

DETECCIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO, PROGESTERONA Y DE PROTEÍNA LIGADORA DE CORTICOSTEROIDES EN EL TRACTO GENITAL DE HEMBRAS CANINAS (CANNIS FAMILIARIS). ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

Detection of Estrogen, Progesterone Receptors and Corticosteroid Binding Globulin in the Canine (Cannis Familiaris) Reproductive Female Tract. Immunohistochemistry Study.

Adriana Vasconcellos Costa, Néstor Sepúlveda Becker, Carolina Pacheco Córdova y Werner Miska*

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

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

RESUMEN

Los receptores esteroidales sexuales del tracto genital de la hembra tienen importancia dado que, a través de ellos, actúan las hormonas responsables de su desarrollo y de sus cambios morfofuncionales. En su mecanismo, uno de los factores a considerar son las posibles diferencias entre las distintas especies. El objetivo del presente estudio fue evaluar, en la especie canina (N=8), la presencia de receptores de estrógenos (RE), progesterona (RP) y la presencia de proteína ligadora de corticosteroides (CBG) en ovario, oviducto y útero de 3 hembras prepúberes (N=3) y 5 hembras adultas (N=5). La evaluación morfológica se realizó con tinción de hematoxilina-eosina (H-E) e inmunocitoquímica, según la técnica de Sternberger (1979). Los resultados revelaron en animales ciclando, inmunorreactividad (IR) positiva, RE en útero, oviducto y ovario siendo marcada en oviducto. La IR para RP fue leve y varió según el estadio del ciclo. En hembras prepúberes, los RE y RP no fueron evidenciados. La CBG mostró positividad en el tracto durante el ciclo y fue negativa en prepúberes. Se concluye que la presencia de RE y RP es detectable en útero, oviducto y ovario de la hembra canina adulta habiendo variaciones de concentración según el estadio del ciclo estral, siendo su presencia en las prepúberes no evidenciable, a diferencia de otras especies (oveja), donde son detectables en este estadio del desarrollo. La presencia de CBG constante durante el ciclo estral y variable en los otros estadios indica su posible participación en los procesos reproductivos.

Palabras clave: Perros, receptores de estrógenos, receptores de progesterona, CBG, inmunocitoquímica.

ABSTRACT

The sexual steroid receptors of the genital tract of the female have significant importance since through them the hormones responsible acting. In their mechanism one of the factors to be kept in mind is the possible differences among the diverse species, the objective of this study was to evaluate in canine (N= 8) the presence of receptors of estrogens (ER), progesterone (PR) and the presence of corticosteroid binding globuline (CBG) in ovaries, oviduct and uterus of prepuberal female (N=3) and matures: (N=5) It was used H-E and immunohistochemical study according to the technique of Stenberger (1979). The results during the oestrus showed: Immune reactivity (IR) positive, ER in uterus and ovary being much stronger in oviduct. The PR varied according the stage of oestrus cycle. In puberal female dog ER and PR were undetectable. The CBG revealed positive in reproductive tract of cycling females but negative in prepubertal. It was concluded that the presence of ER and PR are detectable in uterus, oviduct and ovary of mature female dogs varying their concentration according to the cycle. In prepuberal, its presences come undetectable differing from other species (ovine), in which they are detected at this stage of development. The constant of CBG presence during oeustrus cycle and such variation in other stages of the cycle, it might suggest its participation in the several reproductive activities.

Key words: Dogs, estrogens receptors, progesterone receptors, CBG , immunochemistry.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroidales son esenciales en la reproducción de los mamíferos, las grandes diferencias entre los

géneros son principalmente el resultado de los efectos de la testosterona en machos y de los estrógenos y progesterona en hembras [2].

Los estrógenos y la progesterona, se unen a sus receptores específicos para desencadenar una respuesta biológica. Indiscutible es la importancia de éstos durante el período reproductivo de la hembra, ya que interviene en los cambios cíclicos que se producen en el tracto genital durante el ciclo estral [2,3,5,11,13]. Ellos presentan un complejo mecanismo de control en el cual es necesario tener en cuenta diversos factores, entre ellos la especie.

Garfolo y Tasende [1] y otros autores [5-7,13,16] observaron la presencia de receptores de estrógenos y progesterona en el endometrio de ovejas prepúberes, sin embargo, en caninos prepúberes, la presencia de los receptores de progesterona en endometrio fueron muy bajos o indetectables [4].

Según Slayden [12], en primates y roedores la expresión de los receptores en el endometrio y oviducto es dependiente directamente de las hormonas circulantes.

Para que se produzca el efecto de las hormonas sobre el receptor, éstas van previamente unidas a una proteína ligadora generalmente una globulina. Entre éstas se encuentra la proteína ligadora de corticosteroides (CBG), que une, tanto progesterona como corticoides. La CBG es una molécula que ha sido reconocida en el tracto genital del hombre y de algunas especies [8-10,16] y está involucrada en mecanismos que llevan a la fecundación en humanos y por lo tanto, podría estarlo también en los fenómenos reproductivos de la especie canina.

El objetivo del presente estudio fue determinar en hembras caninas mediante estudio inmunocitoquímico, la presencia de receptores de estrógenos (RE), progesterona (RP) y la presencia de CBG en ovario, oviducto y útero de hembras prepúberes y adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el estudio en 8 tractos reproductivos de hembras caninas sanas procedentes de histerectomías realizadas para prevención del ciclo estral en el Hospital de Pequeños Animales de la Universidad Católica de Temuco, Chile (su etapa reproductiva fue confirmada por anamnesis y citología vaginal). Inmediatamente después de obtener los tractos reproductivos se tomaron muestras de pared uterina, oviducto y ovario de perras durante ciclo estral: 3 en proestro y 1 en estro, 1 en anestro y 3 prepúberes. Cada muestra fue dividida en dos, una parte fue fijada en Bouin acuoso, para tinciones convencionales y la otra en Methacarn (Carnoy modificado), para inmunocitoquímica (IHQ). Las inclusiones se hicieron en paraplast (Merck), de las cuales se obtuvieron cortes seriados de 5-7 micras. Los análisis morfológicos se hicieron con Hematoxilina y Eosina. Merck (H-E).

Para IHQ, los cortes histológicos obtenidos se procesaron siguiendo el método inmunohistoquímico de Peroxidasa anti peroxidasa (PAP) descrito por Sternberger [14], según técnica del segundo anticuerpo. En la serie para los receptores estrogénicos se utilizó como anticuerpo primario o específico, un monoclonal (Dako, M7047), como anticuerpo secundario: anti IgG ratón obtenido en conejo (Dako, Z0109) y el PAP fue PAP-ratón (Dako, P0850). En la serie para los receptores de progesterona se utilizó como anticuerpo primario, un policlonal (Dako, A0098), como anticuerpo secundario: anti IgG conejo obtenido en cerdo (Dako, Z0196) y el complejo PAP desarrollado en conejo (Dako, Z0113). El revelado se hizo con 3,3'-diaminobenzidina (Dako, S-3000 ó Sigma) y H₂O₂ por 1-5 min., para luego ser deshidratados y montados en Entellan (Merck). Para CBG, el anticuerpo específico fue un policlonal anti h CBG, obtenido en conejo (Biogénesis Inc, EUA; y de propia producción), anticuerpo secundario: Dako, Z0109 y PAP conejo: Dako, Z0113. El revelado se hizo con 3,3'-diaminobenzidina (Dako, S-3000 ó Sigma) y H₂O₂ por 1-5 min., para luego ser deshidratados y montados en Entellan (Merck). Una vez finalizada la reacción, los preparados fueron teñidos con Hematoxilina, por 10-30 segundos, como tinción de contraste.

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

Según la intensidad de la tinción se usó la clasificación de positividad fuerte o marcada (+++), moderada (++) , débil o leve (+) y negativa (-). La intensidad de reacción de las muestras fue evaluada comparándola con controles negativos, siendo éstos, cortes de los mismos tejidos tratados con sueros no inmunes.

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tracto genital es muy sensible a la acción de las hormonas sexuales, las que responden por medio de sus receptores específicos modificando sus características estructurales [2,3,11,13]. La respuesta celular depende de distintos factores que afectan la sensibilidad y función de los tejidos como son: el número y afinidad a sus receptores (tipos y subtipos de ellos), el estado hormonal, la expresión selectiva en los órganos diana, la etapa del desarrollo y el estadio reproductivo en que se encuentre el animal y la diferencia entre las diversas especies [5]. La presencia de receptores de estrógenos RE y receptores de progesterona (RP) ha sido estudiada en el tracto genital de distintas especies. En las ovejas se estudió y demostró la presencia de RE y RP en el útero y oviducto de animales prepúberes y en ciclo [1,5-7,15].

En perras, según Lessey [4], los receptores de progesterona fueron en este estadio del desarrollo bajos o indetectables en el útero.

Vermeirsch y Simoens [17], Vermeirsch y cols. [18,19] estudiaron la presencia de receptores de estrógeno y progesterona en útero y oviducto de perra y observaron que su fluctuación fue más pronunciada en el estroma endometrial que en el epitelio glandular, concluyendo que el papel de las células estromales en la regulación de los cambios cíclicos endometriales normales como patológicos, no debe ser subestimado, ya que ellas podrían mediar la acción de varias hormonas esteroidales sobre el epitelio.

Los resultados del presente estudio mostraron para los receptores de estrógenos (RE) durante el ciclo estral, inmunoreactividad positiva moderada en el estroma y el epitelio glandular endometrial (FIG 1) y marcada en epitelio superficial y estroma del oviducto (FIG 2). Los RE mostraron inmunoreactividad leve o negativa en perras anéstricas.

Los RP presentaron en los 3 órganos inmunoposividad leve, en animales cíclicas (proestro y estro) e inmunoreactividad leve o negativa en acíclico.

Los RE y RP fueron indetectables en perras prepúberes.

Un hecho llamativo fue la presencia de receptores de estrógeno comparativamente alta, respecto al endometrio, en estroma y epitelio de oviducto de perra en proestro.

Para que se produzca el efecto de las hormonas sobre el receptor, éstas, son transportadas hasta él por una proteína ligadora que generalmente es una globulina. Entre éstas la CBG une, tanto a la progesterona como a los corticoides y su presencia en el oviducto crearía un ambiente adecuado para la fecundación [10]. Su función respecto al ovario mismo es aún desconocida, sin embargo, su relación con vasos sanguíneos sugiere que su secreción podría tener una función integradora alcanzando el lecho vascular y actuando en forma paracrina o endocrina logrando otros objetivos como el transporte de esteroides a distancia en el sistema reproductor.

Al igual que en un estudio previo en ovejas [16], para el rastreo de CBG se utilizó anticuerpo policlonal comercial (y otro de producción propia) elaborado contra CBG humana pura.

Trabajos del grupo de autores (aún no publicados) indican, que la CBG humana es una molécula proteica (globina) cuyas especificidades podrían presentar reacción cruzada con estructuras moleculares de naturaleza estrechamente relacionadas. Este fundamento apoya los resultados obtenidos [10], en que si bien es un anticuerpo relacionado por la reactividad cruzada, tanto los sitios de reacción como la intensidad de las marcas son similares a los resultados obtenidos en la especie humana con anticuerpos mono y policlonales, y por lo tanto, constituye una buena aproximación al rastreo de esta molécula en otras especies mamíferas.

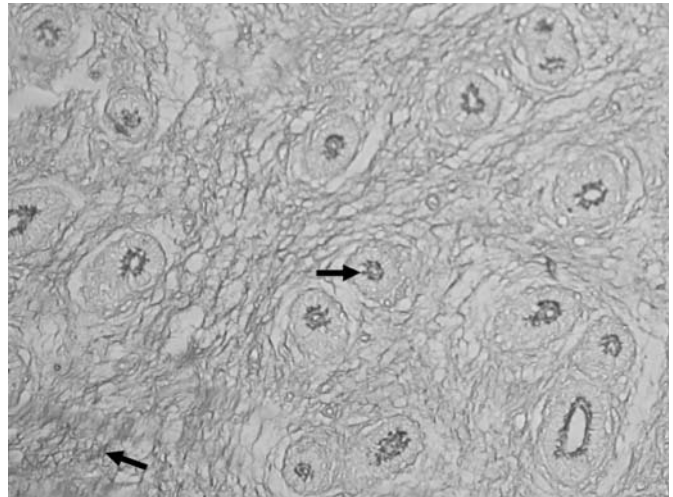


FIGURA 1. ENDOMETRIO DURANTE EL CICLO: PRESENCIA DE RE. LOCALIZACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO GLANDULAR Y ESTROMA ENDOMETRIAL. DETALLE: NÓTESE LA INMUNOREACTIVIDAD (FLECHAS) QUE INDICA LA PRESENCIA DE RECEPTORES (100 X)/ CYCLING ENDOMETRIUM: PRESENCE OF ESTROGEN RECEPTORS. IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF ESTROGEN RECEPTORS IN CELLS OF THE GLANDULAR EPITHELIUM AND STROMA ENDOMETRIAL. DETAIL: NOTICE THE INMUNOREACTIVITY (ARROWS) THAT INDICATES THE PRESENCE OF RECEPTORS (100 X).

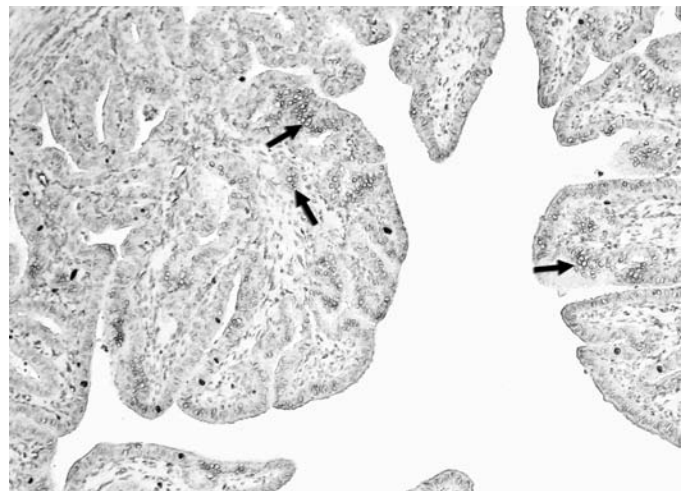


FIGURA 2. OVIDUCTO DURANTE EL CICLO: PRESENCIA DE RE. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS INMUNOPositividad MARCADA EN CÉLULAS DEL EPITELIO OVIDUCTAL Y EN CORIÓN. DETALLE: NÓTESE LA INMUNOREACTIVIDAD (FLECHAS) QUE INDICA LA PRESENCIA DE RECEPTORES (100 X)/ CYCLING OVIDUCT: ESTROGEN RECEPTORS MARKED INMUNOPositivity IN EPITHELIUM OVIDUCTAL CELLS AND IN CORIÓN. DETAIL: NOTICE THE INMUNOREACTIVITY (ARROWS) THAT INDICATES THE PRESENCE OF RECEPTORS (100 X).

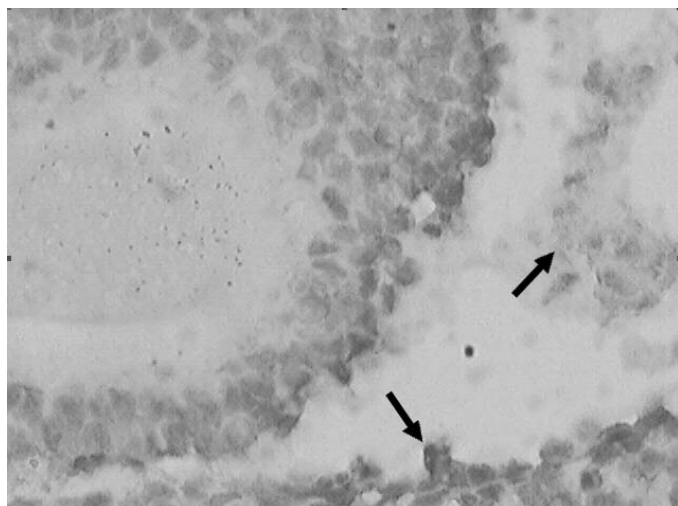


FIGURA 3. OVARIO DURANTE EL CICLO: PRESENCIA DE CBG. INMUPOPOSITIVIDAD CBG EN CÉLULAS FOLICULARES Y EN EL FLUIDO FOLICULAR (FLECHAS) (400X)/ CYCLING OVARY: CBG PRESENCE CBG INMUPOPOSITIVITY IN FOLICULAR CELLS AND IN FOLICULAR FLUID (ARROWS) (400 X).

La inmunorreactividad para CBG en endometrio y en oviducto fue moderada en perras en ciclo estral y negativa en prepúberes y anéstricas. En ovario se observó durante el ciclo reacción inmunopositiva a la CBG en células foliculares, en el fluido folicular (FIG 3) y en células estromales diseminadas, aisladas o en grupos, siendo llamativa su presencia asociada con vasos sanguíneos (FIG 4).

La inmunoreactividad fue negativa en prepúberes.

CONCLUSIONES

- La presencia de RE y RP es detectable en útero, oviducto y ovario de la hembra canina adulta variando sus concentraciones según el estadio del ciclo estral, siendo su presencia no evidenciable en las hembras prepúberes.
- La presencia de CBG constante en los órganos estudiados durante el ciclo estral sugiere su participación en los fenómenos reproductivos de esta especie.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo Universidad de la Frontera (DIUFRO) (proyecto Nº 107-0017).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] GARFOLO, E.G.; TASENDE, C. Uterine estrogen and progesterone receptors in prepuberal ewe distribution in myometrium, endometrium, and caruncles. *Vet Res.* 27:177-3. 1996.

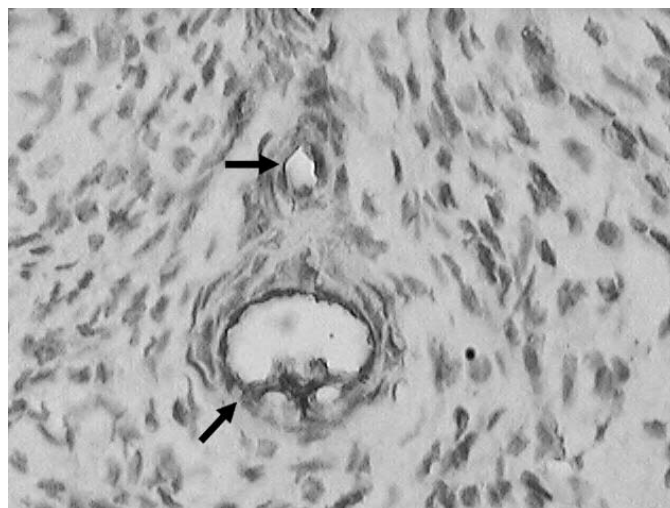


FIGURA 4. OVARIO DURANTE EL CICLO: PRESENCIA DE CBG. INMUPOPOSITIVIDAD CBG EN CÉLULAS DISTRIBUIDAS EN EL ESTROMA OVÁRICO: CÉLULAS INMUPOPOSITIVAS ASOCIADAS A VASOS SANGUÍNEOS (FLECHAS) (400 X)/ CYCLING OVARY: CBG PRESENCE. INMUPOPOSITIVITY CBG IN CELLS DISTRIBUTED IN THE OVARIAN ESTROMA: INMUPOPOSITIVITY CELLS ASSOCIATED TO SANGUINE VESSELS (ARROWS) (400 X).

[2] HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Fisiología de la reproducción Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Interamericana. 7ma Ed. McGraw-Hill. Madrid. España.31-68pp. 2002.

[3] KIMMINS, S.; MAC LAREN, L.A. Oestrous cycly and pregnancy effects on the distributionoestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta.* 22:742-48. 2001.

[4] LESSEY, B.A.; WAHAWISAN, R.; GORELL, T.A. Hormone regulation of cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in the beagle uterus and oviduct. *Moll. Cell. Endocrinol.* 21(2):171-80. 1981.

[5] MEIKLE, A.; TASENDE, C.; RODRÍGUEZ, M.; GARÓFALO, E.G. Effects of estradiol and progesterone on the reproductive trac and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenol.* 48:1105-113. 1997.

[6] MEIKLE, A.; GARÓFALO, E.G.; RODRÍGUEZ-PIÑON, M.; TASENDE, C.; SAHLIN, L. Regulation by gonadal steroids of estrogen and progesterone receptors along the reproductive trac in lambs. *Acta Vet. Scand.* 42:131-39. 2001.

[7] MEIKLE, A.; TASENDE, C.; SOSA, C.; GARÓFALO, E.G. The rol of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod. Nutr. Dev.* 16:385-94. 2004.

[8] MISAO, R.; HORI, M.; ICHIGO, S.; FUJIMOTO, J.; TAMAYA, T. Corticosteroid-bindingglobulin mRNA levels in human uterine endometrium. *Steroids.* 59:603-7. 1994.

- [9] MISKA, W.; FEHL, P.; HENKEL, R. Biochemical and immunological characterization of the acrosome reaction-inducing substance (ARIS) of hFF. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 199(1):125-129. 1994.
- [10] PEÑA, P.; VASQUEZ, B.; VEUTHEY, C.; RISOPATRÓN, J.; SÁNCHEZ, R.; MISKA, W. Evidencias inmunocitoquímicas sobre la presencia de la serpina CBG-símil en el sistema reproductor de la hembra en bovinos. **Rev. Chil. Anat.** 14: 97-203. 1999.
- [11] ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; WATHES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples through the oestrus cycle and early pregnancy in cows. **Reprod.** 122:965-79. 2001.
- [12] SLAYDEN, O.D.; HIRST, J.J.; BRENNER, R.M. Estrogen action in the reproductive tract rhesus monkeys during antiprogestin treatment. **Endocrinol.** 132:1845-56. 1993.
- [13] SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biol. Reprod.** 53:1527-43, 1995.
- [14] STERNBERGER, L.A. The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. **J. Histochem. Cytochem.** 27(12):1657-65, 1979.
- [15] VASCONCELLOS, A.; PEÑA, P.; SEPÚLVEDA, N. Estudio histomorfológico comparativo del endometrio de la oveja prepúber y en anestro bajo influencia hormonal cíclica. **Rev. Científ FCV-LUZ.** XV (4):334-337. 2005.
- [16] VASCONCELLOS, A.; PEÑA, P.; SEPÚLVEDA, N.; MISKA, W. Presencia de CBG y receptores de estrógeno, fracción alfa, y progesterona en el sistema reproductor de ovejas en distintos estadios del ciclo reproductivo. Estudio inmunocitoquímico. **Rev. Científ FCV-LUZ.** XVI(6):655-661. 2006.
- [17] VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P. Variation in the estrogen receptor content of canine uterine tissue throughout the estrous cycle. **Ital. J. Anat. Embryol.** 103 (4 Suppl 1): 267-75. 1998.
- [18] VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; HELLEMANS, A.; CORYN, M.; LAUWERS, H. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenol.** 53(3):773-88. 2000.
- [19] VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H.; CORYN, M. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenol.** 51(4):729-43. 1999.