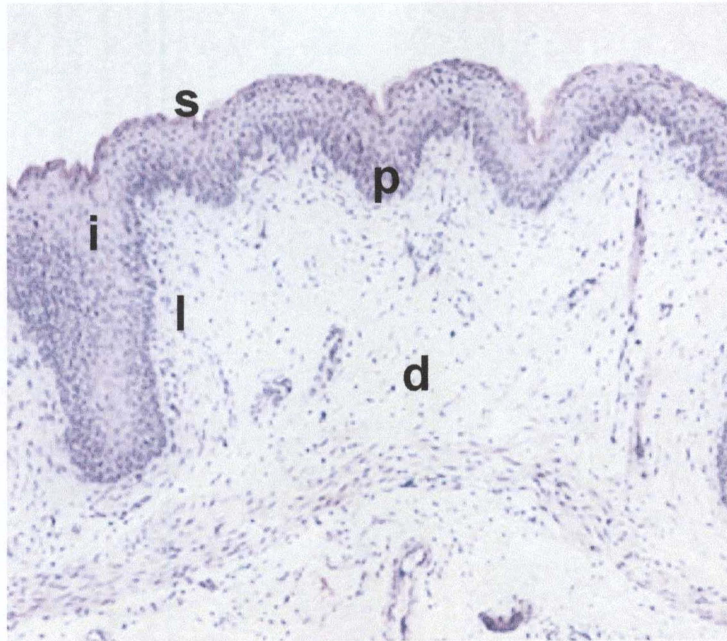
ovocitos secundarios a nivel del oviducto para poder ser fertilizados. Por otra parte, la secreción de progesterona se inicia antes de las ovulaciones que ocurren luego del pico de LH estral. Este hecho se debe a la luteinización de algunas células foliculares en la parte final del crecimiento folicular, que producen progesterona antes de la ovulación (Concannon y col, 1975). La concentración sérica de progesterona en el día del pico de LH, aproximadamente dos días antes de la ovulación es de 2,0-2,9 ng/ml (Concannon y col, 1975; Concannon y Hansel, 1977; Johnston y Root, 1995). En el día de la ovulación, la concentración de progesterona alcanza valores de 4 a 10 ng/ml (Wildt y col, 1979; Johnston y Root, 1995), pasando luego a valores altos de 15-80 ng/ml entre los días 12 y 30 a partir del estro (Concannon y col, 1975). El descenso de la concentración sérica de estrógenos y el aumento de la concentración sérica de progesterona marcan el inicio del comportamiento de estro en las perras (Concannon y Hansel, 1977; Wildt y col, 1979).

En lo que respecta al diestro, los niveles de progesterona llegan a valores de entre 15-90 ng/ml durante el primer mes, alcanzando su máximo durante las 2-3 primeras semanas, manteniéndose en forma de meseta por 1-2 semanas más y por último declinando con lentitud hasta volver a niveles basales alrededor de 70-90 días después del pico de LH (Concannon y col, 2000). La concentración de progesterona se reduce paulatinamente conforme transcurre la segunda parte de la fase lútea, ya que en la especie canina no existe un mecanismo luteolítico agudo como el ejercido por la prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  de origen uterino (Niswender y Nett, 1994), encargada de la destrucción del cuerpo lúteo en otras especies (Okkens y col, 1985). El nivel de LH, en términos generales, se mantiene bajo, aproximadamente entre 1.5 y 1,7 ng/ml durante la fase lútea (Onclin y col, 2002). En lo que respecta a otras hormonas, la concentración sérica de FSH durante el diestro, se mantiene entre 3 a 6 ng/ml y la concentración sanguínea de prolactina se incrementa conforme transcurre el diestro, de forma tal que en la segunda etapa del diestro, esta estará más elevada que en la primera etapa, manteniendo de esta manera la producción de progesterona (Okkens y col, 1990). Günzel-Apel y col. (2006), estudiaron que en algunas razas de perras, especialmente el Pastor Alemán, se ha observado deficiencia lútea, la cual se manifiesta por la presencia de ciclos cortos de 4 meses de duración, caracterizados por menores concentraciones de progesterona, tanto en el período dependiente de las gonadotropinas como en el período dependiente de la prolactina.

Entrada la etapa del anestro, la secreción pulsátil de LH ocurre esporádicamente, la FSH tiende a aumentar, mientras que la progesterona disminuye hasta niveles basales (Jeffcoate, 1993). Existen estudios que avalan la idea de que la FSH sería la hormona crítica para el inicio de la folículo-genesis ovárica y la terminación del anestro (Kooistra y col, 1998).

#### **4.3. ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA VAGINA**

La vagina o colpos (del griego *kolpos*, regazo) es el órgano femenino de la copulación y la parte inferior del canal del parto (Finn Geneser, 2006). Dicho órgano es un tubo muscular que se extiende desde el cuello hasta el vestíbulo, por cuya superficie se extienden pliegues mucoso-submucosos planos y longitudinales (Dellman, 1994). La pared vaginal consta de tres túnicas: una túnica mucosa-submucosa, una túnica muscular y la túnica adventicia o serosa (Imagen 1).



**Imagen 1:** Corte histológico de la vagina de la rata en donde se hayan señalados los compartimientos histológicos que componen las diferentes tunicas. s= epitelio superficial i= epitelio intermedio; p= epitelio profundo; l= conjuntivo laxo; d= conjuntivo denso. Modificado de Luo y col, 1998.

La primera túnica, consta a su vez de dos capas; la mucosa y submucosa vaginal. La mucosa se caracteriza fundamentalmente por presentar un epitelio escamoso estratificado que incrementa o disminuye en su espesor dependiendo de la etapa del ciclo estral en la cual se encuentre (Dellman, 1994). Dentro del epitelio vaginal, se describen tres zonas: la zona profunda corresponde a la capa basal y se compone de células cúbicas cilíndricas con grandes núcleos redondos y citoplasma basófilo; la zona intermedia se compone de células aplanadas naviculares, con núcleos redondos y a menudo retraídos, mostrando su citoplasma basofilia moderada, con abundantes gránulos de glucógeno; y por último, la zona externa se compone de varias capas de células muy aplanadas con pequeños núcleos picnóticos y citoplasma eosinófilo. Las células del epitelio superficial vaginal se desprenden constantemente durante el ciclo, pero esta descamación es más fuerte durante la fase luteal tardía (Bloom-Fawcett, 1988). En la submucosa encontramos una lámina propia, compuesta por una fina capa de tejido conectivo laxo celular, subepitelial. Las células en esta capa son, en su mayor parte, leucocitos, en especial, linfocitos.

En la parte profunda, la capa de tejido conectivo se transforma en una capa con fibras más gruesas y vasos más grandes, lo que denominamos tejido conjuntivo denso, en la cual las células características son principalmente los fibroblastos.

La segunda túnica es la muscular, la cual se compone de una capa circular interna y una capa longitudinal externa de musculatura lisa, de las cuales la externa se caracteriza por ser mucho más gruesa (Finn Geneser, 2006).

Por último, la túnica adventicia o túnica serosa, consta de tejido conjuntivo laxo con gran cantidad de vasos sanguíneos y nervios. Esta misma túnica presenta una delgada capa muscular externa constituida por músculo liso, llamada serosa muscular (Dellman, 1994).



#### **4.4. EFECTOS DE LAS HORMONAS SEXUALES FEMENINAS SOBRE LA HISTOFISIOLOGÍA VAGINAL**

En los mamíferos, el epitelio vaginal posee la característica de ser capaz de experimentar ciertos cambios morfológicos a lo largo de las distintas etapas del ciclo estral, los cuales han sido vinculados desde hace mucho tiempo a las influencias de los estrógenos y la progesterona. En todo el organismo, varias áreas tanto externas (piel), como internas (mucosa oral, esofágica o vaginal), están recubiertas por un epitelio escamoso estratificado que se renueva permanentemente. Durante dicha renovación, las células basales se dividen dando origen a nuevas células hijas que ascienden en el espesor del epitelio, se diferencian y finalmente se descaman al arribar a la superficie. A lo largo de su migración, y dependiendo del tipo de tejido que se trate, las células pueden experimentar tanto un fenómeno de queratinización como de mucificación (Mercer, 1961; Billingham y Silvers, 1963; Matoltsy y Parakkal, 1967). El epitelio de la vagina es considerado singular debido a que a lo largo del ciclo estral se alterna regularmente entre períodos de queratinización y períodos de mucificación (Burgos y Wislocki, 1958; Billingham y Silvers, 1963).

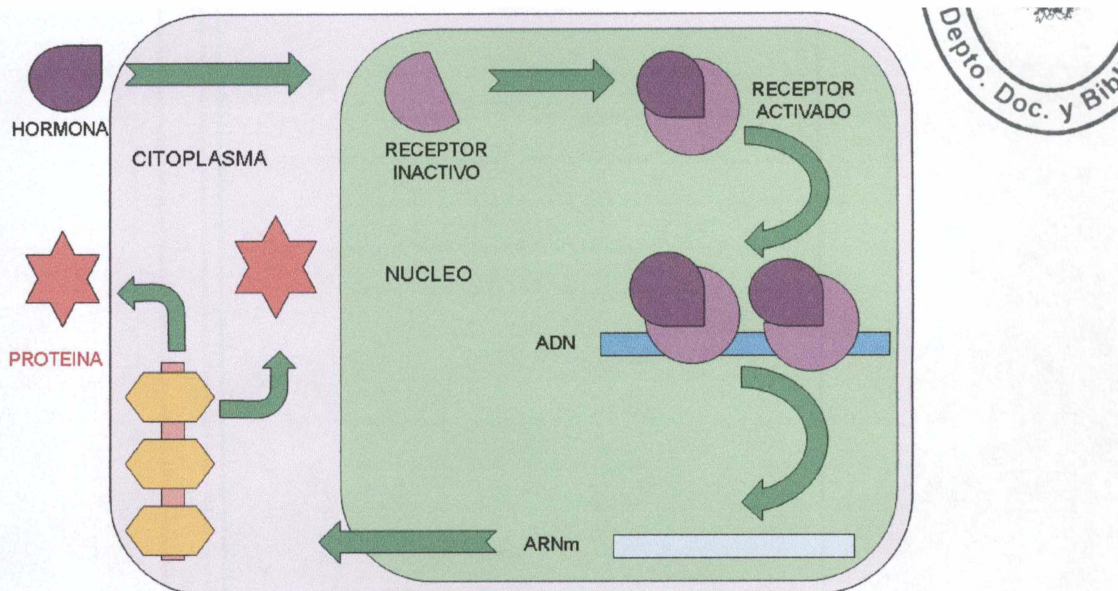
Desde hace larga data, varios estudios han demostrado la alternancia de patrones de queratinización y mucificación durante las fases folicular y luteal del ciclo estral en la vagina, tanto de ratas (Long y Evans, 1922), como de primates (Hartman, 1932). A su vez, algunos investigadores tempranamente lograron reproducir estos mismos estados del epitelio vaginal en animales ovariectomizados por medio de la administración de estradiol (Barker y Walker, 1966; Eddy y Walker, 1969; Forsberg, 1973), progesterona (Parakkal, 1973), o la combinación de estradiol y progesterona (Parakkal y Gregoire, 1972; Parakkal, 1973). En términos generales, los estrógenos poseen la habilidad de iniciar la división celular, producir la proliferación epitelial y eventualmente su queratinización (Biggers y Claringbold, 1955; Barker y Walker, 1966), en tanto que los tratamientos con progesterona típicamente producen la aparición de gotitas de mucus en las superficies celulares, y la reducción de los espacios intercelulares (Holderegger, 1980). Durante aquellas etapas de ciclo estral en las que los niveles plasmáticos de estrógenos se encuentran más elevados (fase folicular), el epitelio vaginal prolifera, las células experimentan su queratinización, y se descaman (Kroneneberg y Clark, 1985). La queratinización de las células epiteliales de la vagina es un proceso que implica la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como queratinas. En la rata, se ha demostrado que la síntesis de estas proteínas y por lo tanto la queratinización de las células epiteliales vaginales puede ser inducida en hembras ovariectomizadas a través de la administración de estrógenos (Kroneneberg y Clark, 1985). Los estrógenos provocan un aumento en el número de filamentos citoplasmáticos en las células basales y en las recién formadas células del estrato espinoso, al tiempo que inducen la mucificación de aquellas células superficiales ya presentes. Posteriormente, las células derivadas del estrato basal bajo las influencias de los estrógenos experimentan su queratinización (Eddy y Walker, 1969). Por otra parte, en aquellas etapas del ciclo estral en las cuales la progesterona se encuentra en sus niveles máximos (fase luteal), el epitelio vaginal se caracteriza por encontrarse en estado de mucificación (Parakkal y Gregoire, 1972). La progesterona provoca el aumento en altura y la mucificación de las células más superficiales del epitelio vaginal. También estimula la infiltración de leucocitos en el epitelio, sin producir efecto alguno (ni mucificación ni queratinización) sobre otros tipos celulares (Eddy y Walker, 1969).

## 4.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SEXUALES

Al igual que en el resto de los órganos del aparato reproductor femenino, en la vagina, los efectos de los estrógenos y de la progesterona, se suscitan sobre los diferentes tipos celulares a través de la acción de las hormonas sobre sus receptores específicos, receptor de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) respectivamente. Existen dos subtipos de receptores de estrógenos, cada uno producto de genes diferentes. El RE $\alpha$  es el subtipo clásicamente descrito y predominante en el tracto reproductivo (Meikle y col, 2004). El RE $\beta$  fue descubierto en la rata y es el subtipo predominante en el ovario (Kuiper y col, 1996). Se puede asumir que ambos subtipos de RE tienen el mismo mecanismo de acción. En cuanto al RP, se han caracterizado dos isoformas en el pollo (Kuhn y col, 1977) y en la rata (Ilenchuk y Walters, 1987). Las isoformas encontradas son denominadas RP-B y RP-A (Krauss y col., 1993). Ambas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por diferentes promotores (ARN mensajeros).

Los receptores de estrógenos y progesterona forman parte de la familia de receptores hormonales de ubicación nuclear. Se trata de proteínas, que desde el punto de vista biológico se definen como factores de transcripción ligando dependientes. Estas proteínas poseen dominios específicos de unión a las hormonas y de unión al ADN que interactúan con secuencias específicas de ADN, los llamados elementos de respuesta a esteroides (ERE) (Tsai y O'Malley, 1994). Como se esquematiza en la Figura 2, los receptores esteroideos, en ausencia de sus ligandos, se encuentran en el núcleo, en un complejo inactivo unidos a proteínas de choque térmico. Dada la naturaleza lipídica de las hormonas esteroideas, las mismas ingresan fácilmente a las células blanco, atravesando las membranas celulares por difusión, y alcanzando a sus receptores específicos a nivel nuclear. Al ingresar a la célula, las hormonas esteroideas interactúan con sus receptores específicos, induciendo la disociación de los mismos de las proteínas de choque térmico (Shupnik, 1997). Al unirse a sus ligandos, los receptores esteroideos se activan, y además de disociarse de las proteínas de choque, sufren ciertos cambios conformacionales, que incluyen la dimerización y les permiten unirse a los ERE en el ADN celular. Se ha propuesto que la fosforilación sería el mecanismo regulador de la unión del receptor al ADN (Orti y col, 1992). La unión del complejo hormona-receptor activado al ADN celular conduce a la activación de genes, estimulando su transcripción para producir ARNs mensajeros, que son traducidos en los ribosomas citoplásmicos a proteínas. En muchos casos la interacción del receptor con los genes puede ser represiva. Una vez que el complejo hormona-receptor interactuó con un gen, el receptor puede ser reciclado o degradado (Clark y Mani, 1994). Se ha descrito que esta acción del receptor nuclear como factor de transcripción (acción genómica) también puede ser causada en ausencia del ligando, por otras moléculas, por ejemplo, factores de crecimiento o neurotransmisores capaces de activar los receptores (Auger, 2001; Flint y col, 2002)

El mecanismo anteriormente descrito (acción genómica) era considerado como la vía de acción exclusiva de las hormonas esteroideas sobre sus receptores. Más tarde, se aceptó que las hormonas esteroideas pueden ejercer acciones de tipo no genómicas (Moss y col, 1997), caracterizadas por la unión de las hormonas esteroideas a receptores ubicados en la membrana celular y desencadenamiento de cascadas de segundos mensajeros (Revelli y col, 1998; Dunlap y Stormshak, 2004; Nadal y col, 2004; Ashley y col, 2006). Las acciones no genómicas son rápidas, inmediatas, mientras que las acciones genómicas tardan minutos, horas o días.



**Figura 2:** Representación esquemática del mecanismo de acción esteroidea en las células blanco. Por explicación de la figura, ver texto.

#### 4.6. RECEPTORES ESTEROIDEOS SEXUALES EN EL TRACTO REPRODUCTIVO FEMENINO

La importancia de la presencia de los receptores de estrógenos y progesterona en los tejidos que componen el tracto genital femenino es indiscutible. Muchos de los cambios que acontecen en los órganos reproductivos de una hembra a medida que transcurre el desarrollo de su aparato genital, y a medida que atraviesa las distintas fases del ciclo estral durante toda su vida reproductiva, están influidos por la presencia de estos receptores hormonales (Greco y col, 1993; Gorski y Hou, 1995; Robinson y col, 2001; Meikle y col, 2004). Varios investigadores se han concentrado en determinar la presencia de estos receptores en distintos órganos del aparato reproductor femenino, en diferentes especies y a lo largo de distintas etapas del desarrollo.

En la oveja adulta la inmunopositividad al  $RE\alpha$  fue alta en todas las células del endometrio al inicio del ciclo estral. Entre los días 1 y 6 del ciclo, la misma decreció tanto en el endometrio como en el miometrio (Spencer y Bazer, 1995). Luego del día 11, las células epiteliales endometriales mostraron inmunopositividades casi indetectables, a la vez que aparecieron escasas células del estroma positivas al  $RE\alpha$ . A partir del día 13 la positividad al  $RE\alpha$  aumentó nuevamente en las células del epitelio endometrial (Spencer y Bazer, 1995). En cuanto al RP, la inmunopositividad en el epitelio luminal y las glándulas superficiales uterinas fue mayor hacia la fase luteal temprana, durante los primeros dos días del ciclo, al tiempo que la inmunopositividad en las glándulas endometriales profundas se desarrolló más tardíamente (Wathes y Hamon, 1993).

En general se acepta que los estrógenos estimulan la expresión del RE $\alpha$  y RP (Koligian y Stormshak, 1977), a la vez que la progesterona inhibe las concentraciones de RE (Evans y Leavitt, 1980), y también las de su propio receptor (Batra y losif, 1989; Clarke, 1990). En la rata adulta, las concentraciones uterinas de RE fluctúan de manera cíclica a lo largo de las distintas etapas del ciclo estral (Lee y Jacobson, 1971). En ratas adultas ovariectomizadas sometidas a diferentes tratamientos hormonales, se demostró que la expresión del RE $\alpha$  a nivel uterino es dosis dependiente de los estrógenos y/o de la co-administración de progesterona. Solamente cuando los animales recibieron altas dosis de estrógenos, o solo progesterona, se constató una regulación a la baja en los niveles de RE $\alpha$  a nivel proteico y del ARNm (Varayoud y col, 2005).

En lo que respecta a la perra adulta, existen varios trabajos que describen la presencia de los RE $\alpha$  y RP a nivel uterino, y los cambios en su expresión a lo largo de las distintas fases del ciclo estral. Algunos autores afirman que ambos receptores (RE $\alpha$  y RP) son más elevados en el estro en relación con el diestro (Dhaliwal y col, 1997), y que a su vez ambos receptores resultan considerablemente mas bajos al alcanzar la mitad de la fase luteal (Donnay y col, 1995). La inmunopositividad al RP en el útero de perras adultas se correlacionó positivamente con los niveles circulantes de 17  $\beta$  estradiol, y negativamente con los niveles de progesterona (Vermeirsch y col, 2000). A su vez, también se ha descrito la existencia de una correlación negativa entre la inmunopositividad al RE $\alpha$  en los cuernos uterinos de perras y los niveles séricos de progesterona. Los niveles de RE $\alpha$  uterinos cayeron desde su máxima expresión en el proestro, progresivamente hacia el estro, hasta alcanzar valores mínimos durante el metaestro (Vermerisch y col, 1999). Por otra parte, Fernández y col. (1989) y Johnston y col. (1985), describen un comportamiento levemente distinto en lo que respecta a la expresión de los RE $\alpha$  y RP uterinos a lo largo del ciclo estral canino, en donde se destaca la permanencia de altos niveles de RE $\alpha$  y RP uterinos aún durante los primeros días del diestro. La concentración del RE $\alpha$  en el endometrio de perras adultas se mantuvo elevada hasta el décimo día de la fase luteal, se redujo al alcanzar el día 20 del diestro, y fue significativamente más baja a los días 30 y 40 del diestro. Luego del día 40 de diestro, cuando las concentraciones séricas de progesterona alcanzaron niveles basales, la concentración endometrial de RE $\alpha$  aumentó y se mantuvo significativamente elevada desde el día 60 hasta el día 80 de diestro (Fernández y col, 1989). En perras adultas las concentraciones uterinas de RE $\alpha$  aumentaron desde el anestro hasta alcanzar un máximo al doceavo día de identificado el estro, y luego decayeron hasta concentraciones mínimas 28 días después del inicio del estro. Las concentraciones uterinas del RP aumentaron desde el anestro hasta un máximo en el día 3 de proestro, y luego bajaron gradualmente hasta el día 28 a partir de iniciado el estro (Johnston y col, 1985). Según, Fernández y col. (1989), las concentraciones uterinas de RP se mantuvieron elevadas desde el proestro hasta el segundo día del diestro, para luego decrecer y mantenerse bajas hasta el día 40, y finalmente volver a aumentar constantemente desde el día 50 hasta el día 80 del diestro.

Respecto a la localización diferencial de los RE $\alpha$  y RP en los distintos tipos celulares uterinos la expresión del RE $\alpha$  fue de positiva a moderada en el estroma y epitelio glandular endometrial, y marcada en el epitelio superficial y estroma del oviducto, en perras ciclando, en tanto que en anestro la inmunopositividad al RE $\alpha$  fue leve o negativa en los mismos tejidos (Vasconcellos y col, 2008). A su vez, Vermeirsch y col. (2000) sugieren la existencia de un tipo de regulación diferencial según los tipos tisulares uterinos, e incluso distinto entre diferentes áreas del epitelio uterino, vinculando esto con

un posible rol del estroma como mediador de los efectos de las hormonas esteroideas sobre las células epiteliales del tracto reproductivo de la hembra canina. De manera similar a lo que ocurre con los receptores de progesterona uterinos (Vermeirsch y col, 2000), los niveles de RE $\alpha$  en el estroma uterino fluctúan de manera pronunciada a lo largo del ciclo estral canino, sugiriendo la importancia del rol del estroma como posible mediador de efectos estrogénicos a lo largo del ciclo estral de la perra (Vermeirsch y col, 1999).

Los trabajos de receptores esteroideos sexuales en vagina de diferentes especies son menos abundantes. En los tejidos vaginales de ovejas adultas ciclando, el porcentaje total de células inmunopositivas al RP fue mayor al día 1 del ciclo estral, intermedio al día 6 y menor al día 13, a la vez que para el RE $\alpha$  la inmunopositividad fue mayor en el día 1 en comparación con los días 6 y 13. La expresión del RE $\alpha$  y RP en estos animales mostró una regulación de tipo tisular con sensibilidades diferentes a los estrógenos y progesterona en el epitelio y el estroma vaginal (Acuña y col, 2007).

En tejidos vaginales de perras, hemos encontrado dos artículos científicos. En perras adultas en distintas fases del ciclo estral se encontraron células positivas al RE $\alpha$  y al RP en el epitelio superficial, el estroma y el músculo liso que integra la vagina (Vermeirsch y col, 2002). Tanto para el RE $\alpha$  como para el RP, la intensidad de expresión del receptor resultó más elevada en las células pertenecientes al estroma que en las células epiteliales (Vermeirsch y col, 2002). Tanto en los tejidos vaginales, como en la vulva, no se detectaron cambios cíclicos significativos en la inmunopositividad a los RE $\alpha$  ni RP (Vermeirsch y col, 2002). Las concentraciones séricas de progesterona no se asociaron con las inmunopositividades a los RE $\alpha$  y RP en todos los tipos celulares vaginales y vulvares. Sin embargo, se sugirieron correlaciones positivas entre la concentración de 17  $\beta$  estradiol y la inmunopositividad al RP en los tejidos vaginales de perras, a la vez que se encontraron correlaciones negativas entre los niveles de esta misma hormona y sus propios receptores vaginales (Vermeirsch y col, 2002). Por otra parte, Prado de Brito y col. (2006) determinaron RE $\alpha$  por inmunohistoquímica en vaginas de perras y describieron un efecto estimulador de los estrógenos e inhibitorio de la progesterona en relación a la RE $\alpha$ ; similar a lo reportado para otros órganos reproductivos de la perra (De Cock y col, 1997; Dhaliwal y col, 1997). Durante el proestro, con concentraciones altas de 17  $\beta$  estradiol, la expresión del RE $\alpha$  fue elevada; y a pesar de una disminución del 17  $\beta$  estradiol la expresión del RE $\alpha$  se mantiene invariable, disminuyendo durante el diestro, cuando las concentraciones de progesterona son altas (Prado de Brito y col, 2006). Este estudio difiere con el de Vermeirsch y col (2002), en donde no se encontraron diferencias en la expresión del RE $\alpha$  y RP en vagina durante las etapas del ciclo estral.

La limitante metodológica de ambos trabajos citados fue que las muestras vaginales provenían de perras eutanasiadas, donde se asignaron las diferentes muestras a las fases del ciclo estral acorde a los hallazgos de estructuras ováricas y/o concentraciones de las hormonas sexuales. No hemos encontrado un estudio en el cual se realizaran determinaciones seriadas en el mismo animal, que se puedan luego asignar con precisión acorde a las propias curvas hormonales del ciclo estral y esto es de relevancia si se tiene en cuenta la importante variación de la duración de las fases del ciclo estral en caninos. Por lo tanto, la finalidad de la presente tesis fue caracterizar la distribución de los RE $\alpha$  y RP en los diferentes compartimientos histológicos vaginales de perras adultas a lo largo del proestro, estro, y diestro y asociarlos a los niveles séricos de progesterona.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVOS GENERALES**

Contribuir al conocimiento respecto la expresión de los receptores esteroideos sexuales en diferentes tipos celulares de vagina en perras.

### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

5.2.1. Determinar la localización de los receptores de estrógenos ( $RE\alpha$ ) y de progesterona (RP) en el epitelio superficial, intermedio y profundo, y en el tejido conjuntivo laxo y denso de la vagina en perras en proestro, estro y período post ovulatorio.

5.2.2. Determinar los niveles séricos de progesterona en perras en proestro, estro y período post ovulatorio

5.2.3. Asociar los niveles séricos de progesterona, con la inmunopositividad a los  $RE\alpha$  y RP en los compartimientos histológicos vaginales estudiados.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para este estudio se utilizaron 4 perras adultas (tres Ovejeras Alemanes y una Blood Hound) pertenecientes al Cuerpo y Plantel de perros de la Policía, cuyas edades y pesos varían entre 3 y 8 años y de 28 a 37 Kg. respectivamente. El uso de los animales y el diseño experimental fueron aprobados por las autoridades del Servicio Veterinario de Coraceros y por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Todos los animales seleccionados para el ensayo experimental vivían en las mismas condiciones, consumían la misma cantidad y tipo de ración y estaban sujetos a la misma rutina de trabajo.

### **6.1 ENSAYO EXPERIMENTAL.**

Para la determinación de los niveles séricos de progesterona se tomaron muestras de sangre de cada una de las perras de forma seriada cada 48 hs comenzando los muestreos luego de constatado el sangrado transvaginal, que marca el inicio clínico del proestro, hasta obtener un total de 8 muestras por animal. Se extrajeron asépticamente 2 ml de sangre de la vena cefálica en un tubo sin anticoagulante. A continuación se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, y el suero obtenido se almacenó a  $-20^{\circ}C$  hasta la determinación de las concentraciones de progesterona.

Paralelamente a la extracción de sangre y su procesamiento, se obtuvieron biopsias vaginales seriadas con pinza de biopsia cada 48 hs para la determinación inmunohistoquímica de los  $RE\alpha$  y RP. Al igual que para las muestras sanguíneas, los muestreos comenzaron una vez constatado el sangrado transvaginal, extendiéndose hasta haber alcanzado un total de 8 biopsias por perra.

## 6.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE PROGESTERONA

El método empleado para la determinación de la concentración de progesterona, fue el radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida, utilizando un kit comercial (Coat-A-Count, DPC, Siemens, CA, USA). En este kit la progesterona marcada con Iodo 125 ( $I^{125}$ ) compete por un tiempo fijo con la progesterona de la muestra del paciente por sitios de unión al anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno (tubos recubiertos con anticuerpos de ratón anti-progesterona), la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar con la competencia y separar la fracción unida al anticuerpo de la progesterona marcada con  $I^{125}$ . La sensibilidad del ensayo fue de 0.01 ng/mL y el CV de variación para controles bajos (0.7 ng/mL), medios (2 ng/mL) y altos (9 ng/mL) fue de 6.4%, 3.6 % y 4.1 % respectivamente.

## 6.3. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ( $RE\alpha$ ) Y DE PROGESTERONA (RP)

Las muestras de vagina obtenidas por biopsias se fijaron en paraformaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina. Secciones de 5  $\mu$ m de espesor se cortaron a partir de los bloques de parafina, se colocaron en buffer citrato (pH = 6,0) y se sometieron a microondas a máximo poder (700W) por un tiempo de 10 minutos con el fin de lograr la exposición de los antígenos tisulares. Para realizar el bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, los cortes se sometieron a peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol por 10 minutos, a temperatura ambiente. Las uniones no específicas se determinaron exponiendo las secciones a suero normal de caballo (Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA) en PBS por 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Para la detección inmunohistoquímica de los  $RE\alpha$  y RP, los cortes se trataron con anticuerpos monoclonales, ER C-311, cat sc-787 (Santa Cruz, California, USA), y RP Zymed cat Z518-0172 (South San Francisco, CA; USA), anti  $RE\alpha$  y RP respectivamente. Se utilizaron diluciones de 1:25 para el anticuerpo anti RE, y de 1:100 para el anticuerpo anti RP. Los controles negativos se realizaron al remplazar los anticuerpos primarios por suero no inmune a concentraciones similares. Luego de la incubación con los anticuerpos primarios, los cortes se sometieron a un anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de ratón (Vectastain, Vector Laboratories) diluido 1:200 en suero normal equino, y al complejo avidin-biotin-peroxidasa (Vectastain Elite; Vector Laboratories). Finalmente, el sitio de unión al antígeno tisular ( $RE\alpha$  y RP) se determina por la aplicación del sustrato 3,3'-diaminobenzidina en peróxido de hidrógeno (DAB kit; Vector Laboratories), un cromógeno que produce un precipitado marrón insoluble al reaccionar con la enzima peroxidasa.

Luego de finalizada la corrida inmunohistoquímica, los cortes fueron teñidos con hematoxilina, y deshidratados, antes de montarse con Pertex (Histolab, Gothenburg, Sweden).

Se describió por lo tanto la presencia de los receptores en los siguientes compartimientos histológicos: epitelio vaginal superficial, epitelio vaginal intermedio, epitelio vaginal profundo, tejido conjuntivo laxo vaginal y tejido conjuntivo denso vaginal.

La inmunopositividad en los distintos compartimientos histológicos vaginales fue evaluada subjetivamente en 10 campos por dos observadores independientes. El inmunomarcado fue clasificado según la intensidad de tinción en una escala de (-) ausente, (+) leve, (++) moderado, e (++++) intenso. Para cada uno de los compartimientos histológicos estudiados en el análisis inmunohistoquímico, se calculó un índice de inmunopositividad según la siguiente ecuación:  $1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3$ , donde n representa el porcentaje de células en el total de los campos que exhiben tinción leve (1), moderada (2) e intensa (3) (Boos y col, 1996). Fue registrada la proporción total de células positivas por campo, es decir el área de tinción.

#### **6.4. DEFINICIÓN DE LAS FASES DEL CICLO**

Para definir las diferentes etapas del ciclo en función de los valores séricos de P4, se establecieron dos puntos de corte. Se consideró 1 ng/ml de P4 sérica como el límite para el inicio del estro, y 10 ng/ml de P4 sérica como valor indicativo de la ovulación (Wildt y col, 1979; Concannon, 1986; Concannon y col, 1989; Johnston y Root, 1995; Concannon, 2011). En función de esto, se consideró como día 0 a aquellos valores de P4 iguales o muy cercanos a 1 ng/ml, correspondiéndose el resto de los días con los sucesivos muestreos realizados cada 48 horas (días -2, 2, 4, 6, 8, 10 y 12).

Por lo tanto, se agruparon las muestras en cuatro grandes fases. La fase 1 (proestro) incluyó aquellas muestras de sangre con valores séricos de P4 menores a 1 ng/ml (días de muestreo menores a -2). Las fases 2 y 3 incluyeron las muestras cuyos valores de P4 séricos oscilaron entre 1 y 10 ng/ml (muestras 0, 2 y 4), correspondiéndose estas con el estro. Dada la gran variabilidad en cuanto a la concentración de P4 sérica dentro de esta etapa, se subdividió al estro en dos fases, fase 2 y fase 3, correspondiéndose estas al estro temprano y estro tardío respectivamente. Por último la fase 4 representó al grupo de muestras cuyos valores de P4 séricos fueron mayores a 10 ng/ml (muestras 6, 8, 10 y 12), denominándose a esta etapa período post ovulatorio.

#### **6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las concentraciones de progesterona, la proporción del total de células positivas y la intensidad de tinción de los receptores para cada uno de los compartimientos histológicos estudiados se analizaron por el procedimiento mixto (PROC MIXED de SAS®, Statistical analysis system, SAS Institute inc., Cary, NC, USA, 2000). Para las variables inmunopositividad, y área de tinción del RE $\alpha$ , el modelo estadístico incluyó los efectos del observador, de la etapa del ciclo estral, del tejido estudiado e interacciones de éstos dos últimos efectos. La progesterona se analizó con un modelo que incluyó el efecto del día anidado en fase de ciclo estral. En los cuadros y las graficas se muestran las medias y los errores estándares. Se consideró significativo cuando  $P < 0.05$  y valores entre  $P > 0.05$  y  $P < 0.1$  se consideraron tendencia.



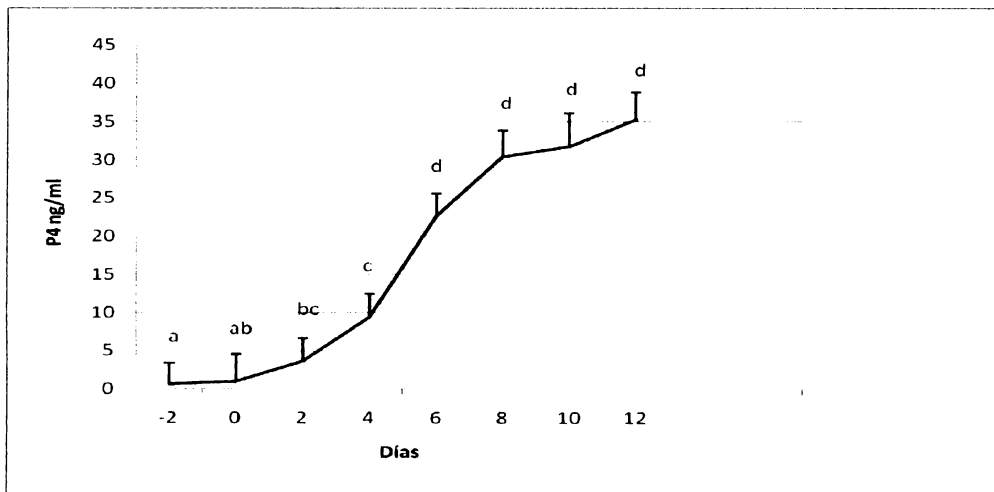
## 7. RESULTADOS

### 7.1. CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA

Las concentraciones medias de progesterona en los diferentes días se encuentran representadas en la Figura 3. El día -2 se correspondió con la fase 1 (valores de P4 menores a 1 ng/ml-proestro), los días 0, 2 y 4 con las fases 2 y 3 (P4 entre 1 y 10 ng/ml-estro), y a partir del día 6 en adelante se correspondieron con la fase 4 (P4 mayor a 10 ng/ml-período post ovulatorio). La concentración de P4 aumento significativamente desde el día -2 al día 2 ( $p < 0,05$ ). La concentración de progesterona continuó aumentando hasta el día 6 y no se encontraron diferencias con el resto de los días evaluados (8, 10 y 12).

Dada la gran variabilidad de la concentración de progesterona durante la etapa del estro, se dividió a dicha etapa arbitrariamente en dos fases; fase 2 y fase 3 (estro temprano y tardío respectivamente).

En lo que respecta a las fases, la concentración de P4 en la fase 1 fue menor a la fase 3 y 4 ( $p < 0,05$ ), al tiempo que la concentración de P4 en la fase 2 fue menor a la de la fase 4 ( $p < 0,05$ ). Los valores promedio de la Fase 1 a la 4 se detallan en el cuadro 1.



**Figura 3:** Concentraciones séricas de progesterona durante el experimento (0=estro). Valores acompañados de literales diferentes son distintos ( $p < 0,05$ ).

**Cuadro 1:** Concentraciones séricas de P4 en las diferentes fases del ciclo estudiadas.

Fases estudiadas	Concentración de P4 sérica (ng/ml)
1	0,6 ± 0,1 (a)
2	2,4 ± 0,7 (ab)
3	8,8 ± 1,9 (b)
4	28,6 ± 4,2 (c)

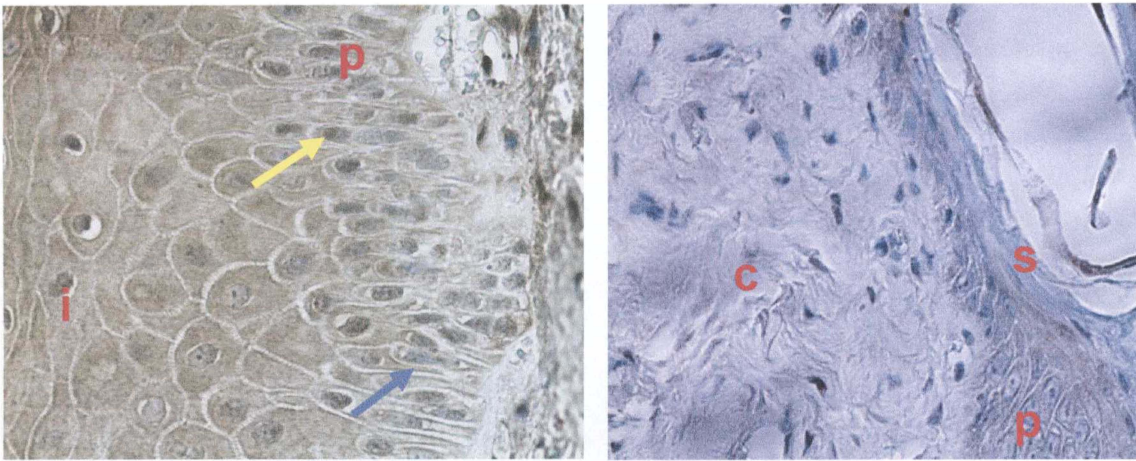
Concentración de P4 sérica (medias ± errores estándar de la media). Valores acompañados por literales distintos son diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 7.2. RECEPTORES ESTEROIDEOS

### 7.2.1 Observaciones generales

No se detectó la presencia de RP en ningún compartimiento histológico en las muestras analizadas.

La inmunopositividad al RE $\alpha$  fue observada exclusivamente a nivel nuclear en todos los compartimentos histológicos que fueron objeto de estudio en esta tesis (epitelios superficial, intermedio, y profundo y tejidos conjuntivos laxo y denso). Cuando el anticuerpo monoclonal fue sustituido por un anticuerpo inespecífico, la ausencia de tinción demostró la gran especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo (Imagen 2).



**Imagen 2:** Inmunolocalización del RE $\alpha$  en distintos compartimientos histológicos de la vagina canina. En la imagen de la izquierda se aprecia la ubicación nuclear del receptor en células positivas (flecha amarilla) y negativas (flecha azul). La imagen de la derecha se corresponde a un control negativo. i= célula del epitelio intermedio; p= célula del epitelio profundo; c= tejido conjuntivo; s= célula del epitelio superficial.

Para la variable índice de inmunopositividad al RE $\alpha$  se detectaron los efectos significativos de la fases del ciclo estral estudiadas ( $p=0,0010$ ), y del compartimiento histológico ( $p<0,0001$ ). Para esta misma variable no resultó significativo el efecto de la interacción fases estudiadas y compartimiento histológico ( $p=0,6020$ ), ni tampoco el efecto del evaluador ( $p=0,3073$ ).

En cuanto a la variable área de tinción del RE $\alpha$  se encontraron los efectos significativos de la fases del ciclo estral estudiadas ( $p=0.0030$ ) y del compartimiento histológico ( $p=0.0001$ ), no resultando significativos el efecto de la interacción fases estudiadas y compartimiento histológico ( $p=0.5673$ ), ni tampoco el efecto del evaluador ( $p=0.9431$ ).

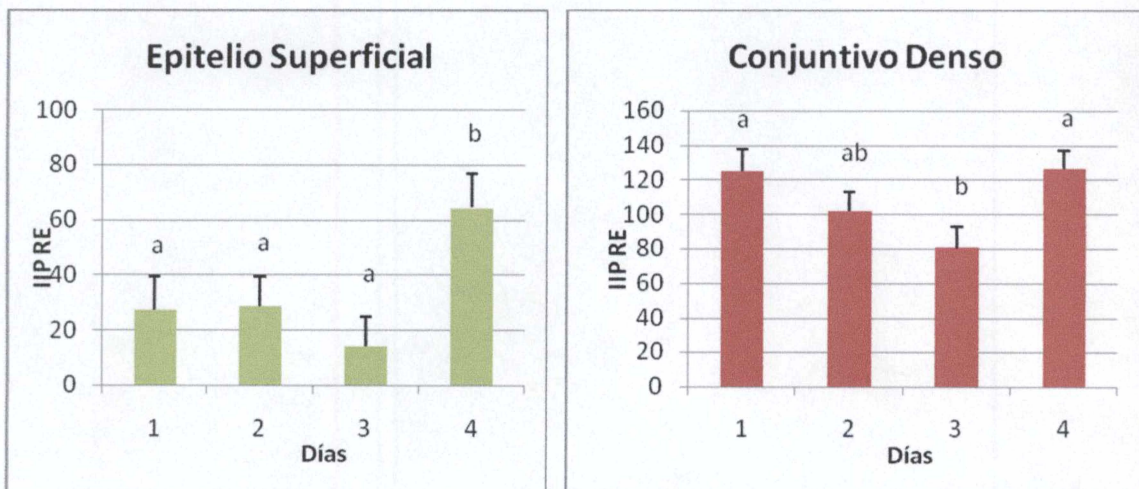
### **7.2.2 Diferencias según las fases del ciclo estral**

Para el caso del índice de inmunopositividad al RE $\alpha$ , solamente se detectaron diferencias entre fases del ciclo estudiadas para el epitelio superficial y tejido conjuntivo denso vaginal (Cuadro 2). La inmunopositividad a RE $\alpha$  en el epitelio superficial aumentó en la fase 4 respecto de las otras fases ( $P<0.05$ ) (Figura 4; Imagen 3), no habiendo diferencias entre ellas. El perfil de inmunopositividad a RE $\alpha$  fue diferente en el tejido conjuntivo denso, ya que disminuyó de la fase 1 a la fase 3 ( $P<0.05$ ) y la inmunopositividad se recuperó en la fase 4. ( $P<0.05$ ). No se encontraron diferencias entre las distintas fases del ciclo en los epitelios intermedio y profundo ni tampoco en el tejido conjuntivo laxo.

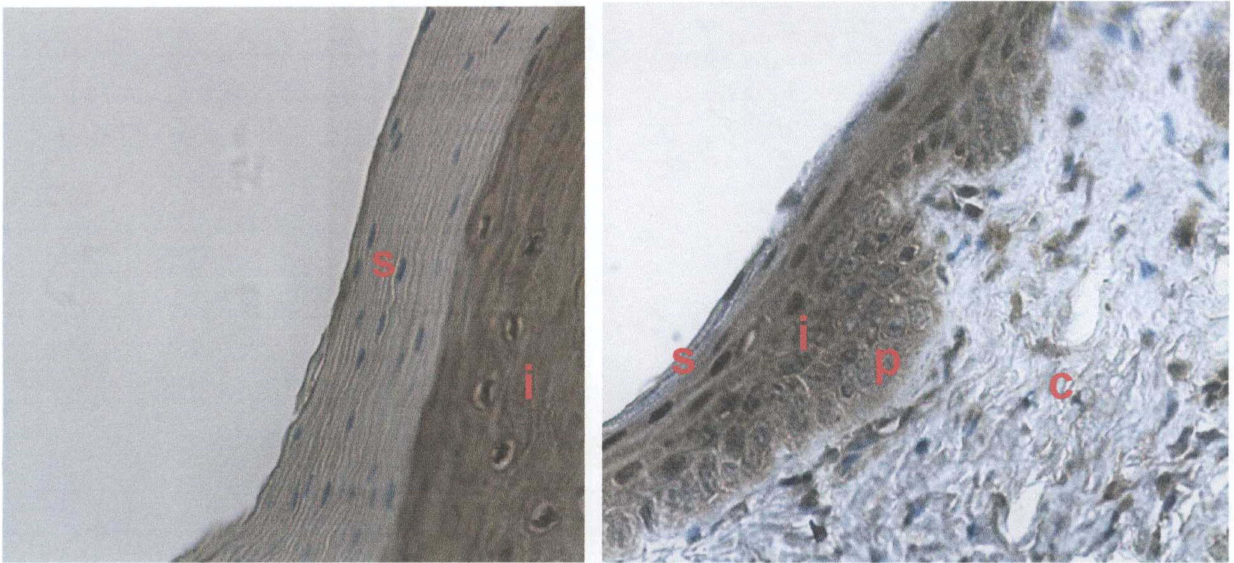
**Cuadro 2:** Índices de inmunopositividad (medias  $\pm$  errores estándar de la media) al RE $\alpha$  en los diferentes compartimientos histológicos durante las distintas fases del ciclo estudiadas.

Fases	Índice de inmunopositividad al RE $\alpha$				
	ES	EI	EP	CL	CD
1	27 $\pm$ 12 (a)	84 $\pm$ 12 (a)	94 $\pm$ 12 (a)	61 $\pm$ 12(a)	125 $\pm$ 12 (a)
2	29 $\pm$ 10 (a)	90 $\pm$ 11(a)	81 $\pm$ 11 (a)	72 $\pm$ 11 (a)	102 $\pm$ 11 (ab)
3	14 $\pm$ 10 (a)	99 $\pm$ 12 (a)	91,1 $\pm$ 12 (a)	64 $\pm$ 12 (a)	80 $\pm$ 12 (b)
4	65 $\pm$ 12 (b)	102 $\pm$ 12 (a)	111 $\pm$ 11 (a)	87 $\pm$ 11 (a)	126 $\pm$ 11 (a)

ES= epitelio superficial; EI= epitelio intermedio; EP= epitelio profundo; CL= conjuntivo laxo; CD= conjuntivo denso. Valores con diferentes literales dentro de la misma columna son significativamente diferentes,  $P < 0,05$ .



**Figura 4:** Índices de inmunopositividad al RE $\alpha$  (IIP RE) en los compartimientos histológicos epitelio superficial y conjuntivo denso durante las diferentes fases del ciclo estudiadas. Barras (medias  $\pm$  errores estándar de la media) con distintas letras son significativamente diferentes.



**Imagen 3:** Inmunolocalización del RE $\alpha$  en el epitelio superficial vaginal en las fases 1 (imagen de la izquierda) y 4 (imagen de la derecha) del ciclo. Además de la mayor inmunopositividad en las células superficiales del epitelio en la fase 4 en relación a la 1, se pueden observar también las diferencias en el espesor de este compartimiento entre las distintas fases. I= epitelio intermedio; p= epitelio profundo; c= tejido conjuntivo; s= epitelio superficial.

En cuanto al área de tinción del RE $\alpha$ , también se detectaron diferencias entre fases del ciclo estral para los compartimentos histológicos epitelio superficial y tejido conjuntivo denso de la vagina (Cuadro 3). En el tejido superficial se encontró menor área de tinción en las fases 1, 2 y 3 respecto a la 4 ( $p=0.0147$ ,  $p=0.0032$  y  $p=0.0005$  respectivamente). Para el caso del tejido conjuntivo denso solamente se encontraron diferencias entre las fases 3 y 4 ( $p=0.0345$ ), encontrándose mayor área positiva en la fase 4.

**Cuadro 3:** Área de tinción (medias  $\pm$  errores estándar de la media) para el RE $\alpha$  en los diferentes compartimientos histológicos durante las distintas fases del ciclo estudiadas.

Fases	Área de tinción del RE $\alpha$				
	ES	EI	EP	CL	CD
1	23.2 $\pm$ 7.5 (a)	68.9 $\pm$ 7.5 (a)	74.0 $\pm$ 7.5 (a)	58.1 $\pm$ 7,5(a)	78,1 $\pm$ 7,5 (ab)
2	19.5 $\pm$ 6.5 (a)	77,4 $\pm$ 6.5 (a)	71.9 $\pm$ 6.5 (a)	58.1 $\pm$ 6,5 (a)	74,6 $\pm$ 6,5 (ab)
3	13.8 $\pm$ 6.5 (a)	72.8 $\pm$ 7.5 (a)	71.5 $\pm$ 7.5 (a)	53.7 $\pm$ 7,5 (a)	60,2 $\pm$ 7,5 (a)
4	49.6 $\pm$ 7.5 (b)	73.6 $\pm$ 7.5 (a)	88.9 $\pm$ 6.5 (a)	62.8 $\pm$ 6.5 (a)	81,6 $\pm$ 6,5 (b)

ES= epitelio superficial; EI= epitelio intermedio; EP= epitelio profundo; CL= conjuntivo laxo; CD= conjuntivo denso. Valores con diferentes literales dentro de la misma columna son significativamente diferentes,  $P < 0,05$ .

### **7.2.3 Diferencias entre compartimientos histológicos**

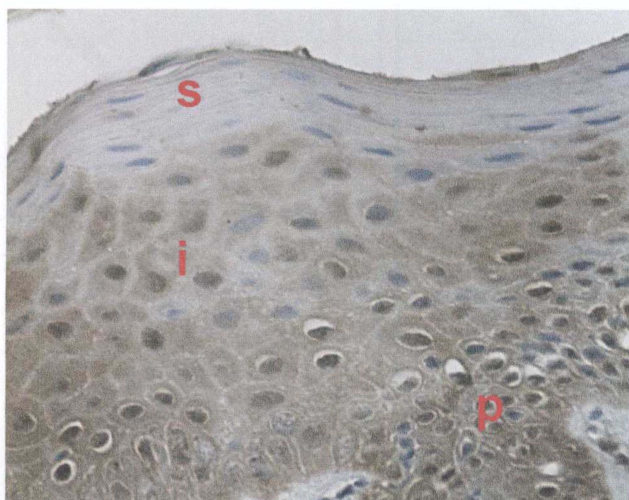
El índice de inmunopositividad y área de tinción para el RE $\alpha$  entre los diferentes compartimientos histológicos se muestran en el cuadro 4. La inmunopositividad al RE $\alpha$  fue más baja en el epitelio superficial vaginal respecto del resto de los compartimientos histológicos analizados (epitelios intermedio y profundo, y tejidos conjuntivos laxo y denso) ( $p < 0,0001$ ) (Imagen 4). A su vez, la inmunopositividad al RE $\alpha$  en el tejido conjuntivo laxo también resultó inferior a la del resto de los compartimientos histológicos analizados con la excepción del epitelio superficial ( $p < 0,05$ ), (Imagen 5).

La variable área de tinción se comportó de la misma manera que la variable inmunopositividad al RE $\alpha$ , siendo más baja en el tejido superficial vaginal en relación al resto de los compartimientos histológicos evaluados ( $p = 0.0001$ ), a la vez que resultó más baja en el tejido conjuntivo laxo en comparación al resto de los compartimientos histológicos, a excepción del epitelio superficial ( $p < 0.05$ ).

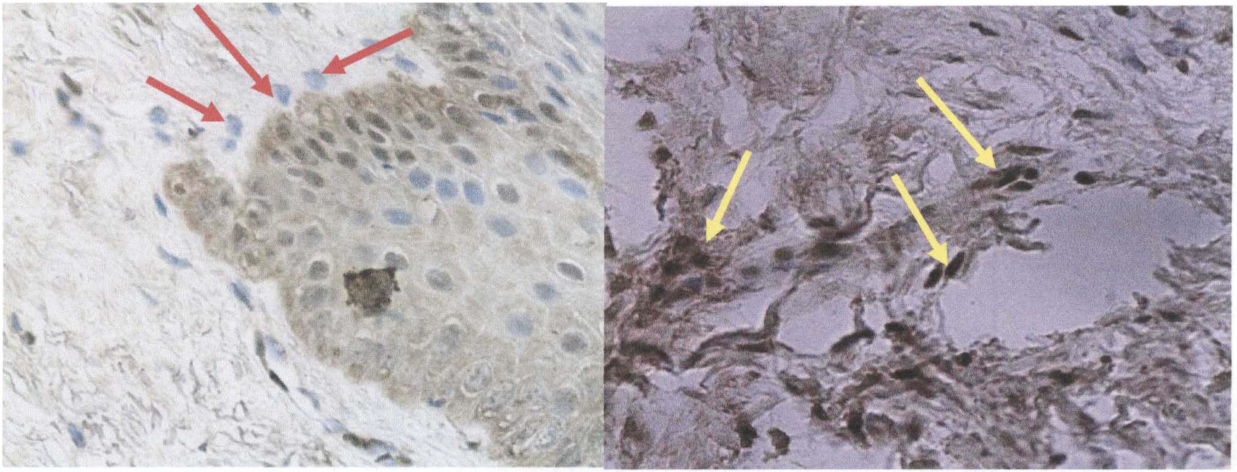
**Cuadro 4:** Índices de inmunopositividad y Área de tinción al RE $\alpha$  (medias  $\pm$  error estándar de la media) en los diferentes compartimientos histológicos. Los valores se presentan como medias  $\pm$  errores estándar de la media.

Compartimiento Histológico.	Índice de inmunopositividad al RE $\alpha$	Área de tinción del RE $\alpha$
Epitelio superficial	33,5 $\pm$ 5,8 (a)	26.5 $\pm$ 3,0 (a)
Epitelio intermedio	93.5 $\pm$ 6,0 (b)	73.1 $\pm$ 3,0 (b)
Epitelio profundo	94,3 $\pm$ 5,8 (b)	76.5 $\pm$ 3.5 (b)
Conjuntivo laxo	70,8 $\pm$ 5,8 (c)	58.1 $\pm$ 3,0 (c)
Conjuntivo denso	108,4 $\pm$ 5,8 (b)	73.6 $\pm$ 3.5 (b)

Valores con distintos literales dentro de la misma columna son significativamente diferentes, P < 0,05.



**Imagen 4:** Inmunolocalización del RE $\alpha$  en el epitelio vaginal. Las células pertenecientes al epitelio superficial aparecen marcadamente más negativas en relación a las células de los epitelios intermedio y profundo. s= epitelio superficial; I= epitelio intermedio; p= epitelio profundo.



**Imagen 5:** Inmunolocalización del RE $\alpha$  en diferentes compartimientos histológicos de la vagina de la perra. La imagen de la izquierda abarca células de los epitelios intermedio y profundo, y células del tejido conjuntivo laxo subyacente. En la imagen de la derecha se observan exclusivamente células pertenecientes al tejido conjuntivo denso vaginal. Nótese la diferencia en la inmunopositividad entre las células del tejido conjuntivo laxo (flechas rojas) y las del conjuntivo denso (flechas amarillas).



## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE PROGESTERONA**

Los niveles séricos de P4 variaron a lo largo de las distintas fases del ciclo estudiadas, resultando significativamente inferiores en la fase correspondiente al proestro, en relación al estro tardío y período post ovulatorio. A su vez ambas fases correspondientes al estro presentaron valores de P4 sérica significativamente inferiores a los encontrados en el período post ovulatorio. Los resultados en el presente trabajo, en general, son consistentes con reportes anteriores (Concannon y col, 1975; Fernandes y col, 1989; Vermeirsch y col, 2002). El uso de las concentraciones séricas de P4 para delimitar las diferentes fases del ciclo estudias se justifica dada la gran variabilidad en cuanto a la duración de cada una de las etapas del ciclo estral canino.

### **8.2 RECEPTORES SEXUALES DURANTE LAS FASES DEL CICLO ESTRAL**

No se detectó la presencia de RP en ningún compartimiento histológico en las muestras analizadas. Esta no detección del RP en vagina de perra puede deberse a que el anticuerpo utilizado no reconozca la proteína RP presente en la vagina canina. En el presente trabajo se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti- RP Bovino; sin embargo, otros autores que efectivamente detectaron RP en vagina de perra utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón y policlonales de conejo, con la diferencia de que ambos anticuerpos eran anti RP humano (Vermeirsh y col, 2002; Vasconcellos y col, 2008).

La expresión de RE $\alpha$  estuvo presente en todos los tipos celulares durante todo el ciclo estral, si bien existieron fluctuaciones acorde a las diferentes fases estudiadas en dos compartimentos histológicos. Se encontró una mayor inmunopositividad al RE $\alpha$  en la fase 4 en el epitelio superficial y en el tejido conjuntivo denso. La información previa existente referida a los cambios cíclicos en la expresión del RE $\alpha$  en vagina de perras es contradictoria. Por una parte algunos autores afirman que no existen cambios significativos en la expresión tanto epitelial como estromal del RE $\alpha$  vaginal a lo largo del ciclo estral en la perra (Vermeirsch y col, 2002), al tiempo que otros autores afirman que la inmunopositividad epitelial al RE $\alpha$  es más elevada durante el proestro, estro y anestro, en comparación con el diestro (Prado de Brito y col, 2006). La primera gran salvedad a realizar a la hora de comparar nuestros resultados con las anteriores descripciones realizadas en perras, de Vermeirsch y col.(2002) y Prado de Brito y col. (2006), es que mientras en dichos experimentos se trabajó con animales eutanasiados, en nuestro caso se utilizaron muestras seriadas tomadas *in vivo* en las mismas perras. A su vez, resulta difícil comparar nuestros resultados en lo que a cambios cíclicos en la expresión epitelial del RE $\alpha$  vaginal respecta, debido a que en nuestro trabajo, a diferencia de los anteriores se dividió al epitelio vaginal en diferentes compartimentos histológicos (epitelio superficial, intermedio y profundo).

En el caso del tejido conjuntivo denso también se detectó un incremento en el nivel de expresión de los RE $\alpha$  desde la fase 3 a la 4 tanto para la variable índice de inmunopositividad como área de tinción. Sin embargo, para la variable índice de inmunopositividad también se detectó una disminución desde la fase 1 a la 3, sin

afectarse el área de tinción. Esto implica que mientras el aumento de la expresión de RE $\alpha$  hacia el período post ovulatorio concurre con un aumento en el número de células positivas al RE $\alpha$ , la disminución en el estro tardío (fase 3) implica una pérdida de los receptores manteniéndose el porcentaje de células sensibles a los estrógenos.

En diversas especies, la mayoría de los estudios que vinculan la expresión de los receptores de estrógenos con las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroideas reportan un estímulo de los estrógenos y una inhibición de la progesterona sobre los RE $\alpha$  (Clark y Mani, 1994). Por otro lado, existen reportes que han demostrado efectos opuestos a los mencionados de las hormonas esteroideas sobre la expresión de los RE (Miller y col, 1977; Meikle y col, 2001). En la especie canina a su vez existen reportes que asocian positivamente los niveles plasmáticos de P4 con la intensidad de expresión de los RE $\alpha$  en diferentes órganos del tracto reproductivo (Johnston y col 1985; Fernandes y col, 1989). A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las especies, en la perra, las concentraciones de RE endometriales determinadas mediante binding (ensayos de unión) no fueron máximas durante el proestro, por lo contrario, tuvieron sus picos durante el diestro temprano (Johnston y col 1985; Fernandes y col, 1989), lo que es consistente con nuestros hallazgos. A su vez, en el caso particular de la vagina canina, según Vermeirsch y col (2002), existe una correlación negativa entre los niveles de 17  $\beta$  estradiol y la inmunopositividad al RE $\alpha$ , al tiempo que no se demostró correlación alguna de los niveles de RE $\alpha$  con la concentración de P4 sérica. A partir de este hallazgo, dichos autores sugieren la existencia de un mecanismo de feed back negativo entre el nivel de 17  $\beta$  estradiol y su receptor. A pesar de que la concentración de 17  $\beta$  estradiol no fue determinada en el presente trabajo, es esperable que en las fases 1 - 3 estuvieran más altas que en la fase 4. Estas fases se caracterizaron por presentar menor contenido de RE $\alpha$  en el epitelio superficial y conjuntivo denso que en la fase 4, lo que sería consistente con lo sugerido por Vermeirsch y col. (2002).

Por otra parte, como ya se mencionó antes, varios estudios sugieren que la P4 es capaz de regular a la baja la expresión tanto del RE $\alpha$  como la de su propio receptor (Evans y Leavitt, 1980; West y Brenner, 1985). Sin embargo, se ha sugerido que dicho efecto inhibitorio de la P4 ocurre primero sobre su propio receptor y más retardadamente sobre el RE (Fernández y col, 1989). En el endometrio canino la P4 fue capaz de reducir los niveles de RE recién al alcanzar el día 30 del diestro, al tiempo que para el caso del RP dicha reducción ocurrió más tempranamente durante los primeros días del diestro (Fernández y col, 1989). De este modo en nuestro estudio, el posible feed back negativo ejercido por el 17  $\beta$  estradiol podría haber sido responsable de mantener bajos los niveles de RE $\alpha$  en el epitelio superficial vaginal hasta finalizado el estro. Una vez comenzado el diestro, la liberación de tal inhibición por parte del 17  $\beta$  estradiol habría permitido un aumento de los RE $\alpha$ , sumado al hecho de que los niveles de P4 en ese momento aun no alcanzaron niveles capaces de inhibir la expresión de los RE $\alpha$ , o bien no los redujo aun debido al efecto retardado que posee la P4 sobre la reducción de los mismos. Por otra parte, el tejido conjuntivo denso vaginal mostró cambios cíclicos en su nivel de expresión del RE $\alpha$  que en parte difieren con los detectados para el epitelio superficial. La reducción en los niveles de expresión del RE $\alpha$  detectada en la fase 3 (estro tardío) podría deberse al alza en los niveles de P4 que ocurre en concomitancia con niveles de estrógenos que todavía no se redujeron a los niveles basales que alcanzarán más tarde durante el diestro.

Estos hallazgos sugieren que en la vagina de la perra, las hormonas esteroideas sexuales regulan de manera diferencial la expresión de los RE $\alpha$  según el compartimiento histológico involucrado.

En general podemos decir que nuestro trabajo demuestra que en aquellos estratos epiteliales en los cuales la expresión del RE $\alpha$  es más intensa, no existen mayores variaciones a lo largo de las fases del ciclo estudiadas. Sin embargo, en aquel estrato epitelial en el cual durante todas las fases del ciclo estudiadas los índices de inmunopositividad resultan los más bajos, se encontraron diferencias significativas entre la fase 4 y el resto de las fases del ciclo. El hecho de que los compartimientos epiteliales intermedio y profundo se hayan comportado de manera diferente al epitelio vaginal superficial, puede responder a las distintas funciones que cumplen estos estratos epiteliales dentro de la histofisiología del epitelio vaginal. Las células epiteliales ubicadas más profundamente están asociadas al desarrollo y crecimiento en espesor del epitelio vaginal que ocurre normalmente durante la fase folicular del ciclo (Finn Genesser, 2006). Se ha demostrado en ovinos que el epitelio glandular más profundo presenta una mayor tinción de RE $\alpha$  que el superficial (Meikle y col. 2000) y los autores han sugerido que esto puede deberse al rol mitogénico de los estrógenos, ya que las células en la base de las glándulas proliferan y migran hacia la luz luego del tratamiento con estradiol (Conti y col. 1981). Por otra parte las células superficiales del epitelio vaginal han sido vinculadas a la acumulación de glucógeno que sirve de sustrato luego de la descamación celular para la acidificación del pH luminal (Bloom Fawcett, 1988). Gorodeski y col, (2005). Esto sugiere que las propias células epiteliales de la vagina son capaces de acidificar el fluido luminal mediante un mecanismo de bombeo de hidrogeniones estrógeno-dependiente (Gorodeski y col, 2005). Tal vez la regulación al alza del RE $\alpha$  en las células superficiales detectada durante el período post ovulatorio en el presente trabajo pueda deberse a la necesidad de mantener la estimulación estrogénica durante esta fase con el fin de sustentar la acidificación del fluido luminal, pese a una disminución en los niveles circulantes de estrógenos.

### **8.3 DIFERENCIAS ENTRE COMPARTIMIENTOS HISTOLÓGICOS**

En el presente trabajo se detectó la inmunopositividad al RE $\alpha$  a nivel nuclear en todos los compartimientos histológicos estudiados. La ubicación nuclear del RE $\alpha$  en los tejidos vaginales se condice con anteriores descripciones realizadas tanto en otras especies (Hodgins y col, 1998), como en la misma especie canina (Vermeirsch y col, 2002; Prado de Brito y col, 2006). El hecho de que dentro del epitelio vaginal, se hayan detectado los mayores niveles de inmunopositividad al RE $\alpha$  en los estratos intermedio y profundo concuerda con la descripción anteriormente realizada en vagina de perras por Prado de Brito y col (2006). Este hecho como ya se mencionó antes probablemente sea debido a las diferentes funciones inherentes a cada compartimiento epitelial. El hallazgo de valores elevados de inmunopositividad en células pertenecientes al tejido conjuntivo vaginal esta de acuerdo con varias descripciones realizadas, tanto en la especie canina como en otras especies. En la perra se encontraron valores de inmunopositividad más elevados en las células estromales en relación a las epiteliales que componen la vagina (Vermeirsch y col, 2002). También a nivel vaginal en la perra se encontró un importante nivel de positividad al RE $\alpha$  en las células estromales (Prado de Brito y col, 2006). Si bien tanto en la descripción realizada por Vermeirsch y col (2002), como en la presente tesis se encontraron niveles elevados de positividad al RE $\alpha$  en las células del tejido conjuntivo

vaginal, existe entre ambos trabajos una importante diferencia a considerar. Mientras que en el trabajo realizado por Vermeirsch y col (2002) la inmunopositividad al RE $\alpha$  en el tejido conjuntivo fue mayor que en el epitelio vaginal, en nuestro trabajo las diferencias fueron encontradas exclusivamente entre los tejidos conjuntivos y el epitelio superficial. La razón por la cual podríamos explicar estas diferencias radica en el hecho de que en nuestra descripción, a diferencia de en la que realizaron Vermeirsch y col (2002), se dividió tanto al tejido conjuntivo, como al epitelio en diferentes estratos. De esta forma podemos especular con el hecho de que aquellas diferencias descritas entre el tejido conjuntivo vaginal y el epitelio vaginal por Vermeirsch y col, (2002), podrían deberse a diferencias exclusivas existentes entre las células superficiales epiteliales y el tejido conjuntivo, y no a diferencias entre todos los componentes (estratos) celulares epiteliales y los tejidos conjuntivos vaginales.

Por otra parte el hallazgo de mayores niveles de positividad en las células pertenecientes a los tejidos conjuntivos vaginales puede ser explicado por el hecho de la existencia de un mecanismo interactivo de transmisión de los efectos estrogénicos entre el epitelio y el estroma. En el ser humano, la expresión estromal del RE $\alpha$  a nivel vaginal, sugiere una interacción epitelio-estromal que podría estar involucrada en la regulación de los efectos estrogénicos epiteliales (Hodgins y col, 1998). La diferenciación del epitelio vaginal es probablemente debida a un mecanismo parácrino vía los RE $\alpha$  estromales (Buchanan y col, 1998). A su vez, el hallazgo de mayores positivities estromales en relación a los tejidos epiteliales, también se halló en el útero canino (Vermeirsch y col, 1999; Vermeirsch y col, 2000; Vermeirsch y col, 2002). La mediación de los efectos tanto estrogénicos como los efectos de otras hormonas esteroideas desde los tejidos conjuntivos hacia los epitelios probablemente sean debidos a un tipo de vínculo parácrino en el cual estarían involucrados como principales mediadores algunos factores de crecimiento entre los cuales se destacan los factores de crecimiento fibroblásticos. Dichos efectos se han demostrado en diferentes órganos, incluida la próstata (Donjacour y col, 2003), y la glándula mamaria (Alarid y col, 1991).

Si nos basamos en las diferencias en la constitución celular de ambas capas de tejido conjuntivo, podríamos explicar la mayor inmunopositividad al RE $\alpha$  en el tejido conjuntivo denso en relación al laxo. Por una parte se describe la presencia de una lámina propia vaginal constituida por una fina capa de tejido conjuntivo laxo celular subepitelial, la cual presenta en su mayor parte leucocitos y en especial linfocitos; luego, en la parte profunda, la capa de tejido conectivo se transforma en una capa con fibras más gruesas y vasos más grandes (Finn Geneser, 2006). El hecho de que los tipos celulares predominantes en el conjuntivo denso sean aquellos involucrados en la mediación parácrina epitelio-estromal, explicaría su mayor intensidad de expresión del RE $\alpha$ , al tiempo que las células presentes en la delgada capa de tejido conectivo laxo de la lámina propia vaginal, estarían involucrados en otras funciones. A su vez, es posible especular también con la existencia de una mediación parácrina de los efectos estrogénicos a partir de las células del tejido conjuntivo denso, en una primera instancia hacia las células del conjuntivo laxo subepitelial, y desde allí finalmente hacia las células del epitelio vaginal.

## **9. CONCLUSIONES**

El RE $\alpha$  está presente en el núcleo de las células de todos los compartimientos histológicos estudiados de la vagina de la perra adulta durante las fases de proestro, estro y período post ovulatorio.

Existen diferencias en la expresión del RE $\alpha$  entre diferentes tipos celulares así como también acorde a la ubicación de los mismos dentro del órgano complejo que es la vagina.

Los principales cambios cíclicos en la expresión del RE $\alpha$  en la vagina de la perra adulta durante el proestro, estro y período post ovulatorio se manifiestan principalmente en el epitelio superficial y el tejido conjuntivo denso vaginal. Estos hallazgos sugieren que en la vagina de la perra, las hormonas esteroideas sexuales regulan de manera diferencial la expresión de los RE $\alpha$  según el compartimiento histológico involucrado.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Acuña S, Tasende C, López C, Garófalo EG. (2007). Receptores esteroideos en vagina de ovejas ciclando en estación reproductiva y en anestro estacional tratadas con GnRH. Vas. Jornadas Técnicas Veterinarias;Montevideo, Uruguay; 153-154.
- 2) Alarid ET, Cunha GR, Young P, Nicoll CS. (1991). Evidence for an organ and sex specific role of basic fibroblast growth factor in the development of the fetal mammalian reproductive tract. *Endocrinology*.129 (4): 148-154.
- 3) Anisko JJ. (1997). Hormonal substrate of estrous odor preference in beagles. *Physiol Behav*; 18: 13-17.
- 4) Ashley RL, Clay CM, Farmerie TA, Niswender GD, Nett TM. (2006). Cloning and Characterization of an Ovine Intracellular Seven Transmembrane Receptor for Progesterone that Mediates Calcium Mobilization. *Endocrinology* 147: 4151-4159.
- 5) Auger AP. (2001). Ligand-independent activation of progestin receptors: relevance for female sexual behaviour. *Reproduction* 122: 847-55.
- 6) Barker TE, Walker BE. (1966). Initiation of irreversible differentiation in vaginal epithelium. *Anatomical Record* 154: 149±160.
- 7) Batra S, Iosif C. (1989). Tissue specific effects of progesterone on progesterone and estrogen receptor in the female urogenital tract. *J Steroid Biochem*; 32:35-39.
- 8) Biggers JD, Claringbold PJ. (1955). Mitotic activity in the vaginal epithelium of the mouse following local estrogenic stimulation. *Journal of Anatomy* 89:124-131.
- 9) Billingham RE, Silvers WK. (1963).The origin and conservation of epidermal specificities. *N Engl J Med*; 268:539-545
- 10) Bloom Fawcett. (1988). Tratado de histología, 12º ed. New York. Mc.Graw-hill interamericana; 930-931.
- 11) Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. (1996). Immunohistochemical assessment of estrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 44 (1): 1-21.
- 12) Bouchard G, Youngquist RS, Vaillancourt D, Krause GF, Guay P, Paradis M. (1991). Seasonality and variability of the interestrous interval in the bitch. *Theriogenology*; 36: 41-50.
- 13) Burgos M H, Wislocki G W. (1958). The cyclical changes in the mucosa of the guinea's pigs uterus, cervix and vagina and in the sexual skin, investigated by electron microscopy. *Endocrinology* 63:106-121.

- 14) Christie D, Bell E. (1972). Studies of canine reproductive behavior during normal estrous cycle. *Anim Behav*, 20: 621-631.
- 15) Clark JH, Mani SK. (1994). Actions of ovarian steroid hormones. En.: Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction* Raven Press Ltd. New York, 1011-1059.
- 16) Clarke CL. (1990). Cell-specific regulation of progesterone receptor in the female reproductive system. *Mol Cell Endocrinol*; 70:29-33.
- 17) Concannon PW, Hansel W, Visek WJ. (1975). The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod* ;13: 112-121.
- 18) Concannon PW, Hansel W. (1977). Prostaglandin F2 induces luteolysis, hypothermia, and abortion in beagle bitches. *Prostaglandins* ;13: 533-542.
- 19) Concannon P, Hansel W, McEntee K. (1977). Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod*; 17: 604-613.
- 20) Concannon PW. (1983). Reproductive physiology and endocrine patterns of the bitch. En: Kirk, RW(ed). *Current Veterinary therapy*. Philadelphia WB Saunders Co. Pp 886-901
- 21) Concannon PW. (1986). Canine physiology of reproduction. *Small Animal Reproduction and Fertility. A Clinical approach to diagnosis and treatment*. Burke T (Ed). Lea and Febiger. Philadelphia: 23-77.
- 22) Concannon PW, Mc Cann J, Temple M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J.Reprod.Fert, Suppl.*39:3-25.
- 23) Concannon PW. (1993). Biology of gonadotrophins secretions in adult and prepuberal female in dogs. *J.Reprod.Fert, Suppl.*47:3-27
- 24) Concannon PW, England G, Verstegen III J, Linde-Forsberg C. (2000). (Eds) En: *Recent Advances in Small Animal Reproduction International Veterinary Information Service*, Ithaca NY. Disponible en [www.ivis.org](http://www.ivis.org). Fecha de consulta:28,07,11
- 25) Concannon PW. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* 124:200-210.
- 26) Conti CJ, Gimenez-Conti IB, Zerbe GO, Gerschenson LE. (1981). Differential Effects of Estradiol-17 $\beta$  and Progesterone on the Proliferation of Glandular and Luminal Cells of Rabbit Uterine Epithelium. *Biol Reprod* 24, 643-648.
- 27) Corti L. (2003). Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado del perro (*Canis familiaris*). Memoria de Titulación, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile, 1-75 pp.
- 28) Cunningham J. (1997). *Fisiología Veterinaria Segunda edición*. Edición Mc Graw-Hill Interamericana. En: Echeverría J (2005). *Aspectos farmacológicos en el manejo*

- reproductivo de la perra. Revisión bibliográfica. Revista electrónica de veterinaria, Vol. VI, (3): 1-21.
- 229) De Cock H, Ducatelle R, Logghe JP. (1997). Immunohistochemical localization of estrogen receptor in the normal canine female genital tract. Dom Anim Endoc; 14: 137-47.
- 30) De Gier J, Kooistra H, Djajadiningrat- Laanen S, Dieleman S, Okkens A. (2006). Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol  $17\beta$ , progesterone, prolactin, and melanocyte stimulating hormone during follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. Theriogenology; 65: 1346-1357.
- 31) Dellman H. (1994). Histología Veterinaria. Buenos Aires, Acribia, 2ª ed. 284-286.
- 32) Dhaliwal GK, Wngland GCW, Noakes, DE. (1977). Immunocytochemical localization of oestrogen and progesterone receptors in the uterus of the normal bitch during oestrus and metoestrus. Journal Of Reproduction and Fertility Supplement 51:167-176.
- 33) Donjacour AA, Thomson AA, Cunha GR. (2003). FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. Dev Biol 261 (1); 39-54.
- 34) Donovan C. (1969). Canine anal glands and chemical signals (pheromones). J. Am. Vet. Ass, 155: 1995-1996.
- 35) Donnay I, Wouters-Ballman P, Devleeschouwer N, Leclercq G, Verstegen J. (1995). Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and affinities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs. Veterinary Research Communications, 19 (2): 101-113.
- 36) Dunlap KA, Stormshak F. (2004). Nongenomic Inhibition of Oxytocin Binding by Progesterone in the Ovine Uterus. Biol Reprod 70: 65-69.
- 37) Edens MSD, Health AM. (2005). Manejo de la reproducción en la perra y la gata. En: Eds. Root Kustritz, MV(ed). Manual de reproducción del perro y del gato. St. Paul, Minnesota, 15-26.
- 38) Eddy EM, Walker BE (1969). Cytoplasmic structure during hormonally controlled differentiation in vaginal epithelium. Anatomical Record 164: 205-218.
- 39) Edquist L, Forsberg M. (1997). Clinical Reproductive Endocrinology. San Diego. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (ed) Academic., p. 589-617.
- 40) Engle E. (1946) No seasonal breeding cycle in dogs. J. of Mammalian. 27:79-81
- 41) Evans RW, Leavitt WW. (1980) Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: dependence on RNA and protein synthesis. Proc Natl Acad Sci USA; 77:5856-5860.



- 42) Feldman Edward C, Nelson Richard W. (1987): Canine and feline endocrinology and reproduction. Philadelphia, 564 p.
- 43) Feldman DV, Nelson R.W, RW. (2001). En: Endocrinología y reproducción en perros y gatos. México. Mc Graw- Hill Interamericana. (2): 572-593.
- 44) Fernandes PA, Bowen RA, Sawyer HR, Nett TM, Gorell TA. (1989). Concentration of the receptors for estradiol and progesterone in canine endometrium during estrus and diestrus. *Am.J.Vet.Res* (50): 64-67.
- 45) Finn Geneser. (2006). Histología, Buenos Aires, 3º ed. Panamericana, 635-637.
- 46) Flint APF, Sheldrick EL, Fisher PA. (2002). Ligand-independent activation of steroid receptors. *Domestic Animal Endocrinology* 23: 13-24.
- 47) Forsberg M, Linde-Forsberg C, Karlsson A, Carlsson MA. (1993). Progesterone and oestradiol in canine plasma monitored by enhanced luminiscence immunoassays. *J. Reprod. Fert.* 47: 127-132.
- 48) Forsberg JG (1973). Cervico-vaginal epithelium: its origin and development. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology* 115, 1025±1043.
- 49) Goodwin M, Gooding KM, Regnier F. (1979). Sex pheromone in the dog. *Science*; 203: 559-561.
- 50) Gorodeski GI, Hopfer U, Chiun CH, Margles E. (2005). Estrogen Acidifies Vaginal pH by Up-Regulation of Proton Secretion via the Apical Membrane of Vaginal-Ectocervical Epithelial Cells. *Endocrinology* 146 (2): 816-824.
- 51) Gorski J, Hou Q. (1995). Embryonic estrogen receptors: Do they have a physiological function? *Environ. Health. Perspect*, 103: 69-72.
- 52) Greco TL, Duello TM, Gorski J. (1993). Estrogen receptors, estradiol, and diethylstilbestrol in early development: The mouse as a model for the study of estrogen receptors and estrogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tracts. *Endocr. Rev.* 59-71.
- 53) Günzel-Apel AR, Zabel S, Bunck CF, Dieleman SJ, Hoppen HO, Einspanier A. (2006). Significance, diagnosis and treatment of luteal deficiency (hypoluteidism) in dog. *Reprod Dom Anim*; 41 (Suppl): 15
- 54) Hartman C (1932). Reproduction in the *Macacus rhesus*. *Embryology* 23: 1-161.
- 55) Hodgins MB, Spike RC, Mackie RM, MacLean AB. (1998). An immunohistochemical study of androgen, oestrogen and progesterone receptors in the vulva and vagina. *Br J Obstet Gynaeco*: 105: 216-222.
- 56) Holderegger C (1980). Ultrastructural study of the mucification of the stratified epithelium of the mouse vagina. *Cell and Tissue Research* 213: 475-482.

- 57) Holst PA, Phemister RD. (1971). The preantral development of the dog; preimplantation events. *Biol Reprod*; 5: 194-206.
- 58) Holst PA, Phemister RD. (1974). Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance. *Am J Vet Res*; 35: 401-406.
- 59) Holst PA, Phemister RD. (1975). Temporal sequence of events in the estrous cycle of the bitch. *Am J Vet Res*; 36: 705-706
- 60) Illenchuk T, Walters M. (1987). Rat uterine progesterone receptor analyzed by H3 R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology*; 120: 1449-1456.
- 61) Jeffcoate IA, Lindsay FEF. (1989). Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J Reprod Fertil. Suppl*: 39: 277-87.
- 62) Jeffcoate IA. Endocrinology of anestrus bitches. (1993). *J Reprod Fertil*; 47 (Suppl):69-76.
- 63) Johnston SD, Kiang DT, Seguin BE, Hegstad RL. (1985). Cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in canine endometrium during the estrous cycle. *American journal of veterinary research*. Volume 46 (8): 1653-1658.
- 64) Johnston SD, Root MV. (1995). Serum progesterone timing of ovulation in the bitch. *En: Proceedings of the annual Meet Soc. Theriogenology*. 195-203.
- 65) Jones GE, Boyns AR, Cameron EHD, Bell E, Christie DW, Parkes MF. (1973). Plasma estradiol, luteinizing hormone and progesterone during the oestrus cycle in the Beagle bitch. *J Endocrinol*; 57:331-332.
- 66) Jones DE. (1988). Vagina, vestibule and vulva. *En: Reproductive clinical problems in the dog*. London .Ed. JO Joshua. Butterworth Scientific, p. 25-33.
- 67) Koligian KB, Stormshak F. (1977). Nuclear and cytoplasmic estrogen receptors in ovine endometrium during the estrous cycle. *Endocrinology*; 101:524-533
- 68) Kooistra HS , Okkens AC, Bevers MM, Poo- Snijders C, Van Haften B, Dieleman SJ, Schoemaker J. (1998 ). Concurrent pulsatile secretion of LH and FSH during different stages of the estrus cycle and anestrus in beagle bitches. *Biol. Reprod*. 60:65-71.
- 69) Krauss LW, Montano M, Katzenellenbogen B. (1993). Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'- region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol endocrinol*; 7: 1603-16.
- 70) Kronenberg MS y Clark JM. (1985). Changes in keratin Expression during the estrogen-mediated differentiation of rat vaginal epithelium. *Endocrinology* 117 (4): 1480-1489.

- 71) Kuhn RW , Schrader WT, Coty WA , Conn PM, O`Malley BW . (1977). Progesterone - binding components of chick oviduct. Biochemical characterization of purified oviduct progesterone receptor B subunit. J Biol Chem; 252:308-317.
- 72) Kuiper G, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson, S, Gustafsson, JA. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. PNAS 93: 5925-5930.
- 73) Linde- Forsberg C. (1996). Monitoreo preciso del ciclo estral de la perra para la inseminación artificial. Inseminación Artificial en Caninos. Editor Facultad de Veterinaria.
- 74) Lindsay F. (1983). The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non cyclic bitch: post uterine endoscopy. J Small Anim Pract 24:1-15
- 75) Lee CH, and Jacobson HI. (1971). Uterine estrogen receptor in rats during pubescence and the estrous cycle. Endocrinology 88, 596-601
- 76) Lessey BA, Wahawisan R, Gorell TH. (1981). Hormonal regulation of cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in the beagle uterus and oviduct. Molecular and Cellular Endocrinology. 21 (2): 171-180.
- 77) Luo SH, Sourla A, Labrie C, Gauthier S, Merand Y, Belanger A, Labrie F. (1998). Effect of twenty-four-week treatment with the antiestrogen EM-800 on estrogen-sensitive parameters in intact and ovariectomized mice. Endocrinology, 139 (5): 2645-2656.
- 78) Long JA, Evans H. (1922). The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. 6,1-48.
- 79) Matoltsy A G, Parakkal P F. (1967). Keratinization. En Ultrastructure of normal and abnormal skin. Philadelphia. Eds. Zelickson, 76-104.
- 80) Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Sahlin L. (2000). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. Reproductive and Nutritional Development; 40 587-596.
- 81) Meikle A, Garófalo EG, Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Sahlin L. (2001). Regulation by Gonadal Steroids of Estrogen and Progesterone Receptors Along the Reproductive Tract in Female Lambs. Acta vet. Scand 2 (42): 161-169.
- 82) Meikle A, Tasende C, Sosa C, Garofalo E.G. (2004). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. Reprod Fertil Dev 16: 385-394.
- 83) Mercer EH. (1961). Keratin and keratinization. Pergamon, New York. 316 p.
- 84) Miller BG, Murphy L, Stone GM. (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. Journal of Endocrinology 73: 91-98.

- 85) Moss RL, Quin GU, Wong M. (1997). Estrogen Nontranscriptional signaling pathway. *Recent Prog Horm Res*, 52: 33-69.
- 86) Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B, Ripio C. (2004). Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. *Steroids* 69, 531-6.
- 87) Nett TM, Akbar AM, Phemister RD, Holst PA, Reichert LE Jr, Niswender GD. (1975). Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in beagle bitch. *Proc Soc Exp Biol Med*; 148: 134-139.
- 88) Niswender GD, Nett TM. (1994). Corpus luteum and its control in infraprimate species. Knobil E, Neil JD. En: *The Physiology of Reproduction*, New York 2<sup>a</sup> ed. Raven Press, 781-816.
- 89) Okkens A, Dieleman S, Bevers M, Willemse A. (1985). Evidence of noninvolvement of the uterus in the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. *Vet Q*, 7: 169-173.
- 90) Olson P, Bowen R, Behrendt M. (1982). Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biol Reprod*; 27: 1196-1206.
- 91) Onclin K, Murphy B, Verstegen JP. (2002). Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology*; 57: 1957-1972.
- 92) Ortega-Pacheco A, Rodríguez-Buenfi J, Leal-Ortega J. (2000). Actividad estrol de perras callejeras en la ciudad de Mérida, Yucatán y su relación con edad, tamaño y condición corporal. *Rev Biomed*, 11:107-111.
- 93) Orti E, Bodwell JE, Munck A. (1992). Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev*, 13:105-128.
- 94) Parakkal PF, Gregoire AT. (1972). Differentiation of vaginal epithelium in the normal and hormone-treated rhesus monkey. *The Biology of Reproduction* 6, 117-130.
- 95) Parakkal PF. (1973). Cyclical changes in the vaginal epithelium of the rat seen by scanning electron microscopy. *Anatomical Record* 178, 529-538.
- 96) Phemister RD, Holst PA, Spano JS, Hopwood ML. (1973). Time of ovulation in the Beagle bitch. *Biol Reprod*; 8: 74-82.
- 97) Prado de Brito C, Motos de Oliveira C, Soares FA, Faustino M, Alvarenga de Oliveira C. (2006). Inmunoquímico de determinación de receptor de estrógeno alfa, en tejidos vaginales y tumorales de hembras sanas y afectadas por TVT y su relación con las concentraciones de estradiol  $17\beta$  y progesterona. *Theriogenology* 66:1587-1592.
- 98) Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. (1998). Nongenomic actions of Steroid Hormones in Reproductive Tissues. *Endocr Rev* 19, 3-17.

- 99) Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. (2001). The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *Journal of Endocrinology* .160, 21–33.
- 100) Root Kustritz MV. (2001). Use of commercial luteinizing hormone and progesterone assay kits in canine breeding management. En: Concannon PW, Wildt D, Panko W, Chakraborty P, Seager S. (1979). Relationship of serum estrone, estradiol 17, and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation. *Biol Reprod*; 20: 648-658.
- 101) Senger P.L. (2005). Pathways to pregnancy and parturition. 2ª ed. 2, 10-14.
- 102) Shupnik PJ. (1997). Steroid and thyroid hormone receptors. Introduction to Molecular and Cellular Reserch. The Endocrine Society, Syllabus, 37-46.
- 103) Sokolowski J, Stover D, Van Ravenswaay F. (1977).The incidence of estrus and interestrus interval for bitches of seven breeds.*J Am.Vet Med Ass.*171:271-273
- 104) Spencer TE, Bazer FW. (1995). Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod*, 53: 1527-1543.
- 105) Tsai MJ, O'Malley BW. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* ; 63 : 451-486.
- 106) Tsuitsui T. (1977). Studies on the reproduction in the dog. *Japan J.Anim.Reprod.*23:41-46
- 107) Varayoud J, Ramos JG, Monje L, Bosquiazzo V, Muñoz de Toro M, Luque EH. (2006). The estrogen receptor alpha sigma3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus. *J Endocrinol*, 186 (1): 51-60.
- 108) Vasconcellos A, Sepúlveda N, Pacheco C, Miska W. (2008). Detección de receptores de estrógeno, progesterona y de proteína ligadora de corticoesteroides en el tracto genital de hembras caninas (*canis familiaris*). Estudio inmunohistoquímico. *Revista Científica, Fcv-Luz*. 18 (3): 262-266.
- 109) Vermeirsch H, Simoens P, Lauwers H, Coryn M. (1999). Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. *Theriogenology*; 51(4):729-743.
- 110) Vermeirsch H, Simoens P, Hellemans A, Coryn M, Lauwers H. (2000). Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. *Theriogenology*; 53(3):773-788.
- 111) Vermeirsch H, Van Den Broeck W, Simoens P. (2002). Inmunolocalización de los receptores de hormonas esteroideas sexuales en tejidos vulvares de caninos y su relación con la concentración de hormonas esteroideas sexuales .*Reprod.Fertil.Dev*; 14: 251-258

- 112) Vestegen J, Onclin K. (1999). Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology* 51:597-611.
- 113) Wanke MM y Gobello C. (2006). Ciclo estral canino. En: *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Eds. Wanke MM y Gobello C. Inter-médica. 1: 1-30.
- 114) Wathes DC y Hamon M. (1993). Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrus cycle and early pregnancy of the ewe. *J. Endocrinol*; 138(3):479-492.
- 115) West NB, Brenner RM. (1985). Progesterone-mediated suppression of estradiol receptors in cynomolgus macaque cervix, endometrium and oviduct during sequential estradiol-progesterone treatment. *J Stero Biochem*; 22: 29-37.
- 116) Wildt DE, Chakraborty PK, Panko W. (1978). Relationship of reproductive behaviour, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol Reprod* 18: 561-570.
- 117) Wildt, DE, Panko WB, Chakraborty PK y Seager SWJ. (1979). Relationship of serum LH, estradiol-17 $\beta$  and progesterone to LH. sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod.* 20:648.
- 118) Wildt DE, Seager SWJ, Chakraborty PK. (1981). Behavioral ovarian and endocrine relationship in the pubertal bitch. *J Anim Sci*; 53: 182-191.