

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

**Presencia de los receptores de estrógenos en tejido endometrial de ovejas raza Texel y Araucana.**

**Estudio inmunohistoquímico<sup>#</sup>**

Presence of estrogen receptors in endometrial tissue from Texel and Araucana sheeps.

Immunohistochemical study.

C Cisternas<sup>a</sup>, A Vasconcellos<sup>b</sup>, M Paredes<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>LINBA, Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>b</sup>CEBIOR, Centro Biotecnológico de la Reproducción, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>#</sup> Financiado por el Proyecto DIUFRO 12-0027

\* Autor para correspondencia: e-mail: mparedes@ufro.cl, casilla 54-D, fax: 45-592832.

## 24 SUMMARY

25 In sheep breeding, the high fertility rate is a desirable trait among breeders. The combination of genetic  
26 and environmental factors in sheep individuals directly affects prolificacy of females. There are high  
27 prolificacy sheep breeds such as Texel and other standard prolificacy, demonstrating that these  
28 particular genetic makeup affects their reproductive aspects, however, there is not much information  
29 about what elements of gene expression are correlated with fertility. In animals with polioestrus stage,  
30 the existence of mechanisms of reproduction is mediated by sex hormones and their receptors. In  
31 sheep, the alpha estrogen receptor (ER- $\alpha$ ) is widely distributed in the reproductive system. This study is a  
32 comparison of immunohistochemical expression of ER- $\alpha$  in endometrial Texel prepubertal sheeps and  
33 Araucana breed, by measuring the optical density (OD) in specific sectors of the endometrium. The  
34 results indicate a significant difference between the expression of ER- $\alpha$  in endometrial Texel and  
35 Araucana ewes, being higher in all sectors evaluated in Texel breed ewes. The existence of this  
36 difference can be attributed to many factors, diet, photoperiod, but essentially to own genetic  
37 characteristics of each breed. Previous works indicated that exist a relation between prolificacy and ER-  
38  $\alpha$  expression in the reproductive sheep system, which is consistent with the results obtained in this  
39 study wich indicate the direct relation of Texel breed and its higher rate of prolificacy and ER- $\alpha$   
40 expression, compared to Araucana standard prolificacy and its lower ER- $\alpha$  expression.

41 KEYWORDS: ER- $\alpha$ , immunohistochemical, prolificacy, endometrium.

42

43

44

45

46

47

48

49

50

## 51 INTRODUCCIÓN

52 Los mecanismos de control endocrino en la reproducción animal están mediados por hormonas  
53 sexuales. Los estrógenos son una de las principales hormonas que modulan el funcionamiento del  
54 tracto reproductivo femenino, el comportamiento reproductivo y los caracteres sexuales secundarios  
55 (Muramatsu y col, 2000; Meikle y col, 2001). El efecto hormonal a nivel celular depende de la  
56 presencia de receptores específicos en los tejidos blancos. La importancia de éstos radica en la  
57 dinámica generada por el complejo hormona-receptor que determinan el estado morfofuncional del  
58 tracto genital, dependiendo también de factores como la respuesta celular, su afinidad por los  
59 receptores, el estado hormonal, la expresión selectiva en órganos diana, y de distintos factores que  
60 afectan la sensibilidad y función de los tejidos (Vasconcellos y col, 2011). En ovinos, animales  
61 poliéstricos estacionales, los estrógenos tienen efecto a nivel del aparato reproductor de la hembra  
62 (Wiley y col, 1987) actuando sobre el desarrollo morfofuncional del endometrio (Vasconcellos y col,  
63 2010). Una baja expresión del RE- $\alpha$  produciría cambios en la sensibilidad endometrial a las hormonas  
64 esteroidales, lo que en estadios de preñez tempranos impediría un desarrollo uterino adecuado,  
65 situación que afectaría a la implantación y sobrevivencia del embrión (Lozano y col., 1997; Sosa y col.,  
66 2004; Abecia y col, 2006). A diferencia de otros mamíferos, en el endometrio de las ovejas se  
67 encuentran receptores de estrógenos fisiológicamente activos desde la etapa prepuberal, no  
68 conociéndose aún el significado fisiológico de esta expresión temprana de receptores en borregas  
69 (Cherny 1991; Meikle y col 2001; Vasconcellos y col, 2009b). La presencia de estos receptores  
70 durante el periodo reproductivo es fundamental, ya que comenzada la actividad ovárica intervienen en  
71 los cambios que se producen en el endometrio durante el ciclo estral (Meikle y col, 2004; Vasconcellos  
72 y col, 2006; 2011). En las ovejas prépuberes se encuentran altas concentraciones de RE- $\alpha$  en el útero y  
73 oviducto (Garfolo & Tasende y Meikle y col., 1997, 2000, 2001, 2004) En primates y roedores la  
74 expresión de los receptores en el oviducto es dependiente de las hormonas (Slayden y col., 1993) y su  
75 regulación sería similar en el oviducto y el útero. Se han descrito la existencia de núcleos positivos en  
76 células de cérvix en ovejas prépuberes, pero no fueron llevados a cabo estudios cuantitativos (Zhao y  
77 col, 1999). El objetivo de este trabajo fue evaluar comparativamente la expresión inmunohistoquímica  
78 del RE- $\alpha$  en cortes histológicos de endometrio en ovejas de raza Texel y Araucana.

## 79 MATERIALES Y MÉTODOS

80 Animales y muestras biológicas:

81 Se utilizaron 6 ovejas prepúberes de 4 meses de edad; 3 de raza Texel y 3 de raza Araucana. Los  
82 animales fueron mantenidos en el Campo Experimental Maquehue de la Universidad de La Frontera  
83 (Región de La Araucanía), Chile, hasta el sacrificio. El manejo de los animales se realizó de acuerdo  
84 con el consentimiento del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de La Universidad de La  
85 Frontera. Luego del sacrificio con pentobarbital sódico (100 a 200 mg/Kg) vía intravenosa (Andrews y  
86 col 1993, Bolant y col 1990, Gnanalingham y col 2005), se extrajo el útero el cual fue dividido  
87 quirúrgicamente en tres partes: cervix, cuerpo y cuernos. Cada una de las secciones se fijó en  
88 paraformaldehído al 10 %. Para el análisis del tejido endometrial se utilizaron los cuernos uterinos.

89

90 Análisis Inmunohistoquímico.

91

92 Las muestras fijadas se incluyeron en Paraplast Plus (Mc Cormick scientific, USA). Posteriormente se  
93 prepararon cortes de 5µm a partir del tejido incluido. Los cortes se procesaron desparafinando con xilol  
94 y posteriormente rehidratando mediante incubación en batería de concentración decreciente de etanol,  
95 con un posterior lavado con buffer fosfato salino 1X (PBS). Luego, se bloqueó la actividad peroxidasa  
96 endógena natural, incubando con perhidrol 0,3% en metanol por 30 minutos. Se lavó con PBS 3 veces  
97 por 5 minutos y se procedió a incubar los cortes con solución de bloqueo provista por el Kit “R.T.U  
98 Vectastain Universal Elite ABC Kit” (Vector Laboratories, USA), a temperatura ambiente por 30  
99 minutos. Los cortes se incubaron a continuación con el anticuerpo policlonal anti-ERα (Santa Cruz  
100 Biotechnology, USA) diluido 1:500, en solución de bloqueo, durante 12 horas a 37°C. Posteriormente,  
101 se lavaron los cortes con PBS 1X, 3 veces por 5 minutos. Luego se incubaron con un segundo  
102 anticuerpo biotinilado provisto por el kit descrito anteriormente, por 30 minutos a temperatura  
103 ambiente. Luego los cortes se lavaron con PBS 3 veces por 5 minutos y se procedió a incubar con el  
104 reactivo Vectastain Elite ABC reagent, por 30 minutos. Finalmente se lavaron 3 veces por 5 minutos  
105 con PBS 1X. La detección cromogénica se realizó incubando en solución diaminobencidina (DAB)  
106 0,5% en PBS, a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego la muestra histológica se lavó con PBS  
107 1X y seguidamente se tiñó para contraste nuclear con hematoxilina 10% y ácido bórico 1%.  
108 Seguidamente, se deshidrató en una batería creciente de etanol y se diafanizó con xilol. Finalmente, los  
109 cortes se montaron con resina Entellan (Merck). El análisis microscópico y captura de imágenes  
110 digitales se efectuó utilizando un microscopio Olympus modelo CX31.

111

112 Análisis de densitometría óptica integrada.

113 El análisis de densitometría óptica integrada fue realizado a través del programa de procesamiento  
114 de imágenes Image-Pro Plus 6.0<sup>®</sup>, (Mediacybernetics, USA) de acuerdo al perfil de medición de  
115 densidad óptica integrada (IOD) operacionalizado en el programa. Se evaluaron un total de 5 sectores  
116 por imagen digital en las preparaciones de los 3 animales analizados por raza, se presenta como  
117 resultado el promedio de densidad óptica del total de mediciones por raza (OD mean).

118

#### 119 Análisis estadístico

120 La significancia estadística de las diferencias de los valores de densidad óptica integrada (OD) por  
121 se evaluó mediante el método de T- de Student, considerando un nivel de significancia del 95%  
122 ( $p < 0,05$ ), utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc, USA).

#### 123 RESULTADOS

124 El análisis inmunohistoquímico realizado muestra expresión del RE- $\alpha$  en tejido endometrial de  
125 ambas razas (Figura 4). Se aprecia cualitativamente una mayor expresión en tejido endometrial de  
126 ovejas de raza Texel (Figura 1). La mayor intensidad del marcaje inmunohistoquímico se aprecia a  
127 nivel de la zona glandular basal en ambas razas (Figura 4). También hay expresión visual en menor  
128 proporción en la región glandular luminal, epitelio de revestimiento y en células estromales (Figura 1).  
129 Desde el punto de vista del análisis densitométrico, los resultados muestran que en tejido endometrial a  
130 nivel de capa basal de ovejas de raza Araucana (Figura 2), existe una mayor densidad óptica que en la  
131 capa luminal, con una diferencia de alrededor de 0,02 unidades de OD. En raza Texel, la densidad  
132 óptica es superior en la capa basal que en la luminal (Figura 3), y entre ambas razas, Texel posee  
133 mayores valores de OD en las 2 capas de entre 0,04 y 0,07 unidades de OD (Figura 4). A nivel de  
134 glándulas, las ovejas de raza Texel poseen mayor densidad óptica (Figura 5), mostrando diferencias de  
135 alrededor de un 0,08. Con respecto a la medición de OD en miometrio (Figura 6) en ambas razas, existe  
136 una diferencia de alrededor de 0,03 unidades de OD. Esto se repite en la medición de la zona estromal  
137 (Figura 7), mostrando mayores valores en raza Texel, difiriendo en aproximadamente en la mitad de la  
138 OD. Finalmente, a nivel de epitelio de revestimiento (Figura 8) existe una diferencia de OD de  
139 aproximadamente 0,05 unidades de OD, siendo mayor en raza Texel.

140

#### 141 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

142 En las ovejas como en los demás mamíferos, los estrógenos juegan un rol fundamental en la  
143 diferenciación sexual y en los mecanismos reproductivos. El número y afinidad de los receptores por la  
144 hormona determina los efectos morfo-funcionales relacionados con la función reproductiva (Meikle y  
145 col, 2004). Se ha observado en el tracto reproductivo de la oveja, la presencia de receptores de  
146 estrógeno  $\alpha$  y  $\beta$ , y se cree que el primero media la acción estrogénica en sistema reproductivo (Ing y  
147 Ott, 1999). Algunos estudios recientes señalan que la expresión de RE- $\alpha$  en el sistema reproductivo de  
148 ovejas de raza Texel a nivel transcripcional se presenta una distribución histológica similar a lo visto en  
149 otras razas, sin embargo, no se analiza las diferencias de expresión a nivel de raza o zona histológica a  
150 nivel endometrial (Vasconcellos y col, 2012). De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio la  
151 expresión evaluada cuantitativamente mediante la estimación de la ODI en las imágenes digitales  
152 registradas con similares parámetros ópticos fue mayor en ovejas de raza Texel. La expresión de  
153 receptores de RE- $\alpha$  en animales adultos está asociada a mecanismos de diferenciación y proliferación  
154 celular que hacen posible la funcionalidad reproductiva sin embargo, no está claro aún la presencia de  
155 receptores en hembras ovinas prepúberes (Meikle y col 2004). Más aún considerando otros mamíferos  
156 no expresan receptores durante la etapa prepuberal (Vasconcellos y col, 2005). Según los resultados  
157 obtenidos en este trabajo existen claras diferencias en la expresión inmunohistoquímica entre una raza  
158 de alta prolificidad como Texel (Riquelme, 2005; Vasconcellos y col, 2011) respecto a una de baja  
159 prolificidad como la Araucana, lo cual podría sugerir que las diferencias en niveles de expresión en  
160 ovejas prepúberes podría estar relacionada con prolificidad en estas razas, ya que algunos trabajos  
161 asocian la baja expresión del RE- $\alpha$  con cambios en la sensibilidad endometrial a las hormonas  
162 esteroidales, lo que impediría un desarrollo uterino adecuado y una baja prolificidad (Lozano y col,  
163 1997; Sosa y col, 2004; Abecia y col, 2006; Vasconcellos y col, 2009b). De este modo, una oveja  
164 prépuber con mayores niveles de expresión de receptores podría tener una respuesta más eficiente  
165 frente al impacto hormonal durante sus ciclos reproductivos, y esto podría traducirse en un mayor nivel  
166 de prolificidad.

167 Un estudio que evalúe la expresión del RE- $\alpha$  en un grupo numeroso de razas con alta y baja  
168 prolificidad posiblemente permitiría validar de mejor forma esta hipótesis del punto de vista de la  
169 correlación de estas 2 variables. Los resultados de este trabajo permiten concluir que la expresión del  
170 RE- $\alpha$  presenta una distribución amplia a nivel celular en el tejido endometrial, pero con diferencias  
171 importantes en cuanto a la intensidad de la expresión, también se pone en manifiesto diferencias  
172 significativas de la expresión del RE- $\alpha$  entre ovejas prepúberes de la misma edad y condición

173 fisiológica de razas de alta y baja prolificidad. Se sugiere una posible relación entre la intensidad de la  
174 expresión y la prolificidad.

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

## 205 RESUMEN

206 Dentro de la reproducción ovina, la alta tasa de fertilidad constituye un rasgo deseable entre los  
207 criadores. La combinación de factores genéticos y ambientales en los individuos ovinos incide  
208 directamente sobre la prolificidad de las hembras. Existen razas ovinas de alta prolificidad, como  
209 Texel y otras de prolificidad estándar, lo cual demuestra que la genética particular de estas razas  
210 influye sobre sus aspectos reproductivos, sin embargo no existe mucha información sobre qué  
211 elementos de la expresión genética están correlacionados con la fertilidad. En animales poliéstricos,  
212 la existencia de mecanismos de reproducción está mediada por hormonas sexuales y sus receptores. En  
213 ovejas, el receptor de estrógeno (RE- $\alpha$ ) se encuentra ampliamente distribuido en el sistema  
214 reproductor. En este estudio se realiza una comparación de expresión inmunohistoquímica del RE en  
215 endometrio de ovejas prepúberes de raza Texel y Araucana, por medio de la medición de la densidad  
216 óptica (OD) en sectores determinados del endometrio. Los resultados indican que existe una diferencia  
217 significativa entre la expresión del RE en endometrio de ovejas de raza Texel y Araucana, siendo  
218 mayor en todos los sectores evaluados en ovejas prepúberes de raza Texel. La existencia de esta  
219 diferencia puede ser atribuida a múltiples factores, alimentación, fotoperiodo, pero esencialmente a la  
220 genética propia característica de cada raza.

221

222 PALABRAS CLAVES: RE- $\alpha$ , inmunohistoquímica, prolificidad, endometrio.

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

## 237 AGRADECIMIENTOS

238 Se agradece al Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal (LINBA) de la Universidad de  
239 La Frontera por el apoyo en el uso de su infraestructura y utilización de reactivos para la realización de  
240 este trabajo. Se agradece a la Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera, Temuco,  
241 Chile, por el apoyo económico entregado, mediante el proyecto DIUFRO.

## 242 REFERENCIAS

243 Abecia, J A Sosa, C Forcada, F & Meikle, A. The effect of undernutrition on the establishment of  
244 pregnancy in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.*, 46:367-78, 2006.

245  
246 Andrews E J, B T Bennett, J D Clark, K A Houpt, P J Pascoe, G W Robinson, J R Boyce. 1993.  
247 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medical*  
248 *Association* 202 (2), 229-249.

249 Bolant B, M A Calvo, D Cejalvo, L O Gimeno, L Gimeno, J M Lloris. 1990. La eutanasia en los  
250 animales de laboratorio. Centro de investigación. Hospital General Universitario de Valencia.  
251 *Research in surgery*, suplemento 5.

252 Cherny, R. A. Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the endometrium of the ewe.  
253 *Reprod. Fertil. Dev.*, 3:321-31. 1991.

254

255 Gnanalingham M G, A Mostyn, M E Symonds, T Stephenson. 2005. Ontogeny and nutritional  
256 programming of adiposity in sheep: potential role of glucocorticoid action and uncoupling  
257 protein-2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, 1407–1415

258 Garfalo, E G & Tasende, C Uterine estrogen and progesterone receptors in prepuberal ewe distribution  
259 in myometrium, endometrium, and caruncles. *Vet. Res.*, 27:177-3, 1996

260 Ing, N. H.; & Ott, T. L. Estradiol up-regulates estrogen receptor- a messenger ribonucleic acid in sheep  
261 endometrium by increasing its stability. *Biol. Reprod.*, 60:134-9, 1999.

262

263 Meikle, A Tasende, C. Rodriguez, M & Garofalo, E. G. Effects of estradiol and progesterone on the  
264 reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology*,  
265 48:1105-13, 1997

266

- 267 Meikle A, Forsberg, M, Shalin, L, Masironi, B, Tasende, C, Rodriguez-Pinon, M. & Garofalo, E. G,  
268 A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor expression in the lamb  
269 uterus. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40: 283-93, 2000  
270
- 271 Meikle A, Garófalo E. G, Tasende C, Rodríguez-Piñón, Shalin, L. Regulation by gonadal steroids of  
272 estrogen and progesterone receptors along the reproductive tract in female lambs. *Acta Vet.*  
273 *Scand.*, 42:161-9, 2001.  
274
- 275 Meikle A, Tasende, C, Sosa, C y Garófalo, E. G. The rol of sex steroid receptors in sheep female  
276 reproductive physiology. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16(4):385-94, 2004.  
277
- 278 Muramatsu M and Inoue S: Estrogen receptors: How do they Control Reproductive and non  
279 reproductive functions. *Biochem. Biophys. Commun.* 270, 1-10-2000.
- 280 Riquelme, J. Medición de características productivas de ovinos de raza Texel del sector de Pillanlelbún  
281 en la IX Región. Tesis de grado, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile, 2005.  
282
- 283 Slayden, O D Hirst, J J & Brenner, R M Estrogen action in the reproductive tract of rhesus monkeys  
284 during during antiprogestin treatment. *Endocrinology*, 132:1845-56, 1993  
285
- 286 Vasconcellos, C A, Sepúlveda B N y Pacheco C C, Presencia de receptores de estrógeno, progesterona  
287 y de CBG en el tracto genital de ovejas y de perras. Estudio inmunocitoquímico. *Int. J.*  
288 *Morphol.*, 24(3):457-62, 2006.  
289
- 290 Vasconcellos, C. A.; Paredes, H M, Barrientos, V E, Olmazábal, S Y.; Núñez, R D, NAVARRETE, V  
291 J & Molina, E B Análisis de la expresión del receptor del estrógeno en endometrio de ovejas  
292 alimentadas con dieta normal y dieta suplementada. *Int. J. Morphol.*, 27(4):1093-1098, 2009b.  
293
- 294 Vasconcellos A, Paredes M, Núñez D, Barrientos E, Olmazabal Y, Navarrete, J & Molina B, Study of  
295 the Expression of Progesterone Receptors in the Endometrium of Ewes with Normal and  
296 Supplementary Diet. *Int. J. Morphol.*, 28(2):575-81, 2010.  
297

298 Vasconcellos, C. M.; Paredes, H. M, Hernández , V. C.; Muñoz, S. A. & Navarrete, J. Expresión de  
299 receptores de estrógenos y progesterona en el tracto genital de ovejas raza Texel. *Int. J.*  
300 *Morphol.*, 29(4):1268-1273, 2011.

301

302 Vasconcellos, C. A. & Paredes, H. M. Detección inmunohistoquímica del receptor de estrógeno en el  
303 endometrio de ovejas de alta prolificidad y de prolificidad estándar.

304 *Int. J. Morphol.*, 30(3):1090-1093, 2012.

305

306 Zhao Y, Williams LM, Hannah LT, Ross AW, McKelvey WAC, Robinson JJ: Oestrogen and  
307 progesterone receptor immunoreactivity and c-fos expression in the ovine cervix. *J. Reprod.*  
308 *Fert.* 1999, 115, 287-292

309

310

311

312

313

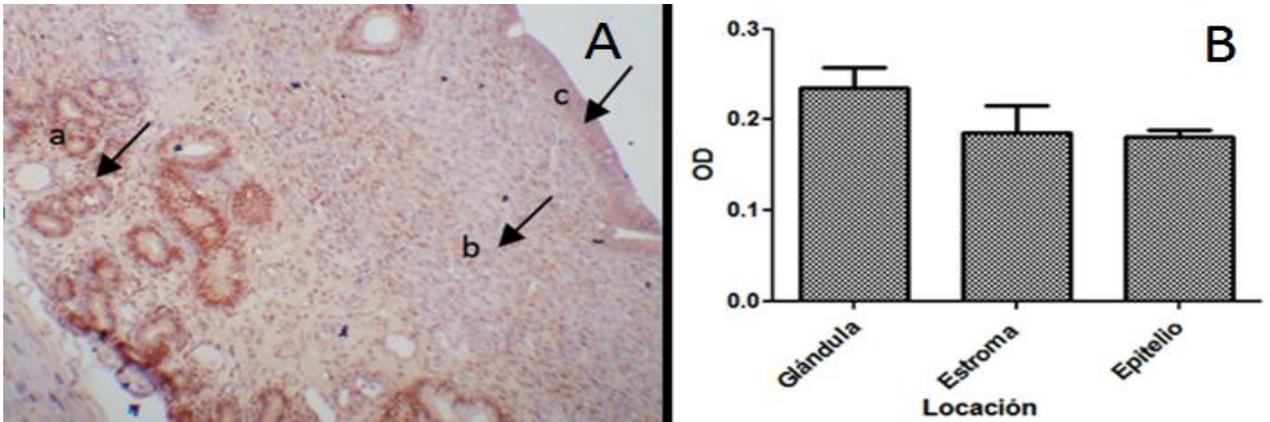
314

315

316

317

318

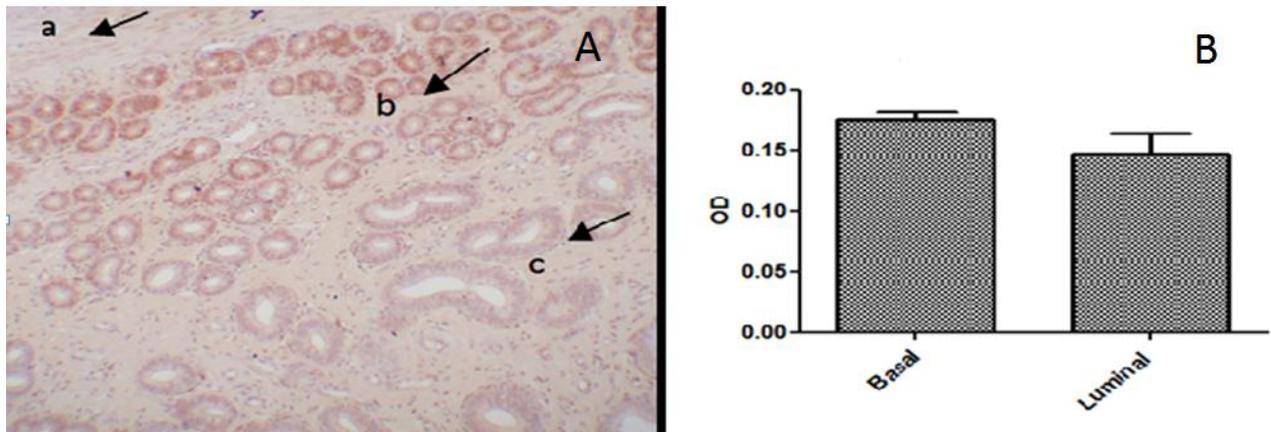


319  
 320 **Figura 1.** (A) RE-  $\alpha$  en endometrio de oveja prépuber de raza Texel. Se destaca inmunoreacción  
 321 intensa en glándulas de región intercaruncular (a), expresión moderada en zona caruncular aglandular  
 322 (b), e inmunoreacción leve en epitelio revestimiento (c) (40x). (B) Análisis de densitometría por óptica  
 323 integrada de las zonas destacadas en la fotografía "A" (n=5; p<0,05).

324

325 (A) ER- $\alpha$  in prepubertal Texel breed sheep endometrium. It highlights intense  
 326 immunoreactions in intercaruncular glands region (a), moderate expression in aglandular caruncular  
 327 area (b), and mild immunoreaction in lining epithelium (c) (X40). (C) Integrated optic densitometry  
 328 analysis for the highlighted area in "A" image. (n = 5, p < 0.05).

329

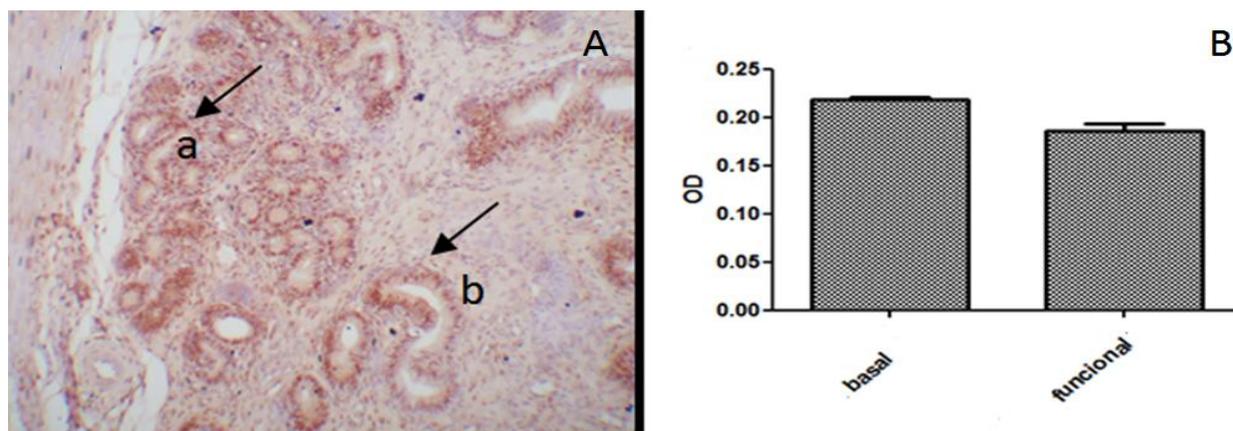


330  
 331 **Figura 2.** (A) RE-  $\alpha$  en endometrio de oveja prépuber raza Araucana. Se observa intensa  
 332 inmunoreacción en las glándulas de la zona basal que se va haciendo menos intensa hacia la superficie.  
 333 Hay inmunoreacción leve en el miometrio vecino (40X) (B) Análisis de densitometría por óptica  
 334 Integrada de las zonas destacadas en la fotografía "A" (n=5; p<0,05).

335

336 (A) ER- $\alpha$  in prepubertal Araucana breed sheep endometrium. Intense immunoreaction  
 337 was observed in the glands of the basal area and it becomes less intense toward the surface. There is  
 338 slight immunoreaction in neighboring myometrium (X40) (B) Integrated optic densitometry analysis  
 339 for the highlighted area in "A" image. (n = 5, p <0.05).

340

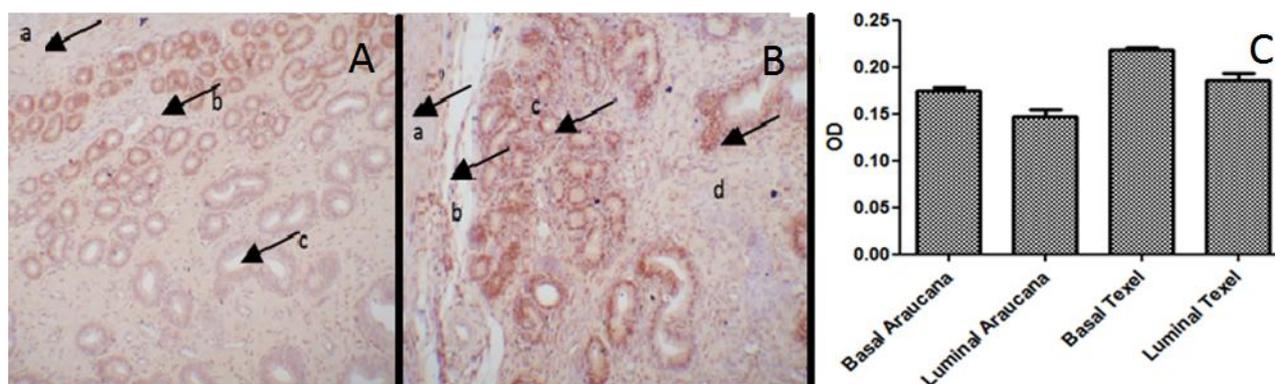


341

342 **Figura 3.** (A) RE-  $\alpha$  en endometrio de oveja prépuber raza Texel. Se observa intensa  
 343 inmunoreacción en las glándulas de la zona basal que se va haciendo menos intensa hacia la superficie.  
 344 Hay inmunoreacción leve en el miometrio vecino. (X40) (B) Integrated optic densitometry analysis for  
 345 the highlighted areas in "A and B" images. (n = 5, p <0.05).

346 (A) ER- $\alpha$  in prepubertal sheep endometrium Texel breed. Intense immunoreaction was  
 347 observed in the glands of the basal area and it becomes less intense toward the surface. There is slight  
 348 immunoreaction in the neighbor myometrium. (x40) (B) Integrated optic densitometry analysis for the  
 349 highlighted area in "A" image. (n = 5, p <0.05).

350



351

352 **Figura 4.** (A) RE-  $\alpha$  en endometrio de ovejas prépuberes Araucana. Se observa intensa  
 353 inmunoreacción en las glándulas de la zona basal que decrece en intensidad hacia la superficie en  
 354 ambas razas (X40). (B) endometrio de ovejas raza Texel en “a” la capa del miometrio formada por  
 355 musculatura lisa, en “b” la zona luminal glandular de tipo cilíndrica y en “c” zona luminal glandular  
 356 (X100) (C) Análisis de densitometría por óptica Integrada de las zonas destacadas en la fotografía “A y  
 357 B” (n=5; p<0,05).

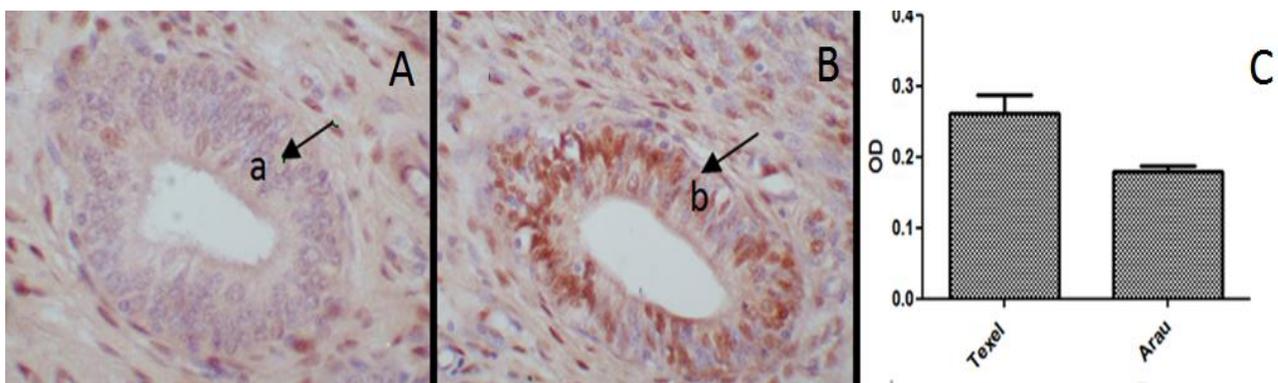
358

359 (A) ER- $\alpha$  in Texel and Araucana prepurbertal sheep endometrium. Intense  
 360 immunoreaction was observed in the glands of the basal area and it becomes less intense toward the  
 361 surface in both races (X40). In (B) shown in "a" the myometrial layer consisting in smooth muscle in  
 362 "b" cylindrical type luminal glandular area and in "c" glandular luminal area (X40) (C) Integrated optic  
 363 densitometry analysis for the highlighted areas in "A and B " images. (n = 5, p <0.05).

364

365

366



367

368 **Figura 5.** (A y B) RE-  $\alpha$  en glándulas endometriales de ovejas prépuberes. Podemos observar en (A)  
 369 una glándula de oveja Araucana con células levemente inmunoreactivas. En (B) una glándula de oveja  
 370 Texel con células intensamente inmunoreactiva. Se observa inmunoreacción en algunas células  
 371 estromales vecinas (x100). (C) Análisis de densitometría por óptica Integrada de las zonas destacadas  
 372 en la fotografía “A y B” (n=5; p<0,05).

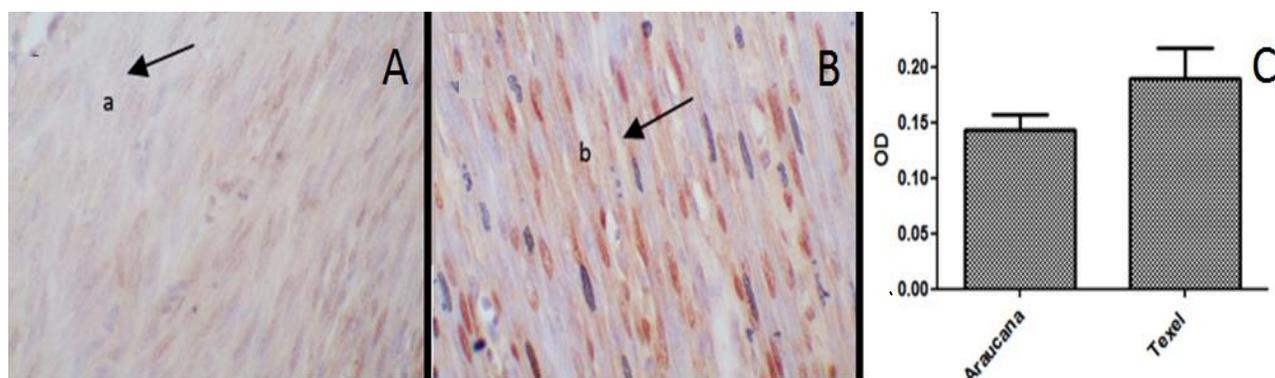
373

374

375 (A and B) ER- $\alpha$  in endometrial glands of prepubertal sheeps. We can see in (A) a Sheep  
 376 Araucana gland slightly immunoreactive. In (B) a Texel Sheep gland intensely immunoreactive.  
 377 Immunoreaction was observed in some neighboring stromal cells (x100). (C) Integrated optic  
 378 densitometry analysis for the highlighted areas in "A and B" images. (n = 5, p <0.05).

379

380



381

382 **Figura 6.** (A y B) RE-  $\alpha$  en miometrio de oveja prépuber. Podemos observar en (A) miometrio de  
 383 oveja Araucana fibras musculares levemente inmunoreactivas. En (B) miometrio de oveja Texel fibras  
 384 musculares intensamente inmunoreactivas (x40). (C) Análisis de Densitometría por Óptica Integrada de  
 385 las zonas destacadas en la fotografía "A y B" (n=5; p<0,05).

386

387 (A and B) ER- $\alpha$  in myometrium of prepubertal sheeps. We can observe in (A) Araucana sheep  
 388 myometrium muscle fibers slightly immunoreactives. In (B) Texel sheep myometrium muscle fibers  
 389 intensely immunoreactives (x40). (C) Integrated optic densitometry analysis for the highlighted areas in  
 390 "A and B" images. (n = 5, p <0.05).

391

392

393

394

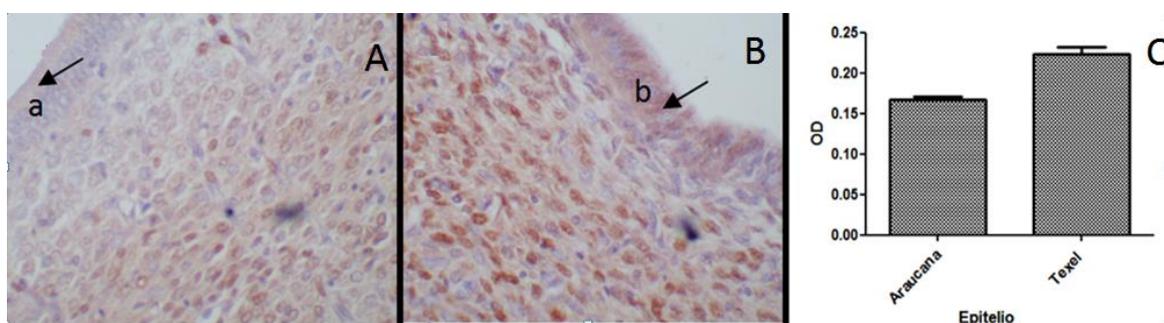
395 **Figura 7.** (A y B) RE-  $\alpha$  en endometrio de ovejas prepúberes. Se observa en (A) células estromales de  
 396 oveja de raza Texel intensamente inmunoreactivas (x40) y en (B) células estromales de oveja raza  
 397 Araucana levemente inmunoreactivas (C) Análisis de Densitometría por Óptica Integrada de las zonas  
 398 destacadas en la fotografía "A y B" (n=5; p<0,05).

399

400 (A and B) ER- $\alpha$  in prepubertal sheep endometrium. It is noted in (A) Texel sheep stromal  
 401 cells intensely immunoreactive (x40) and (B) Araucana sheep stromal cells slightly immunoreactive  
 402 (C) Integrated optic densitometry analysis for the highlighted areas in "A and B" images. (n = 5, p  
 403 <0.05).

404

405



406 **Figura 8.** (A y B) RE-  $\alpha$  en tejido epitelial de ovejas prepúberes. Podemos observar en (A) epitelio de  
 407 revestimiento en endometrio de oveja Araucana levemente inmunoreactivo y en (B) epitelio de  
 408 revestimiento de oveja Texel intensamente inmunoreactivo (x100). (C) Análisis de Densitometría por  
 409 Óptica Integrada de las zonas destacadas en la fotografía "A y B" (n=5; p<0,05).

410

411 (A and B) ER- $\alpha$  in epithelial tissue of prepubertal sheeps. We can observe in (A) Araucana  
412 sheep endometrial epithelium coating slightly immunoreactive and in (B) Texel Sheep coating  
413 epithelium intensely immunoreactive (x100). (C) Integrated optic densitometry analysis for the  
414 highlighted areas in "A and B" images. (n = 5, p <0.05).

415

416