

CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL PROTEICO EN EL FLUIDO LUMINAL UTERINO DURANTE EL CICLO ESTRAL EN VACAS DOBLE PROPÓSITO

Characterization of the Protein Profile in the Uterine Luminal Fluid During the Estrous Cycle of Dual Purpose Cows

José Rodríguez-Márquez¹, Mario Riera¹, Gladys Hidalgo¹, Roneisa Morales-Piñero², Roberto Palomares³ y Julio Boscán³

¹ *Unidad de Investigaciones de Ciencias Morfológicas (UNICIM). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Maracaibo 4005-A. Estado Zulia. Venezuela. E-mail: jmrodrim@cantv.net; jose.rodriguez@fcv.luz.edu.ve.*

² *Dpto. Socioeconómico. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia.*

³ *Unidad de Investigación en Reproducción Animal.*

Resumen

Con el objetivo de conocer las características fisiológicas de adaptación del tracto reproductivo de vacas doble propósito, es evaluado el patrón de secreción de proteínas en el fluido luminal uterino (FLU) durante el ciclo estral (CE) bajo diferentes ambientes hormonales. Para ello se realizó una investigación de tipo experimental con 16 vacas doble propósito clínicamente sanas. Se obtuvieron muestras de FLU mediante lavados, la composición proteica se determinó mediante el método de Bradford, seguido de electroforesis y coloreadas con comassie. El método estadístico utilizado consistió en estadística descriptiva y correlaciones. Aproximadamente, 16 fracciones de proteínas del FLU bovino fueron determinadas al calcular la movilidad relativa en geles de 11 y 15% de poli-acrilamida comparadas con proteínas de pesos moleculares conocidos (7,1 a 209 kDa). Una proteína de peso molecular de 7 kDa fue encontrada únicamente en el día cero del CE de vacas doble propósito, es decir, bajo dominio de estradiol-17 β (E₂). Bajo dominio de niveles sanguíneos altos de progesterona (P₄) se encontró una proteína de 20 kDa, sugiriendo que su síntesis está bajo la influencia de la P₄. Asimismo, bajo este dominio se encontró una proteína de 40 kDa, coincidente con el peso molecular del factor de permeabilidad vascular. Una proteína de 66 kDa fue encontrada en ambas fases del CE con predominio de los valores bajo dominio estrogénico, lo cual puede ser el resultado de los cambios hormonales con significativa de mayor proporción en el estro. Con base en lo anterior se puede concluir que existe variación en la cantidad y patrón de proteínas del FLU de vacas doble propósito, de acuerdo al dominio hormonal, siendo mayor el número al día 0 del CE, por lo que el E₂ tendría mayor influencia en la secreción de proteínas endometriales.

Palabras clave:

Vaca, ciclo estral, doble propósito, fluido luminal uterino, proteínas.

Abstract

In order to know the adaptative physiological characteristics used by the reproductive tract of dual purpose crossbred cows, the pattern of secretion uterine proteins from the uterine fluid during the estrous cycle (EC) under different hormonal domains were studied. Sixteen crossbred cows clinically healthy were included in this research.

Uterine fluid samples were taken through uterine lavages done on these 16 cows. The protein composition was determined through the Bradford method, followed by electrophoretic techniques and then stained with comassie. Statistical analyses included correlations and descriptive statistical methods. Approximately, 16 different protein fractions were found in samples of uterine luminal fluid placed in 11 and 15% polyacrylamide gels and compared with the mobility of molecular weight proteins (7.1 to 209 kDa). A 7 kDa protein was found only on day 0 of the EC of crossbred dual purpose cows, that is, under estrogenic control. Mean while, under progesterone (P_4) control, a 20 kDa protein, suggesting that its synthesis is under the influence of P_4 . A 40 kDa protein was also found under P_4 dominance, which is similar in molecular weight to the vascular permeability factor. A protein of 66 kDa was found in both phases of the EC, but with higher values under estrogenic dominance which could be the result of a more significant hormonal change during estrus. In conclusions, there were variations in the quantity and pattern of proteins found in the uterus luminal fluid of cows depending on the stage of the EC, being day 0 of the EC the day that showed the greatest amount of protein measured. This suggests that estrogens (E_2) would have the greatest influence in the secretion of endometrial proteins.

[Frame 15](#)

Key words:

Cow, estrous cycle, dual purpose, uterine luminal fluid, proteins.

INTRODUCCIÓN

Existen varias proteínas uterinas cuya secreción está condicionada al estatus de esteroides, tales como estrógenos (E_2) y progesterona (P_4) [10], en tal sentido, la tasa de secreción de proteínas debe cambiar entre las diferentes fases del ciclo estral (CE). El E_2 desempeña un papel esencial en la secreción de proteínas uterinas en la oveja (*Ovis aries*), pues *in vitro* se demostró que el tejido uterino de ovejas tratadas con estrógenos tuvo un incremento general en la capacidad sintética de proteínas, efecto no encontrado en animales tratados con P_4 , la cual sin embargo, también interfiere con la secreción de algunas proteínas [10]. Por otro lado se sabe que, la P_4 tiene influencia sobre la secreción de proteínas, ya que las proteínas de la leche uterina son sintetizadas y liberadas desde el epitelio endometrial en cantidades copiosas después de la implantación en animales gestantes y cuando los animales ovariectomizados son tratados con P_4 , pero este incremento sólo fue visto luego del día 14 de iniciada la terapia de P_4 y fue mayor al día 30 [14]. Los estrógenos también causan síntesis y liberación de proteínas uterinas durante el estado inicial de la gestación [9], e inducen específicamente la expresión del factor de crecimiento insulínico I en células uterinas [6]. La P_4 regula la síntesis del factor de crecimiento epidérmico [13], el cual aumenta el número de receptores para P_4 favoreciendo su acción [24]. La P_4 también ejerce un efecto indirecto sobre la regulación uterina del desarrollo del *conceptus*, a través de la secreción de factores de crecimiento endometriales locales. La secreción y liberación de estos factores de crecimiento ocurre durante el periodo peri-implantación, de allí que jueguen un importante papel en el desarrollo del *conceptus* y útero durante la gestación [11].

La tasa de secreción de las proteínas uterinas es influenciada por hormonas esteroideas ováricas [10]. Ing y col. [14] reportan que el tratamiento con E_2 induce la maduración del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso en las células epiteliales glandulares y la combinación de E_2 - P_4 mantiene la diferenciación del aparato secretorio.

En la vaca (*Bos taurus - indicus*) también se ha estudiado el perfil de proteínas liberadas del endometrio durante el CE; sin embargo, en animales de zonas templadas y razas puras, hay limitada información de la composición de las proteínas de estos fluidos. En trabajos previos se reporta que la proporción de proteínas liberadas fue afectada por los días del CE [25]. Anteriormente, en esta misma especie Godkin y col. [12], demostraron por electroforesis que durante el período de peri-implantación (días 14 al 38) se sintetizan cuatro grupos de proteínas ácidas de bajo peso molecular y un grupo de proteínas ácidas de alto peso molecular, el número y concentración cambió con el desarrollo del *conceptus*. Por todo lo anterior, se hace necesario conocer el perfil proteico del Fluido Luminal Uterino (FLU) de vacas doble propósito bajo condiciones tropicales, como punto de partida para conocer más de los procesos fisiológicos que se suceden durante el ciclo estral, a fin de poder lograr la manipulación del mismo, así como entender los posibles cambios en dicho perfil, lo cual sin duda servirá de base para la búsqueda de marcadores biológicos en vacas repetidores de servicio y con manifiesta ocurrencia de mortalidad embrionaria.

El objetivo de esta investigación fue caracterizar el perfil proteico del FLU bajo los diferentes dominios hormonales del ciclo estral en vacas doble propósito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un total de 16 vacas doble propósito (*Bos taurus x Bos indicus*) sexualmente maduras y regularmente ciclando.

Los días de la toma de muestras de FLU (días 0 y 16 del CE) se determinaron los niveles de P₄, las muestras de sangre fueron tomadas por venopunción de la caudal media en tubos al vacío estériles sin anticoagulante, siendo luego centrifugados (centrifuga con refrigeración. Eppendorf; 5417R; EUA), para separar el suero de los elementos formes. El suero se congeló a -20°C (freezer. Frigidaire; FFU2006DW; Frigidaire; Venezuela), hasta el momento de ser utilizado para la determinación de P₄ por radioinmunoanálisis (RIA) (Genesys Gamma 1™. Single Well RIA Gamma Counter; Laboratory Technologies, Inc. Maple Park, EUA), para lo cual se utilizaron kits Coat-A-Count progesterone de la Diagnostics Products Corporation (DPC), EUA, que poseen una sensibilidad de 0,02 ng/mL y una reactividad cruzada muy baja con otros componentes presentes en la muestra. El coeficiente promedio de variación intraensayo fue del 8,012%, no se reporta variación interensayo debido a que sólo se utilizó un Kit.

Las muestras del FLU fueron tomadas los días cero (0) y dieciséis (16) del ciclo estral, por lavados de los cuernos uterinos con NaCl 0,15M, mediante el uso de un catéter de Foley. Las muestras fueron transferidas a tubos estériles, adicionándoles inhibidores de proteasas para evitar la degradación de las proteínas. Posteriormente se centrifugaron para remover el material insoluble a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C (centrifuga con refrigeración. Eppendorf; 5417R; EUA), y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta ser analizado [7]. La concentración total de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) revisado por Smith [22], el cual permite cuantificar de 60 a 300 µg de proteínas.

La separación de las proteínas se llevó a cabo utilizando electroforesis 1D-SDS-PAGE, mediante el uso de una cámara de electroforesis modelo MINI PROTEAN III, Bio-Rad, EUA, aplicando el método discontinuo de Laemmli [5], para ello se usó un gel separador, el cual fue preparado a 11 y 15% de acrilamida y un gel concentrador preparado al 5%. Las proteínas fueron desnaturalizadas por calor (5' a 100°C) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 2-mercaptoetanol.

Así mismo, se separaron utilizando electroforesis de dos dimensiones (2D-SDS-PAGE). Técnica que combina dos diferentes procedimientos de separación como el enfoque-isoeléctrico (EIE) en un tubo de gel, seguido por electroforesis en gel de poliacrilamida sulfato-dodecil-sódico (PAGE-SDS) en una dirección perpendicular, la cual puede ser usado para resolver más de 1.000 proteínas [2], basado en el procedimiento original de O'Farrell [20] revisado por Mozdzanowski y col. [19]. Después de la tinción, las proteínas aparecen al final en el gel de segunda dimensión como sitios redondos o elípticos, en lugar de la banda rectangular observada en los geles de una dimensión [19].

En el primer paso, las proteínas fueron separadas con base a su carga intrínseca. La muestra fue disuelta en una solución de detergente no iónico, junto con mercaptoetanol y el reactivo de urea desnaturalizante. Esta solución solubiliza, desnaturaliza y disocia todas las cadenas polipéptidicas, las cuales son separadas por el procedimiento llamado EIE, que depende del hecho que, la carga neta de una molécula de proteína varíe con el pH de la solución circunvecina, de manera que las proteínas son sometidas a electroforesis en un tubo delgado de gel de poliacrilamida, en el cual, un gradiente de pH es establecido por una mezcla de bufferes especiales, cada proteína se mueve a una posición en el gradiente que corresponde a su punto isoelectrico (PI) y se detiene allí [2].

En el segundo paso, los tubos delgados de gel que contienen las proteínas, fueron de nuevo sometidos a electroforesis. En esta fase, las proteínas fueron separadas de acuerdo a su tamaño, como en el PAGE-SDS de una dimensión: El tubo de gel delgado original se colocó en el borde de una lonja de gel de poliacrilamida SDS, en el cual cada cadena polipéptidica migra para formar un sitio discreto. Esta es la segunda dimensión de electroforesis en geles de poliacrilamida de dos dimensiones [2].

Las proteínas se estimaron por migración relativa comparadas con marcadores proteínicos de peso molecular conocido. La electroforesis fue llevada a cabo usando una cámara de electroforesis modelo MINI PROTEAN III, Bio-Rad, EUA. Las proteínas fueron coloreadas con azul brillante de Comassie, con un límite de detección de 0,3 a 1 µg de proteína por banda [21]. También se colorearon con plata no amoniacal.

Los datos fueron analizados a través de estadística descriptiva y análisis de correlación. Para el análisis de los perfiles electroforéticos de proteínas en los días 0 y 16 del ciclo estral, se determinó el comportamiento de la variabilidad mediante el empleo de análisis multivariado, determinando el coeficiente de similaridad y la distancia entre pares de variables, para lo cual los geles fueron cuantificados por una función indicadora, asignando el valor 1 si la banda estaba presente y 0 (cero) si no estaba [16].

Todos los datos fueron procesados mediante el uso del paquete estadístico computarizado, Minitab 15 [17].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Niveles de progesterona en las vacas doble propósito los días 0 y 16 del ciclo estral

Los niveles de progesterona medidos mediante RIA, los días 0 y 16 del CE de las vacas, mostraron una diferencia estadística significativa ($P < 0,001$) entre los dos días del CE estudiados, encontrándose un promedio para el día 0 de 0,7375 ng/mL y para el día 16 de 3,675 ng/mL (FIG. 1).

Contenido total de proteínas del FLU

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración total proteica por el método de Bradford, de la cual se obtuvo una confiabilidad del 99,6% ($r = 0,9962$) en el presente estudio, revelaron una mayor concentración total de las proteínas en el día cero (dominio estrogénico) respecto al día 16 (dominio progestacional) del CE de vacas doble propósito, resultados que demuestran una diferencia del efecto del dominio hormonal sobre la secreción de proteínas hacia el lumen uterino en vacas doble propósito, posiblemente porque los estrógenos estimulan la maduración del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso en las células epiteliales glandulares. Resultados similares fueron reportados por Findlay y col. [10].

Perfil de proteínas del FLU durante el CE de vacas doble propósito por electroforesis de 1D-SDS-PAGE

Existen características que pueden ser del orden fisiológico, como la determinación de proteínas en el FLU bajo los diferentes estatus endocrinos que gobiernan el CE de estos animales, las cuales serían responsables del acondicionamiento de un medio ambiente intrauterino favorable, conducente a un proceso satisfactorio de implantación embrionaria y la obtención de descendencia viable, a su vez pudiendo servir de marcador(es) biológico(s) de receptividad uterina.

Frame_37_26.JPG

Aproximadamente 16 fracciones de proteínas del FLU bovino fueron determinadas al calcular la movilidad relativa en geles de 11 y 15% de poliacrilamida comparadas con proteínas de pesos moleculares conocidos (7,1 a 209 kDa).

Entre los dos días del CE estudiados (días 0 y 16), se encontró una diferencia de 18%, representada por la presencia de dos proteínas de alto peso molecular ~159 y 117 kDa al día 0 y no al día 16 del CE. Otra diferencia responde a una mayor concentración de proteínas individuales al día 0 respecto al día 16, notado en las proteínas de 66 y de 55 kDa, y principalmente en las menores de 50 kDa. Contrariamente al día 16 se encontró una proteína de ~140 kDa, no identificada en el día 0 del CE.

Así mismo, el día 0 del CE, fase bajo dominio del E_2 , se encontró una proteína con peso molecular de 7 kDa (FIG. 2), que no se observó el día 16. Esto demuestra la influencia del E_2 sobre la síntesis de esta fracción de proteína. Estos resultados no coinciden con los de Alavi-Shoushtari y col. [1], quienes reportaron que la proteína de menor peso en esta fase estrogénica fue de 38 kDa. Sin embargo, esta última también fue encontrada en el presente trabajo, en mayor abundancia en la fase de dominio de los estrógenos, que en la de dominio de la P_4 .

Bajo dominio de niveles sanguíneos altos de progesterona se encontró una proteína de 20 kDa, sugiriendo que su síntesis está bajo la influencia de esta hormona, toda vez que no fue encontrada el día 0 del CE estudiado, resultados que coinciden con lo reportado por Alavi-Shoushtari y col. [1], quienes trabajaron con úteros de matadero. Por otro lado, bajo este dominio se encontró una proteína de 40 kDa, coincidente con el peso molecular del factor de permeabilidad vascular, el cual promueve el crecimiento de células endoteliales siendo un candidato para mediar el incremento de la permeabilidad y el crecimiento de vasos sanguíneos, contribuyendo en el acondicionamiento del medio ambiente intrauterino, así como en el desarrollo y establecimiento de la placenta y por lo tanto en el establecimiento de la gestación en caso de que el animal quede gestante.

Una proteína de 66 kDa fue encontrada durante ambas fases del CE con predominio de los valores el día 0 del CE, lo cual puede ser el resultado de los cambios hormonales con significativa mayor proporción en el estro (dominio de los estrógenos), pues el E_2 desempeña un papel esencial en la secreción de proteínas uterinas, *in vitro* se demostró que el tejido uterino de ovejas tratadas con estrógenos tuvo un incremento general en la capacidad sintética de proteínas, efecto no encontrado en animales tratados con P_4 , la cual sin embargo, también interfiere en la secreción de algunas proteínas [10]. En otros estudios también se demuestra que la influencia del E_2 es indispensable en la

secreción de proteínas uterinas principalmente en combinación con la P₄ ya que el patrón de secreción de proteínas depende de la presencia de E₂ y P₄ [18].

Perfil proteico del flu durante el CE de vacas doble propósito por electroforesis 2D-SDS-PAGE

La especificidad de la separación de proteínas mediante electroforesis 2D-SDS-PAGE, permitió establecer un patrón más detallado sobre el perfil proteico del FLU de vacas doble propósito bajo las diferentes condiciones de este estudio. Con electroforesis de 2D se logra obtener otra característica importante de diferenciación entre proteínas, como es su punto isoeléctrico además del peso molecular. En este aspecto se encontraron diferencias individuales mínimas entre los animales del mismo día del CE estudiado, por lo que para el análisis de la electroforesis 2D-SDS-PAGE, los perfiles obtenidos en los diferentes animales se agruparon para cada día del CE. Las condiciones experimentales (concentración de acrilamida y anfolitos) para 2D-SDS-PAGE permitió visualizar proteínas entre 6,5 y 205 kDa, con un rango de PI, de 3,6 a 9,5, de modo que se pudieron establecer diferencias más puntuales como se muestra a continuación.

El día 0 del CE se identificaron, en promedio, 150 proteínas, encontrándose varias proteínas (~24), de las cuales, dos proteínas de pH bajo, una de ~7,7 kDa coincide con el PM del IGF-I, y otra de ~6,5 kDa, que coincide con el del EGF, los cuales actúan como potentes mitógenos. El IGF-I, por sí sólo, es a menudo débilmente estimulador de la proliferación celular pero marcadamente potencia la actividad de otros mitógenos tales como el EGF [8], lo que explica la expresión conjunta de estos dos factores de crecimiento. Por otra parte su secreción sería favorecida posiblemente por la acción local del E₂, que induce específicamente la secreción de IGF-I por las células uterinas y que a su vez actúa localmente para estimular la síntesis de EGF en el útero.

Frame_50.JPG

El perfil de proteínas del FLU, obtenido a través de electroforesis 2D-SDS-PAGE, el día 16 del CE (fase bajo dominio progestacional), se ilustra en la FIG. 3. Se observó que las proteínas predominantes en el FLU fueron una de pH alto (PI ~7,87) de ~25,7 kDa y un complejo de 3 proteínas del FLU con similar PM ~60 kDa, con un rango de PI de ~4,16 a 4,44.

En ninguno de los días estudiados del CE se encontró el par de proteínas secretorias endometriales inducidas por la P₄, tal como lo describen Liu y Hansen [15], quienes mencionaron que son responsables de inhibir la respuesta inmune celular; la no presencia de estas proteínas, principalmente el día 16 del CE, se debe a que sólo son detectadas en días posteriores del CE [3, 14], ya que la progesterona puede actuar como un pre-requisito para su síntesis y secreción. Los resultados anteriores indicarían que existen diferentes perfiles proteicos bajo dominio progestacional, en los cuales la P₄ regula la secreción de proteínas a nivel uterino. Debido a que al día 16 en el caso de preñez no se ha dado el reconocimiento materno de la gestación, lo que hace presumir que en este mismo día del CE, la P₄ actuaría preparando el medio ambiente intrauterino para una posible implantación, produciendo un aumento de la capilaridad así como la secreción de proteínas [23], sin embargo, la exposición del endometrio a la P₄, no solamente prepara el útero para la preñez, sino que también activa mecanismos para la producción endometrial de algunos factores, como el factor luteolítico PGF_{2a} en el caso de que la preñez no sea establecida [4].

CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que los dominios hormonales el día 0 (E₂) y 16 (P₄) del CE, afectan diferencialmente la secreción de proteínas en el lumen uterino en vacas doble propósito, siendo mayor el número de proteínas presentes el día 0 del CE, por lo que el predominio de el E₂ favorecería la secreción de un mayor número de proteínas endometriales.

Existen cambios temporales en la composición proteica del FLU en los diferentes estadios del CE de vacas doble propósito, debido a proteínas secretadas solamente en un estado del CE, de modo que se convierte en un requerimiento para el acondicionamiento del medio ambiente uterino en respuesta al estatus hormonal predominante.

AGRADECIMIENTO

Agradecimiento al Fondo Nacional de Ciencia, Investigación y Tecnología (FONACIT), por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]

ALAVI-SHOUSHTARI, S.; ASRI-REZAI, S.; ABSHHENAS. J. A study of the uterine protein variations during the estrous cycle in the cow: Molecular weights determination. **Anim. Reprod. Sci.** 105(3-4):302-310. 2008.

[2]

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Fractionation of cells and analysis of their moleculares. **Molecular biology of the cell.** 3rd. Ed. Garland Publishing, Inc. N. Y. & London. 1294 pp. 1994.

[3]

BAZER, F. W.; FIRST, N. L. Pregnancy and parturition. **J. Anim. Sci.** 57 (Suppl. 2): 425-459. 1983.

[4]

BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. Interferon Tau: A novel pregnancy recognition signal. **Amer. J. Reprod. Immunol.** 37: 412-420. 1997.

[5]

BOLLAG, D. M.; ADELSTEIN, S. J. Protein methods. John weley-liss, Inc. New York. 45-139 pp. 1993.

[6]

BRIGSTOCK, D. R.; HEAP, R. B.; BROWN K. D. Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. **J. Reprod. Fertil.** 85: 747-758. 1989.

[7]

BUHI, W. C.; ALVAREZ, Y. M.; SUDHIPONG, V.; DONES-SMITH, M. M. Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. **Biol. Reprod.** 43: 929-938. 1990.

[8]

CORP, A.N.; BROWN, K. D. Ligand-receptor interactions involved in the stimulation of swiss 3T3 fibroblasts by insulin-like growth factors and insulin. **Biochem. J.** 252: 119-125. 1988.

[9]

FAZLEABAS, A. T.; HILD-PETITO, S.; VERHAGE, G. Secretory proteins and growth factors of the baboon (*Papio Anubis*) Uterus: Potential roles in pregnancy. **Cell Biol. internat.** 18(12): 1145-1153. 1994.

[10]

FINDLAY, J. K.; ACKLAND, N.; BURTON, R. D.; DAVIS, A. J.; WALKER, F. M. M.; WALTERS, D. E.; HEAP, R. B. Protein, prostaglandin and steroid synthesis in caruncular and intercaruncular endometrium of sheep before implantation. **J. Reprod. Fertil.** 62: 361-377. 1981.

Frame_56.JPG

[11]

GEISERT, R. D.; Lee, C. Y.; Summen, F.; Zavy, M. T.; Fiss, A. E.; Bazer, F. W.; Simmen, R. C. M. Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor -I, II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Biol. Reprod.** 45: 975-983. 1991.

[12]

GODKIN, J. D.; LIFSEY, B. J.; GILLESPIE, B. E. Characterization of bovine *conceptus* proteins produced during the peri- and postattachment periods of early pregnancy. **Biol. Reprod.** 38: 703-711. 1988.

[13]

HARVEY, M. B.; LECO, K. J.; ARCELLANA, M. Y.; ZHANG, X.; EDWARDS, D. R.; SCHULTZ, G. A. Roles of growth factors during peri-implantation development. **Moll. Human. Reprod.** 10(3):712-718. 1995.

[14]

ING, N. H.; FRANCIS, H.; MC DONNELL, J.; AMANN, J. F.; ROBERTS, R. M. Progesterone induction of the uterine milk proteins: major secretory proteins of sheep endometrium. **Biol. Reprod.** 41: 643-654. 1989.

[15]

LIU, W. J.; HANSEN, P. J. Effect of the progesterone-induced serpin-like proteins of the sheep endometrium on natural-killer cell activity in sheep and mice. **Biol. Reprod.** 49(5): 1008-1114, 1993.

[16]

MARTÍNEZ, O. Análisis estadístico en biología molecular: uso y aplicación en poblaciones vegetales. **Simposio internacional de estadística en agricultura y medio ambiente.** CIAT, Palmira, Junio 23. Colombia. 153-171 pp. 1995.

[17]

MINITAB STATISTICAL SOFTWARE. Ver. 15. 2009.

[18]

MURRAY, M. K.; SOWER, S. A. Estrogen and progesterone- dependent secretory changes in the uterus of the sheep. **Biol. Reprod.** 47: 917-924. 1992.

[19]

MOZDZANOWSKI, J.; SPEICHER, D.; HARPER, S. Two-Dimensional Gel Electrophoresis. **Current protocols in Protein Science.** John Wiley & Sons, Inc. 10.4.1–30 pp. 1995.

[20]

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** 250 (10): 4007-4021. 1975.

[21]

SASSE, J.; GALLAGHER, S. R. Analysis of proteins: Detection of proteins, In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.) **Current Protocols in Molecular Biology.** John Wiley & Sons, Inc, New York, NY. 10.6.1-10.6.8 pp. 1991.

[22]

SMITH, J.A. Quantitation of proteins, *In:* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (Eds.), **Current Protocols in Molecular Biology.** John Wiley & Sons, Inc, New York, N.Y. Vol. 2.10.1.1–10.1.3 pp. 1994.

[23]

SONDERSTROM, B. Maternal recognition of pregnancy. 1996. Southern Illinois University Home Page SIUC College of Agriculture Home Page SIUC Animal Science, Food & Nutrition Home Page T.A. Winters Homepage. On line: <http://www.siu.edu/~tw3a/531mrp.htm>. 28/01/2009.

[24]

TAGA, M. Role of growth factors in the regulation of embryo development and implantation. **Nippon - Sanka - Fujinka-Gakkai-Zasshi**. 44(8): 939-948. 1992.

[25]

WILLIAMS, B. L.; GWAZDAUSKAS, F. C.; PEARSON, R. E. The effect of day of the estrous cycle, location of ovulatory structure, and progesterone on in vitro bovine endometrial secretions. **J. Dairy Sci.** 75(8): 2112-2118. 1992.