

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE SHOCK
TÉRMICO HSP90 EN ENDOMETRIO DE
YEGUAS ADULTAS**

por

**Ana Laura CAMACHO BENÍTEZ,
Rossana Lyle VASCONCELLOS QUEVEDO**

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
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Danilo Fila

Segundo miembro (tutor):

Graciela Pedrana

Tercer miembro:

Elizabeth Pechiar

Co-tutor

Paula Lombide

Fecha:

_____05/12/2016_____

Autores:

Ana Laura Camacho Benítez

Rossana Lyle Vasconcellos Quevedo

AGRADECIMIENTOS

De Ana Laura:

Infinitas gracias a Graciela Pedrana por su dedicación y paciencia para ayudarnos a realizar ésta tesis; por su ejemplo de lucha y trabajo en la vida; y a su familia. A nuestra co-tutora Paula Lombide por su constante disponibilidad. A todas las personas que trabajan en la Cátedra de Histología Embriología y Desarrollo por abrirnos las puertas y hacer que todo este trabajo fuera tan disfrutable. Al equipo de tesistas, que juntas aprendimos a trabajar en equipo. Al personal de Biblioteca de Facultad de Veterinaria. A Rossana mi compañera de tesis y amiga. A Sebastián Acuña, Javier Mirazo, Helena Katz, Oscar Jackson y todas aquellas personas que colaboraron con la realización práctica de éste trabajo. Gracias a mis amigas y compañeras de Facultad, por acompañarme a lo largo de mi carrera y por su amistad. Gracias a mis tíos, primos, ahijada, sobrina, abuelos, especialmente a mi abuela Rosa por su ayuda y compañía en gran parte de mi carrera. A Diego mi compañero y amor. Y el agradecimiento más especial a mis padres y a mi hermano, por todo el sacrificio que hicieron para que yo estudiara, y por el apoyo y amor incondicional. Gracias Dios.

De Rossana:

A mi padre, que me incentivó a empezar esta carrera; a mi abuelo por ser mi ejemplo y a Yaya por su perseverancia. A mi madre y hermano, que me aguantaron el malhumor; a mis hermanas de la vida por estar siempre a mi lado. A Nico, por acompañarme y darme para adelante; a mis jefes, compañeros y amigos de trabajo, por todo el apoyo incondicional. A Graciela por siempre tirar de la piola para demostrarnos seguridad en nosotras mismas. A mis amigas de facultad, que son un estímulo constante, y a Ana, por demostrarme que se puede aprender y disfrutar al mismo tiempo siempre que hacemos lo que nos gusta.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	10
SUMMARY.....	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Reproducción de la yegua	12
1.2 Factores reguladores de la actividad endometrial	12
1.3 Proteínas de Shock Térmico	13
1.4 HSP90	13
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Anatomía de aparato reproductor femenino	14
2.1.1. Ovarios	14
2.1.2. Trompa uterina	14
2.1.3. Útero	14
2.1.4. Cérvix	15
2.1.5. Vagina	15
2.1.6. Vestíbulo	15
2.1.7. Vulva	15
2.2. Fisiología reproductiva de la yegua	16
2.2.1. Fotoperíodo	16
2.2.2. Ciclo estral	17
2.2.2.1. Estro	17
2.2.2.2. Diestro	17
2.2.3. Control endócrino del ciclo estral de la yegua	17
2.2.4. Cambio fisiológicos del tracto genital durante el ciclo estral de la yegua	18
2.2.5. Receptores de estrógenos y progesterona en endometrio	19
2.3. Histología del endometrio en yeguas	20
2.3.1 Endometrio	20
2.3.1.1. Cambios histológicos del endometrio durante el ciclo estral de la yegua	21
2.3.1.2. Cambios durante el estro	21
2.3.1.3. Cambios durante el diestro	22
2.3.1.4. Cambios durante el anestro	22
2.3.2. Miometrio	22
2.3.3. Perimetrio	22
2.4. Proteínas de shock térmico	23

2.4.1. Proteínas de Shock Térmico 90	24
2.4.2. HSP90 en endometrio humano, roedores y rumiantes	26
3. OBJETIVOS	27
Objetivo general	
Objetivos específicos	
4. HIPÓTESIS	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Animales	28
5.2. Diseño experimental	29
5.3. Obtención de muestras	31
5.4. Procesamiento histológico	32
5.5. Técnica de inmunohistoquímica	32
5.6. Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica	33
5.7. Análisis cuantitativo digital de imágenes	33
5.8. Análisis morfométrico	33
5.9. Análisis estadístico	34
6. RESULTADOS	35
6.1. Resultados descriptivos de localización de la inmunoexpresión de HSP90 en epitelio de revestimiento endometrial de yeguas.	35
6.2. Resultados cuantitativos del porcentaje de área inmunomarcada de HSP90 en epitelio de revestimiento.	36
6.3. Resultados descriptivos de localización de la inmunoexpresión de HSP90 en Glándulas endometriales.	37
6.4. Resultados cuantitativos del porcentaje de área inmunomarcada de HSP90 en glándulas endometriales.	38
6.5. Resultados descriptivos de la inmunoexpresión de HSP90 en Estroma conjuntivo endometrial.	39
6.6. Resultados cuantitativos del porcentaje de área inmunomarcada de HSP90 en estroma conjuntivo endometrial.	40
6.7. Resultado descriptivo de la inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial.	41
6.8. Resultados cuantitativos del porcentaje de área inmunomarcada de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial.	42
6.9. Resultados de análisis morfométricos de endometrio de yeguas	43
6.9.1. Altura de epitelio de revestimiento endometrial	43
6.9.2. Diámetro de glándulas endometriales	45
6.9.3. Volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales	47
6.9.4. Volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo endometrial	49
6.10. Resumen de resultados	50
7. DISCUSIÓN	51
1- ¿Cómo se expresa la HSP90 en el epitelio endometrial de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?	51
2- ¿Cómo se expresa la HSP90 en las glándulas endometriales de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?	51

3- ¿Cómo se expresa la HSP90 en estroma endometrial de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?	51
4- ¿Cómo se expresa la HSP90 en el endometrio de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?	52
5- ¿Cómo varia la altura del epitelio de revestimiento endometrial de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?	52
6- ¿Cómo varia el diámetro de las glándulas endometriales en la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?	53
7- ¿Cómo varia el volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales en la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?	53
8- ¿Cómo varia el volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo endometriales en la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?	53
9- Consideraciones finales de la expresión de la proteína de shock térmico HSP90 en endometrio de yeguas en anestro y durante el ciclo reproductivo	54
8. CONCLUSIONES	55
9. BIBLIOGRAFÍA	56

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

- Figura 1. Esquema de la regulación hormonal del ciclo estral de la yegua donde se muestra la interrelación entre la glándula pineal; hipotálamo, glándula pituitaria y ovarios.....16
- Figura 2. Diagrama del ciclo estral de la yegua, con una duración promedio de 21 días, 4-7 días de estro y 14-15 días de diestro. La ovulación ocurre 1 o 2 días antes del fin del estro.....18
- Figura 3. Esquema de las capas del útero.....20
- Figura 4. Imagen histológica de endometrio de yegua donde se aprecia el epitelio luminal (flecha), estrato compacto (A) y estrato esponjoso (B) de la lámina.....21
- Figura 5. Estructura de HSP90 dímeros en estado abierto(Saibil, 2013).....24
- Figura 6. Esquema ilustrativo de la unión de HSP90 al receptor nuclear manteniéndolo inactivo, hasta la unión del ligando-receptor que lo activa, se transloca hacia el núcleo.....25
- Figura 7. Esquema ilustrativo de etapas reproductivas definidas por ultrasonografía y palpación rectal. Momento de extracción de biopsias endometriales (flechas negras). Meses en lo que se extrajo la muestra y sus respectivos n.30
- Figura 8. Pinza de biopsia (A) con la cual se extrajeron las muestras de endometrio de yeguas, útero de yegua (B) mostrando la unión cuerno-cuerpo uterino (círculo), de donde se extrajo la biopsia.....31
- Figura 9. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se marca la inmunexpresión de la proteína HSP90 en epitelio de revestimiento endometrial en color marrón. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 μ m.....35
- Figura 10. Inmunexpresión de HSP90 en epitelio endometrial de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).36
- Figura 11. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se marca la inmunexpresión de la proteína HSP90 en glándulas endometriales en color marrón. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 μ m.....37
- Figura 12. Inmunexpresión de HSP90 en glándulas endometriales de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).38
- Figura 13. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se marca la inmunexpresión de

la proteína HSP90 en el estroma conjuntivo endometrial en color marrón. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 μ m.....39

Figura 14. Inmunoexpresión de HSP90 en estroma conjuntivo endometrial de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....40

Figura 15. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se marca la inmunoexpresión de la proteína HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial en color marrón. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 μ m.....41

Figura 16. Inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....42

Figura 17. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se aprecia la altura del epitelio de revestimiento endometrial. Técnica de tinción H-E. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 μ m.....43

Figura 18. Altura de Epitelio de Revestimiento Endometrial de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....44

Figura 19. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se aprecia el diámetro de las glándulas endometriales. Técnica de tinción H-E. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 μ m.....45

Figura 20. Diámetro de Glándulas endometriales de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....46

Figura 21. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se aprecia la densidad de glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial. Técnica de tinción H-E. Magnificación final 40 aumentos. Barra de escala= 10 μ m.....47

Figura 22. Volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....48

Figura 23. Volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican

medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....49

Figura 24. Tabla de resumen de resultados. Flechas indicativas de aumento o disminución de las variables de inmunoexpresión de HSP90 β 1 y morfometría.....50

RESUMEN

Las proteínas de shock térmico (HSPs) juegan un rol esencial en las células, siendo expresadas tanto en condiciones fisiológicas así como en condiciones fisiopatológicas en organismos procariontas y eucariotas. La proteína HSP90 se expresa en endometrio humano, asociada a los receptores de esteroides sexuales. Sin embargo no se han registrado trabajos que describan en el endometrio de yegua cuáles son los patrones de expresión de la HSP90. Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue determinar la expresión de HSP90 en el endometrio de yeguas en fase reproductiva y en anestro. Se utilizaron yeguas de raza Cuarto de Milla adultas vírgenes, las que se distribuyeron en los siguientes grupos: anestro (n=7), estro (n=5) y diestro (n=7) determinados por ultrasonografía transrectal. Se colectaron biopsias endometriales que fueron procesadas histológicamente hasta su inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos y se realizaron técnicas de coloración hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica. Se capturaron imágenes histológicas y se analizaron mediante el programa ImageJ, determinándose las siguientes variables de inmunoexpresión de HSP90: porcentaje de área inmunomarcada en el epitelio de revestimiento, en las glándulas y en el estroma conjuntivo endometrial; y las variables morfométricas: altura del epitelio de revestimiento, diámetro de glándulas y volumen (%) ocupado por glándulas y por estroma conjuntivo endometrial. Los datos se presentaron como medias \pm error estándar y fueron analizados por ANOVA. La inmunoexpresión de HSP90 en el endometrio es mayor en estro que en diestro y anestro. La altura del epitelio de revestimiento endometrial fue mayor en estro que en diestro y anestro, el diámetro de las glándulas endometriales y el volumen (%) ocupado por glándulas endometriales son mayores en estro y diestro que en anestro, y el volumen (%) ocupado por estroma fue mayor en anestro que en estro y diestro. Nuestros resultados coinciden con estudios previos realizados en endometrio humano, donde se describe que las HSP90 participan en la modulación funcional de los receptores de esteroides sexuales en respuesta a las hormonas esteroideas, aumentando su inmunoexpresión durante la fase proliferativa en comparación con la secretora. Dada la importancia de las HSP90 y los cambios observados en su expresión durante el ciclo estral y anestro podemos afirmar que interviene en la reproducción de yeguas. Los resultados obtenidos en el presente estudio sentarán las bases para futuros análisis comparativos de la expresión de la HSP90 en endometrio de yeguas en diferentes condiciones.

SUMMARY

Heat shock proteins (HSPs) play an essential role in cells, being expressed both in physiological conditions and in pathophysiological conditions in prokaryotic and eukaryotic organisms. The HSP90 protein is expressed in human endometrium, associated with sex steroid receptors. However, there are no studies describing mare endometrium patterns of HSP90 expression. Therefore, the objective of this study was to determine the expression of HSP90 in the endometrium of mares in breeding season and beyond. Mare quarter horses adult virgins were used, which were distributed in the following groups: estrus (n = 5), diestrus (n = 7) and anestrus (n = 7), determined by transrectal ultrasonography. Endometrial biopsies were collected and processed histologically until their inclusion in paraffin. Histological sections were obtained for hematoxylin-eosin staining techniques and immunohistochemistry. Histological images were captured and analysed using ImageJ program, determining the following variables of HSP90 immune expression: percentage of immunostaining area in surface epithelium, in glands and endometrial stroma; and morphometric variables: the height of surface epithelium, glands diameter and volume (%) occupied by endometrial glands and stroma. Data were presented as mean \pm standard error and analysed by ANOVA. The immune expression of HSP90 in the endometrium is higher in estrus than diestrus and anestrus. The height of the endometrial surface epithelium was higher in estrus than diestrus and anestrus, the diameter of the endometrial glands and the volume (%) occupied by endometrial glands are larger in estrus and diestrus than anestrus, and the volume (%) occupied by stroma was higher in anestrus than estrus and diestrus. Our results agree with previous studies in human endometrium, which describes that HSP90s participate in functional modulation of sex steroid receptors in response to steroid hormones, increasing immunoexpression during the proliferative phase compared to the secretory phase. Given the importance of HSP90 and the changes observed in its expression during the estrus cycle and anestrus, we can affirm that it is involved in the reproduction of mares. The results obtained in the present study will provide the basis for future comparative analyses of HSP90 expression in mares' endometria under different conditions.

INTRODUCCIÓN

1.1. Reproducción de la yegua

El objetivo principal en la producción de caballos es asegurar un potro sano por yegua por año, independientemente de la finalidad de la raza y la utilización. En condiciones ideales, esto significa que las yeguas deben concebir en el primer mes posparto, para reducir el periodo entre los partos. Esto depende de varios factores como el estado nutricional y el balance energético, que se refleja en la condición corporal (Fradinho et al., 2014).

El rendimiento reproductor no depende únicamente de la producción de gametos con éxito, sino también de un ambiente apropiado para la fertilización, vida libre del embrión, implantación, placentación y parto. Las infecciones del aparato reproductor son la mayor causa de infertilidad, siendo la endometritis la principal causa de muerte embrionaria, como consecuencia de un inadecuado ambiente uterino para la supervivencia del embrión, causando grandes pérdidas para la industria equina (Morel, 2005).

La endometritis en la yegua es una entidad clínica frecuente e importante, sean sus causas infecciosas o no infecciosas, éstas se pueden diagnosticar en muchos casos por métodos convencionales como la palpación rectal, vaginoscopía y cultivos bacteriológicos (Doig et al., 1981). La biopsia constituye el mejor medio de confirmación de las alteraciones endometriales y es el mejor método de diagnóstico y pronóstico de la habilidad del endometrio para llevar una cría a término (Snider et al., 2011).

1.2. Factores reguladores de la actividad endometrial

La actividad uterina es controlada por varias hormonas, principalmente estrógeno y progesterona, que trabajan a través de sus receptores. El apareamiento y la fertilización requieren la presencia de estradiol, que induce el comportamiento reproductivo, y prepara el tracto reproductivo para recibir los gametos masculinos, mientras que la progesterona mantiene la gestación (Hartt et al., 2005).

Los mecanismos de defensa del útero contra los agresores externos comprenden complejas interacciones entre diferentes elementos. Tanto las barreras físicas como los componentes celulares y humorales, tienen un rol importante para que la yegua quede gestante. Muchos de estos factores de defensa uterina son modificados por las hormonas esteroideas (Katila, 1996).

Las yeguas son más susceptibles a la endometritis durante el dominio de la progesterona que cuando está bajo la influencia de los estrógenos o con ninguna influencia hormonal (Katila, 1996). Los estrógenos aumentan la migración de leucocitos hacia la luz uterina, lo que incrementa la actividad fagocítica de éstos en el útero durante el estro (Roberts, 1979).

1.3. Proteínas de Shock Térmico

Existen diferentes condiciones y factores externos que pueden desequilibrar la homeostasis celular, y para evitar esto las células desarrollaron un grupo de proteínas que supervisan y responden frente a estos cambios extremos (Cortés-González et al., 2008).

En situaciones de estrés celular, la síntesis proteica se ve afectada dando lugar a proteínas mal plegadas o con una conformación inadecuada, entonces se activa la transcripción de genes dirigida hacia proteínas reparadoras conocidas como proteínas de shock térmico, denominadas en inglés como Heat Shock Protein (HSP), lo que inicia la reparación (Cortés-González et al., 2008).

Las HSPs se denominan "chaperonas moleculares" y son expresadas tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. Son proteínas altamente conservadas durante la evolución y son expresadas en organismos procariotas y eucariotas (Kampinga et al., 2009; Tabibzadeh and Broome, 1999).

1.4. HSP90

Teniendo en cuenta los cambios que sufre el endometrio en el ciclo reproductivo, y los cambios hormonales, realizamos éste estudio, ya que las HSP 90, entre muchas de sus funciones, participan en la modulación funcional de los receptores de esteroides sexuales (Komatsu et al., 1997).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Anatomía de aparato reproductor de la yegua.

El aparato reproductor de la yegua se compone de dos grupos de órganos: aquellas estructuras que son intrínsecas a la vía reproductiva: ovarios y genitales tubulares y aquellas estructuras que están físicamente aisladas de la vía reproductiva, y que desempeñan un papel en la regulación de los eventos de la reproducción: glándula pineal, la retina, el hipotálamo, glándula hipófisis (Brinsko et al., 2011).

2.1.1. Ovarios

En el equino los ovarios son en forma de haba y varían en tamaño según la actividad ovárica; son más grandes durante la temporada de cría (primavera y verano) y más pequeños durante la época no reproductiva (anestro invernal) (Brinsko et al., 2011). Los ovarios están ubicados en la zona sublumbar (ventral a la quinta vértebra lumbar), suspendidos por el mesovario. Están constituidos por una corteza que es interna y una medula externa (Dyce, 2003). El ovario tiene tanto función exocrina como endocrina. La función exocrina es la liberación de óvulos, y la función endocrina es la producción de hormonas (Hafez, 2000).

2.1.2. Trompa uterina

La trompa uterina actúa como conductora de los ovarios, transportan los ovocitos desde el ovario al útero (Getty et al., 1982). Se divide en tres partes: el infundíbulo (parte en forma de embudo más cercano al ovario), la ampolla (porción media), y el istmo (porción estrecha que conecta la ampolla de la trompa uterina). La ampolla es la parte media de la trompa uterina donde ocurre la fertilización y segmentación temprana del óvulo fecundado. (Brinsko et al., 2011). La trompa uterina está sujeta por el mesosálpinx (Dyce, 2003).

2.1.3. Útero

El útero es un órgano muscular hueco que está suspendido dentro de la cavidad pélvica y el abdomen por los ligamentos anchos. Está formado por dos cuernos y un cuerpo, con forma de letra T o Y cuando se observa dorsalmente en su posición natural en la yegua (Getty et al., 1982). La vascularización del útero se compone a cada lado por tres arterias y venas que forman su camino a través del ligamento ancho. La pared uterina está constituida por tres capas. La capa más interna consiste en el endometrio, que es glandular y secretora. La capa media es el miometrio, es bastante grueso y es responsable de la variación en el tono muscular del útero de la yegua. La capa más externa se denomina perimetrio. (Brinsko et al., 2011). El útero realiza varias funciones, como transportar los espermatozoides desde el sitio de eyaculación hasta la trompa uterina, regula el funcionamiento del cuerpo lúteo, y es el lugar donde se lleva a cabo la implantación, gestación, parto e involución posparto (Hafez, 2000).

2.1.4. Cérvix

El cérvix es un órgano dinámico en la yegua. Se alinea internamente por células secretoras que contiene el epitelio que produce una mucosidad delgada como lubricante durante el estro y una mucosidad espesa para ocluir el lumen del cérvix durante el diestro y la preñez, de modo que es menos permeable a las bacterias y el material extraño. El cérvix se expande para acomodar el pene del semental durante el estro y el potro durante el parto (Brinsko et al., 2011). Excepto durante el estro y en el parto, el cérvix se encuentra cerrado (Dyce, 2003).

2.1.5. Vagina

La vagina es un órgano tubular que se extiende desde el orificio externo del cérvix hasta el pliegue transversal que recubre el orificio uretral externo. La vagina continúa caudalmente como el vestíbulo (Getty et al., 1982). El lumen de la vagina está contraído, excepto durante la preñez y el paso del potro en el parto. La vagina, incluyendo su mucosa, es altamente elástica y se expande considerablemente para acomodar el paso del potro. El lumen de la vagina está cubierta con epitelio estratificado escamoso (Brinsko et al., 2011).

2.1.6. Vestíbulo

El vestíbulo es la parte terminal del tracto genital, limita cranealmente con la vagina en el orificio uretral y externamente con la hendidura vulvar (Dyce, 2003). Está rodeado por el músculo constrictor vulvar y vaginal, lo que minimiza la entrada de material extraño. El portal contiene glándulas vestibulares ventralmente que segregan moco para proporcionar lubricación del tracto tubular posterior (Brinsko et al., 2011).

2.1.7. Vulva

La vulva es la abertura externa del tracto reproductivo femenino, tiene una comisura ventral redondeada y otra dorsal más aguda. Está en posición ventral al suelo de la pelvis y normalmente el orificio vulvar se debe encontrar cerrado (Dyce, 2003). Los labios de la vulva contienen musculatura subyacente que funciona para cerrar la abertura vulvar, proporcionando una mayor barrera a la entrada de material extraño en el tracto tubular. La vulva contiene tejido elástico y se expande durante el paso del feto en el parto. El clítoris, se encuentra en una cavidad craneal a la comisura ventral de la abertura vulvar (Brinsko et al., 2011).

2.2. Fisiología reproductiva de la yegua

Las yeguas son reproductoras poliéstricas estacionales de día largo, con actividad ovárica máxima en primavera y verano. El factor determinante de la actividad ovárica es la duración de periodo luz/día, proceso conocido como fotoperíodo, y éste depende de la latitud geográfica (Raz and Aharonson-Raz, 2012). Además de fotoperíodo, factores exógenos como la edad, estado reproductivo, nutrición, condición corporal y la temperatura del medio ambiente afectan a la actividad reproductiva estacional de la yegua (Aurich, 2011). La época de inactividad reproductora se denomina anestro (Morel, 2003). El anestro se observa fisiológicamente en la mayoría de las yeguas durante el invierno, y se caracteriza por falta de receptividad sexual de la hembra, los ovarios y el tracto reproductivo no dan señales de ciclicidad (McKinnon et al., 2011). El periodo entre anestro y la etapa reproductiva se denomina transición y cursa con ciclos irregulares que pueden durar días o semanas (Aurich, 2011).

2.2.1. Fotoperíodo

La presencia o ausencia de luz se percibe por fotorreceptores de la retina del ojo, éstos mandan mensajes neurales a la glándula pineal. Durante la noche la glándula pineal produce la hormona melatonina, que inhibe el eje hipotálamo-hipofisario. A medida que las horas de luz son mayores, se desinhibe el eje, y comienza la producción de la hormona liberadora de gonadotropinas. En respuesta a esto la adenohipófisis produce gonadotropinas FSH y LH, y comienza la etapa reproductiva (Brinsko et al., 2011).

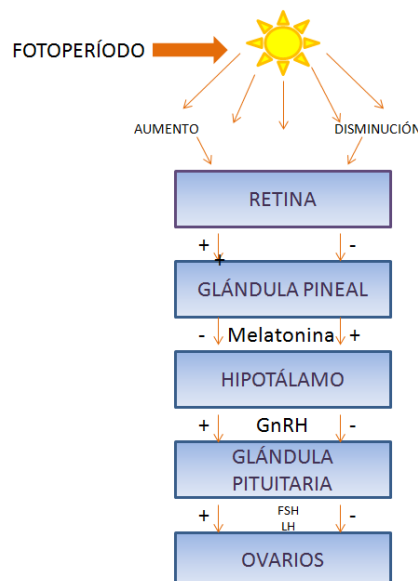


Figura 1. Esquema de la regulación hormonal del ciclo estral de la yegua donde se muestra la interrelación entre la glándula pineal; hipotálamo, glándula pituitaria y ovarios, adaptado de: (Brinsko et al., 2011).

2.2.2. Ciclo estral

El ciclo estral se define como el período desde una ovulación a la siguiente, en que se manifiestan signos de celo y concentraciones plasmáticas de progesterona menores a 1 ng/ml (Raz and Aharonson-Raz, 2012). La yegua comienza a ciclar cuando alcanza la pubertad a los 10-24 meses de edad. El ciclo estral tiene una duración media de 21 días y puede dividirse en dos fases: la fase folicular que incluye al período denominado estro, con una duración de 4-7 días y la fase luteal que incluye al diestro con una duración de 14-15 días (Brinsko et al., 2011).

2.2.2.1. Estro

El estro es el período caracterizado por el deseo sexual y la aceptación del macho por la hembra. El tracto genital está preparado para aceptar y transportar espermatozoides y un ovocito al sitio de fertilización (Raz and Aharonson-Raz, 2012). En esta fase se produce el fenómeno de selección folicular, donde de una cohorte de folículos solo uno pasa a ser el dominante u ovulatorio (Ginther et al., 2008). Éste folículo dominante crece 3 mm por día, hasta alcanzar su tamaño preovulatorio de 40-45 mm (Samper, 2009). La ovulación ocurre 24-48 horas antes del fin del estro y se denomina día 0 (McKinnon et al., 2011).

2.2.2.2. Diestro

Durante el periodo de diestro, la yegua no es receptiva al semental, y el tracto genital está preparado para aceptar y nutrir el concepto. En el lugar de la ovulación, se forma el cuerpo lúteo (Brinsko et al., 2011). El cuerpo lúteo madura a partir del día 5 y secreta progesterona. Al final de este periodo el endometrio en respuesta a que no existe un óvulo fertilizado, secreta prostaglandina $F2\alpha$, que es luteolítica y causa la caída de los niveles de progesterona al final del ciclo (Roberts, 1979).

2.2.3. Control endócrino del ciclo estral de la yegua

El control endócrino del ciclo estral está gobernado por el eje hipotálamo-hipofisario-ovario. El hipotálamo secreta la hormona GnRH, la cual estimula a la adenohipófisis a producir y liberar gonadotropinas, cuyos órganos diana son los ovarios. Dentro de las gonadotropinas se encuentra la hormona folículo estimulante (FSH), responsable del comienzo de una nueva onda folicular y del reclutamiento de folículos. Los grandes folículos secretan inhibina que ejercen un feedback negativo en la producción de FSH (Morel, 2003).

La hormona luteinizante (LH) aumenta pocos días antes del estro y sus concentraciones crecientes inducen la secreción de estrógenos por el folículo preovulatorio, éstos ejercen una retroalimentación positiva que desencadena la ovulación, este momento se denomina día 0 del ciclo. La LH alcanza su mayor concentración en plasma generalmente un día después de producida la ovulación y en diestro sus niveles descienden (Ginther et al., 2006).

Luego de la ovulación, dentro del folículo colapsado se forma el cuerpo lúteo que secreta progesterona. La concentración máxima de progesterona ocurre entre el día 5 y 15 del ciclo estral, ésta tiene un efecto inhibitorio sobre el eje hipotálamo-

hipofisario, particularmente en la liberación de LH, por lo tanto el estro no comienza hasta que los niveles de progesterona descendan (Palmer, 1978). En ausencia de reconocimiento materno de preñez, el endometrio equino secreta prostaglandina, que es luteolítica, destruye el cuerpo lúteo, entonces los niveles de progesterona caen y se desinhibe el eje hipotálamo-hipofisario, se vuelven a liberar FSH y LH y comienza un nuevo estro (Morel, 2003).

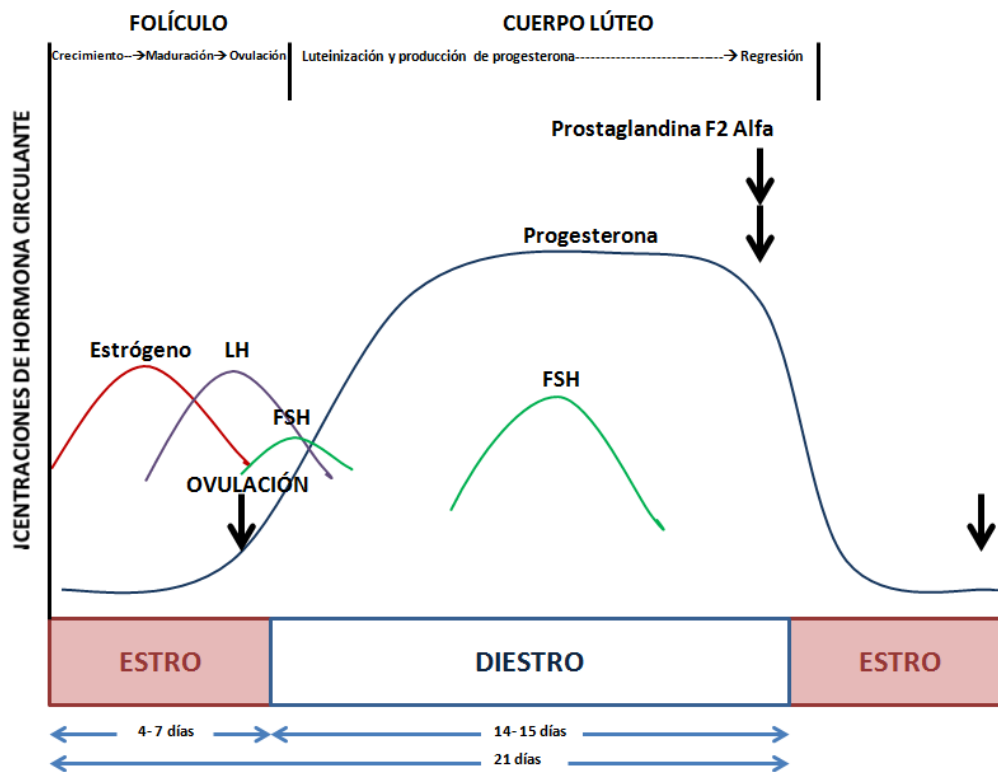


Figura 2. Diagrama del ciclo estral de la yegua, con una duración promedio de 21 días, 4-7 días de estro y 14-15 días de diestro. La ovulación ocurre 1 o 2 días antes del estro, adaptado de: (Brinsko et al., 2011).

2.2.4. Cambios fisiológicos del tracto genital durante el ciclo estral de la yegua

A lo largo del ciclo estral, el endometrio equino sufre cambios morfológicos y funcionales, que son inducidos principalmente por las hormonas ováricas: la progesterona y el estradiol (Aurich, 2011; Gebhardt et al., 2012).

Durante el estro bajo la influencia de estrógenos la vulva se hincha, esta húmeda con corrimiento de moco transparente y los labios se tornan laxos e hiperémicos (Hafez, 2000). La vagina y el cérvix se encuentran relajados. En el endometrio hay edema aumentado. Hay un rango para determinar el grado de edema endometrial, que va de 0 a 5 grados, en 0 no hay edema y en 5 hay máximo edema. El edema en diestro es grado 1, y en estro grado 4. Una vez que los estrógenos alcancen su máximo nivel, y la yegua se aproxime a su ovulación, la intensidad del edema comienza a decrecer (Samper, 2009). En cuanto al tono uterino hay incremento en el grosor y la turgencia a medida que la yegua pasa del estro al diestro, preparándose para la inminente implantación del embrión (Morel, 2003). A nivel del cérvix se forma un tapón mucoso (Samper, 2009). Si la yegua no queda preñada, la luteólisis da como resultado la

reducción del grosor de la pared uterina y de nuevo los cambios asociados al acercamiento al estro (Morel, 2005).

2.2.5. Receptores de estrógenos y progesterona en el endometrio de la yegua

La expresión de los receptores de hormonas esteroideas está fuertemente influenciada por la etapa del ciclo estral en la que se encuentre la yegua, siendo máxima durante el estro, estimulada por los estrógenos, y mínima durante el diestro tardío regulada por la progesterona (Aurich, 2011).

Los receptores de hormonas esteroides desocupados se encuentran unidos a la proteína de shock térmico 90, que los mantiene inactivos hasta la unión con su ligando. Ésta unión de hormona-receptor, da como resultado la liberación de las proteínas asociadas y conduce a la activación del receptor. El complejo ligando-receptor va al núcleo y modula la transcripción de genes de destino (Bagchi et al., 1991).

2.3. Histología del endometrio en yeguas

La pared uterina se compone de tres capas: la mucosa-submucosa o endometrio, la capa muscular o miometrio, y la serosa o perimetrio. La capa longitudinal y vascular del miometrio se continúan con el ligamento ancho del útero (Dellmann, 1994).

2.3.1. Endometrio

La histología del endometrio de la yegua consiste de epitelio luminal (epitelio de revestimiento endometrial) y lamina propia (Kenney, 1978). El epitelio endometrial de la yegua es cilíndrico simple o cúbico simple en algunas regiones, la altura y la estructura de las células epiteliales están relacionados con la secreción de hormonas ováricas durante todo el ciclo (Dellmann, 1994). Menos de la mitad de las células epiteliales son ciliadas (McKinnon et al., 2011). La lámina propia contiene el estrato compacto que es superficial y estrato esponjoso más profundo. El estrato compacto consta de un tejido conjuntivo laxo, muy vascularizado, con muchos fibroblastos. Se hallan presentes en la lámina propia muchos macrófagos y mastocitos. Desde la sangre penetran leucocitos granulocitos, linfocitos y plasmocitos. El estrato esponjoso consta de tejido conjuntivo y es menos celular que el superficial (Dellmann, 1994). También hay capilares, arteriolas, vénulas y ocasionalmente pequeñas arterias musculares (Kenney, 1978). Se hallan presentes por todo el endometrio glándulas tubulares ramificadas, simples y arrolladas, revestidas por epitelio cilíndrico simple. La ramificación y enrollamiento de las glándulas son marcadas en la yegua, el aumento de los niveles de estrógenos estimulan el crecimiento y la ramificación de las glándulas, y la secreción aumenta por estímulo de la progesterona (Dellmann, 1994).

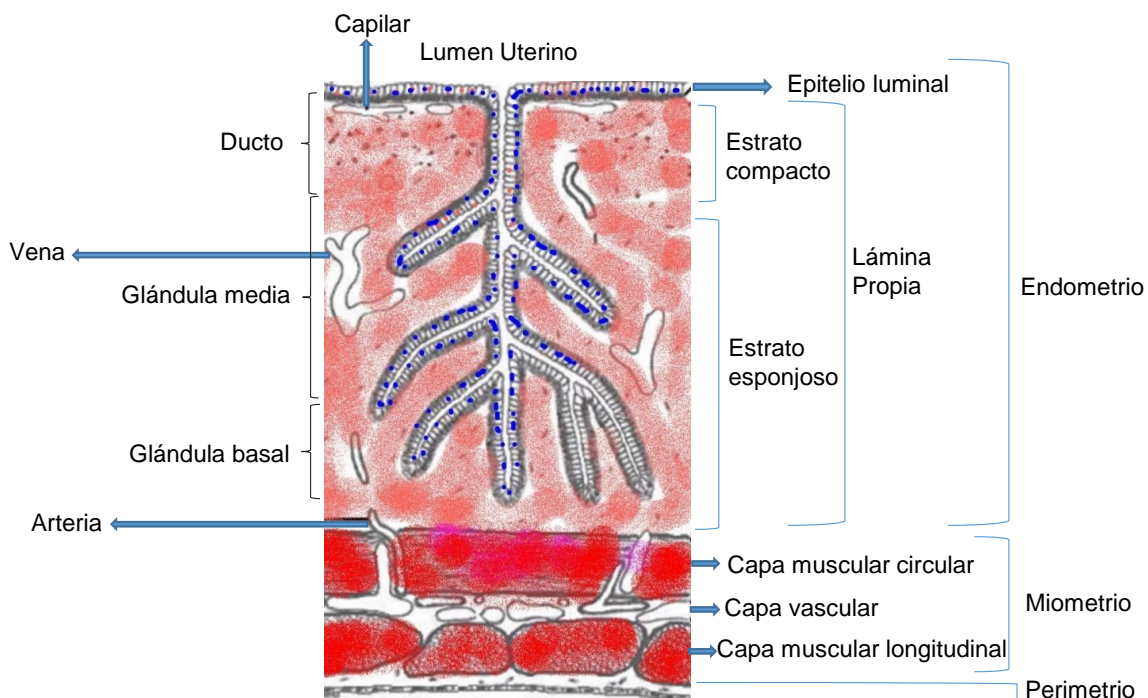


Figura 3. Esquema de las capas del útero, adaptado de: (Kenney, 1978).

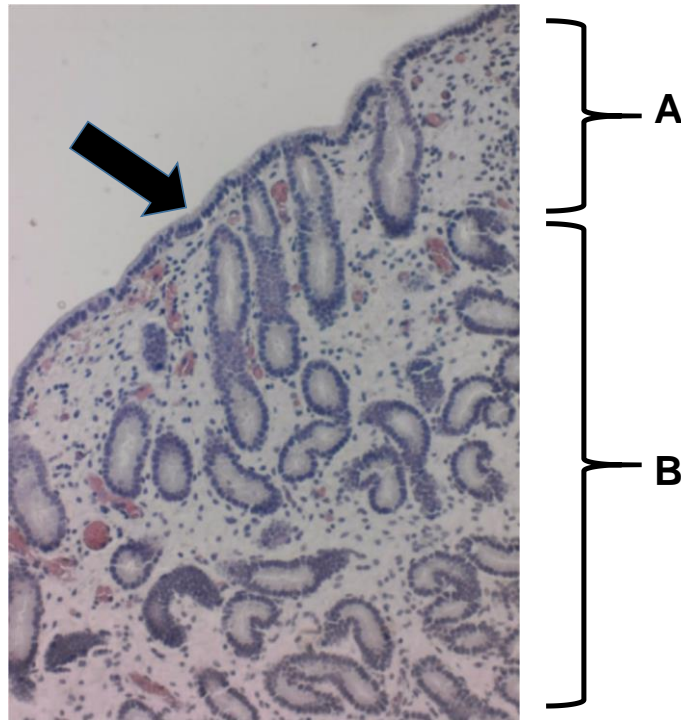


Figura 4. Imagen histológica de endometrio de yegua donde se aprecia el epitelio luminal (flecha), estrato compacto (A) y estrato esponjoso (B) de la lámina propia (autoría: Pedrana, G; Camacho, A.; Vasconcellos, R., 2016).

2.3.1.1. Cambios histológicos del endometrio durante el ciclo estral de la yegua

Los cambios endometriales relacionados con el ciclo estral son regulados por las hormonas esteroides ováricas progesterona y estrógenos que interactúan con sus receptores endometriales (Aurich, 2011).

2.3.1.2. Cambios durante el estro.

Este periodo está marcado por proliferación del epitelio luminal y de la lámina propia. Esto resulta en la elevación de la mucosa que delimitan invaginaciones más o menos profundas (criptas endometriales) donde las glándulas desembocan en grupos (Barone, 1978).

Durante el estro el epitelio de revestimiento endometrial es cilíndrico, y varía de simple a pseudoestratificado (Kenney, 1978).

Las altas concentraciones de estrógeno y bajas de progesterona contribuyen a aumentar el edema de la pared uterina, siendo más evidente en el estrato compacto (Aurich, 2011).

En el estro las glándulas endometriales se alargan y ramifican y se hacen flexuosas, y contornean entre los fascículos de la región adyacente al miometrio. Su epitelio se hace más alto. Sus células se multiplican y toman características secretorias manifiestas (Barone, 1978).

2.3.1.3. Cambios durante el diestro

El epitelio prolifera durante el diestro temprano preparándose para la implantación del embrión. Las células epiteliales se activan y aparecen como columnares altas durante el diestro, transformándose en cuboidales cuando se acerca el nuevo estro (Morel, 2005).

El endometrio pasa por una fase secretoria activa hacia el comienzo del diestro. En el diestro las glándulas vuelven a ser poco flexuosas, cortas y estrechas, su epitelio comienza a perder características secretorias y retoma su tipo columnar bajo o cubico (Barone, 1978).

2.3.1.4. Cambios durante el anestro

La mucosa endometrial es relativamente fina en periodos de reposo (anestro). Las glándulas endometriales están poco desarrolladas y apenas sinuosas, excepto en la parte profunda que son más tortuosas y alcanzan el miometrio. Su epitelio es cubico o columnar bajo (Barone, 1978).

2.3.2. Miometrio

El miometrio tiene una gruesa capa interior circular, y una capa externa longitudinal de músculo liso. Entre estas dos capas se encuentra la capa vascular (McKinnon et al., 2011).

2.3.3. Perimetrio

El perimetrio está formada por tejido conectivo laxo y se continua con el ligamento ancho (Getty et al., 1982). Numerosas fibras, linfáticos, vasos sanguíneos y los nervios están presentes en esta capa (Dellmann, 1994).

2.4. Proteínas de shock térmico

Estas proteínas fueron descubiertas en el año 1962 por un científico Italiano, Feruccio Ritossa, estudiando la síntesis de ácido nucleico de las glándulas salivales de las larvas de la mosca de la fruta *Drosophila*, cuando notó que a mayor temperatura, en las células había una actividad transcripcional con nuevos cromosomas. Hoy en día, sabemos que la respuesta de shock térmico es una respuesta universal a una amplia gama de tensiones, y que las proteínas de shock térmico desempeñan un papel de protección. Su función se ha extendido a muchos procesos celulares básicos, tales como el plegamiento de proteínas, lo que ha dado lugar en su denominación como chaperonas moleculares (De Maio et al., 2012).

Las chaperonas moleculares son diversas familias de proteínas que se han desarrollado para controlar a las proteínas a alcanzar su forma nativa, prevenir la agregación de proteínas o mediar el plegamiento o desplegado. Su aumento de expresión en respuesta al estrés es un factor clave en la salud de la célula y la longevidad de un organismo (Saibil, 2013).

Los genes que codifican para las HSP se activan en la exposición de los tejidos a un aumento de temperatura (shock térmico) y sus proteínas codificadas se localizan tanto a nivel intracelular como extracelular (De Maio and Vazquez, 2013).

Las HSP se encuentran ubicadas principalmente en el citosol y su principal función es mantener la homeostasis celular y evitar la toxicidad de la célula. En condiciones adversas la expresión de algunas HSP aumenta con el propósito de reparar las proteínas dañadas. En este proceso, las HSP pueden ensamblar correctamente a las proteínas parcialmente dañadas y degradar a las que fueron dañadas irreversiblemente (Cortés-González et al., 2008).

Las HSP son expresadas tanto en condiciones fisiológicas así como en condiciones fisiopatológicas, por ejemplo, aumentan en procesos tumorales. Las HSPs son proteínas altamente conservadas durante la evolución y son expresadas en organismos procariontes y eucariotes. Las HSPs clasifican de acuerdo a su peso molecular, expresado en kiloDaltons: HSP15-30, HSP-40, HSP-60, HSP-70, HSP-90 y HSP1. Esta nomenclatura fue asignada por el Comité de nomenclatura HUGO Gene (HGNC) (Kampinga et al., 2009).

2.4.1. Proteínas de Shock Térmico 90

HSP90 es una proteína homodimérica que se compone de tres dominios estables a la proteólisis limitada: un dominio N-terminal implicado en la hidrólisis de unión y de ATP, un dominio medio que ayuda a facilitar la hidrólisis de ATP y está implicado parcialmente en la unión del sustrato y un dominio C-terminal que media la dimerización. Estos tres dominios están separados por bisagras flexibles que permiten a la chaperona adoptar diferentes conformaciones (Flynn et al., 2015).

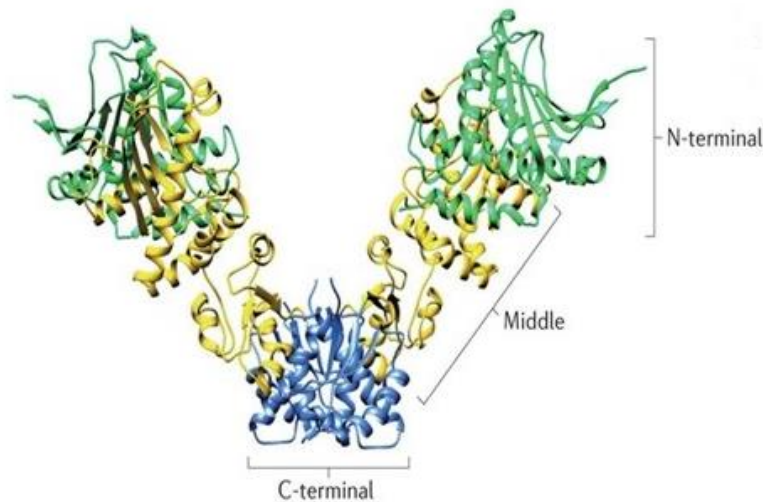


Figura 5. Estructura de HSP90 dimeros en estado abierto (Saibil, 2013).

Hasta el momento, se han descrito cinco isoformas de HSP90: la Grp94, la HSP90N, la TRAP1, la HSP90 α y la HSP90 β que se diferencian básicamente por su localización intracelular. La HSP90 α y la HSP90 β se encuentran en el citosol de las células de los mamíferos comprendiendo el 80% de la subfamilia, por ende modulan la mayoría de las acciones intracelulares. Las otras isoformas se encuentran asociadas a organelos (Cortés-González et al., 2008). HSP90 está localizada en el citoplasma, pero muy pequeñas cantidades están presentes en el núcleo también (Pratt, 1997).

La HSP90 α es inducible bajo condiciones de estrés, mientras que la HSP90 β se expresa constitutivamente (Li and Buchner, 2012).

La proteína HSP90 α es codificada en equinos por el gen HSP90AB1N que se localiza en el cromosoma 20: 43, 115,768-43, 121,698, tiene un transcrito HSP90AB1-201, contiene 2541 pares de bases y está conformada por 724 aminoácidos. Las HSP90 en el equino se han descrito en cerebro, embrión, vellosidades de la placenta y en testículo (Coleman et al., 2013). Dos genes codifican HSP90, con los productos de genes humanos HSP90 α y HSP90 β que tiene 86% de homología (Pratt, 1997)(Pratt and Dittmar, 1998).

La HSP90 representa el 1-2% de la proteína citosólica en células no estresadas, pudiendo llegar a aumentar su expresión hasta 15% en condiciones de estrés celular (Cortés-González et al., 2008).

La inducción de las HSP90 comienza con la liberación del factor de respuesta a estrés térmico (HSF1), que comúnmente se encuentra asociado a HSP90 en el citosol. Éste se transloca al núcleo activando la transcripción de HSP90, dando como resultado el aumento de HSP90 (Cortés-González et al., 2008)

La sobreexpresión de HSP90 es fundamental en la adaptación, proliferación y supervivencia de las células tumorales. Existen diferentes inhibidores de HSP90, dentro de los cuales se encuentran análogos de la geldanamicina, que se utilizan solos o en combinación con agentes quimioterapéuticos en el tratamiento contra el cáncer, por lo que la inhibición de HSP90 se utiliza como estrategia terapéutica para evitar o reducir la carcinogénesis (Cortés-González et al., 2008).

La principal función de las HSP90 es interactuar con proteínas cliente dentro de las cuales se encuentran los receptores de hormonas esteroideas (Röhl et al., 2013). Las HSP90 se unen a los receptores de esteroides sexuales, tales como los receptores de estrógeno (ER) y los receptores de progesterona (PR), entonces la expresión de HSP puede ser regulada por los esteroides sexuales (Komatsu et al., 1997). Éstos receptores se mueven entre el núcleo y citoplasma y en ausencia de la hormona están unidos a la proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90) formando un complejo, la cual los mantiene inactivos. La unión de la hormona al receptor provoca la liberación del complejo HSP90 y la translocación del complejo hormona-receptor hacia el núcleo para modular la transcripción de ADN (Squires, 2006) (Pratt and Dittmar, 1998) (Bagchi et al., 1991).

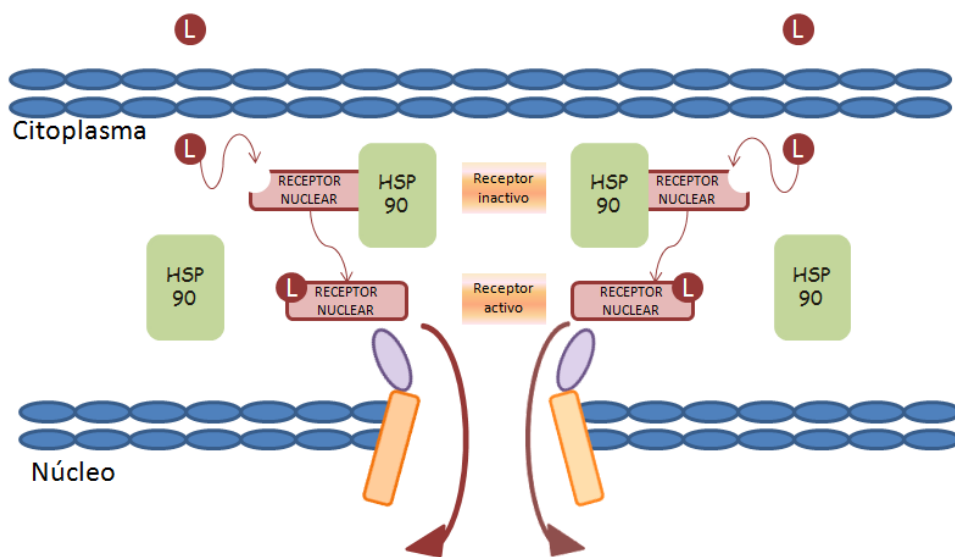


Figura 6. Esquema ilustrativo de la unión de HSP90 al receptor nuclear manteniéndolo inactivo, hasta la unión del ligando-receptor que lo activa, se transloca hacia el núcleo. Adaptado de: (Ortega-Domínguez, Bibiana Herrera-Ramírez, Marlene Tecalco-Cruz, 2015).

2.4.2. HSP90 en endometrio humano, roedores y rumiantes.

La HSP90 se expresa en el endometrio humano durante todo el ciclo menstrual, tanto en el epitelio como el estroma endometrial. Se observó inmunoreactividad de HSP90 en las células glandulares y estromales de ambas capas basal y funcional a lo largo del ciclo menstrual, aunque la intensidad de tinción era más fuerte en ambos tipos de células durante la fase de proliferación activa que en la fase secretora. Esta expresión más fuerte de HSP90 en estas células durante la fase proliferativa parece estar correlacionado con los niveles elevados de ER y PR que también se han observado en esta fase. Los cambios en la expresión de HSP90 pueden representar la fluctuación de los niveles ER o PR durante el ciclo menstrual en las glándulas y estroma endometrial (Koshiyama et al., 1995).

Las HSPs están implicadas en la protección del endometrio contra el daño citotóxico durante el periodo crítico de la "ventana de implantación", disminuyendo en ratas la expresión de la HSP105 en el epitelio luminal y aumentando en las células estromales de acuerdo al día de implantación, facilitando la invasión del trofoblasto (Yuan et al., 2009).

La HSP90 también fue descrita en el útero de ratonas tratadas con bisfenol A (BPA) y E2. El bisfenol tiene similares efectos que los estrógenos. En ambos tratamientos se expresó la HSP90, su localización en el epitelio de revestimiento endometrial fue a nivel de núcleo y citoplasma, y a nivel de células estromales se localizó en el núcleo (Ici et al., 2001).

Se ha descrito que las HSP pueden ser identificadas como marcadores de endometritis en bovinos. Los niveles de estas proteínas se vieron aumentados cuando las células fueron expuestas a estrés, como la inflamación y la apoptosis. Las HSP27 y HSP70 están implicadas en la regulación de endometritis y desempeñan un papel importante en la preparación del endometrio para su implantación (Choe et al., 2010).

¿Qué falta por conocer? ¿Cómo se expresan las HSPs en las yeguas?

No se han registrado trabajos que describan en la yegua cuáles son los patrones de expresión de la HSP90 a nivel endometrial durante el ciclo estral.

Hasta donde sabemos se desconocen los cambios en la expresión de las HSP en el endometrio de yeguas en fase reproductiva y en anestro.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la expresión de HSP en endometrio de yeguas en fase reproductiva y en anestro.

Objetivos específicos

1. Localizar y cuantificar la inmunexpresión de HSP90 en el epitelio de revestimiento endometrial.
2. Localizar y cuantificar la inmunexpresión de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial.
3. Cuantificar las variables morfométricas del endometrio: altura de epitelio de revestimiento endometrial, diámetro de glándulas endometriales, volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales y volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo endometrial.

4. HIPÓTESIS

Las HSP90 se expresan diferencialmente de acuerdo a la etapa del ciclo estral, aumentando en estro, disminuyendo en diestro y ausentes en anestro.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Animales

Se utilizaron yeguas pertenecientes al establecimiento ubicado en el Departamento de Treinta y Tres, Uruguay (33°S, 54°W), (DICOSE 190735117), "Haras del Olimar".

Los muestreos contaron con la aprobación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), Exp 111130-000644-14, cuyos responsables fueron Sebastián Acuña y Rodrigo Mattos, y el Dr. Oscar Jackson (veterinario en ejercicio liberal de la profesión), Ana Laura Camacho Benítez y Rossana Lyle Vasconcellos Quevedo.

Se utilizaron siete yeguas de raza Cuarto de Milla de 3 a 6 años de edad, de 435 Kg de peso promedio y sin antecedentes de enfermedades reproductivas, ni de montas, por lo que consideramos que eran yeguas vírgenes, y tenían la sanidad al día. Las yeguas fueron mantenidas a campo, en el mismo potrero, alimentadas en pasturas naturales, en condiciones de luz natural y con agua disponible *ad libitum*.

A la evaluación anatómica del aparato reproductivo se comprobó por observación de la verticalidad vulvar y coaptación de labios vulvares, que eran yeguas anatómicamente normales. Por otra parte, la evaluación histológica endometrial determinó que las yeguas no presentaban alteraciones histopatológicas, por lo que se consideró que eran yeguas con un endometrio con características normales.

5.2 Diseño experimental

Se extrajeron biopsias endometriales en tres etapas, estro, diestro y anestro. Las muestras de estro y diestro fueron tomadas en los meses de noviembre a abril, y la muestra de anestro en mayo y junio, tal como se observa en la figura 7.

Las 3 etapas fueron definidas por palpación rectal y ultrasonografía (mediante transductor lineal de 5 MHz, ecógrafo marca Pie Medical, modelo Tringa) de la siguiente manera:

1. Anestro invernal profundo (n=7)

Las muestras de anestro fueron tomadas a fines de otoño en los meses de mayo y junio. A la ecografía el ovario se observó de pequeño tamaño y sin estructuras activas. A la palpación el útero no presentó tono y el cérvix disminuyó el grosor, por lo que consideramos que estaba en anestro (Miro, 2012). La muestra de anestro se extrajo en días con menos horas de luz, y el número de animales para esta etapa fue de 7.

2. Estro (n=5)

Se consideró en estro cuando a la ultrasonografía en el ovario se observó la presencia de una estructura anecogénica, correspondiente a un folículo de >40 mm. En el endometrio se observó aumento del ancho de los pliegues endometriales con bordes hiperecogénicos y el centro hipo-ecogénico, correspondiente a un edema 4 característico de estro (Samper, 2009). A la palpación rectal el útero no presentó tono y el cérvix aumento de grosor, lo que indica que está relajado y abierto. La muestra de estro se extrajo cercano al día de la ovulación, y el número de animales para esta etapa fue de 5.

3. Diestro (n=7)

Se consideraron en etapa de diestro cuando a la ultrasonografía del ovario se observó una estructura ecogénica característica de un cuerpo lúteo, sin presencia de folículos dominantes y en el útero se observó edema grado 1 característico de diestro (Samper, 2009). A la palpación rectal el útero presentaba tono, y el cérvix disminuyó de grosor, lo que indica que está cerrado. La muestra de diestro se extrajo entre el día 7 y 10 del ciclo, y el número de animales para esta etapa fue de 7.

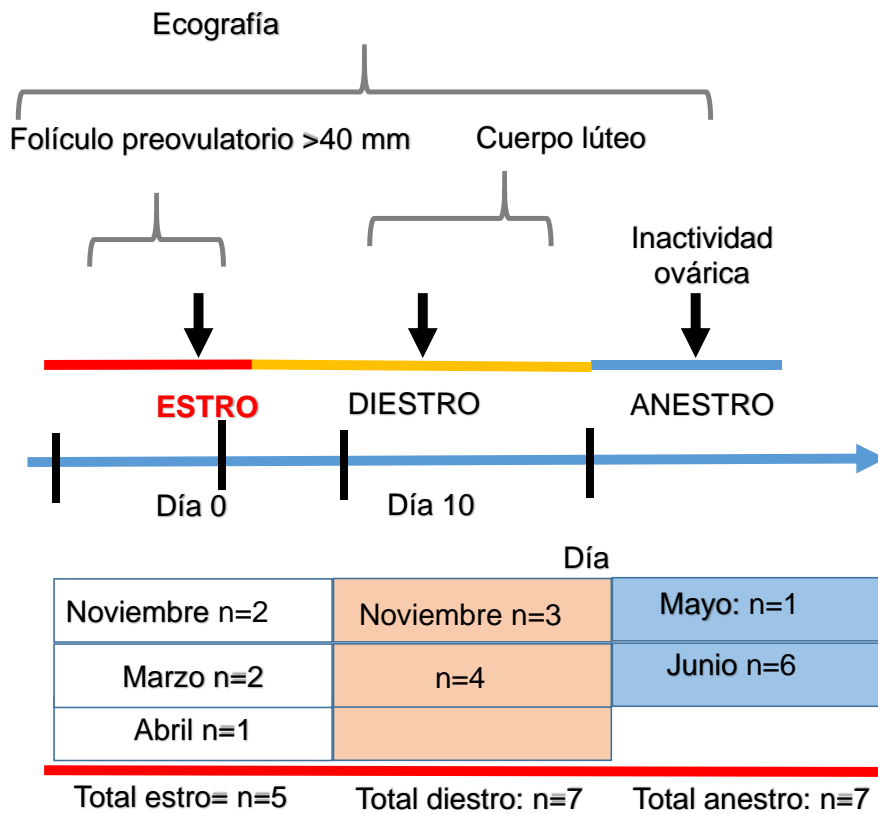


Figura 7. Esquema ilustrativo de etapas reproductivas definidas por ultrasonografía y palpación rectal. Momento de extracción de biopsias endometriales (flechas negras).

5.3. Obtención de muestras

Se tomaron biopsias endometriales de la zona de unión entre el cuerpo y los cuernos uterinos de cada yegua, con una pinza de biopsia marca Jorvet de 60 cm de longitud con una cesta de corte de 1,2 cm por 0,6 cm de ancho, previo higienizado de la zona perineal con jabón neutro y clorhexidina. Las biopsias fueron fijadas en paraformaldehído al 4 %, pH 7,4 durante 24 horas.



Figura 8. Pinza de biopsia (A) con la cual se extrajeron las muestras de endometrio de yeguas, útero de yegua (B) mostrando la unión cuerno-cuerpo uterino (círculo), de donde se extrajo la biopsia adaptado de: (Dyce, 2003).

5.4. Procesamiento histológico

Los procesamientos histológicos, microtomía, ensayos de inmunohistoquímica, coloración de Hematoxilina y Eosina, análisis de imagen (morfométricos y análisis para inmunohistoquímica) se realizaron en el Área de Histología y Embriología, Facultad de Veterinaria de Montevideo, Uruguay a partir de las biopsias previamente tomadas.

Actividades específicas realizadas

1. **Confección de bloque de parafina:** las biopsias endometriales fueron deshidratadas sumergiéndolas en concentraciones crecientes de etanol (70°, 95° y 100°), en cloroformo durante 12 horas, e incluidas posteriormente en 3 baños sucesivos de parafina por 1:30 horas (30 minutos en cada una).
2. **Microtomía:** Se realizaron cortes de 5 micrómetros de espesor en micrótomo (Leica Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Alemania). Se colocaron en un baño de flotación de agua corriente a 37°C. Luego se levantaron los cortes en portaobjetos. Se procedió al secado de las láminas en estufa o platina caliente para evitar el desprendimiento. Se obtuvieron 20 cortes histológicos por biopsia endometrial.
3. **Coloración de Hematoxilina y Eosina:** los cortes fueron desparafinados en xilol, hidratados en concentraciones decrecientes de etanol (100°, 95° y 70°), inmersos en hematoxilina de Mayer por 1 minuto, virados en agua corriente por 3 minutos, inmersos en eosina por 1 minuto, deshidratados en etanol en concentraciones crecientes (70°, 95° y 100°), sumergidos en xilol para su posterior montaje con entellan y colocación de cubreobjeto.
4. **Preparación de soluciones buffer, alicuotado y dilución de anticuerpo:** Para la realización de los ensayos de inmunohistoquímica se debió realizar previamente la preparación de soluciones buffer (Buffer fosfato salino (PBS) y Buffer citrato). Posteriormente se realizó el alicuotado del anticuerpo en tubos eppendorf y se guardó en freezer a -20°C para ser utilizados posteriormente. Luego se llevó a cabo la dilución del anticuerpo, con una concentración final de 1/50 µl previo a la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

5.5. Técnica de inmunohistoquímica

Se realizó el desparafinado de los cortes de endometrio en estufa a 60° (15 minutos), inmersión en xilol (15 minutos); luego se hidrataron por inmersión en concentraciones decrecientes de alcoholes (100°, 95°, 70°). Posteriormente se lavaron en PBS durante 5 minutos y se realizó la recuperación antigénica por calor en microondas con solución buffer citrato 0,01 M pH 6.0, durante 3 minutos a 100% de potencia. Nuevamente se lavó con PBS y luego se procedió a la inactivación de peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Luego se cubrieron los cortes con anticuerpo primario antiHSP-90: mouse monoclonal 37-9400 -clona H90 10, Invitrogen, a una concentración de 1/50 µl. Se incubaron por 18 horas a 4°C. Se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y luego se colocó el anticuerpo secundario biotinilado (concentrado, volumen 10 ml, kit mouse monoclonal HRP/DAB, ab 64259 Abcam) durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS y se colocó el complejo

enzimático estreptavidina-peroxidasa (HRP/DAB detection Kit, ab 64259 Abcam, EEUU) 30 minutos y se lavaron con PBS, para luego realizar el revelado con solución de cromógeno de Diaminobencidina (DAB, volumen 10 ml, HRP/DAB detection Kit, ab 64259, Abcam, EEUU) de 1 a 10 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se agregó Hematoxilina de Mayer durante 30 segundos para la contracoloración. Luego se realizó el virado en agua corriente y la posterior deshidratación en concentraciones crecientes de etanol 70°, 95° y 100°. Por último se realizó el aclaramiento con xilol, montaje con entellan y se colocaron los cubreobjetos. Para verificar la especificidad de la técnica se realizaron controles negativos reemplazando el anticuerpo primario por suero normal.

5.6. Captura de imágenes de preparaciones de inmunohistoquímica

Las imágenes digitales se obtuvieron de los preparados histológicos mediante software de captura. Se capturaron 25 imágenes a 400 aumentos, de cada yegua en cada etapa reproductiva, utilizando el software DinoCapture 2,0 (AnMo Electronics Corporation, Taiwan) de la cámara digital Dino-Eyepiece (AM-423X, AnMo Electronics Corporation, Taiwan) conectada a un microscopio binocular (Premiere profesional, modelo MRP-5000, Manassas, EE.UU.).

5.7. Análisis cuantitativo digital de imágenes

Se realizó el análisis cuantitativo para determinar el porcentaje de área inmunomarcada de HSP90 en:

- a. Epitelio de revestimiento endometrial
- b. Glándulas endometriales
- c. Estroma conjuntivo endometrial
- d. Glándulas y estroma conjuntivo endometrial

Se utilizó el software Image J 1.43m, Wayne Rasband open Source, National Institutes of Health, EEUU, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Dicho procesamiento incluye la segmentación, binarización, umbralización y creación de macro automatizando el procesamiento de cada imagen con los parámetros de intensidad de coloración marrón (DAB positivos) seleccionados/umbralizados previamente.

5.8. Análisis morfométrico

Se midieron mediante software de análisis de imágenes antes mencionado:

- a. altura de epitelio de revestimiento endometrial
- b. diámetro de glándulas endometriales
- c. volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales
- d. volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo endometrial

5.9. Análisis estadístico

Las variables continuas analizadas fueron las siguientes: área inmunomarcada e intensidad de inmunoexpresión de HSP90 en epitelio de revestimiento, glándulas y estroma endometrial; altura de epitelio de revestimiento, diámetro y volumen porcentual ocupado por glándulas y estroma endometrial. Todas las variables fueron expresadas como medias (\pm e.e.m) y se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) considerando en el modelo los efectos de la fecha (estro, diestro y anestro), regiones del endometrio (epitelio, estroma y glándulas endometriales) e interacciones entre ambas. Se utilizó el programa estadístico (SAS; v. 9.1; SAS Institute Inc; Cary, NC, EE.UU). En todos los casos, el nivel de significación fue de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

La evaluación histológica confirmó que las yeguas presentaron un endometrio sin alteraciones histopatológicas.

6.1. Resultados descriptivos de localización de la inmunoexpresión de HSP90 en epitelio de revestimiento endometrial de yeguas.

En el epitelio de revestimiento endometrial la HSP90 se localiza en el citoplasma, núcleo y región perinuclear de las células basales, tanto en estro, diestro y anestro.

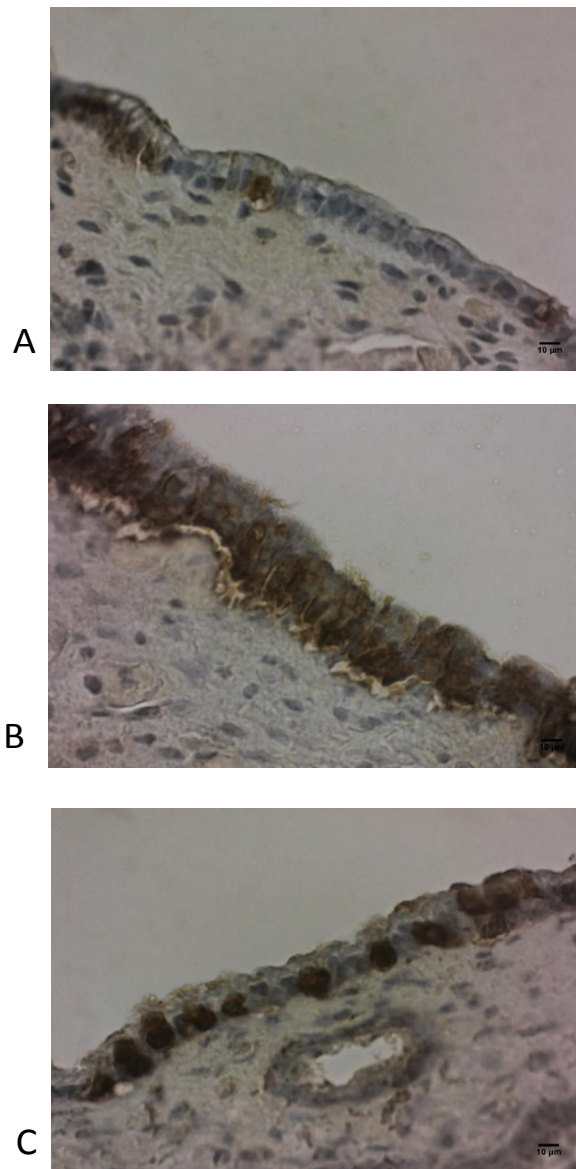


Figura 9. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se marca la inmunoexpresión de la proteína HSP90 en epitelio de revestimiento endometrial en color marrón. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 µm.

6.2. Resultados cuantitativos del porcentaje de área inmunomarcada de HSP90 en epitelio de revestimiento

Se registraron diferencias entre el grupo de yeguas en anestro y en estro ($p < 0,0001$), siendo mayor la inmunoexpresión de HSP90 en el epitelio endometrial en el grupo de estro. También se registraron diferencias entre el grupo de yeguas en estro y en diestro ($p < 0,0001$), siendo la inmunoexpresión de HSP90 en el epitelio endometrial mayor en el grupo de yeguas en estro. Sin embargo no se observaron diferencias en la inmunoexpresión de HSP90 en el epitelio endometrial entre el grupo de yeguas en anestro y en diestro ($p = 0,2949$).

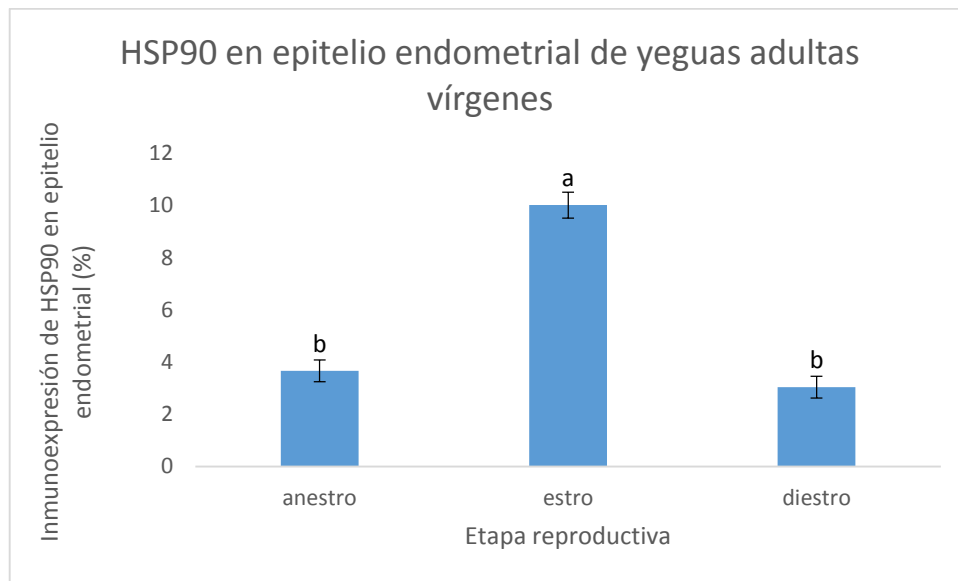


Figura 10. Inmunexpresión de HSP90 en epitelio endometrial de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.3. Resultados descriptivos de localización de la inmunexpresión de HSP90 en glándulas endometriales

En las glándulas endometriales la HSP90 se localiza en la región supranuclear de las células del epitelio glandular, y en algunos núcleos, en etapa de anestro, estro y diestro.

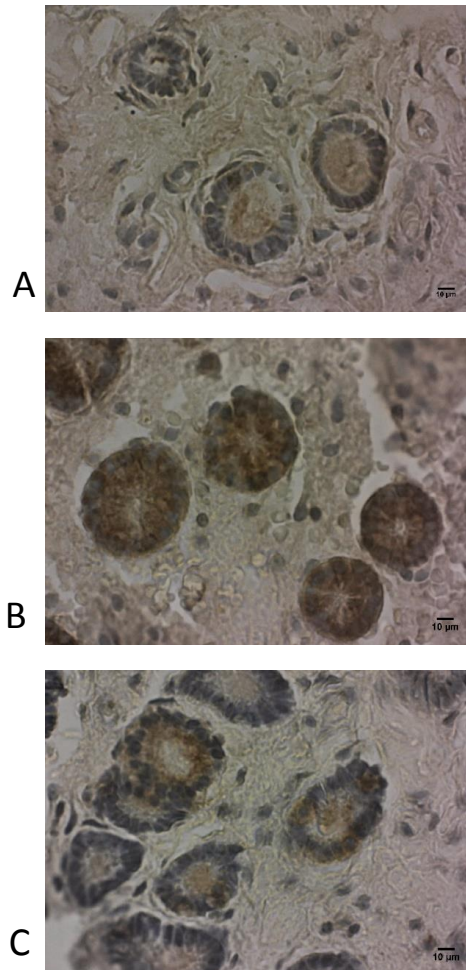


Figura 11. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se marca la inmunexpresión de la proteína HSP90 en glándulas endometriales en color marrón. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 µm.

6.4. Resultados cuantitativos del porcentaje de área inmunomarcada de HSP90 en glándulas endometriales

Se registraron diferencias en la inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales entre el grupo de yeguas en anestro y en estro ($p < 0,0001$), siendo mayor la inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales en el grupo de yeguas en estro. También hay diferencias entre el grupo de yeguas en estro y en diestro ($p < 0,0001$), siendo mayor la inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales en el grupo de yeguas en estro. Asimismo se observaron diferencias entre el grupo de yeguas en anestro y en diestro ($p = 0,0049$), siendo mayor la inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales en el grupo de yeguas en diestro.

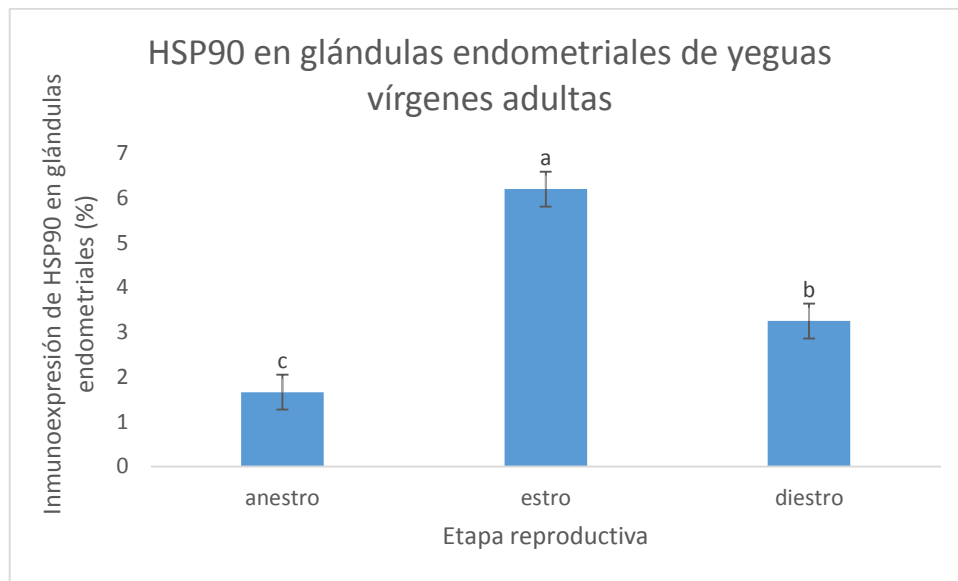


Figura 12. Inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.5. Resultados descriptivos de la inmunexpresión de HSP90 en estroma conjuntivo endometrial.

En el estroma conjuntivo endometrial la HSP90 se expresa en el citoplasma de células mesenquimáticas y en el espacio intercelular, en etapa de anestro, estro y diestro.

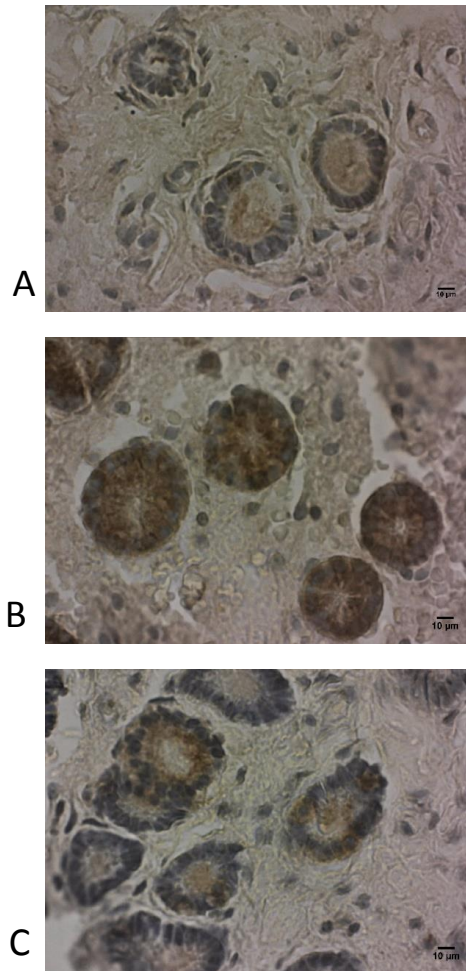


Figura 13. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se marca la inmunexpresión de la proteína HSP90 en el estroma conjuntivo endometrial en color marrón. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 µm.

6.6. Resultados cuantitativos del porcentaje de área inmunomarcada de HSP90 en estroma conjuntivo endometrial.

No se registraron diferencias en la inmunoexpresión de HSP90 en el estroma conjuntivo endometrial entre el grupo de yeguas en anestro y en estro ($p=0,8953$). Si se observaron diferencias entre el grupo de yeguas en estro y en diestro ($p=0,0059$), siendo mayor la inmunoexpresión de HSP90 en el estroma conjuntivo endometrial en el grupo de yeguas en estro. También se observaron diferencias entre el grupo de yeguas en anestro y diestro ($p=0,0041$) siendo mayor la inmunoexpresión de HSP90 en el estroma conjuntivo endometrial en el grupo de yeguas en anestro.

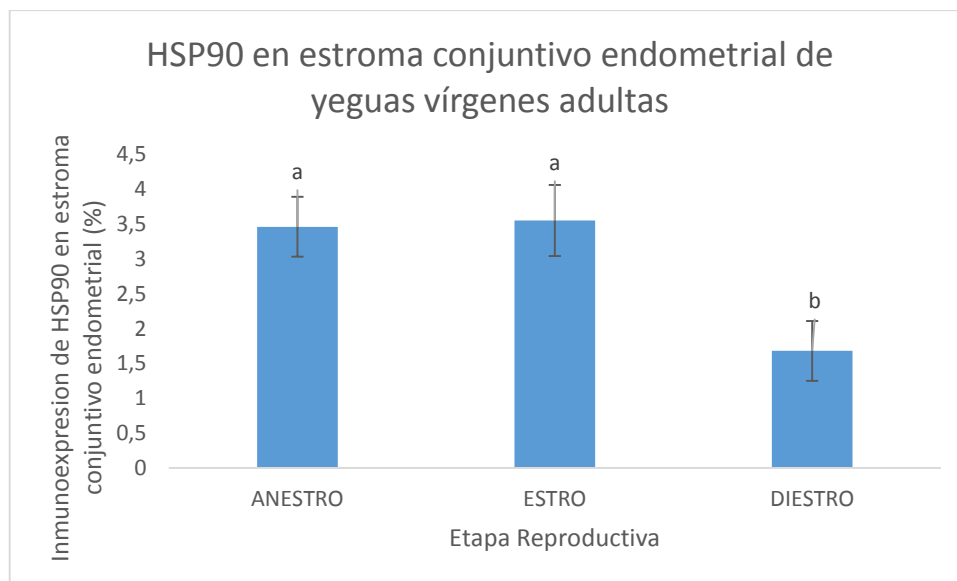


Figura 14. Inmunexpresión de HSP90 en estroma conjuntivo endometrial de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p<0,05$).

6.7. Resultados descriptivos de la inmunexpresión de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial

En las glándulas endometriales la HSP90 se localiza en la región supranuclear de las células del epitelio glandular, y en algunos núcleos, en etapa de anestro, estro y diestro.

En el estroma las HSP90 se expresaron en el citoplasma de células mesenquimáticas y en el espacio intercelular, en etapa de anestro, estro y diestro.

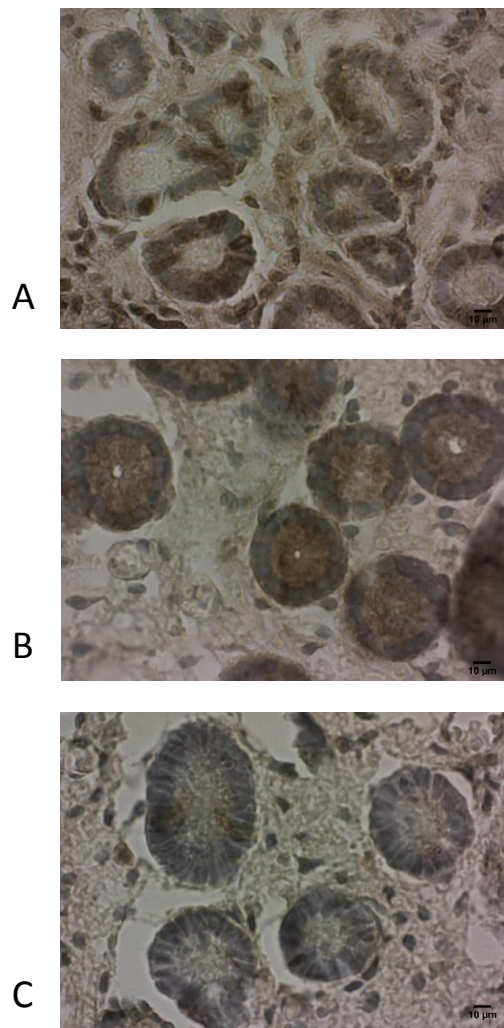


Figura 15. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se marca la inmunexpresión de la proteína HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial en color marrón. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 µm.

6.8. Resultados cuantitativos del porcentaje de área inmunomarcada de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial.

Se registraron diferencias en la inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial entre el grupo de yeguas en anestro y en estro ($p < 0,0001$), siendo mayor la inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial en el grupo de yeguas en estro. También se observaron diferencias entre el grupo de yeguas en estro y en diestro ($p < 0,0001$), siendo mayor la inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial en el grupo de yeguas en estro. Sin embargo no se observaron diferencias entre el grupo de yeguas en anestro y en diestro ($p = 0,8125$).

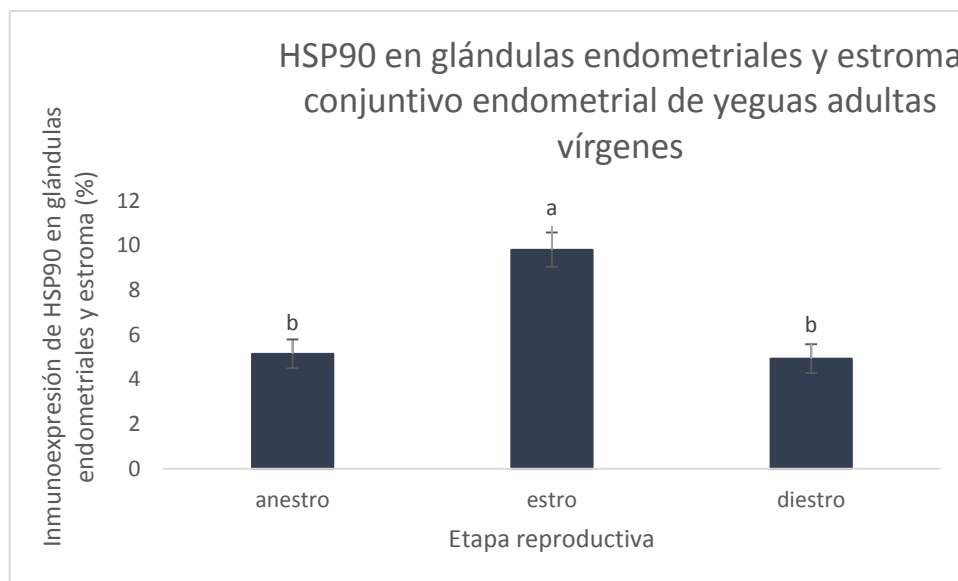


Figura 16. Inmunoexpresión de HSP90 en glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.9. Resultados de análisis morfométrico de endometrio de yeguas

6.9.1. Altura de epitelio de revestimiento endometrial

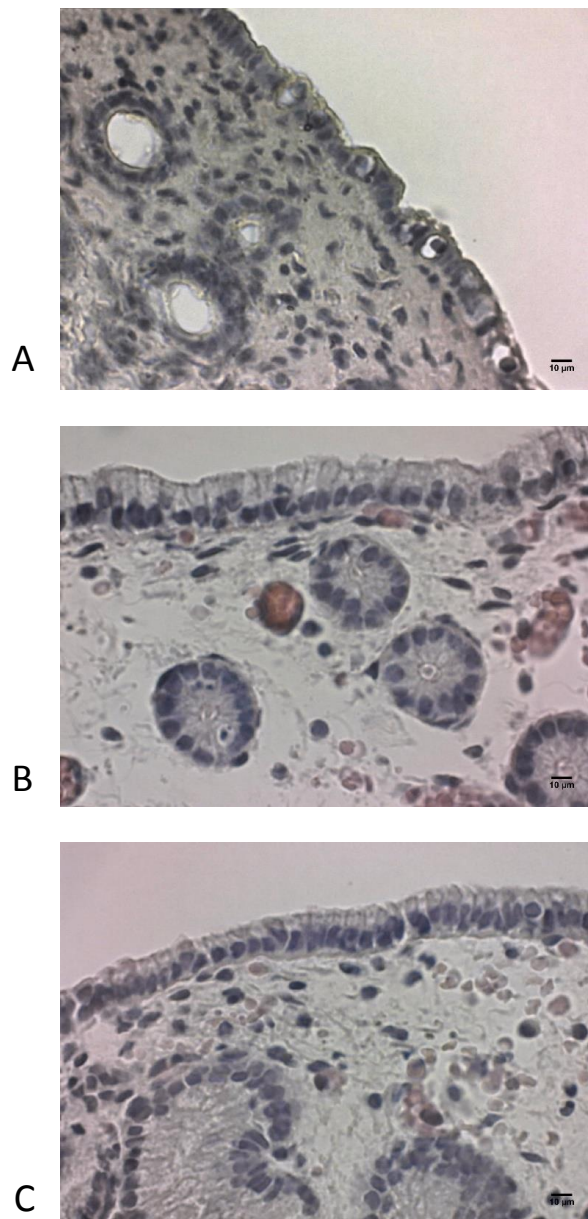


Figura 17. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se aprecia la altura del epitelio de revestimiento endometrial. Técnica de tinción H-E. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 μ m.

Se registraron diferencias en la altura del epitelio de revestimiento endometrial entre el grupo de yeguas que estaban en anestro y estro ($p < 0,0001$), siendo mayor la altura del epitelio de revestimiento endometrial en el grupo de yeguas que estaba en estro. También se registraron diferencias en la altura del epitelio de revestimiento endometrial entre el grupo de yeguas que estaban en estro y diestro ($p < 0,0001$), siendo mayor la altura del epitelio de revestimiento endometrial en el grupo de yeguas

que estaban en estro. Asimismo se registraron diferencias en la altura del epitelio de revestimiento endometrial entre el grupo de yeguas que estaban en anestro y diestro ($p < 0,0001$), siendo mayor la altura del epitelio de revestimiento endometrial en el grupo de yeguas que estaban en diestro.

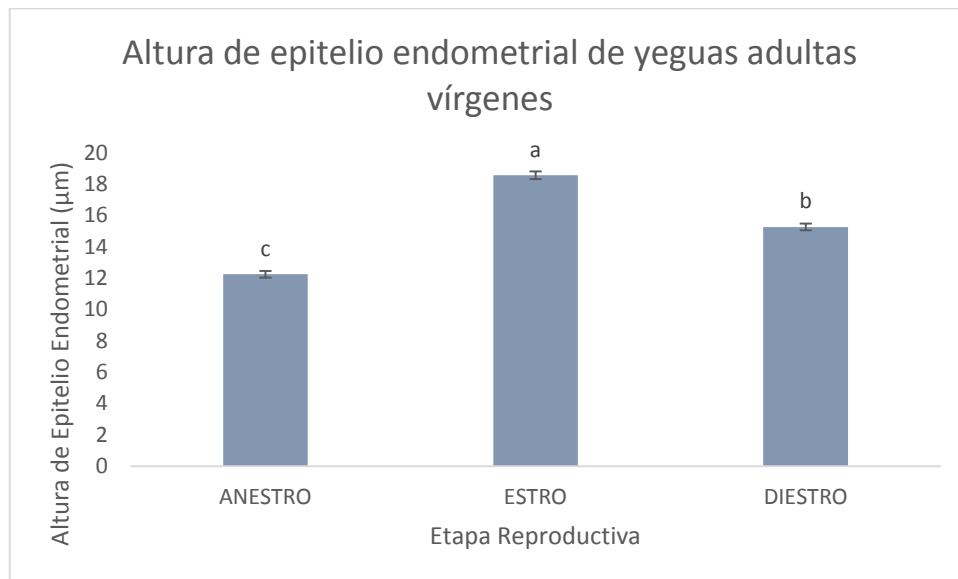


Figura 18. Altura de epitelio de revestimiento endometrial de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.9.2. Diámetro de glándulas endometriales

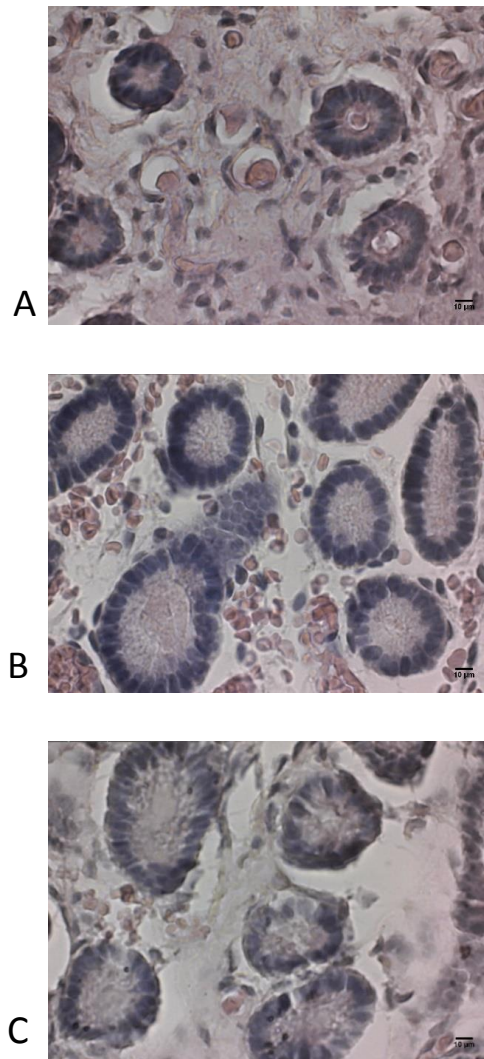


Figura 19. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se aprecia el diámetro de las glándulas endometriales. Técnica de tinción H-E. Magnificación final 400 aumentos. Barra de escala= 10 μ m.

Se registraron diferencias en el diámetro de glándulas endometriales entre el grupo de yeguas que estaban en anestro y estro ($p < 0,0001$), siendo mayor el diámetro de glándulas endometriales del grupo de yeguas que estaban en estro. No se observaron diferencias en el diámetro de glándulas endometriales entre el grupo de yeguas que estaban en estro y diestro ($p = 0,0620$). Se observaron diferencias en el diámetro de glándulas endometriales entre el grupo de yeguas que estaban en anestro y diestro ($p < 0,0001$), siendo mayor el diámetro de glándulas endometriales en el grupo de yeguas que estaban en diestro.

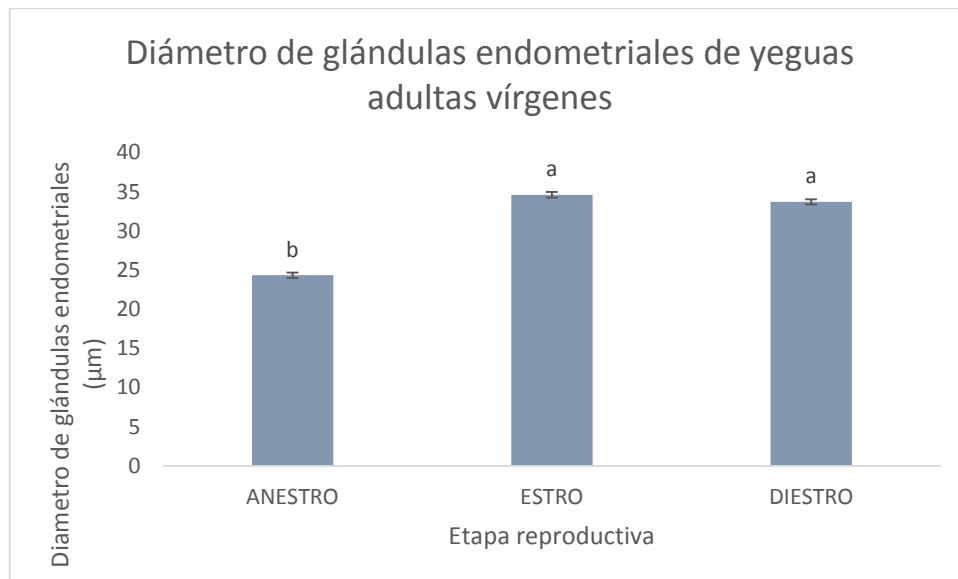


Figura 20. Diámetro de glándulas endometriales de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.9.3. Volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales

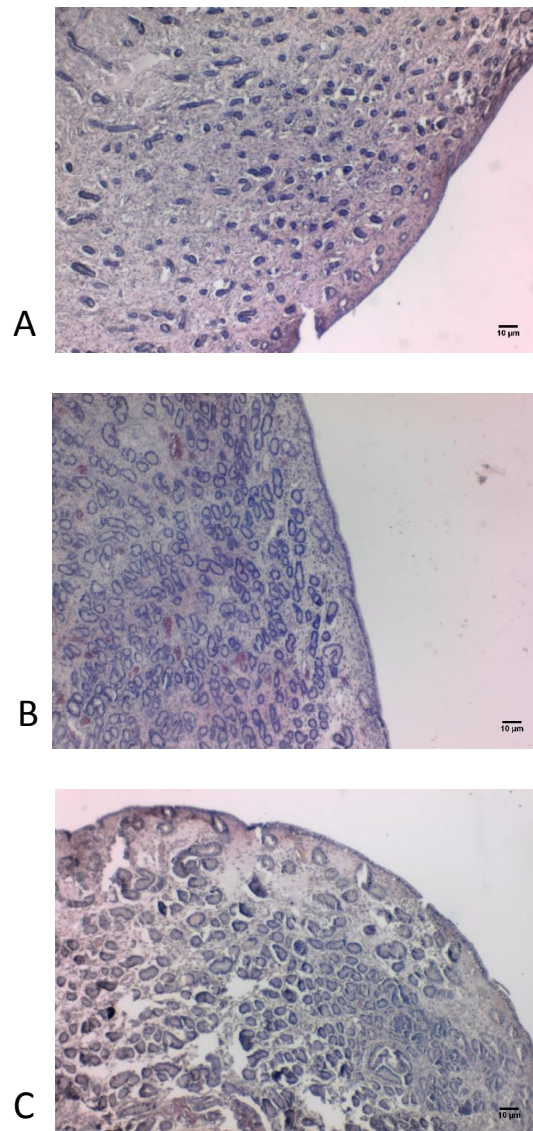


Figura 21. Imágenes representativas de muestras de biopsias endometriales de yeguas en anestro (A), estro (B) y diestro (C) donde se aprecia la densidad de glándulas endometriales y estroma conjuntivo endometrial. Técnica de tinción H-E. Magnificación final 40 aumentos. Barra de escala= 10 µm.

Se observaron diferencias en el volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales entre el grupo de yeguas que estaban en anestro y estro ($p > 0,0001$), siendo mayor el volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales en el grupo de yeguas que estaban en estro. No se observaron diferencias en el volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales entre el grupo de yeguas que estaban en estro y diestro ($p = 0,1073$). Se observaron diferencias en el volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales entre el grupo de yeguas que estaban en anestro y diestro ($p < 0,0001$), siendo mayor el volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales en el grupo de yeguas que estaban en diestro.

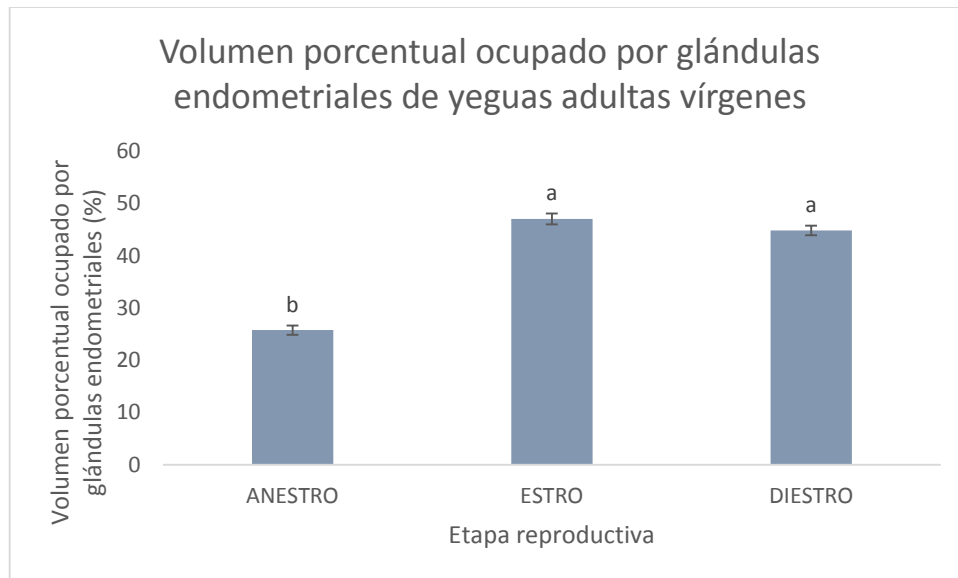


Figura 22. Volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.9.4. Volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo endometrial

Se observaron diferencias en el volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo entre el grupo de yeguas que estaban en anestro y estro ($p > 0,0001$), siendo mayor el volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo en el grupo de yeguas que estaban en anestro. No se observaron diferencias en el volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo entre el grupo de yeguas que estaban en estro y diestro ($p = 0,1073$). Se observaron diferencias en el volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales entre el grupo de yeguas que estaban en anestro y diestro ($p < 0,0001$), siendo mayor el volumen porcentual ocupado estroma conjuntivo en el grupo de yeguas que estaban en anestro.

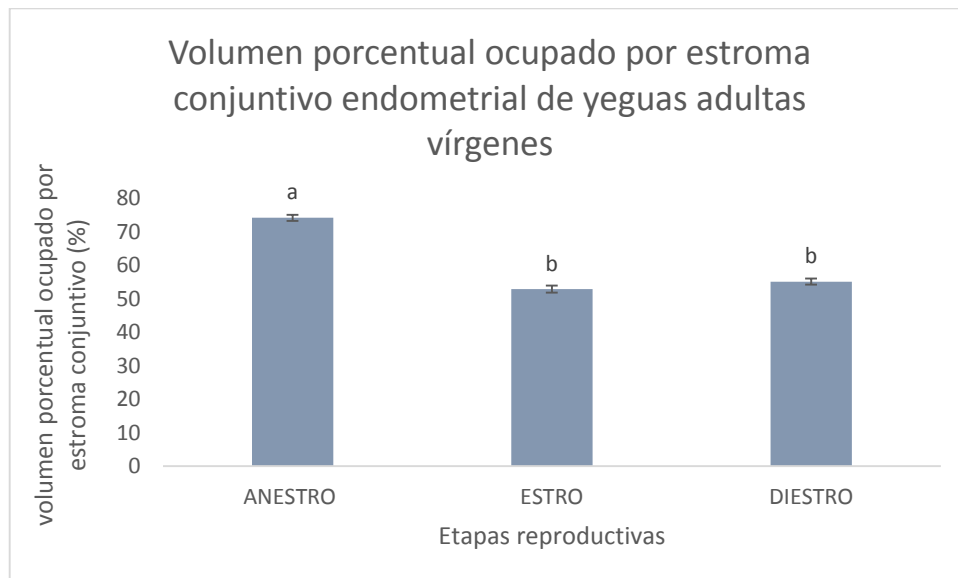


Figura 23. Volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo de yeguas adultas vírgenes en distintas etapas reproductivas: anestro, estro y diestro. Las barras indican medias por grupo \pm error estándar. Diferentes literales en la gráfica sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.10. Resumen de resultados

En la siguiente tabla se resumen los resultados más destacados:

En cuanto a las variables de inmunexpresión de HSP90, se registró un aumento de todas las variables en estro. En diestro todas las variables estuvieron disminuidas con respecto al estro, y en anestro todas las variables disminuyeron, excepto en estroma que fue comparable con el estro.

Dentro de las variables de morfometría, en estro se registró un aumento de todas las variables excepto el volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo endometrial. En diestro se registró un aumento del diámetro y volumen glandular. Y en anestro todas las variables disminuyeron, excepto el volumen porcentual ocupado por estroma endometrial.

	INMUNOEXPRESIÓN HSP90β1			MORFOMETRIA			
	epitelio	glándulas	estroma	Altura de epitelio	Diámetro glandular	Volumen glandular	Volumen estroma
anestro	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↑
estro	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓
diestro	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓

Figura 24. Tabla de resumen de resultados. Flechas indicativas de aumento o disminución de las variables de inmunexpresión de HSP90β1 y morfometría.

7. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que describe la inmunoexpresión y localización de HSP90 en el endometrio de la yegua en fase reproductiva y en anestro. Estudios previos vinculados a HSP90 han relacionado la expresión de estas proteínas en endometrio humano y carcinomas endometriales humanos (Komatsu et al., 1997; Koshiyama et al., 1995; Nanbu et al., 1996).

¿Cómo se expresa la HSP90 en el epitelio endometrial de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?

Nuestros resultados indican que la inmunoexpresión de HSP90 en el epitelio endometrial de la yegua es más alta durante el estro y menor en diestro y anestro. Esto coincide con estudios anteriores que describieron la expresión de HSP90 en el epitelio endometrial de la mujer, donde la expresión fue débil en la fase secretora (Tabibzadeh and Broome, 1999). Esto puede estar asociado a la ausencia de los receptores de estrógenos y progesterona que hay en el epitelio de revestimiento endometrial durante la fase luteal, y al aumento de ellos durante la fase folicular (Hartt et al., 2005). La inmunoexpresión de receptores de estrógenos se presentó en el núcleo y el citoplasma, y los receptores de progesterona en el núcleo principalmente, del epitelio de revestimiento endometrial (Silva et al., 2014).

¿Cómo se expresa la HSP90 en las glándulas endometriales de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?

Nuestros resultados indican que la inmunoexpresión de HSP90 en las glándulas endometriales de la yegua fue más alta en el grupo de yeguas en estro en comparación con el grupo de yeguas en diestro. Nuestros datos referidos a la fase proliferativa del estro y fase secretora de diestro, coinciden con estudios previos realizados en el endometrio humano. Dichos estudios correlacionan esta expresión de HSP90 con la fluctuación de los niveles de receptores de hormonas esteroideas, ya que participa en su modulación funcional, aumentando su inmunoexpresión en las células glandulares durante la fase proliferativa en comparación con la secretora (Komatsu et al., 1997; Hartt et al., 2005). La inmunotinción de receptores de estrógenos está presente en el núcleo y el citoplasma del epitelio glandular, y los receptores de progesterona en el núcleo principalmente (Silva et al., 2014).

¿Cómo se expresa la HSP90 en el estroma endometrial de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?

Nuestros resultados indican que la inmunoexpresión de HSP90 en el estroma endometrial es mayor en estro y anestro en comparación con diestro.

Coincidiendo con estudios anteriores que determinaron que durante el estro, las células estromales tendían a teñir más intensamente para ambos tipos de receptores de estrógeno y progesterona y durante el diestro tendieron a disminuir (Watson et al., 1992).

Hasta el momento no se ha descrito la expresión de HSP90 en etapa de anestro en ninguna especie, este trabajo es el primero en describirlas. Nuestros resultados

indican que no hay diferencias en la expresión de HSP90 en estroma conjuntivo endometrial en anestro y estro.

¿Cómo se expresa la HSP90 en el endometrio de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?

Nuestro resultado de aumento en la inmunoexpresión de HSP90 en el epitelio, estroma y glándulas endometriales del grupo de yeguas en estro y en diestro, en comparación con el grupo de yeguas en anestro, coinciden con el aumento de receptores de estrógenos y progesterona durante los mismos periodos del ciclo reproductivo registrado en estudios previos.

Dichos estudios demostraron la localización de los receptores de estrógenos y progesterona en el epitelio de revestimiento, glándulas y estroma conjuntivo endometrial en el ciclo estral. Estos receptores fueron más altos alrededor del estro, sus niveles disminuyeron en diestro y aumentaron de nuevo en las yeguas cíclicas durante el tiempo en que la luteólisis ocurre normalmente y las yeguas regresan al estro (Hartt et al., 2005, Silva et al., 2014; Koshiyama et al., 1995).

Sugerimos que esta expresión de HSP90 se explica por el nivel de receptores de hormonas esteroideas. Los receptores de estrógenos tienen una regulación positiva sobre la HSP90, y los receptores de progesterona tienen una regulación negativa sobre la HSP90 (Ataba et al., 2001).

¿Cómo varía la altura del epitelio de revestimiento endometrial de la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?

Nuestros resultados se corresponden con descripciones previas de Kenney en 1978, en cuanto a la altura del epitelio de revestimiento endometrial. En anestro se caracteriza por un epitelio luminal cuboidal que mide 10 μm de altura. El epitelio luminal alcanza su altura máxima de 20 - 30 μm en el estro temprano. En algunas yeguas el epitelio puede disminuir a 15 μm en el estro tardío, aunque en otras la disminución no ocurre hasta varios días después del cese de la conducta estral. Después del día siete, correspondiente al diestro la altura del epitelio tiende a incrementarse a 15 μm (Kenney, 1978). La variación de la altura está relacionada a las hormonas que actúan en cada etapa del ciclo.

En cuanto a la altura del epitelio de revestimiento uterino está correlacionada positivamente con nuestros resultados de aumento en la inmunoexpresión de HSP90. Esto coincide con estudios previos que vinculan la HSP90 y HSP27 con la proliferación celular del epitelio endometrial humano (Ataba et al., 2001).

¿Cómo varía el diámetro de las glándulas endometriales en la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?

Las descripciones de diámetro glandular y altura del epitelio glandular se realizaron ambas en procesos inflamatorios, pero no diferenciados por etapas del ciclo (Monteiro et al., 1994). Existe una correlación positiva entre espesor y densidad glandular, que aumentan en diestro, dado su importancia en la producción de secreciones de glucoproteínas de las glándulas endometriales (leche uterina) que forma la primera nutrición a partir de (histotrofo) del embrión y anexos embrionarios (Hanada et al., 2012).

Nuestros resultados indican que hay mayor diámetro en estro y diestro, con respecto al anestro. Encontramos una correlación en el presente trabajo, entre el diámetro y volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales, en estro y diestro. Ésto se explica por la función que cumple la secreción glandular en la inminente implantación del embrión (Hanada et al., 2012).

¿Cómo varía el volumen porcentual ocupado por glándulas endometriales en la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?

Los datos obtenidos con referencia a los diámetros glandulares y volumen ocupado por glándulas endometriales a nuestro entender son los primeros realizados en yeguas, y nos dan un paneo general de la actividad endometrial.

Estudios previos determinaron la importancia de la correlación entre el grosor endometrial y la densidad glandular, para la supervivencia del embrión y desarrollo fetal. Esto se manifiesta en la etapa de diestro, donde las glándulas endometriales aumentan su tortuosidad y se ramifican en las capas más profundas del endometrio, bajo la influencia de la progesterona luteal, lo que resulta en un aumento en el número de glándulas endometriales. También describe que la toma de la biopsia en la unión cuerno-cuerpo uterino es el mejor lugar para reflejar el estado del endometrio, ya que es el lugar donde normalmente se implanta el concepto (Hanada et al., 2012).

Por otra parte, nuestros resultados indican que el diámetro glandular no solo está aumentado en diestro sino también en estro. Esto puede estar atribuido a que nuestro muestreo de glándulas, no diferenció entre regiones superficial, media y profunda. Estudios previos realizados en ovinos dividen en tres regiones el endometrio (superficial, media y profunda) para el análisis de receptores tanto para el estroma como las glándulas endometriales, no registrando análisis morfométricos (Meikle et al., 2000).

¿Cómo varía el volumen porcentual ocupado por estroma conjuntivo endometrial en la yegua en etapa de anestro, estro y diestro?

Con el volumen porcentual ocupado por el estroma conjuntivo endometrial, ocurre lo contrario al volumen porcentual ocupado por las glándulas endometriales. En anestro hay mayor volumen porcentual de estroma que en estro y diestro; esto se da por el menor desarrollo de las glándulas endometriales, durante el anestro (Barone, 1978).

Por último, como mencionamos anteriormente, durante el anestro, no hay actividad cíclica por lo que, por lo tanto no hay niveles elevados de hormonas estrógenos y

progesterona circulantes, lo que lleva a una muy baja actividad glandular, y atrofia glandular, tal como describe Kenney durante el anestro estacional, aumentando por lo tanto el volumen estromal. La inmunexpresión de HSP90 se correalaciona positivamente con el aumento del volumen estromal.

Consideraciones finales de la expresión de la proteína de shock térmico HSP90 en endometrio de yeguas en anestro y durante el ciclo reproductivo

Con todo lo anteriormente mencionado, podemos concluir que la HSP90 se expresa en endometrio de las yeguas. Podemos afirmar que se localiza en distintos tejidos que componen el endometrio y que su expresión varía de acuerdo a la etapa reproductiva.

Dada la importancia de las HSP90 y su vinculación a procesos inflamatorios, como la endometritis, podemos afirmar que este estudio sienta las bases para futuros trabajos de análisis del endometrio en diferentes condiciones patológicas o terapéuticas. La proteína de shock térmico HSP90 β 1, por lo tanto está expresada en endometrio de yeguas y se localiza tanto en epitelio de revestimiento, estroma y glándulas endometriales.

Su expresión varía de acuerdo a la etapa del ciclo reproductivo, siendo por otra parte expresada en la etapa de anestro. Los cambios en la inmunexpresión de la proteína de shock térmico HSP90 β 1 son concomitantes con los cambios morfológicos y morfométricos del endometrio y sus tejidos constituyentes.

8. CONCLUSIONES

El presente estudio determinó que en el endometrio de yegua durante distintos momentos reproductivos, estro, diestro y anestro, existe expresión de proteínas de shock térmico. Hasta donde sabemos éste es el primer reporte acerca de la expresión de proteínas de shock térmico en endometrio equino.

Específicamente los resultados evidenciaron la inmunoexpresión de la proteína de shock térmico HSP90, tanto en epitelio de revestimiento endometrial, como en glándulas y estroma conjuntivo endometrial. Asimismo se cuantificó dicha inmunoexpresión en los tejidos antes mencionados, demostrando diferencias de acuerdo a la etapa del ciclo reproductivo. A partir de los datos obtenidos podemos concluir que en el endometrio de la yegua, la mayor inmunoexpresión de HSP90 se manifiesta durante el estro.

Dada la importancia de las HSP90, mencionada en el endometrio humano, así como los cambios observados en su expresión durante el ciclo estral, podemos afirmar que dicha proteína interviene en la reproducción de las yeguas. Los resultados obtenidos en el presente estudio sientan las bases para futuros análisis comparativos de la expresión de la HSP90 en endometrio de yeguas en diferentes condiciones, tanto patológicas como terapéuticas. Este estudio sienta las bases para posteriores análisis reproductivos

Se espera continuar los estudios vinculados a reproducción equina mediante otros abordajes metodológicos de hibridación in situ para determinar las células que producen proteínas de shock térmico y western blot para cuantificar dichas proteínas en el endometrio de yeguas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ataba KW, Aito TS, Ukunaka KF, Shihara KA, Ishimura MN, Udo RK (2001). Over-Expression of Heat Shock Proteins in Carcinogenic Endometrium. *Int. J. Cancer* 456: 448–456.
2. Aurich C (2011). Reproductive cycles of horses. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 220–228.
3. Bagchi MK, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1991). Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, hsp56, and hsp70. *J. Mol. Cell. Biol.* 11: 4998–5004.
4. Barone R (1978). *Anatomie comparée des mammifères domestique*. Lyon, Beaux-Arts, 951p.
5. Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D (2011). *Manual of Equine Reproduction*. Missouri, Elsevier, 332 p.
6. Choe C, Park J-W, Kim E-S, Lee S-G, Park S-Y, Lee J-S, Cho M-J, Kang KR, Han J, Kang D (2010). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine endometrium with endometritis. *J. Korean J. Physiol. Pharmacol.* 14: 205–212.
7. Coleman SJ, Zeng Z, Hestand MS, Liu J, Macleod JN (2013). Analysis of Unannotated Equine Transcripts Identified by mRNA Sequencing. *Plos One* 8: e70125.
8. Cortés-González CC, Ramírez-González V, Ariza AC, Bobadilla NA (2008). Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa. *Rev. Investig. Clin.* 60: 311–320.
9. Dellmann HD (1994). *Histología veterinaria*. Zaragoza, Acribia, 408 p.
10. Doig PA, McKnight JD, Miller RB (1981). The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can. Vet. J.* 22: 72–76.
11. Dyce KM (2003). *Anatomía Veterinaria*. Mexico D.F, Mc. Graw-Hill Interamericana, 956 p.
12. Flynn JM, Mishra P, Bolon DNA (2015). Mechanistic Asymmetry in Hsp90 Dimers. *J. Mol. Biol.* 427: 2904–2911.
13. Fradinho MJ, Correia MJ, Grácio V, Bliebernicht M, Farrim A, Mateus L, Martin-Rosset W, Bessa RJB, Caldeira RM, Ferreira-Dias G (2014). Effects of body condition and leptin on the reproductive performance of Lusitano mares on extensive systems. *Theriogenology* 81: 1214–1222.

14. Gebhardt S, Merkl M, Herbach N, Wanke R, Handler J, Bauersachs S (2012). Exploration of Global Gene Expression Changes During the Estrous Cycle in Equine Endometrium. *Biol. Reprod.*: 87(6):136, 1–13.
15. Getty R, Sisson S, Grossman JD, Martín Roldán R (1982). *Anatomía de los animales domésticos*. Filadelfia, MASSON, 1416 p.
16. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA (2008). Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Periovulatory Hormones: What's New? *J. Equine Vet. Sci.* 28: 454–460.
17. Ginther OJ, Utt MD, Bergfelt DR, Beg MA (2006). Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 95: 144–150.
18. Hafez ESE and BH (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*. Mexico D.F, McGraw-Hill, 519 p.
19. Hanada M, Maeda Y, Oikawa M (2012). Equine Endometrial Gland Density and Endometrial Thickness Vary among Sampling Sites in Thoroughbred Mares. *J. Equine Sci.* 23: 35–40.
20. Hartt LS, Carling SJ, Joyce MM, Johnson GA, Vanderwall DK, Ott TL (2005). Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction* 130: 241–250.
21. Ici A, Papaconstantinou AD, Fisher BR, Umbreit TH, Goering PL, Lappas NT, Brown KM (2001). Effects of β -Estradiol and Bisphenol A on Heat Shock Protein Levels and Localization in the Mouse Uterus Are Antagonized by the. *Toxicol. Sci.*, 180: 173–180.
22. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14: 105–111.
23. Katila T (1996). Uterine defence mechanisms in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 197–204.
24. Kenney RM (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 241–262.
25. Komatsu T, Konishi I, Fukumoto M, Nanbu K, Koshiyama M, Mandai M, Mori T (1997). Messenger ribonucleic acid expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in human endometrium and myometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1385–1389.

26. Koshiyama M, Konishi I, Nanbu K, Nanbu Y, Mandai M, Komatsu T, Yamamoto S, Mori T, Fujii S (1995). Immunohistochemical localization of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in the human endometrium: correlation with sex steroid receptors and Ki-67 antigen expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 1106–1112.
27. Li J, Buchner J (2012). Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomed. J.* 36: 106–117.
28. Maio A De, Gabriella Santoro M, Tanguay RM, Hightower LE (2012). Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: A new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones* 17: 139–143.
29. Maio A De, Vazquez D (2013). Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock* 40: 239–246.
30. McKinnon A, Squires E, Vaala W, Varner D (2011). *Equine Reproduction*, 2^a ed. Chichefter, Wiley-Blackwell, 3288 p.
31. 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. *Reprod. Nutr. Dev.* 40: 587–596.
32. Miro J (2012). Ovarian Ultrasonography in the Mare. *Reprod. Domest. Anim.* 47: 30–33.
33. Monteiro CMR, Silva CAM, Barros SS de (1994). Morfologia E Morfometria Das Dilatações Glandulares No Endométrio Da Égua. *Ciência Rural* 24: 127–131.
34. Morel MCGD (2003). *Equine Reproductive Physiology, Breeding, and Stud Management*. Wallingford, Cabi, 417p.
35. Ortega-Domínguez, Bibiana Herrera-Ramírez, Marlene Tecalco-Cruz A (2015). Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *Tip Rev. espec. cienc. quim-biol.*, 18: 131–143.
36. Palmer E (1978). Control of the oestrous cycle of the mare. *J. Reprod. Fert* 5: 495–505.
37. Pratt WB (1997). the role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via map kinase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 297–326.
38. Pratt WB, Dittmar KD (1998). Studies with purified chaperones advance the understanding of the mechanism of glucocorticoid receptor-hsp90 heterocomplex assembly. *Trends Endocrinol. Metab.* 9: 244–252.

39. Raz T, Aharonson-Raz K (2012). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the mare. *Isr. J. Vet. Med.* 67: 11–18.
40. Roberts SJ (1979). *Obstetricia veterinaria y patologica de la reproducción*. Buenos aires, Hemisferio Sur, 2021 p.
41. Röhl A, Rohrberg J, Buchner J (2013). The chaperone Hsp90: Changing partners for demanding clients. *Trends Biochem. Sci.* 38: 253–262.
42. Saibil H (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 630–642.
43. Samper JC (2009). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Missouri, Elsevier, 336 p.
44. Silva ESM, Scoggin KE, Canisso IF, Troedsson MHT, Squires EL, Ball BA (2014). Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E2 in the endometrium and myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 151: 169–181.
45. Snider TA, Sepoy C, Holyoak GR (2011). Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology* 75: 1567–1581.
46. Squires J (2006). *Endocrinología animal aplicada*. Zaragoza, Acribia, 265 p.
47. Tabibzadeh S, Broome J (1999). Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 7: 5–9.
48. Watson ED, Skolnik SB, Zanecosky HG (1992). Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology* 38: 575–580.
49. Yuan JX, Xiao LJ, Lu CL, Zhang XS, Liu T, Chen M, Hu ZY, Gao F, Liu YX (2009). Increased expression of heat shock protein 105 in rat uterus of early pregnancy and its significance in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 23.