



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**PREÑEZ TEMPRANA EN LA YEGUA: CAMBIOS
ENDOMETRIALES Y DE HORMONAS CIRCULANTES DESDE LA
OVULACIÓN HASTA LOS 13 DÍAS**

Evaluación De La Histomorfología, La Inflamación Endometrial Y Las Hormonas
Circulantes En Yeguas Sanas Desde La Ovulación Hasta Los 13 Días Del Ciclo
Estral Y Preñez

María Noel Martínez Pereira Machado

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2016**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**PREÑEZ TEMPRANA EN LA YEGUA: CAMBIOS
ENDOMETRIALES Y DE HORMONAS CIRCULANTES DESDE LA
OVULACIÓN HASTA LOS 13 DÍAS**

**Evaluación De La Histomorfología, La Inflamación Endometrial Y Las Hormonas
Circulantes En Yeguas Sanas Desde La Ovulación Hasta Los 13 Días Del Ciclo
Estral Y Preñez**

María Noel Martínez Pereira Machado

**Dr. Daniel Cavestany
Director de Tesis**

**Dr. Rodrigo Costa Mattos
Dra. Ana Meikle
Co-directores**

2016

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Carolina Viñoles; DVM, MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay

Sandra Fiala Rechsteiner; DVM, MS, PhD
Instituto de Biología
Universidad Federal de Pelotas – Brasil

Marcelo Miragaya; DVM, MS, PhD
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Buenos Aires – Argentina

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN.....	iii
SUMMARY	iv
ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES GENERALES.....	2
2.1 Sistema reproductivo y Ciclo estral en la yegua	2
2.2 Luteólisis en la yegua	3
2.3 Reconocimiento materno de la preñez, inhibición de la luteólisis y desarrollo embrionario temprano	5
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	7
3.1 Progesterona en el diestro y la preñez temprana	7
3.2 17 β estradiol en el diestro y la preñez temprana	8
3.3 Hormonas metabólicas asociadas a la preñez temprana y el diestro	10
Insulina.....	10
Factor de crecimiento insulínico tipo 1.....	11
Hormonas secretadas por el tejido adiposo: Leptina y adiponectina.....	12
3.4 El endometrio	15
Estructura	16
Cambios histológicos.....	16
Histomorfometría endometrial del diestro y la preñez temprana	17
Células inflamatorias endometriales durante la preñez temprana	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
4.1 HIPOTESIS	21
4.2 OBJETIVOS.....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	22
5.1 Diseño experimental.....	22
5.2 Procesamiento de las muestras	23
5.2.1 Biopsias endometriales.....	23
5.2.2 Determinación hormonal.....	24
5.3 Análisis estadístico	25
6. RESULTADOS	26

6.1	Histomorfología endometrial.....	26
6.2	Inflamación endometrial.....	30
6.3	Perfiles hormonales	33
6.4	Correlación entre las concentraciones hormonales, las variables histomorfológicas y el número de células inflamatorias	36
7.	DISCUSIÓN	38
8.	CONCLUSIONES	42
9.	CONSIDERACIONES FINALES.....	42
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo financiero de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (041/2011), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (474350/2011-8) y FAPERGS. Fue realizado con el apoyo de una beca de maestría de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Muchas gracias a las personas que me ayudaron a realizar este trabajo:

Al Dr. Daniel Cavestany, por apoyar el proyecto en todos sus aspectos.

Al Dr. Rodrigo Costa Mattos, por poner la cabeza en mi trabajo, sin él hubiera sido imposible completar la redacción del trabajo y realizar el análisis de los datos obtenidos, siempre con buen humor y disposición. Por impulsar la idea inicial del proyecto y apoyarlo en todos los sentidos.

A la Dra. Ana Meikle, que a pesar de su falta de tiempo me dispuso un espacio para evacuar mis dudas, siempre pendiente de mi trabajo en el laboratorio e incluso me ayudó a llevarlo a cabo. Gracias por instruirme en el manejo del SAS, ayudarme en el análisis de los datos y guiarme en la redacción del mismo. A su vez, por apoyar el proyecto y ayudar a bajarlo a tierra.

A la Dra. Irene Kalpokas por la ayuda y el apoyo incansable, desde ayudarme en problemas en la parte experimental del proyecto, conseguir los insumos, la redacción de tesis, por bajar a tierra el proyecto. Siempre con una palabra de aliento, para mí es un placer y un orgullo poder trabajar con ella en nuestra práctica privada, encontré una gran amiga.

Al Dr. Fernando Perdígón, una persona increíble que me apoya sin esperar nada a cambio cada día en nuestro trabajo y no fue menos en este proyecto. Sin su ayuda no podría haberlo llevado a cabo. Me brindó desinteresadamente el grupo de yeguas necesarias para el trabajo así como el personal que me ayudó y el uso de las instalaciones de Míguas. Sin él, el desafío inicial de la recuperación de embriones y todo el trabajo experimental hubiera sido imposible. Me sentí muy apoyada.

Al Dr. Rodolfo Rivero que me instruyó en la técnica de biopsia endometrial, haciéndose un tiempo y brindándome los materiales para que pudiera aprender la técnica que fue una herramienta esencial para llevar a cabo éste proyecto.

A la Dra. Sandra Fiala que me instruyó en la evaluación histopatológica esencial para el procesamiento de las muestras y me brindó un espacio en el Departamento de Morfología del Instituto de Biología de la Universidad Federal de Pelotas (Brasil) para preparar las láminas histológicas. A su vez quiero agradecer al equipo donde se realizaron las láminas por hacerme sentir muy a gusto, explicarme y dejarme participar en todo el proceso.

Al Dr. Alejandro Bielli por permitirme utilizar los materiales del departamento de Histología para realizar la toma de fotografías de las láminas y por instruirme en el

funcionamiento del software de análisis de imagen, también esencial para llevar a cabo el trabajo.

A las chicas del laboratorio de Técnicas nucleares: Isabel, Paula, Claudia, Victoria, Andrea, Gretel por la buena disposición y ayuda constante. En especial a la Lic. Milena Sequeira quien me ayudó a realizar los RIAs y me instruyó en el funcionamiento del SAS. En ella encontré una muy buena compañera con la cual compartimos largas jornadas en el laboratorio de técnicas nucleares.

Al personal del campo experimental N°1 de Miguez por siempre hacerme sentir muy a gusto, en especial al Sr. Jorge Rodriguez, quien siempre de buen humor a pesar de las largas jornadas de trabajo con yeguas difíciles estaba siempre listo para trabajar.

A Fatro por la donación de sedantes, al Nutritec por la donación de Prostaglandina F2 α , a Sinervia por la donación de hCG, a Biotay por la reducción en los precios de sus productos.

A mi familia que incondicionalmente me apoya en todo lo que me proponga y especialmente a mi padre, Dr. Luis Fernando Martínez, por la invención de la sonda que nos permitió obtener los lindos embriones de 13 días.

A Juan Pablo, mi compañero de vida. Que padeció el día a día de este trabajo siempre alentándome a seguir y a ser mejor, a nunca bajar los brazos. E incluso por poner su cabeza y tiempo en solucionarme problemas que estaban a su alcance solucionar.

Muchas gracias a todos!!

“Intelligence is not what you know, but what you do when you don't know”

Jean Piaget

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar alteraciones histológicas del endometrio, variaciones de las concentraciones séricas de progesterona, 17β estradiol, insulina, factor de crecimiento insulínico tipo 1, leptina y adiponectina de yeguas durante la gestación temprana, en comparación con yeguas cíclicas y verificar la existencia de correlaciones entre las variables. Se utilizaron 30 yeguas sanas, durante un ciclo vacío (yeguas cíclicas) y un ciclo preñado (las yeguas fueron asignadas al grupo preñado solamente tras la recuperación embrionaria exitosa). Las hormonas fueron determinadas diariamente mediante radioinmunoanálisis, desde la ovulación hasta los 13 días del ciclo estral y preñez. Paralelamente se tomaron biopsias endometriales en los días 7, 10 y 13 del ciclo estral y preñez, a través de las cuales se realizó un estudio histomorfológico de la estructura glandular endometrial y del epitelio luminal, además de cuantificar las células inflamatorias presentes en el tejido endometrial. Dentro de las mediciones histomorfológicas, no se detectaron diferencias en la altura del epitelio luminal entre los días de muestreo, ni entre los grupos; sin embargo se registraron mayores valores en las yeguas preñadas que en las cíclicas en la altura del epitelio glandular, el diámetro glandular, el diámetro del lumen glandular y de las secreciones intraglandulares ($P < 0,05$). El epitelio y el diámetro glandular decrecieron a lo largo de los días de muestreo en ambos grupos, mientras que el lumen y las secreciones glandulares aumentaron a través de los días en el grupo preñado ($P < 0,05$) no observándose variaciones en el grupo cíclico. Se observaron mayor cantidad de eosinófilos y linfocitos el día 7 en las yeguas preñadas que en las cíclicas ($P < 0,05$), reduciéndose ambos tipos celulares en las yeguas preñadas a lo largo de los días de muestreo ($P < 0,05$). De las hormonas séricas medidas, no se detectaron diferencias entre los grupos de estudio con la excepción de la insulina sérica que tendió a ser mayor en el grupo cíclico que el preñado ($P = 0,07$); con mayores concentraciones los días 8 y 12 en las yeguas cíclicas que en las preñadas ($P < 0,05$). En conclusión, la preñez temprana se asoció a cambios en las glándulas endometriales y en las células inflamatorias presentes en el tejido endometrial. Además se observaron cambios en la insulina sérica durante la preñez temprana. De las hormonas determinadas solamente la progesterona se correlacionó con cambios histomorfológicos en ambos grupos de yeguas y con cambios en las células inflamatorias en las yeguas preñadas, a su vez los cambios glandulares se vieron interrelacionados.

SUMMARY

The objective of the present study was to compare histological changes and levels of serum progesterone, 17β estradiol, insulin, insulin-like growth factor 1, leptin and adiponectin in pregnant and non-pregnant mares and verify the existence of correlations between variables. Thirty healthy mares were used during a non-pregnant and a pregnant cycle (mares were assigned to the pregnant group only after successful embryo recovery). Hormones were determined daily by radioimmunoassay, from ovulation until the 13th day of the estrous cycle and pregnancy. Endometrial biopsies were taken at days 7, 10 and 13 of the estrus cycle and pregnancy, through which a histomorphological study of endometrial glandular structure and of the luminal epithelium and quantification of the inflammatory cells present in endometrial tissue were performed. Within the histomorphological measurements, higher values were registered in the height of glandular epithelium, glandular diameter, glandular lumen diameter and glandular secretions in pregnant mares than in cyclic mares ($P < 0.05$). Glandular epithelium height and glandular diameter decreased along sampling days in both groups, while glandular lumen diameter and glandular secretions increased along days in pregnant group ($P < 0.05$); with no variations in the cyclic group. No difference was detected in the height of luminal epithelium between sampling days and between groups. Greater number of eosinophils and lymphocytes were observed in pregnant mares than in cyclic ones on day 7 after ovulation ($P < 0.05$), both cellular types decreased along sampling days in pregnant mares ($P < 0.05$). No differences were found in the levels of hormones measured between the study groups, with the exception of serum insulin, that tended to be higher in the cyclic group than in the pregnant group ($P = 0.07$), showing higher concentrations in days 8 and 12 in cyclic mares ($P < 0.05$). In conclusion, early pregnancy is associated with changes in the endometrial glands and in the inflammatory cells within the endometrial tissue, and changes in serum insulin. Among the measured hormones, only progesterone was correlated with histomorphological changes in both groups of mares, and with changes in inflammatory cells in pregnant mares. At the same time, changes in endometrial glands were associated.

ABREVIATURAS

Adipo R1 y R2	Receptor de adiponectina 1 y 2
CL	Cuerpo lúteo
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
COX-2	Ciclooxigenasa 2
E2	17 β estradiol
EC	Estrato compacto
EE	Estrato esponjoso
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	Hormona de crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGFBP-3	Proteína de unión de alta afinidad 3 para IGF 1
IGFBPs	Familia de proteínas de unión de alta afinidad para IGF 1
INF τ	Interferon tau
LG	Lumen glandular
LH	Hormona luteinizante
MB	Membrana basal
NK	Natural killers
Ox	Oxitocina
P4	Progesterona
PAS	Ácido periódico de Schiff
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGFM	13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha
PMN	Polimorfonucleares
RMP	Reconocimiento materno de la preñez
ROx	Receptores de oxitocina

1. INTRODUCCIÓN

La industria equina es heterogénea y las motivaciones para la cría son igualmente variadas; van desde aspectos sentimentales a económicos (Samper, 2009). El vínculo con los equinos se escapa de una definición simple, proviene de un reconocimiento de que los caballos son realmente diferentes de cualquier otro animal doméstico. Los caballos son únicos no sólo en la fisiología de su reproducción, sino en el lugar que ocupan en nuestra sociedad. El caballo puede ser un compañero, un animal de trabajo, un animal de rendimiento, o simplemente algo etéreo para sus propietarios (McKinnon et al. 2011).

En nuestro país, un estudio realizado por Ferrari et al. (2012) muestra que en los últimos 10 años la industria equina ha adquirido un importante desarrollo, en consecuencia del aumento de la exportación de caballos en pie y de la participación en los deportes ecuestres, con la consecuente generación de empleos. Para el 2012, el sector ecuestre generaba 18.000 empleos al país (trabajadores que componen núcleos familiares de 67.000 personas); con un stock de 425.000 caballos.

A través de los siglos, el caballo ha sido seleccionado basado principalmente en sus habilidades para la guerra, la carga, los deportes y exposición, pero no por su fertilidad. No es extraño entonces que la yegua presente la más baja eficiencia reproductiva de los animales domésticos (Ginther, 1992). La preñez temprana es un período importante de pérdida embrionaria que afecta económicamente a la industria equina (Hayes et al. 2012), provoca un aumento en los costos debido a la necesidad de servicios adicionales en las yeguas y/o en consecuencia de la disminución en la producción de potrillos (Vanderwall, 2008). Se reportan un 18% de pérdidas embrionarias desde la fertilización hasta los 50 días de preñez, siendo el 9% previo al día 14 post ovulación en yeguas sanas (Ball, 1988).

Los conocimientos sobre la preñez temprana en los equinos son rudimentarios en algunos aspectos en comparación con otras especies domésticas (Aurich & Budik, 2015). Adicionalmente, varias características de la preñez en la yegua son inusuales y difieren marcadamente de los eventos equivalentes en otras especies domésticas bien estudiadas (Allen, 2005). El reconocimiento materno de la preñez (RMP) y la comunicación materna embrionaria en un sentido más amplio, es un proceso recíproco que involucra a ambos, tanto al embrión como al ambiente uterino (Klein, 2016b). Creemos que elucidar las interrogantes sobre dicho período, previo y durante el RMP, conociendo los cambios que se generan y los requerimientos para la supervivencia del embrión, ayudaría a reducir parte de las pérdidas embrionarias previamente mencionadas, generando de ésta manera una mayor productividad para el sector ecuestre.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Sistema reproductivo y ciclo estral en la yegua

El sistema reproductivo se compone de dos grupos de órganos: las estructuras intrínsecas al sistema reproductor (ovarios y genitales tubulares) y aquellas estructuras que están físicamente aisladas del tracto reproductivo, pero que desempeñan un papel en la regulación de los eventos reproductivos (la retina, la glándula pineal, el hipotálamo, la glándula pituitaria) (Ginther, 1992).

Los ovarios de las yeguas presentan una estructura única en relación a otras especies domésticas, son de tamaño grande y pesado (35-120 cm³, 40-80 gr de peso), presentan una fosa ovulatoria y una localización de la corteza y de la médula inversa al ovario de dichas especies (Aurich, 2011). Cuando el óvulo es descargado del folículo durante la ovulación, es recibido por la bursa del ovario. La trompa uterina es responsable del movimiento de los espermatozoides y óvulos a un sitio común (la ampolla) para la fertilización (Blanchard et al. 2003). El óvulo fecundado entonces viaja por la trompa uterina y llega a alcanzar el útero para el soporte gestacional 5 a 6 días luego de la fertilización (Weber et al. 1991). El útero proporciona el entorno adecuado para que el embrión se desarrolle (Blanchard et al. 2003). El útero equino es un órgano túbulo-muscular con forma de “T” o “Y”, dependiendo de cómo se distribuya en relación a las vísceras intestinales (Ginther, 1992); está compuesto por dos cuernos uterinos y un cuerpo corto, se extiende caudalmente desde la cuarta vértebra lumbar hasta la pelvis. El órgano está suspendido dentro de la cavidad pélvica y el abdomen por dos grandes ligamentos (ligamento ancho y redondo). La irrigación depende de la arteria uterina y de la rama uterina de la arteria ovárica. El drenaje venoso se extiende desde el plexo pampiniforme a los vasos ilíacos y los vasos linfáticos del centro linfático ilíaco y lumbar. La inervación proviene del plexo uterino y pélvico del sistema nervioso autónomo (Kainer, 2011).

Los equinos son reproductores estacionales, con actividad ovárica relacionada a los días largos y con una longitud promedio del ciclo estral de 22 días, con 5 a 7 días de estro (Aurich, 2011). El patrón de regulación del ciclo estral depende del delicado balance entre las hormonas producidas por la glándula pineal, el hipotálamo, la glándula pituitaria, los ovarios y el endometrio (Blanchard et al. 2003). El aumento en la luz del día estimula el hipotálamo para aumentar la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), lo que estimula la actividad de las gonadotrofinas: la hormona folículo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). El ciclo tiene también el control de los factores ováricos: las hormonas 17β estradiol (E2), inhibina y progesterona (P4), que a través de la retroalimentación negativa o positiva controlan la liberación de FSH y LH (McMeen, 2002). Además del fotoperíodo, factores exógenos como la edad, el estatus reproductivo, la nutrición, la condición corporal y la temperatura ambiental afectan la actividad reproductiva estacional tremendamente (Aurich, 2011).

El año calendario puede dividirse en cuatro etapas que difieren endocrina y fisiológicamente: etapa anovulatoria, transición de primavera, etapa reproductiva y transición de otoño (Gigli et al. 2006).

Etapa anovulatoria: durante el invierno, la mayor cantidad de horas de oscuridad, produce una cantidad suficiente de melatonina como para bloquear el eje hipotalámico-hipofisario gonadal. Como consecuencia, la GnRH es liberada con muy baja amplitud y frecuencia, resultando insuficiente para producir la secreción de FSH y LH (Gigli et al. 2006).

Transición de primavera: el inicio de la actividad reproductiva se produce paulatinamente. Durante este período, la concentración de FSH es óptima para producir el reclutamiento de folículos pero al no liberarse LH en cantidad suficiente, no se desencadena la ovulación (Gigli et al. 2006).

Etapa reproductiva: El comienzo de la etapa reproductiva sucede cuando las horas luz son suficientes para suprimir el reflejo inhibitorio producido por la melatonina sobre la liberación de GnRH, quien estimula la síntesis de FSH y LH que entran en la circulación. Las fases del ciclo son el estro, o la fase folicular, y diestro, o la fase lútea. El estro es el período en que la yegua es sexualmente receptiva a un padrillo; el comportamiento estral es estimulado por niveles altos de E2 producido por un folículo dominante en desarrollo, en ausencia de P4. La ovulación normalmente ocurre 24 a 48 horas previo al fin del estro, siendo la P4 la responsable del fin del comportamiento estral (McCue, 2011). El diestro es el período en que la yegua no es receptiva al semental y el tracto reproductivo está preparado para recibir y nutrir el embrión (Blanchard et al. 2003); normalmente dura de 12 a 16 días (Ginther, 1992). La fase lútea es iniciada con la ovulación y la generación de un cuerpo lúteo (CL) secretor de P4 (Gigli et al. 2006). En la yegua puede ocurrir una o dos ondas foliculares mayores por ciclo estral; la onda folicular primaria (onda que termina en la ovulación durante el estro) se origina en el diestro 7 a 8 días luego de la ovulación, siendo la FSH responsable del crecimiento inicial de los folículos por 6 a 7 días (McCue, 2011). Posteriormente tras la selección del folículo dominante, los niveles de FSH disminuyen en consecuencia del aumento en la producción folicular de inhibina y E2 (Aurich, 2011). Tras el aumento de E2, aumentan los niveles de LH, hormona responsable de la maduración final del folículo e inducción de la ovulación (Alexander & Irvine, 1982). El patrón de secreción de LH durante el estro es único en la yegua con un pico de concentración 1 a 2 días posteriores a la ovulación (Ginther, 1992). La P4 producida por el CL ejerce un feedback negativo sobre la LH (Blanchard et al. 2003).

Transición de otoño: ocurren cambios paulatinos que van a terminar temporalmente con la activación de folículos y el mecanismo de la ovulación. La concentración sérica de la LH disminuye a mayor velocidad luego de su aumento pre-ovulatorio y finalmente no logra alcanzar los niveles necesarios para desencadenar la ovulación (Ginther, 1992; Gigli et al. 2006).

2.2 Luteólisis en la yegua

Al igual que en otras especies domésticas está ampliamente documentado que la fase lútea del ciclo estral en la yegua es terminada por la secreción de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) por el endometrio (McCracken et al. 1999). El CL equino tiene una alta afinidad por el factor luteolítico, resultando en una alta sensibilidad al mismo

(Aurich, 2011), llegando a ser 18 veces más sensibles que en otras especies domésticas (Ginther, 1992). El período luteolítico dura aproximadamente 23hs, y la misma comienza el día 13 post ovulación. La P4 comienza a decrecer linealmente tras el pico luteolítico de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, (Ginther et al. 2011). Dada la corta vida media que presenta la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en sangre, normalmente se mide un metabolito pulmonar de la misma: el 13,14-dihydro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM); que representa las concentraciones circulantes de la luteolisina (Samuelsson et al. 1975).

A diferencia de los rumiantes en quienes el mecanismo luteolítico está identificado y descrito en amplitud (McCracken et al. 1999), en la yegua dicho proceso aún es parcialmente conocido (Klein & Troedsson, 2011) con varias interrogantes por responder. Existe una gran diferencia entre la yegua y los rumiantes en la ruta de transporte de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ entre el útero y el CL. En la yegua, la luteolisina alcanza el ovario a través de la circulación sistémica, mientras que en los rumiantes lo hace por proximidad entre los vasos venosos y linfáticos del útero con la arteria ovárica y el pedículo ovárico, generando un pasaje unilateral entre el cuerno uterino y el CL (Ginther, 2012). En la yegua, la arteria ovárica es menos tortuosa y no tiene contacto mayor con la vena uterina por lo que no existe el pasaje útero-ovárico unilateral (Ginther et al. 1972).

Al día 15 del ciclo, la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2) en las células epiteliales uterinas de yeguas no preñadas aumenta en gran proporción; dicha expresión es inhibida en el endometrio de las yeguas preñadas (Aurich, 2011). La regulación en la expresión endometrial de COX-2 es considerada un evento clave en la inducción de la luteólisis, por ser la enzima inductora de la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Boerboom et al. 2004).

Existe evidencia de que la oxitocina (Ox) juega un rol integral para la luteólisis en la especie equina. Los niveles circulantes de Ox son altos durante la fase lútea media y tardía, y bajos durante la ovulación y el diestro temprano (Tetzke et al. 1986). La administración de Ox durante el diestro tardío induce el aumento inmediato de PGFM (Goff et al. 1987). Sturbuck et al. (1998) concuerdan con lo anterior al constatar un aumento marcado en la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en respuesta a la administración de Ox el día 14 post ovulación en yeguas cíclicas, a su vez correlacionaron dicho fenómeno a un aumento en los receptores de Ox endometriales durante la fase luteolítica, constatando un aumento en la sensibilidad uterina a la Ox en el momento apropiado del ciclo estral. Ha sido propuesto que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada por el endometrio es la desencadenante de la secreción de Ox de la neurohipófisis durante el inicio de la luteólisis en la yegua (Vanderwall et al. 1998); pero lo que regula esa liberación inicial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aún se desconoce. La Ox de la pituitaria a continuación estimula la secreción endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$, estableciéndose retroalimentación positiva (Klein & Troedsson, 2011). En contraste con lo que sucede en los rumiantes, no existe una síntesis significativa de Ox por el CL (Stevenson et al. 1991). Sin embargo, el neuropéptido fue detectado en el endometrio de yeguas; Bae & Watson (2003) reportaron la existencia de células secretorias endometriales específicas conteniendo Ox. Teniendo esto en cuenta, Aurich (2011) concluye que en la yegua existe un sistema paracrino-autocrino que involucra a la Ox endometrial con la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que acelera la luteólisis en la yegua cíclica.

Los estrógenos y sus receptores juegan un rol fundamental en la regresión lútea en los rumiantes a través del aumento de los receptores de oxitocina endometriales, cuando la Ox provoca la secreción pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (McCracken et al. 1999). Dicha dependencia no sucede en la yegua, debido a que el aumento de estradiol no comienza hasta varias horas luego de iniciada la luteólisis (Ginther et al. 2011). Otra diferencia con los rumiantes es que en la yegua no existe alteración en el flujo sanguíneo del CL previo a la luteólisis sino que el flujo sanguíneo decrece posterior al pico luteolítico de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Ginther, 2012).

2.3 Reconocimiento materno de la preñez, inhibición de la luteólisis y desarrollo embrionario temprano

El reconocimiento materno de la preñez (RMP) es una frase creada por Short (1969) hace casi 5 décadas. Se refiere a la secuencia de eventos por los cuales señales de origen embrionarias prolongan la función lútea más allá de su vida útil durante un ciclo estral natural, asegurándose la continua secreción de P4 por el CL (Klein, 2016b). Dicho CL primario es la única fuente de P4 durante los primeros 40 días de preñez (Squires et al. 1975). Cada especie animal adoptó diferentes formas de prevenir la luteólisis (Klein, 2016b), siendo en los rumiantes el interferón tau y en los cerdos los estrógenos secretados por el embrión los encargados de dicha señal y cuyos procesos se encuentran ampliamente descritos (Bazer et al. 1997 y Geisert et al. 1990). En la yegua tanto la señal de RMP como el momento exacto en que comienza a secretarse es aún desconocido; se cree que es una molécula de bajo peso molecular (3-10 kDa) y existe evidencia indirecta que indica que comenzaría a secretarse a partir de los 10 días post ovulación (Klein, 2016b).

La reducción de la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante el RMP parece ser un evento temporario en la yegua (Klein, 2016b). La presencia del concepto altera la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de tal manera que no se logran medir picos de la luteolisina en la circulación sistémica materna durante el tiempo que corresponde a la luteólisis en la yegua cíclica (Kindahl, 1981); de la misma manera las mediciones de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el plasma de la vena uterina de la yegua mostraron que las concentraciones de la misma en los días 10 y 14 de preñez son más bajas que en los días correspondientes del ciclo estral (Douglas & Ginther, 1976). Sin embargo, flushings de yeguas preñadas al día 18 contienen concentraciones similares a las observadas durante el momento de la luteólisis en yeguas cíclicas (Stout & Allen, 2002). Por lo tanto, los autores llegaron a la conclusión de que el embrión retrasa más que impide la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial durante el RMP. La señal producida por el embrión equino es por lo tanto principalmente de naturaleza antiluteolítica, más que luteoprotectiva (inhibir la acción de $\text{PGF}_{2\alpha}$) o luteotrófica (apoyar la función del cuerpo lúteo) (Klein & Troedsson, 2011). Tras el aumento en la $\text{PGF}_{2\alpha}$ al día 18 la misma alcanza su pico de secreción al día 20 para caer nuevamente a valores insignificantes para el día 30. El motivo por el cual la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en estos días no resulta en la lisis del CL aún no fue estudiado en detalle (Klein, 2016b). Aparentemente el CL muestra una capacidad reducida a la unión con la $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir del día 20 (Vernon et al. 1981); lo que explicaría el paradójico aumento de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en ausencia de luteólisis.

La respuesta a la Ox también se ve alterada durante la preñez en la yegua. Catorce días después de la ovulación, las yeguas preñadas responden con una disminución de la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tras la administración de Ox (Goff et al. 1987). Esta reducción de la respuesta a la Ox coincide con una disminución de la capacidad de unión de los receptores de Ox (ROx) para la Ox (Starbuck et al. 1998), por lo que para algunos autores, la prevención de la luteólisis en la yegua preñada no parece depender de la inhibición del aumento de los ROx (Starbuck et al. 1998; Boerboom et al. 2004). Goff et al. (1987) reportan que en la yegua cíclica, la capacidad de respuesta significativa a la oxitocina endometrial se desarrolla alrededor del día 11 después de la ovulación, por lo que deducen que en la preñez, la señal embrionaria que suprimiría este aumento de la sensibilidad a la oxitocina debe comenzar a ser liberado a partir del día 10. El efecto inhibitorio se mantiene hasta el día 18 de preñez, momento en que existe un aumento en la respuesta a la administración de Ox, produciendo mayores niveles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Starbuck et al. 1998).

Desde el comienzo el embrión presenta una forma de reconocimiento de preñez primario, donde solo el embrión en desarrollo tiene la capacidad de ser transportado hacia el útero, mientras que los ovocitos no fertilizados son retenidos en la unión istmo-ampolla donde lentamente se degeneran (Betteridge, 1982). El concepto, en la etapa de mórula compacta a partir de los 5 días post ovulación, secreta cantidades apreciables de prostaglandina E2 (PGE2) (Allen, 2001). Ésta hormona actúa localmente relajando las fibras musculares lisas de la capa circular de la pared de la trompa uterina, permitiendo el pasaje del embrión al útero tras 24 horas (Allen, 2001). En un estudio de Weber et al. (1991) demostraron que la administración intraoviductal continua de PGE2 es suficiente para inducir la entrada prematura de embriones al útero.

Para el momento en que el embrión entra en el útero, su desarrollo ha progresado hasta mórula tardía o blastocisto en etapa temprana. En coincidencia con el momento de la blastulación se hace visible una cápsula glicoproteica acelular entre el trofoectodermo y la zona pelúcida (día 6,5) (Betteridge et al. 1982). Durante las siguientes 24 horas, la zona se reduce para permitir la expansión del blastocisto, ahora completamente encerrado dentro de la cápsula (Stout et al. 2005). El trofoblasto es la fuente principal del material capsular (Albihn et al. 2003) y es necesario que el embrión se encuentre dentro de un medio uterino adecuado para que suceda la formación correcta de dicha estructura (Tremoleda et al. 2003). Debido a la estrecha conexión con la cápsula, el trofoblasto no es capaz de elongarse (entre los días 10 y 16) y en su lugar, el concepto equino se mantiene esférico, completamente separado del útero y altamente móvil (Stout et al. 2005). Además de proporcionar protección al blastocisto para que pueda soportar las contracciones miométriales que lo propulsan a través del útero, la cápsula es imprescindible en la regulación del suministro de nutrientes al embrión. Debido a su carga electrostática negativa y a la configuración del glicocalix, la superficie externa de la cápsula atrae otras proteínas (Oriol et al. 1993). Antes de la implantación el concepto es soportado únicamente por las secreciones que se acumulan en el lumen uterino, un fenómeno conocido como nutrición histotrófica (Ashworth, 1995).

Sin lugar a dudas la fase móvil del embrión es un fenómeno único para la especie equina (Klein, 2016b). Dicha movilidad puede ser observada tan temprano como se pueda visualizar el embrión por ultrasonografía transrectal; Ginther (1984), por vía

ecográfica, estudió el movimiento del concepto en el útero. Observó el movimiento durante el día 9, registrando un aumento hacia el 10, siendo máximo en los días 11 a 14 y cesando el día 16, momento en que sucede la fijación embrionaria. El papel propuesto para la extensa migración en todo el lumen uterino es para que el embrión distribuya el factor antiluteolítico sobre la totalidad de la superficie del endometrio (McDowell et al. 1988). Dado que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial alcanza el CL a través de la circulación sistémica (como fue visto previamente), la señal embrionaria de RMP debe ser llevada a la totalidad de la superficie endometrial (Klein, 2016b). La restricción del movimiento embrionario a menos de dos tercios de la superficie uterina resulta en la falla de la preñez; dicho evento puede ser prevenido con la administración concurrente de P4, indicando que la lisis del CL es la causa de la pérdida embrionaria cuando se restringe la movilidad del mismo (McDowell et al. 1988).

Es de aceptación general que el embrión estimula las contracciones uterinas localizadas que lo propulsan dentro del lumen uterino (Klein, 2016b). Dicho fenómeno es logrado gracias a la producción de PGE2 (Weber et al. 1991) y $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Watson & Sertich, 1989) por el embrión, paradójicamente la misma sustancia que causa la luteólisis y cuya liberación pulsátil debe ser evitada durante la preñez temprana (Allen & Stewart, 2001). Sin embargo, existe evidencia indirecta que señala que de ambas prostaglandinas, la PGE2 sería la que predominantemente causa la movilidad embrionaria (Klein, 2016a).

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

3.1 Progesterona en el diestro y la preñez temprana

La P4 es una hormona derivada del colesterol, sintetizada por las células del CL. En las yeguas preñadas tras la placentación, la unidad placentofetal se vuelve la fuente predominante de la hormona (Vanderwall, 2011). En todos los mamíferos, el establecimiento y la mantención de la preñez depende de la presencia de P4 (Aurich & Budik, 2015).

Algunos de los factores fisiológicos regulados por la hormona incluyen la secreción de gonadotrofinas de la glándula pituitaria anterior, el tono cervical y uterino (aumenta con respecto al estro), el edema endometrial (disipación del mismo) y la actividad secretoria del tracto reproductivo (Vanderwall, 2011). Los cambios histológicos correspondientes al diestro y la preñez temprana se tratarán en detalle más adelante, pero en general en un ambiente de dominancia de P4 se observa un aumento de la densidad glandular (por disminución del edema endometrial y aumento de la tortuosidad de las glándulas), cambios en el epitelio luminal (Kenney, 1978) y en las secreciones intraglandulares (Keenan et al. 1991). La dominancia de la P4 también genera modificaciones en las células inflamatorias a nivel endometrial. Acuña & Fumoso (2013) reportaron una menor cantidad de células inmunes el día 7 post ovulación, adjudicando un efecto inhibitorio de los mayores niveles de progesterona plasmática hallados ese día. Los efectos inhibitorios de la progesterona sobre células del sistema inmune han sido reportados en útero de ratonas (Hunt et al. 1998), mujeres (Wira et al. 2010) y ovejas (Intan-Shameha et al. 2011). Asimismo,

Watson et al. (1987) demostraron en yeguas ovariectomizadas, que la migración de polimorfonucleares (PMN) hacia el útero, así como su actividad fagocítica fue deprimida por el tratamiento con progesterona.

En la vaca se demostró una correlación positiva entre la concentración de P4 en el plasma materno y el desarrollo embrionario, de tal manera que un aumento en la concentración de P4 en la fase post ovulatoria temprana del ciclo estral genera una señal antiluteolítica más fuerte (Mann & Lamming, 1999). En la yegua la presencia de dicha hormona es un pre requisito para la adecuada movilidad del concepto, su fijación en la base de uno de los cuernos uterinos y para su orientación dentro del útero (Kastelic et al. 1987). La expresión de receptores de P4 en el trofoblasto equino permite efectos directos de la hormona sobre el concepto (Rambags et al. 2008b); sin embargo, la principal tarea de la P4 es la preparación del útero para la preñez (Aurich & Budik, 2015). Uno de los roles más importantes de la hormona como efecto “pro gestacional” es la regulación del ambiente uterino luminal, dado que el concepto equino es completamente dependiente de las secreciones uterinas para cubrir sus necesidades nutricionales y metabólicas (Vanderwall, 2011). Aurich & Budik (2015) también recalcan la importancia de la P4 para la producción de histotrofo uterino. La secreción de uterocalina (una de las proteínas más abundantes del histotrofo) es dependiente de la secreción de P4; de tal manera que la cantidad presente en los lavados uterinos se correlacionan con las concentraciones séricas de dicha hormona. Incluso, su secreción puede ser inducida mediante la administración por varios días de P4 exógena a yeguas en anestro (Stewart et al. 1995).

Las concentraciones sanguíneas de P4 durante el estro se encuentran debajo de 1 ng/mL, pero se elevan rápidamente en las 24 horas posteriores a la ovulación. A diferencia del bovino o del ovino en los que los niveles de P4 no aumentan durante 3 días, en los equinos se eleva considerablemente dentro de las 10 horas post ovulación (Ginther, 1979). Las concentraciones máximas, tanto en yeguas en diestro como preñadas, se alcanzan entre el día 5 y 8 post ovulación; posteriormente mientras que en la yegua en diestro las concentraciones disminuyen lentamente hasta el comienzo de la luteólisis alrededor del día 14 (Allen, 2001; Nagy et al. 2004), en la yegua preñada se mantienen los valores elevados (Sato et al. 1977).

3.2 Estradiol 17 β en el diestro y la preñez temprana

Las concentraciones séricas de E2 comienzan a elevarse en los 14 a 16 días posteriores a la ovulación, lo que marca el fin del diestro y comienzo del estro (Ginther, 1979). Alcanza el pico en su concentración 1 a 2 días previos a la ovulación y se halla en disminución al momento de la misma, lo que se ve reflejado ecográficamente por la reducción del edema uterino (McCue, 2011). Durante el ciclo estral el E2 es responsable de una variedad de cambios físicos, endocrinos y comportamentales en la yegua. Induce la relajación del cérvix, estimula la formación de edema uterino, aumenta el carácter y el volumen de las secreciones uterinas, estimula la secreción de LH e induce el comportamiento estral (McCue, 2011).

Durante el diestro, se observan las concentraciones mínimas de E2 (Ginther, 1979). Comparando las concentraciones séricas de dicha hormona durante los mismos días

del diestro que de la preñez temprana en la yegua, no se encontraron resultados concisos; algunos de los estudios reportan valores más bajos en las yeguas preñadas que aquellas en diestro (Sato et al. 1977; Zavy et al. 1979), mientras que otros no reportan diferencias entre ambos grupos (Terqui & Palmer, 1979; Daels et al. 1991).

Los estrógenos son producidos en considerable cantidad por parte del embrión equino preimplantación (Zavy et al. 1979; Flood et al. 1978) a partir de los 10 días posovulación; la alta tasa de producción persiste durante los 40 días de la etapa de preimplantación (Wilsher et al. 2006). Los estrógenos embrionarios se suponen responsables de la estimulación de la migración embrionaria, además de cambios en el tono uterino y la actividad secretoria glandular endometrial (Stout & Allen, 2001; Merkl et al. 2010). Juegan un papel importante en estimular la producción de proteínas glandulares específicas de la preñez (Wilsher et al. 2006). En el cerdo, los estrógenos embrionarios estimulan la secreción del factor de crecimiento insulínico tipo (IGF-1) que modula la tasa de crecimiento embrionario (Wilsher et al. 2006). Dicha estimulación en la secreción de IGF-1 también se observa en roedores (Murphy & Ghahary, 1990) y primates (Adesanya et al. 1996); sin embargo según el estudio de Walters et al. (2001), dicho fenómeno no sucede en la yegua.

El E2 además promueve la angiogénesis uterina, tanto indirectamente, mediante la estimulación de la secreción de factores angiogénicos por las células endometriales (Albrecht et al. 2003), como directamente a través de la estimulación de la proliferación y migración de las células endoteliales (Losordo et al. 2001). Dado que los embriones equinos producen grandes cantidades de estrógenos durante la preñez temprana, parece probable que estos esteroides contribuyan al aumento en la vascularización uterina en las yeguas preñadas (Klein, 2016a). Los capilares y vénulas uterinas son relativamente impermeables a las proteínas plasmáticas, excepto durante las respuestas transitorias al E2 (McRae, 1988). Concomitante al aumento de permeabilidad vascular se observa el ingreso de células inflamatorias al endometrio bajo el efecto de dicha hormona. Acuña & Fumoso (2013) observaron la mayor cantidad de células inmunes presentes en el estrato compacto del endometrio durante la fase folicular y el diestro temprano, con altas concentraciones de E2 y valores basales de P4. A su vez, el tratamiento con estrógenos en yeguas ovariectomizadas provocó una invasión masiva de leucocitos al útero (Watson et al. 1987).

Frecuentemente ha sido especulado que los estrógenos embrionarios en la yegua pudieran actuar de forma similar que en los embriones porcinos y lograran la luteostasis y el RMP (Allen, 2000). Sin embargo, los distintos experimentos realizados han generado resultados ambiguos y contradictorios; en alguno de ellos no se logró la luteostasis (Goff et al. 1993; Vanderwall et al. 1994; Wilsher & Allen, 2011), mientras que en otros han logrado que en alrededor del 60% de las yeguas tratadas con E2 parenteral o intrauterino sufrieran la prolongación de la vida del CL (Berg & Ginther 1978; Stout, 1997). Sin embargo, no existe una explicación de la falta de respuesta en el 40% de las yeguas restantes (Allen, 2000); por lo que no se descarta completamente que el E2 esté involucrado en el RMP en la yegua, pero se plantea como poco probable (Wilsher & Allen, 2011).

3.3 Hormonas metabólicas asociadas a la preñez temprana y el diestro

Insulina

La insulina, hormona de 6 KDa secretada por los islotes de Langerhans pancreáticos, es la principal reguladora de los carbohidratos y el metabolismo de la grasa corporal. Su rol está mediado por receptores celulares y transportadores de glucosa en el hígado, tejido adiposo y tejido muscular (Kaye, 1997).

Dicha hormona participa en varios procesos reproductivos a nivel del útero y ovario en las especies domésticas (Rambags et al. 2008a). La administración de insulina, o dietas que inducen un aumento de insulina en la circulación sanguínea de animales domésticos, afecta numerosos parámetros reproductivos incluyendo el crecimiento folicular, la tasa de ovulación, la activación de la maduración folicular, la función lútea y la secreción de esteroides y de LH (Clarke et al. 1990; Bhushan et al. 2005). Sin embargo, Rambags et al. (2008a) reportan que al contrario de lo que sucede en otras especies como el bovino y el porcino, la administración de insulina no afectó los niveles circulantes de P4 en la yegua.

Rambags et al. (2008a) postulan que la insulina tendría una función facilitadora en el desarrollo embrionario temprano. La insulina materna afecta el embrión directamente dado que la suplementación *in vitro* de insulina provoca un aumento en el consumo de glucosa, aminoácidos y proteínas, así como un aumento en la síntesis de proteínas y ARN por el embrión (Harvey et al. 1988; Lewis et al. 1992). A su vez la insulina previene la apoptosis, aumenta el número de células embrionarias y promueve la formación blastocística (Heyner et al. 1989; Rambags et al. 2008a).

Existe evidencia de que la insulina se une a las células del embrión pre implantación en la etapa de mórula; a su vez la misma es capaz de estimular el transporte de glucosa y la síntesis de proteínas en embriones de ratones pre implantación (Harvey et al. 1988). En un estudio realizado por Heyner et al. (1989), los autores probaron que la insulina materna es internalizada por el embrión del ratón preimplantación de manera no específica a través de la zona pelúcida y específicamente a través de receptores en las células de embriones en etapa de mórula y blastocisto. Desde la fertilización hasta la formación de la mórula, los embriones de los mamíferos son relativamente quiescentes a nivel metabólico, con bajo consumo de oxígeno, presentando como fuente principal de sustrato el piruvato (Lewis et al. 2015). Tras la blastulación, existe un aumento pronunciado en el consumo de glucosa (Heyner et al. 1989; Lane et al. 2001; Lewis et al. 2015); dicho consumo aumenta exponencialmente a mayor diámetro y área de superficie embrionaria en el embrión equino (Lane et al. 2001). El aumento en el nivel de oxidación de glucosa por el blastocisto equino se asocia a las altas demandas energéticas que requiere una cavidad blastocística en rápida expansión desde diámetros de 150 a 900 μm en relativamente poco tiempo. En el equino, los requerimientos de glucosa durante la embriogénesis parecen diferir con otras especies como los bovinos, ovinos, humanos y ratones (Herrera et al. 2008). Los blastocistos de ovinos y bovinos no se expanden a la misma velocidad que el equino lo que se ve reflejado en las diferencias de consumo de nutrientes de los embriones de las distintas especies (Lane et al. 2001). La utilización de medios de cultivo embrionarios con altos niveles de glucosa ha permitido la producción de potrillos saludables (Herrera et al. 2008).

En el 2004, Stout et al. propusieron a la insulina como candidato de señal del RMP en la yegua, cuando en un estudio preliminar se identificó ésta hormona en el medio de cultivo utilizado para la incubación de conceptos de 10 a 18 días. Por tal motivo, en el 2008(a), Rambags et al. realizaron un estudio en la yegua en el cual tras la administración de insulina en el período de RMP, evaluaron cambios en la luteólisis y el ciclo estral. Los autores concluyeron que dado que no se alteró la luteólisis, no se suprimió la habilidad del endometrio para liberar $\text{PGF2}\alpha$, así como tampoco se detectó la presencia de la hormona en vesículas embrionarias de 10 a 14 días, sería poco probable que la insulina fuera la señal de RMP.

De los escasos trabajos publicados que vinculan la insulina materna sistémica con cambios histomorfológicos endometriales se destaca el de Rodrigues de Melo & Valeri (1980) quienes, a través de la evaluación por microscopía electrónica de las células endometriales tras la administración de insulina en ratas, sugieren que la hormona estimularía la actividad celular al identificar un aumento en las vesículas secretorias y complejos Golgi comparado con los animales no tratados.

Hasta el momento no hemos encontrado estudios acerca de los niveles hormonales sanguíneos de insulina en relación a la preñez temprana y el diestro en yeguas.

Factor de crecimiento insulínico tipo 1

El IGF-1 es un polipéptido de aproximadamente 7 KDa estructuralmente homólogo a la proinsulina (AboEl-Maaty et al. 2013). La mayor parte del IGF-1 circulante es sintetizado en el hígado bajo el estímulo de la hormona de crecimiento (GH) (Thiessen et al. 1994). No obstante, el IGF-1 también es sintetizado en órganos de importancia reproductiva como el hipotálamo, hipófisis, ovario, oviducto, útero y placenta (Ruiz Arboleda et al. 2011). Sus actividades biológicas están reguladas por una familia de proteínas de unión de alta afinidad: IGFBPs (AboEl-Maaty et al. 2013). Los IGFs tienen un efecto importante en el metabolismo, la diferenciación y la proliferación celular (Rutanen, 1998).

En varias especies, el IGF-1 estimula la actividad ovárica al promover la proliferación y mitosis de las células de la granulosa y de la teca; además actúa en sinergismo con las gonadotropinas al estimular la esteroidogénesis (Deichsel et al. 2006). En cuanto a los niveles circulantes de IGF-1 en la yegua durante el ciclo estral existen discordancias; Derar et al. (2012) reportan un aumento de IGF-1 previo a la ovulación, con mayores niveles durante el estro en comparación con la fase lútea, mientras que AboEl-Maaty et al. (2013) reportan iguales concentraciones séricas de IGF-1 en yeguas en estro que en la fase lútea a los 7 y 14 días, así como a los 14 días de preñez. Deichel et al. (2006), encontraron resultados similares que el último estudio mencionado, reportando iguales concentraciones entre las yeguas en estro que aquellas durante la fase lútea. A su vez se reporta una correlación entre el patrón de secreción de E2 y de IGF-1 (Derar et al. 2012).

Los IGFs en humanos juegan un rol importante en la proliferación y diferenciación endometrial y en la interacción embrión-endometrio (Rutanen et al. 1988). En la yegua, poco se conoce del rol de la IGF-1 durante la preñez temprana (Derar et al. 2005); diversos autores sugieren que la IGF-1 promueve el desarrollo embrionario al disminuir la apoptosis y aumentar la proliferación celular (Herrler et al. 1998;

Beckclmann et al. 2013); lo mismo se ve apoyado por la detección de mRNA de IGF-1 en conceptos equinos a los 11 días de preñez, así como de su proteína de unión (IGFBP-3) entre los 10 y 16 días de preñez (Beckclmann et al. 2013).

En las yeguas, tanto el embrión como el endometrio produce cantidades significativas de IGF-1 (Walters et al. 2001); dicho péptido se secreta de manera autocrina-paracrina durante el estadio de preñez temprana (Herrler et al. 2000). Se ha detectado IGF-1 en lavados uterinos de yeguas preñadas a los 12, 13, 14, 16 y 17 días de gestación (Walters et al. 2001; Salute & Tucker, 1992). Dichas vías de secreción remarcan la importancia del factor de crecimiento en las primeras etapas de la gestación. Derar et al. (2005) concluye que tales patrones secretorios pueden no reflejarse en las concentraciones plasmáticas maternas de IGF-1 y que, al igual que en otras especies, parece improbable que la IGF-1 sistémica materna estimule directamente el crecimiento del concepto durante las primeras etapas de la preñez en la yegua.

En los suínos, la IGF-1 actuaría como una señal paracrina desde el útero para coordinar eventos asociados con el RMP (Walters et al. 2001). Ha sido sugerido que la IGF-1 en la yegua tendría la misma función, actuando como una señal importante durante la preñez temprana para coordinar el reconocimiento de la preñez y el desarrollo embrionario (Siemmen et al. 1995). En esta fase no existe una diferencia en la expresión de mRNA y proteína de IGF-1 relacionada a la edad pero si al sexo del embrión (mayor en embriones hembra) que podría contribuir a la supervivencia preferencial de los embriones de uno u otro sexo en condiciones ambientales específicas. Esto podría estar relacionado con la estimulación de la señal de RMP o a la disminución de los mecanismos de apoptosis (Beckclmann et al. 2013).

Hormonas secretadas por el tejido adiposo: Leptina y adiponectina

El tejido adiposo actúa como depósito de energía y como un órgano endocrino activo secretando gran número de moléculas biológicamente importantes: las adipoquinas. Las mismas están involucradas en la regulación de las funciones reproductivas (Pérez-Pérez et al. 2015).

Leptina

La leptina, primer adipoquina descrita en 1994, es un péptido de 16 KDa secretada principalmente por el tejido adiposo y codificada por el gen *ob*; juega un rol integral en la regulación del peso corporal y el consumo de energía (Friedman & Halaas, 1998). Se considera una hormona multifuncional que regula además de la homeostasis corporal la termogénesis, angiogénesis, las funciones neuroendocrinas e inmunes, así como la presión arterial. Varía directamente con la masa y grasa corporal (Ferreira Dias et al. 2005); ha sido postulada como mediadora entre el status metabólico y la función reproductiva.

Dentro de las funciones reproductivas regula las funciones ováricas, la maduración oocitaria, el desarrollo embrionario, la implantación y la placentación (Cervero et al. 2005). Actuando a través de receptores transmembrana regula el desarrollo de los oocitos y del embrión pre implantación en varias especies como la porcina (Chapazz et al. 2008) y bovina (Maillard et al. 2010). En el caso de la yegua, los resultados de

Consiglio et al. (2009) demostraron que proteínas de la leptina y su receptor son expresados en embriones luego de la fertilización por inyección intracitoplasmática de oocitos equinos.

La leptina circulante atraviesa la barrera hemato-encefálica de manera similar a la insulina, llevando al hipotálamo un mensaje acerca del almacenamiento de grasa en el tejido adiposo (Budak et al. 2006). La adipoquina tiene un efecto estimulador directo en el eje hipotálamo hipófisis gonadal al estimular la secreción de GnRH en las neuronas hipotalámicas en una manera dosis dependiente (Pérez-Pérez et al. 2015). En la hipófisis estimula la secreción de LH y FSH (Budak et al. 2006). Galvão et al. (2014), reportan un efecto luteotrópico por parte de leptina en la yegua, quien de manera dosis dependiente afecta la secreción de P4 y de PGE2, así como la angiogénesis lútea.

Yeguas con restricción nutricional exhiben frecuentemente ciclos estrales anormales con dificultad para reproducirse. La baja condición corporal en yeguas fue asociada a bajas concentraciones de leptina y a un período anovulatorio extenso en relación a aquellas con correcto estado corporal (Gentry et al. 2002). La hiperleptinemia en yeguas obesas también interfiere en los procesos reproductivos normales (Huff et al. 2008). La leptina plasmática disminuye luego del parto, siendo más bajo en yeguas en lactación que en aquellas en no lactación (Huff et al. 2008). Heidler et al. (2003) proponen que la disminución de la leptina promueve el consumo de alimento evitando que las yeguas en lactación pierdan energía.

Hasta el momento se encontraron escasas publicaciones referentes a las concentraciones séricas de la leptina en las yeguas durante el ciclo estral y preñez temprana, y dichas publicaciones discrepan entre sí. Mientras que Abol El-Maaty et al. (2013) reportan una ausencia de diferencias en las concentraciones de dicha hormona entre el estro, la fase lútea (día 7 y 14) y el día 14 de preñez, Abdelnaby et al. (2015) reportan un aumento en las concentraciones séricas de leptina desde el estro hasta la ovulación, seguido por una disminución significativa desde la ovulación hasta el día 9 del ciclo. A diferencia de lo que se ha visto en la yegua, en la mujer las concentraciones sanguíneas de leptina se correlacionan con las concentraciones de progesterona durante el ciclo menstrual, coincidiendo el pico de concentración de ambas hormonas en el mismo momento de la fase lútea (Hardie, 1997). En la vaca, Garcia et al. (2002) reportan que la leptina sérica tendió a decrecer durante la fase lútea tardía y el comienzo de la fase folicular, no observando diferencias en las restantes etapas del ciclo estral.

Inicialmente se pensaba que la leptina no se secretaba por el embrión, que la misma era solamente de origen materno. Actualmente se reconoce que en los humanos, durante la etapa de pre implantación embrionaria, la leptina presente en la cavidad uterina es de origen embrionario, endometrial (secreción autocrina-paracrina) y de los adipocitos maternos (origen endocrino) (Budak et al. 2006). La habilidad del útero de producir pequeñas cantidades de leptina confirma el rol local de la misma junto con la leptina circulante en regular no solamente el flujo sanguíneo del útero durante el ciclo estral, sino también preparar el útero para recibir el futuro embrión tras la ovulación (Abdelnaby et al. 2015). El mecanismo por el cual la leptina regula el desarrollo embrionario temprano estaría dado por la capacidad de proliferación celular que presenta (Herrid et al. 2014). Diversos autores le adjudican a la leptina un

rol importante en la implantación del embrión (Pérez- Pérez et al. 2015); la misma aumenta el número total de células del blastocisto, especialmente de las células del trofoectodermo, células necesarias para la implantación y la formación de la placenta y membranas extra embrionarias (Craig et al. 2005). Hasta el momento no se encontraron referencias sobre efecto de la leptina sobre la morfología endometrial en la yegua, pero si en ratones (Barash et al. 1996). En el mencionado trabajo, los ratones (con deficiencia congénita de leptina) tratados con leptina intraperitoneal mostraron un aumento en el área de sección transversal del útero, de la altura epitelial, del área endometrial y del área glandular en comparación con los animales no tratados; adjudicándole a la hormona un efecto proliferativo a nivel uterino.

En conclusión la leptina es un marcador de la homeostasis energética en el sistema corporal. Actúa como un mensajero vital entre el tejido adiposo y el eje reproductivo, indicando al último si existen reservas energéticas adecuadas para una función reproductiva normal.

Adiponectina

La adiponectina es una proteína de 30 KDa secretada predominantemente por los adipocitos (Kleiblova et al. 2006). Fue descubierta en 1995 y 1996 por diversos grupos por lo que se la conoce por diferentes nombres: Acrp30, AdipoQ, GBP28, apM1; actúa a través de dos receptores transmembrana: AdipoR1 y AdipoR2. Es una de las adipoquinas secretadas en mayor proporción, corresponde al 0,05% de las proteínas séricas (Michalakis & Segars, 2010). La misma circula bajo diferentes isoformas las cuales actúan sobre distintos tejidos blanco e incluso presentan diferentes efectos biológicos (Pajvani et al. 2004). Juega un rol importante en la regulación del consumo de alimento, la homeostasis energética, así como la homeostasis vascular e inmunitaria (Rodríguez Pacheco et al. 2006). Es un factor sensibilizante de la insulina, reduce la producción de glucosa endógena al aumentar la sensibilidad hepática a la insulina y aumenta el consumo de glucosa por los adipocitos y miocitos; a su vez promueve la oxidación de ácidos grasos en el músculo (Wu et al. 2003). En humanos, bajos niveles circulantes de la adipoquina se asocia a la obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (Maillard et al. 2010).

Existe evidencia que involucra a la adiponectina en el control de las funciones reproductivas. La adiponectina actúa a nivel hipotálamo hipofisario reduciendo la secreción de GnRH y LH, pero sin afectar la FSH (Angelidis et al. 2012), a su vez ejerce su acción sobre las células somatotrofas reduciendo la secreción de GH (Michalakis & Segars, 2010). A nivel ovárico se cree que la adipoquina estaría involucrada en la proliferación celular, la esteroidogénesis y la maduración oocitaria (Angelidis et al. 2012).

Se encontraron escasas publicaciones sobre los niveles séricos de adiponectina con respecto al ciclo estral y la preñez en la yegua. Pearson (2015) reporta ausencia de diferencias en las adiponectina sérica al comparar yeguas cíclicas y preñadas a los 8 y 16 días del ciclo y preñez. En la mujer, varios autores reportan la ausencia de cambios de la adiponectina sérica a través del ciclo menstrual (Takemura et al. 2005; Kleiblova et al. 2006; Dafopoulos et al. 2009). Dada la escasa información encontrada hasta el momento relacionada a cambios en la adiponectina sérica y su relación con la preñez temprana, se tratará brevemente de sus efectos locales sobre el

embrión y el endometrio. A nivel endometrial, ambos receptores de la adiponectina son expresados en el humano (Takemura et al. 2006; Dos Santos et al. 2012) y porcino (Kiezun et al. 2013) y más específicamente en el epitelio glandular y fibroblastos del estroma. Los niveles de los transcritos de éstos receptores están aumentados en la fase lútea media, cuando ocurre la implantación y pre implantación en éstas especies, lo que sugiere que las funciones homeostáticas y antiinflamatorias de ésta hormona puedan afectar éste proceso (Michalakis & Segars, 2010). Takemura et al. (2006) sugieren un rol antiinflamatorio de la adipoquina sobre el endometrio humano al modular la secreción de citoquinas proinflamatorias producidas por las células estromales endometriales; a su vez sugiere que la adiponectina regularía el aporte de energía en el endometrio dada la capacidad de inducir la fosforilación de AMPK en las células estromales y epiteliales del endometrio. En la yegua receptores de adiponectina fueron hallados en el endometrio en los días 8 y 12 del ciclo estral (Gebhard et al. 2012). Pearson (2015), reportó la localización de dichos receptores en el epitelio glandular y luminal del endometrio de yeguas a los 8 y 16 días del ciclo estral y preñez; con mayores niveles en la yegua preñada al día 16, sugiriendo un rol de la misma en la gestación temprana y la fijación embrionaria. Chappaz et al. (2008) brindó evidencia de que la adiponectina juega un papel regulador en la proliferación celular durante el desarrollo del embrión pre implantación, al adicionar la adipoquina al cultivo embrionario porcino y promoviendo el desarrollo de los mismos hacia la etapa de blastulación.

En conclusión, la adiponectina serviría como una señal que une el estatus metabólico y el control endocrino de la reproducción y el crecimiento, como fue previamente probado para la leptina. Los niveles circulantes de leptina están correlacionados inversamente a los de adiponectina en animales obesos y flacos, incluidos los equinos (Kearns et al. 2006; Rodriguez Pacheco et al. 2006); esto sumado al efecto divergente en las células somatotrofas y gonadotrofas apoyan el punto de vista de que estas dos adipoquinas envían diferentes señales metabólicas a los ejes somatotrópicos y reproductivos (Rodriguez Pacheco et al. 2006).

3.4 El endometrio

La composición y la calidad del medio ambiente uterino son determinantes del éxito y la performance reproductiva (Kenney, 1978; Ginther, 1992; Hartt et al. 2005). El útero es parte del sistema endocrino: un órgano diana de los esteroides y productor de hormonas (Blanchard et al. 2003). Los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en las células uterinas durante el ciclo estral están controladas por las concentraciones relativas de los esteroides ováricos (P4 y E2) y por la acción local de varios factores de crecimiento (Pollard et al. 1990); la inhabilidad del endometrio de responder adecuadamente a éstos estímulos hormonales representa una de las causas de subfertilidad en la yegua (Gerstenberg et al. 1999). Las hormonas controlan la actividad secretoria uterina cuantitativa y cualitativamente; la sincronía entre las hormonas maternas y el desarrollo embrionario es una condición para que se establezca la preñez. Como fue mencionado con anterioridad, antes de la implantación el embrión es sustentado únicamente por las secreciones que se acumulan en la cavidad uterina. Las secreciones de las glándulas endometriales equinas tienen una multitud de proteínas que son esenciales para la supervivencia,

crecimiento y desarrollo del concepto en la preñez temprana (Hanada, 2012). A través del endometrio se genera un sistema de intercambio metabólico de nutrientes y desechos con la vesícula embrionaria (Ginther, 1992). Por este motivo, el ambiente uterino es crítico para el continuo soporte y desarrollo del concepto a partir del día 6 pos ovulación (Ball, 1993; Crosset et al. 1996). Un inadecuado ambiente uterino causa mortalidad embrionaria, un problema con alta incidencia en los equinos (Reilas, 2001).

Estructura

El útero está compuesto por tres capas, una capa serosa externa o perimetrio, una capa muscular media o miometrio y una interna, el endometrio (organizado macroscópicamente en pliegues endometriales) (Figura 1). El endometrio está formado por el epitelio luminal y la lámina propia carente de tejido muscular. El epitelio luminal está constituido por células cuboidales altas adheridas a una membrana basal (MB), variando en su altura dependiendo de la fase del ciclo estral y siendo menos de la mitad de ellas ciliadas; la lámina propia está compuesta por dos estratos, el compacto (EC) y el esponjoso (EE) (Kenney, 1978). El EC presenta una alta densidad de células en el estroma; contiene los ductos glandulares que se abren al epitelio luminal, pero no exhibe glándulas. Los componentes del EC son acompañados por numerosos capilares debajo de la MB. El EE posee un tejido estromal laxo, con baja densidad de células que le da el aspecto esponjoso; da sostén a los cuerpos glandulares junto a vasos linfáticos, capilares sanguíneos, vénulas, arteriolas y ocasionalmente a pequeñas arterias musculares (Kenney, 1978).

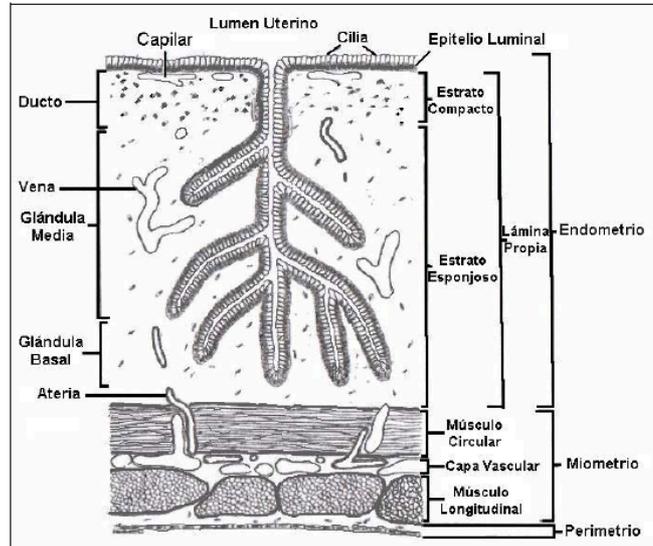


Figura 1. Diagrama esquemático de las capas uterinas (Kenney, 1978).

Cambios histológicos

Existen diversas formas de evaluar el útero y el endometrio, sin embargo muchas alteraciones pueden ser reveladas únicamente mediante una biopsia endometrial (Kenney, 1978). La biopsia endometrial consiste en la extracción de una porción de un pliegue endometrial, sin llegar al músculo, aunque ocasionalmente puede incluir una porción de la capa circular interna miometrial (Kenney, 1978). La técnica ha sido

ampliamente descrita por diversos autores (Ricketts, 1975; Kenney, 1978; Kenney & Doig, 1986). Una muestra apropiada de endometrio requiere una pinza de biopsia de 70 cm de largo con una superficie de corte de 20x3x3mm afilada para evitar hemorragias y distorsiones del tejido. A pesar de la gran superficie endometrial (850 – 1350 cm²), este instrumento provee una muestra representativa de toda su extensión (Kenney, 1978). La biopsia es obtenida normalmente de la pared dorsal del cuerpo uterino o de la base de uno de los cuernos (Love, 2011). Es una técnica diagnóstica que permite evaluar la integridad estructural del endometrio visualizando dos tipos de procesos patológicos: inflamatorios o endometritis y degenerativos o endometrosis (Love, 2011); a su vez permite predecir la habilidad del endometrio de sostener una gestación a término y determinar la etapa del ciclo estral en que fue tomada la muestra (Gross, 1984).

El endometrio equino experimenta cambios histológicos según la estación y dentro de la estación reproductiva durante las distintas etapas del ciclo estral (Doig & Waelchli, 1993), dichos cambios histológicos han sido descritos en detalle por varios autores (Ricketts, 1975; Kenney, 1978). Los cambios más notorios a través del ciclo estral se visualizan en la configuración de las glándulas, las características de las secreciones, la presencia de edema en la lámina propia y la altura del epitelio luminal (siendo la altura más alta alcanzada durante el estro) (Leishman et al. 1982). Gerstenberg et al. (1999), analizaron biopsias endometriales de yeguas tomadas en los distintos estadios del ciclo estral. Contando las figuras mitóticas, observaron que las células epiteliales luminales sufrían su mayor división durante el final del estro, mientras que las células epiteliales glandulares alcanzaban su mayor división el día 4 del diestro cuando las concentraciones de P4 en suero se encuentran en ascenso. Como ya fue mencionado anteriormente, el embrión equino se retiene en el oviducto por 5 a 6 días tras su fertilización (Freeman et al. 1991). Dicho transporte oviductal lento podría estar relacionado a la necesidad de proliferación del epitelio secretorio glandular previo a la entrada del embrión, para que cuando éste ingrese al útero al día 6, el endometrio sea capaz de producir suficiente histotrofo para su nutrición (Gerstenberg et al. 1999).

Histomorfometría endometrial del diestro y la preñez temprana

De acuerdo a los cambios patológicos, el endometrio puede ser clasificado de acuerdo a distintas categorías. Las más aceptadas y reconocidas son las de Kenney (1978) y Kenney & Doig (1986). Sin embargo la aplicación de estos métodos para clasificar las biopsias endometriales depende de una evaluación subjetiva. La histomorfometría (medición de estructuras histológicas) permite un estudio objetivo de la morfología endometrial y un diagnóstico más preciso de las patologías endometriales de la yegua (Duna Mansour et al. 2004). El estudio morfométrico de las estructuras epiteliales es útil dado que el epitelio uterino responde rápida y dramáticamente al ambiente hormonal (Samuel et al. 1979); como ya fue mencionado, el mismo varía en relación a la concentración de hormonas esteroideas ováricas (E2 y P4) así como por la acción local de varios factores de crecimiento (Gerstenber et al. 1999).

Durante el diestro, cuando el endometrio se encuentra bajo la dominancia de P4 el epitelio luminal puede variar en altura entre las 10 – 20 μm (Kenney, 1978; Keenan et al. 1987); pudiendo ser columnar bajo, columnar alto, cuboidal o

pseudoestratificado (Ricketts, 1975; Kenney, 1978). Durante dicha etapa del ciclo estral es aparente una densidad glandular mayor dada por la reducción en el edema de la lámina propia comparado con el estro (Kenney, 1978; Ginther, 1992). El epitelio glandular es columnar con una altura de 14 a 17 μm y el diámetro glandular es de alrededor de 35 μm (Keenan et al. 1987).

Existen referencias de que la presencia del embrión en el útero genera cambios tempranos en la morfometría endometrial de la yegua, sin embargo la mayoría de estos trabajos son posteriores a la fijación del concepto, encontrándose hasta el momento escasos reportes de los cambios previos a esta etapa. Keenan et al. (1987) reportaron que el epitelio luminal se vería afectado por la preñez al encontrar una mayor altura del mismo entre los 2 a 5 días pos ovulación en yeguas preñadas que en yeguas cíclicas en los mismos días del ciclo; dicha diferencia no se mantuvo en los otros días de muestreo (Días 6 a 9 y 12 a 14). Posteriormente Keenan et al. (1991) reportó una mayor amplitud de la luz glandular en yeguas a los 12 días de preñez en relación a yeguas cíclicas en el mismo día pos ovulación, en consecuencia de la acumulación de secreciones intraglandulares en el primer grupo. En cuanto al epitelio y diámetro glandular, Kennan et al. (1987) reporta la disminución de ambas variables a través de los días de muestreo tanto en yeguas preñadas como cíclicas, sin detectar diferencias entre los grupos.

Hasta el momento no se encontraron más trabajos acerca de dichos cambios en el período en estudio en la yegua.

Células inflamatorias endometriales durante la preñez temprana

El sistema inmune discrimina lo propio de lo no propio, y elimina aquello que determina como ajeno. La preñez en mamíferos pareciera representar una falla en la discriminación de aquello no propio, representando una estrategia reproductiva altamente eficaz (Engelhardt et al. 1997). Hasta liberarse de la zona pelúcida, los embriones de mamíferos son inmunológicamente inertes, con baja expresión génica del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y poca evidencia de la alteración en la función de las células inmunitarias maternas. El concepto se beneficia de citoquinas producidas tanto por leucocitos residentes del tracto reproductivo como por otras células localizadas en dicho tracto (Hansen, 2011). El embrión a su vez produce citoquinas que regulan la función leucocitaria, señalando de ésta manera su presencia al sistema inmunitario materno (Hansen, 2011); por ejemplo en rumiantes el interferón tau ($\text{IFN}\tau$), además de su reconocido rol en el RMP, tendría un rol inhibitorio sobre la proliferación linfocitaria (Alexenko et al. 1997). En la yegua tanto el concepto como las células del tracto reproductivo producen prostaglandinas (Stout & Allen, 2002), y una de ellas, la PGE2 puede inhibir la proliferación linfocitaria (Low et al. 1988). A su vez, como se reportó en secciones previas, la P4 presenta efectos inhibitorios sobre las células del sistema inmune en la yegua (Acuña & Fumoso, 2013).

En la yegua se hallaron diversos trabajos acerca de los cambios leucocitarios endometriales en diversas situaciones fisiológicas como el estro (Kenney, 1978), tras el servicio (Troedsson et al. 2001; Card, 2005 entre otros) y durante la preñez peri y pos implantación del concepto (Allen 2001; Bacon et al. 2002; Noronha et al. 2010 entre otros), pero se encontraron escasas referencias de la respuesta inmune uterina

durante la preñez temprana, tras la entrada del embrión al útero. Keenan et al. (1987) reportaron un aumento en el número de linfocitos y de eosinófilos en yeguas preñadas entre los 6 y 9 días pos ovulación comparándolo con yeguas cíclicas en los mismos días del ciclo. En dicho trabajo adjudicaron la presencia de mayor cantidad de linfocitos a una respuesta inmunológica materna hacia el embrión durante el contacto inicial del mismo con el endometrio, y al aumento de eosinófilos como moderadores de ésta respuesta, considerando que en el siguiente muestreo (días 12 a 14) decreció el número de ambos tipos de células inflamatorias. Watson et al. (1993) coincidieron con el previo estudio reportando en que el número de linfocitos T no difiere entre yeguas preñadas y en diestro al día 14 pos ovulación.

Dada la poca información en equinos sobre las células inmunes endometriales durante el período en estudio, se brindarán datos sobre otras especies mayormente estudiadas como ser la cerda y la mujer. Una preñez exitosa en la cerda está asociada a una inmunosupresión intrauterina; se reconoce la supresión del CMH y la respuesta de los linfocitos T que permiten que el embrión (genéticamente ajeno a la madre) se desarrolle en el útero sin ser rechazado (Kaeoket et al. 2003). Durante la preñez temprana en la cerda, King (1988) reportó que el número de linfocitos en el epitelio superficial a los 10 a 19 días de preñez eran significativamente más bajos que en etapas anteriores de la preñez y que en las cerdas cíclicas en los mismos días. Concordando con dicho estudio, Engelhardt (2002) publicó que una reducción en el número de linfocitos endometriales podía ser detectada previo a la implantación en la misma especie. Los resultados del estudio de las subpoblaciones linfocitarias presentes en el endometrio porcino mostraron que las más comunes son los linfocitos T y las células natural killers (NK) durante las diferentes etapas del ciclo estral y la preñez temprana (Bischof, 1995; Kaeoket et al. 2003). Los suinos tienen similitudes con los humanos y roedores en que células NK están presentes en el estroma uterino y parecieran jugar un rol en la preñez; estas células serían importantes en las interacciones tempranas entre el concepto y el sistema inmunitario materno (Engelhardt et al. 1995). En la mujer, ante la presencia del embrión en el útero se reporta una remodelación endometrial que incluye la transformación del estroma uterino, el ingreso de células NK y la remodelación vascular (Modi et al. 2015). Las células NK en la mujer son encontradas en la mucosa uterina antes y durante la gestación en el endometrio y los tejidos deciduales (Croy et al. 2006). Los NK en la decidua presentan propiedades de remodelación tisular, preparando al útero para la implantación embrionaria. Dichas células carecen de efecto citolítico contra las células del trofoblasto, tienen citotoxicidad reducida. En lugar de liberar factores citotóxicos liberan citoquinas y factores angiogénicos esenciales para la invasión trofoblástica y las modificaciones vasculares (Hanna et al. 2006). Los NK en el endometrio de la mujer han sido estudiados en menor proporción; se tiene conocimiento que dichas células proliferan en la fase lútea del ciclo menstrual (Manaster et al. 2008).

Además de los linfocitos, los eosinófilos jugarían un papel importante durante la preñez temprana. Además de poseer una función principal de destruir el material extraño, presentan una variedad de sustancias potentes en sus gránulos que cumplirían un rol en la remodelación vascular y tisular del endometrio (Jeziorska et al. 1995). En los días 10 a 14, Bischof et al. (1995) reportaron un aumento de eosinófilos en el estroma endometrial de la cerda preñada. Posteriormente, Kaeoket et al. (2003) encontraron igual cantidad de eosinófilos tanto en cerdas preñadas como

cíclicas en el día 11 del ciclo y preñez; por lo que asoció la cantidad de eosinófilos al nivel de progesterona y no a la preñez, destacando que dichas células estarían asociadas con cambios dinámicos en la estructura y función endometrial que estaría preparándose para la posible implantación de un embrión.

No se encontraron referencias vinculando a otras células inflamatorias con la preñez temprana normal, dichas células se reportan en situaciones patológicas o fisiológicas como el estro o el parto. La presencia de plasmocitos se relaciona a inflamación crónica severa a moderada, con estimulación antigénica continua; los hemosiderófagos (macrófagos que han fagocitado sangre) representan hemorragia dado por un trauma, el parto, aborto o muerte embrionaria. Los neutrófilos (PMN) por otro lado se visualizan durante el estro en la periferia de vénulas y capilares cerca del lumen uterino; normalmente pocos PMN migran desde los vasos hacia el estroma o el epitelio luminal por lo que la presencia de PMN en el tejido se interpreta como signo de inflamación (Kenney, 1978).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Varios aspectos de la preñez en equinos parecen ser exclusivos del género *Equus* y son de considerable interés académico y relevancia práctica. Los primeros días de la preñez es un período importante de pérdida embrionaria que afecta económicamente a la industria equina (Hayes et al. 2012), con un 9% de pérdidas previo al día 14 pos ovulación en yeguas sanas (Ball, 1988). Creemos que el estudio de las interrogantes sobre la preñez temprana, previo y durante el RMP podría ayudar a disminuir las pérdidas embrionarias previamente mencionadas, generando de ésta manera una mayor productividad para el sector ecuestre. El presente trabajo tuvo como cometido realizar un aporte en dicho conocimiento, investigando cambios que la preñez temprana pudiera provocar en el endometrio a través de los días tras la ovulación, así como cambios en los niveles circulantes de una serie de hormonas involucradas en el desarrollo embrionario.

4.1 HIPOTESIS

- I) La preñez temprana genera cambios histomorfométricos y en el número de células inflamatorias del endometrio comparado con yeguas cíclicas en los mismos días pos ovulación.
- II) La preñez temprana se asocia a cambios en los niveles séricos de progesterona, estradiol, insulina, IGF-1, leptina y adiponectina comparado con yeguas cíclicas durante los mismos días pos ovulación.
- III) Las variables morfométricas del endometrio, el número de células inflamatorias y las concentraciones séricas de las hormonas estudiadas se encuentran correlacionadas.

4.2 OBJETIVOS

- I) Determinar las medidas histológicas del epitelio luminal y de las glándulas endometriales así como el número de células inflamatorias en el endometrio a los 7, 10 y 13 días pos ovulación en yeguas preñadas y cíclicas sanas.
- II) Determinar mediante radioinmunoanálisis las concentraciones séricas de progesterona, estradiol, insulina, IGF-1, leptina y adiponectina en yeguas preñadas y cíclicas sanas desde la ovulación hasta los 13 días del ciclo y preñez.
- III) Evaluar la existencia de correlaciones entre las variables morfométricas del endometrio, el número de células inflamatorias y las concentraciones séricas de las hormonas en estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño experimental

El presente trabajo se llevó a cabo, en el campo experimental n° 1 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Departamento de Canelones, Uruguay (latitud 34°22'23.1"S, longitud 55°36'10.3"O), durante la estación reproductiva, siendo el proyecto previamente aprobado por la comisión de experimentación animal (CHEA).

Se utilizaron 30 yeguas, entre 5 y 10 años de edad, sin raza definida (fenotipo raza Criolla), con un peso aproximado de 400 kg provenientes de una manada comercial. Las mismas fueron mantenidas en pasturas naturales con agua *ad libitum*. Los animales presentaron condición corporal > 3 en una escala de 1 a 5 durante el experimento (Malschitzky et al 2001), sin antecedentes de problemas de fertilidad. Se evaluó su estado sanitario mediante examen físico y ginecológico de rutina y se verificó su ciclicidad mediante examen ginecológico y ultrasonografía (por la presencia de un CL y/o un folículo mayor a 25 mm) (SonoScape® A6v (SonoScape, China) con un transductor lineal multifrecuencia (5-7,5 MHz).

Ante la visualización ultrasonográfica de un cuerpo lúteo se administró 250 µg (dosis total) de dl-cloprostenol sódico (IM) (Estrumate®, Schering-Plough, Essex Animal Health Friesoythe, Alemania), con el fin de provocar el retorno al estro. Las yeguas fueron monitoreadas mediante ultrasonografía diaria; ante la presencia de un folículo preovulatorio con diámetro ≥ 35 mm y edema uterino grado 3 (Ginther et al., 1984) se administró 2500 UI de hCG intravenoso (IV) (Chorulon®, Intervet, Internacional, B.V., Holanda). Se continuó con control ecográfico diario, detectando el día de la ovulación (día 0 del ciclo 1). En el primer ciclo se extrajeron biopsias endometriales de ambos cuernos uterinos los días 7 (n=6), 10 (n=6) y 13 (n=6) pos ovulación, constituyendo el grupo de yeguas cíclicas. Las muestras de biopsia endometrial se extrajeron de acuerdo al método descrito por Kenney (1978) utilizando pinza de Yeoman. Se tomó una muestra de cada cuerno uterino en el primer tercio dorsal de los mismos tras la esterilización de la pinza mediante flameado; seguidamente se repitió el procedimiento de sincronización (250µg de PGF_{2α} sintética (IM), seguimiento ultrasonográfico e inducción de ovulación con hCG).

En el segundo ciclo las yeguas fueron servidas por monta natural 24 horas luego de la administración de hCG, ante la presencia de un folículo preovulatorio con diámetro ≥ 35 mm y edema uterino grado 3 (Ginther et al., 1984), por uno de tres padrillos fértiles, elegido al azar. Paralelamente se realizó control ecográfico diario para detectar la ovulación (día 0). A los días 7 (n=6), 10 (n=6) y 13 (n=6) pos ovulación se realizó la recuperación embrionaria por lavado uterino. Las yeguas con visualización del concepto por ultrasonografía previo al lavado o recuperación embrionaria exitosa fueron asignadas al grupo preñado. Los conceptos se colectaron por lavado uterino transcervical con 1 a 3 litros (de acuerdo a la edad gestacional) de solución Ringer lactato a 37°C. Los embriones de día 7 y 10 fueron recuperados por

el método regular (Blanchard et al., 2003). Los embriones de día 13 fueron recuperados mediante una sonda uterina de fabricación casera con tubuladura de silicona de 1,5 cm de diámetro. Inmediatamente después de la recuperación embrionaria fueron retiradas, de todas las yeguas, biopsias de ambos cuernos uterinos con la misma metodología empleada para las yeguas cíclicas.

5.2 Procesamiento de las muestras

5.2.1 Biopsias endometriales

Las muestras de ambos cuernos uterinos (ipsi y contralateral a la ovulación) se colocaron separadamente en tubos de ensayo de 5 mL, en paraformolaldehído bufferado al 4%, fueron identificadas para ser sometidas posteriormente a análisis histológico. Tras la inclusión en parafina, se cortaron secciones de 5 μ m las cuales fueron teñidas con hematoxilina–eosina y ácido periódico de Schiff (PAS) en el Departamento de Morfología del Instituto de Biología de la Universidad Federal de Pelotas, Brasil, para su posterior análisis.

5.2.1.1 Análisis histológico

El análisis histológico se realizó en el Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. En las láminas teñidas con hematoxilina-eosina se cuantificaron el número de eosinófilos, linfocitos, neutrófilos, hemosiderocitos y plasmocitos presentes en ambos estratos (estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE)). El análisis se realizó mediante un microscopio óptico (Nikon[®], Optiphot, Japón) a 400 aumentos, a través del cual se cuantificaron el número y tipo de células inflamatorias presentes en 5 campos para cada estrato del endometrio. Posteriormente se realizó un promedio de cada tipo celular hallado en cada estrato para cada cuerno uterino.

5.2.1.2 Análisis morfométrico

El estudio histomorfométrico se llevó a cabo en el departamento de Histología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. Se utilizó un sistema de análisis de imagen (Infinity analyze[®], Toronto, Canadá) conectado a un microscopio óptico (Olympus[®], BX50, Japón) a través del cual se midió a 400x la altura del epitelio luminal y glandular, el diámetro glandular, el lumen glandular y la secreción intraglandular en las láminas teñidas con PAS.

La altura del epitelio luminal fue registrada en cinco zonas, elegidas al azar, del preparado, midiendo desde la membrana basal hasta la membrana apical de las células. Las restantes variables se registraron en 10 glándulas esféricas del EE elegidas al azar. La altura del epitelio glandular se midió desde la membrana basal de las células a la membrana apical de las mismas; para el diámetro glandular se midieron 2 diámetros perpendiculares de cada glándula (desde una membrana basal a la opuesta), registrando la media entre ambas medidas. El lumen glandular se midió

de igual forma que la variable anterior, midiendo el espacio entre las membranas apicales de las células epiteliales. Para la medición de la secreción intraglandular se buscaron 10 glándulas esféricas en las cuales la secreción intraglandular también se mantuviera esférica, y se midieron los 2 diámetros mayores de dicha secreción realizando un posterior promedio entre ambas medidas y registrando dicho valor.

Por último se realizó un promedio de los registros de cada variable para cada cuerno uterino; utilizando dichos valores para realizar el análisis estadístico.

5.2.2 *Determinación hormonal*

Diariamente se extrajeron muestras de sangre por venopunción yugular en tubos secos al vacío a todas las yeguas desde el día de la ovulación hasta el día del muestreo endometrial en ambos ciclos. Dentro de los 15 minutos posteriores a la extracción, las muestras fueron centrifugadas a 3000 g por 15 minutos (centrífuga Luguimac[®], LC-15, Argentina). Se removió y almacenó el suero en tubos Ependorff identificados y por duplicado a -20°C hasta la determinación hormonal.

Las determinaciones de las concentraciones de progesterona, 17 β -estradiol, insulina, factor de crecimiento insulínico tipo 1, leptina y adiponectina fueron realizadas mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

La P4 fue determinada utilizando el Kit PROG-RIA-CT KIP1458; DiaSource[®] ImmunoAssays SA, Louvain la Neuve, Belgium. El límite de detección del análisis fue 0,72 ng/mL con un coeficiente de variación (CV) intraensayo para el control bajo (I) (0,84 ng/mL) y alto (II) (2,65ng/mL) de 14 y 7,5 % respectivamente, y un CV interensayo de 4,8 y 8% para el control I y II respectivamente.

El 17 β -estradiol fue determinado utilizando un Kit de RIA con doble anticuerpo (ImmuChem[®] Double Antibody 17 β Estradiol 125 RIA Kit, ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA). El límite de detección del análisis fue 2,6 pg/mL. El estudio presentó un CV intraensayo para el control (5,9 pg/mL) de 10,8% y un CV interensayo de 8,7%.

La insulina fue determinada por análisis inmunoradiométrico (IRMA) (INS-IRMA KIP1251-KIP1254; DiaSource[®] ImmunoAssays SA, Louvain la Neuve, Belgium). El límite de detección fue de 3,66 μ UI/mL con CV intraensayo para el control I (15,5 μ UI/mL) y control II (70,8 μ UI/mL) de 8,7 % y 7,9%, respectivamente y un CV interensayo de 7,8 y 6,5% para el control I y II respectivamente.

Las concentraciones de IGF-1 fueron determinadas mediante RIA utilizando un kit comercial (Cisbio bioassays[®], Codolet, France). El límite de detección del análisis fue 0,57 ng/mL, con un CV de 6,9 % y 4,1% para el control I (51 ng/mL) y II (367 ng/mL) respectivamente.

La leptina fue determinada mediante RIA utilizando un kit comercial (Linco[®], Millipore). Al protocolo se modificó la cantidad de hormona marcada a 75 µl en vez de 100 µl para lograr la detección de bajos valores séricos. La sensibilidad del análisis fue 1,2 ng/mL, con un CV de 7,5 % y 11,4% para el control I (3,5 ng/mL) y II (9,6 ng/mL) respectivamente.

Las concentraciones de adiponectina fueron determinadas por el mismo método utilizando un kit comercial (HADP-61 HK, Linco[®], Millipore). La sensibilidad del análisis fue 0,59 ng/mL, con un CV intraensayo de 8,8% y 18,6% para el control I (8,9 ng/mL) y II (75,9 ng/mL) respectivamente, mientras que el CV interensayo fue de 13,1% para el control I y 14,2% para el control II.

5.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa Statistical Analysis System (SAS, Cary, NC, USA). Las concentraciones hormonales fueron sometidas a análisis de varianza de medidas repetidas utilizando un modelo mixto utilizando el programa PROC MIXED. Los efectos fijos del modelo estadístico fueron el grupo (yeguas cíclicas o preñadas), el día en que se tomaron las muestras y la interacción entre ambos. Fue realizado el análisis Univariate a todas las variables para identificar inconsistencias y valores extremos, ante la ausencia de normalidad en los datos se realizó un estudio no paramétrico por medio del uso de PROC GENMOD verificando la consistencia con los datos del PROC MIXED los cuales fueron finalmente utilizados. La comparación entre variables fue realizada mediante el test de Tukey Kramer.

La morfología endometrial fue analizada de la misma manera, incluyendo además como efectos fijos el lado del cuerno uterino en que ocurrió la ovulación (ipsilateral o contralateral a la ovulación). El número de células inflamatorias en el endometrio fue analizado mediante el uso de PROC GENMOD, utilizando como efectos fijos los mismos que aquellos utilizados en la morfología endometrial.

El estudio de la correlación entre las variables histomorfométricas, las concentraciones hormonales y las células inflamatorias se realizó mediante la utilización de PROC CORR utilizando los valores hormonales obtenidos los días del muestreo endometrial.

El nivel de significancia en todos los casos fue considerado como $P < 0.050$ y la tendencia cuando $0.050 > P > 0.100$.

6. RESULTADOS

6.1 Histomorfología endometrial

No se observaron diferencias significativas al comparar las variables según el cuerno ipsi o contralateral a la ovulación.

La altura del epitelio luminal no fue afectado por el día ($P = 0,39$) ni por la preñez ($P = 0,86$) y no hubo interacción grupo x día ($P = 0,37$) (Figura 2A). El día ($P < 0,001$) y el grupo ($P = 0,002$) afectaron la altura del epitelio glandular (Figura 2B). Tanto en las yeguas preñadas como en las cíclicas la altura del epitelio glandular fue similar ($P > 0,05$) entre los días 7 y 10 y disminuyó al día 13 ($P < 0,05$). Entretanto, se observaron diferencias en la altura del epitelio glandular entre las yeguas preñadas y cíclicas al día 7 ($P = 0,008$) y al día 10 ($P = 0,05$). No se observó interacción grupo x día ($P = 0,36$).

Las yeguas preñadas presentaron mayor diámetro glandular en relación a las yeguas cíclicas a los 7 ($P < 0,001$), a los 10 ($P = 0,05$) y a los 13 días ($P < 0,001$) (Figura 3A). El diámetro glandular fue afectado por el día del muestreo ($P < 0,001$), disminuyendo con el pasar de los días. Dentro de cada grupo, en las yeguas preñadas se observaron diferencias entre el día 7 y el 13 ($P < 0,05$), mientras que en las yeguas cíclicas entre los días 7 y 10 en relación al 13 ($P < 0,001$ y $P < 0,01$ respectivamente). No se observó interacción grupo x día ($P = 0,62$).

Se observó influencia del día ($P < 0,001$), del grupo ($P = 0,01$) e interacción grupo-día ($P = 0,03$) en relación al diámetro del lumen glandular (Figura 3B). En las yeguas preñadas el lumen glandular fue similar ($P > 0,05$) entre los días 7 y 10, aumentando ($P < 0,01$) entre los días 7 y 13. De la misma forma se detectó mayor tamaño del lumen glandular al día 13 en las yeguas preñadas que en las cíclicas ($P < 0,001$). Dentro del grupo de las yeguas cíclicas no se verificaron cambios del lumen glandular ($P > 0,05$) entre los días 7, 10 y 13.

La secreción glandular fue influenciada por el grupo ($P = 0,003$) pero no lo fue por el día ($P = 0,11$) (Figura 4). Se observó un aumento de la secreción a los 10 ($P = 0,02$) y a los 13 días ($P = 0,02$) en las yeguas preñadas en relación a los mismos días en las yeguas cíclicas. Fue observada una tendencia de interacción grupo x día ($P = 0,07$).

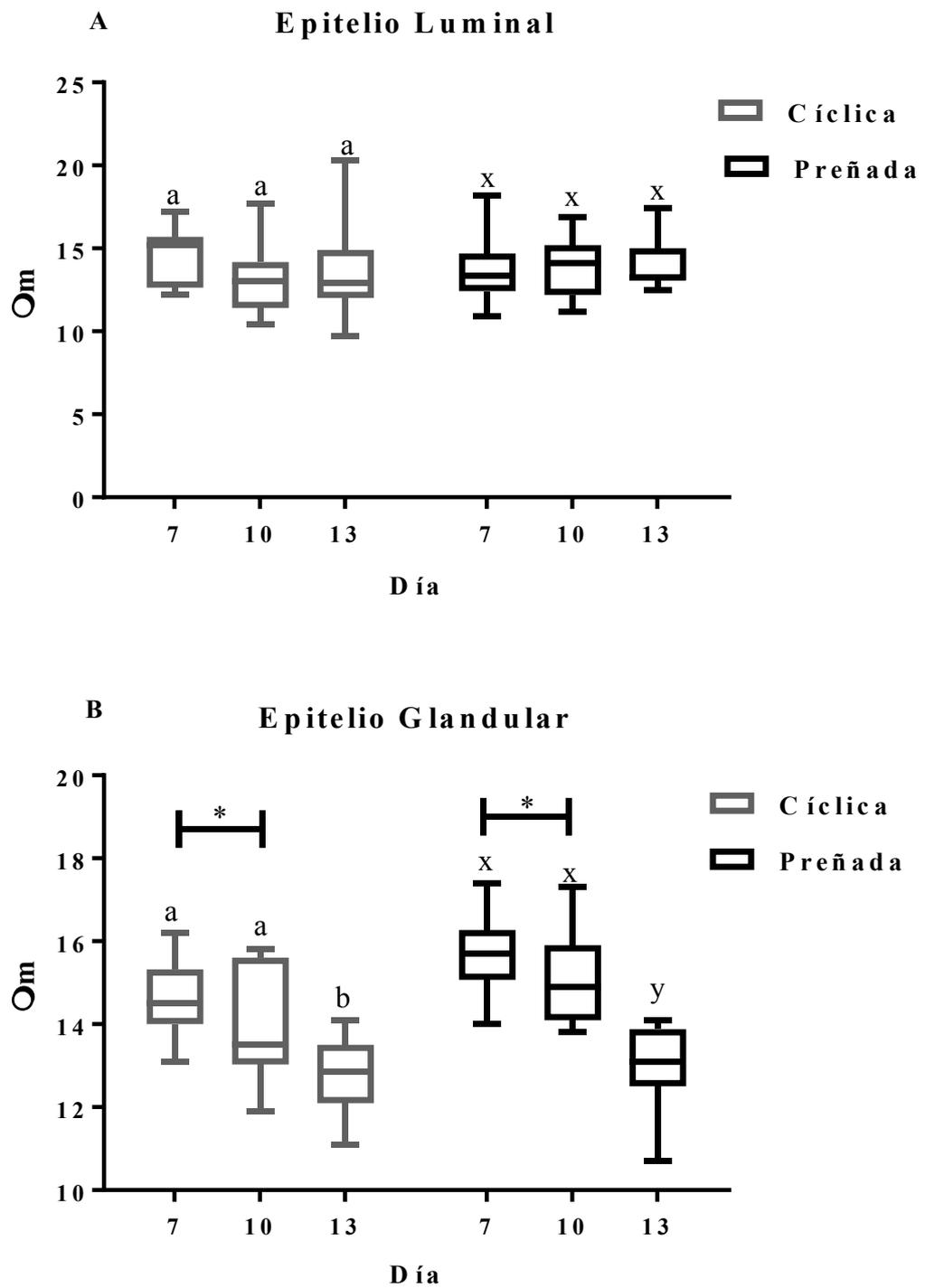


Figura 2. Box-plots de la altura del Epitelio Luminal (A) y del Epitelio Glandular (B) de yeguas cíclicas y preñadas a los 7, 10 y 13 días después de la ovulación. Letras diferentes (a,b o x,y) representan diferencias significativas ($P < 0,05$) dentro del mismo grupo (cíclicas o preñadas). Símbolo diferente (*) representa diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$) en los respectivos días (n=36).

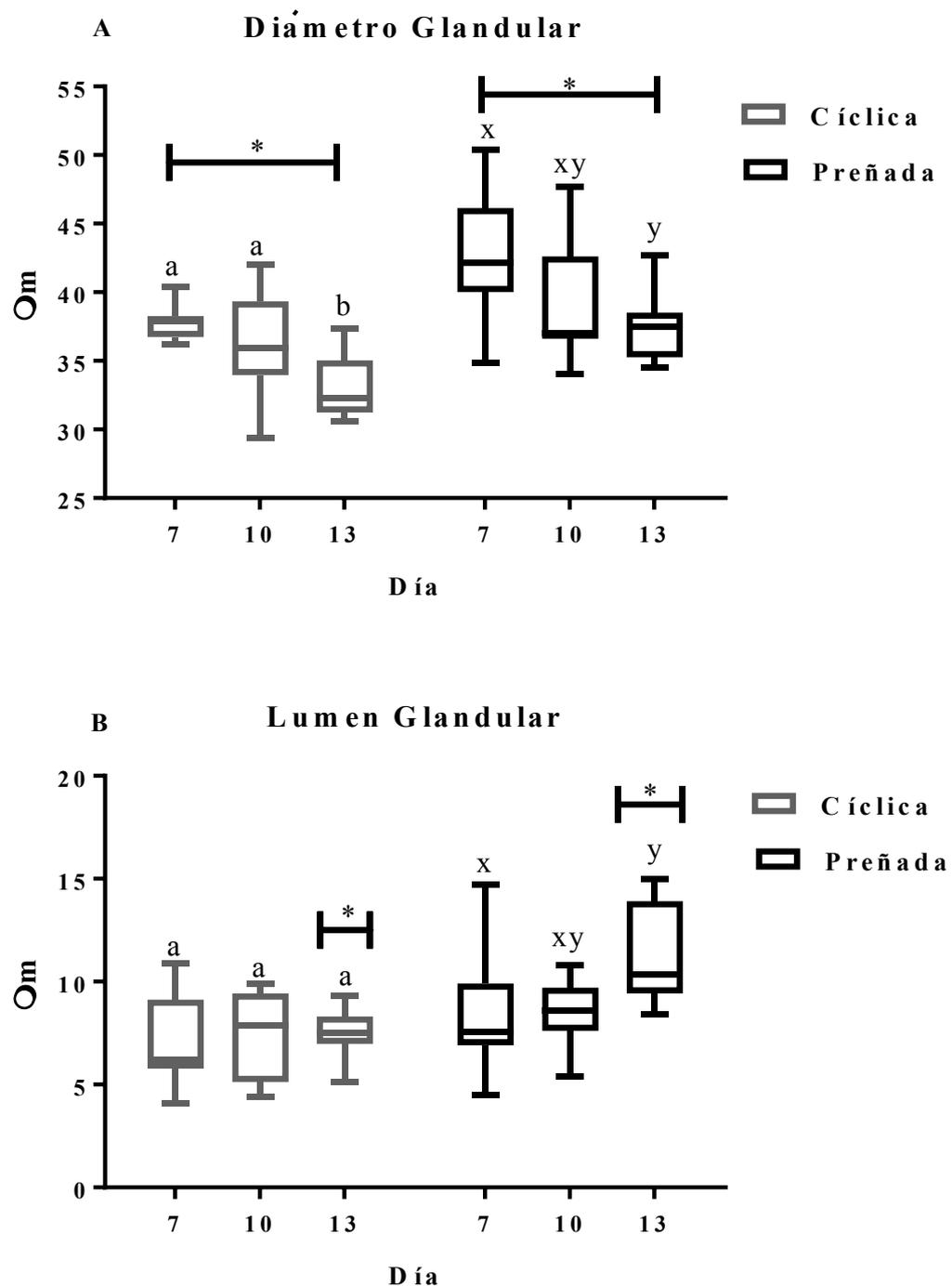


Figura 3. Box-plots del Diámetro Glandular (A) y Lumen Glandular (B) de yeguas cíclicas y preñadas a los 7, 10 y 13 días después de la ovulación. Letras diferentes (a,b o x,y) representan diferencias significativas ($P < 0,05$) dentro del mismo grupo (cíclicas o preñadas). Símbolo diferente (*) representa diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$) en los respectivos días ($n=36$).

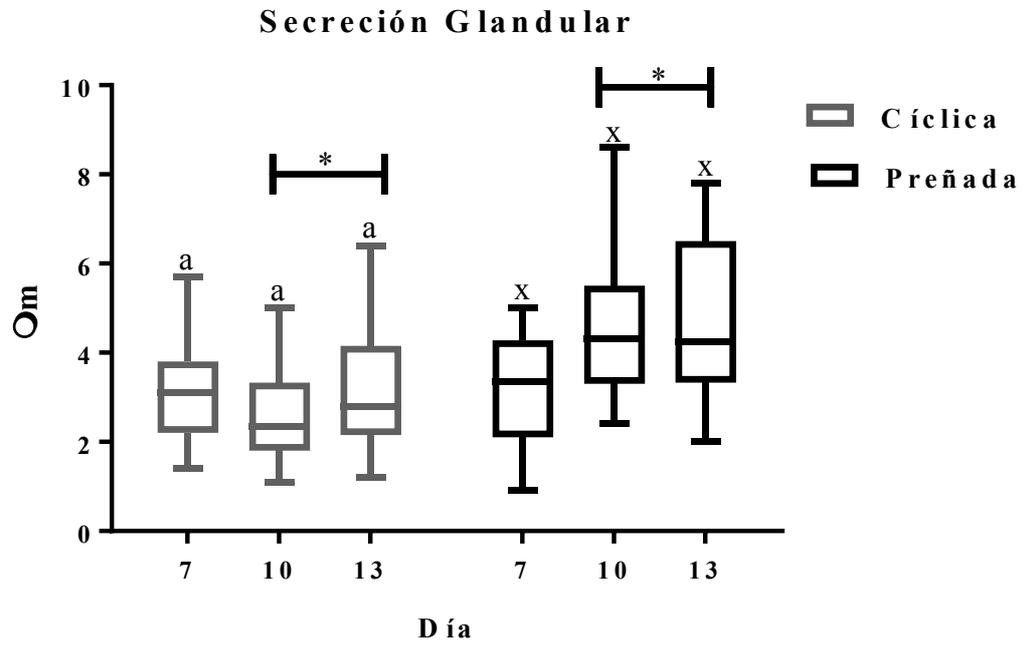


Figura 4. Box-plot de la Secreción Glandular de yeguas cíclicas y preñadas a los 7, 10 y 13 días después de la ovulación. Letras semejantes (a o x) representan diferencias no significativas ($P > 0,05$) dentro del mismo grupo (cíclicas o preñadas). Símbolo diferente (*) representa diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$) en los respectivos días ($n=36$).

6.2 Inflamación endometrial

Eosinófilos

La presencia de eosinófilos en el EC fue influenciada por el día del muestreo ($P = 0,003$) y por el grupo muestreado ($P = 0,002$). Se observó mayor ($P = 0,005$) presencia de eosinófilos a los 7 días pos ovulación en las yeguas preñadas que en las cíclicas. En las yeguas preñadas el número de eosinófilos en el EC fue menor al día 13 que en el día 7 ($P < 0,01$). Se verificó interacción grupo x día ($P = 0,009$) (Figura 5A).

En el EE el día influyó el número de eosinófilos ($P = 0,04$) pero no así el grupo ($P = 0,2$). Se constató mayor incidencia dentro del grupo de las yeguas preñadas a los 7 días en comparación con el día 13 ($P < 0,05$). Se verificó una tendencia de interacción grupo x día ($P = 0,06$) (Figura 5B).

Linfocitos

El número de linfocitos en el EC fue influenciado por el día ($P = 0,007$) y por el grupo ($P = 0,041$). Se observó mayor ($P = 0,021$) presencia de linfocitos en el día 7 en las yeguas preñadas que en las cíclicas. En las yeguas preñadas, se observó una disminución de linfocitos en el EC desde el día 7 al día 13 ($P = 0,05$). Se constató interacción grupo x día ($P = 0,02$) (Figura 6A).

En el EE no se verificó influencia del día ($P = 0,23$) ni del grupo ($P = 0,23$). Hubo una tendencia de interacción grupo x día ($P = 0,09$) (Figura 6B).

Demás células inflamatorias

Se observaron mínima cantidad de neutrófilos, hemosiderocitos y plasmocitos (media menor a 1 célula entre los 5 campos observados en ambos estratos endometriales), sin diferencias entre en los días de muestreo ni entre los diferentes grupos.

No se observaron diferencias significativas al comparar las células inflamatorias según el cuerno ipsi o contralateral a la ovulación.

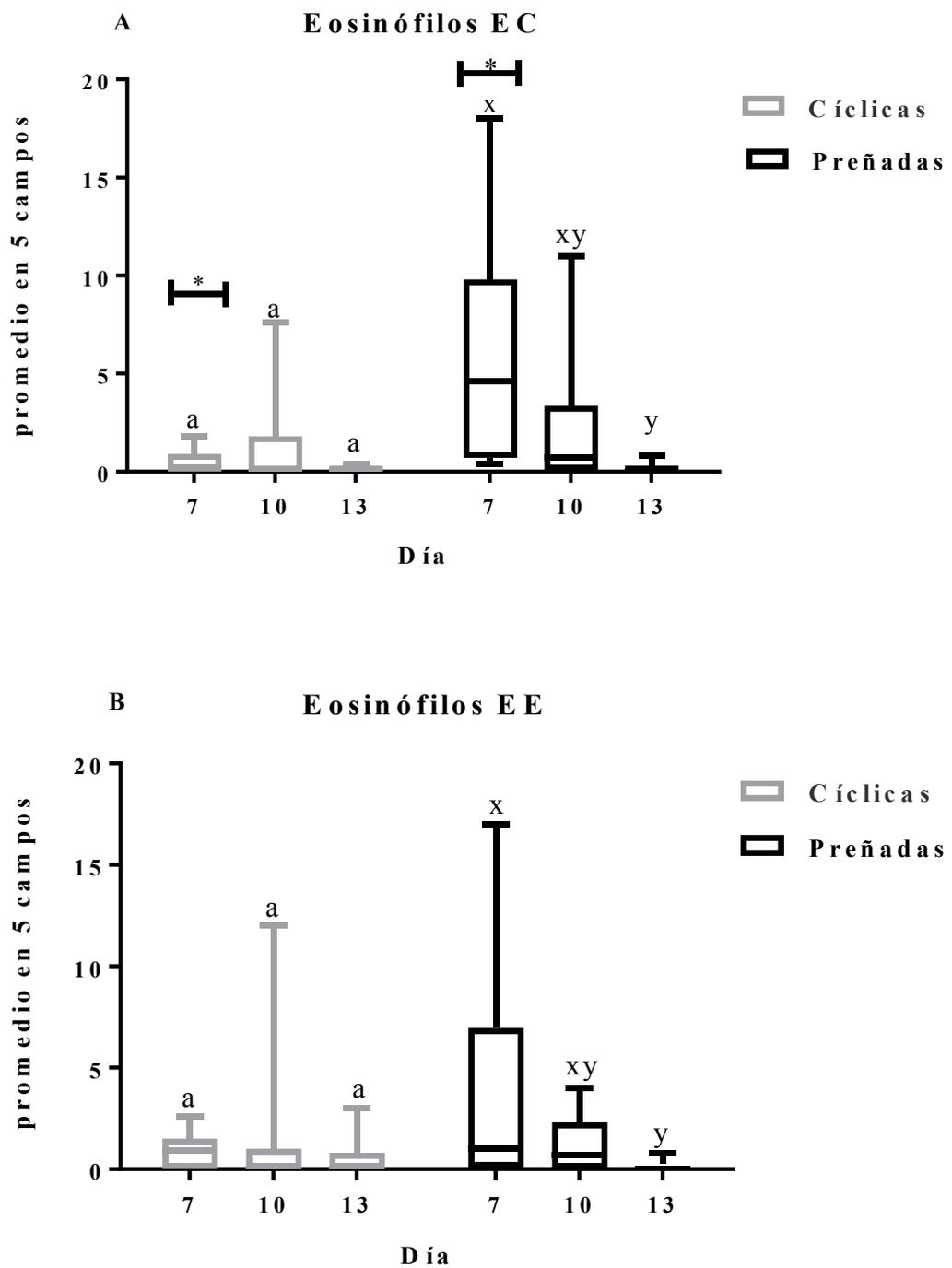


Figura 5. Box-plot del número de eosinófilos en el EC (A) y EE (B) del endometrio de yeguas cíclicas y preñadas a los 7, 10 y 13 días después de la ovulación. Letras diferentes (a,b o x, y) representan diferencia significativa dentro del mismo grupo (cíclicas o preñadas). Símbolo diferente (*) representa diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$) en los respectivos días ($n=36$). EC= Estrato compacto, EE= Estrato esponjoso.

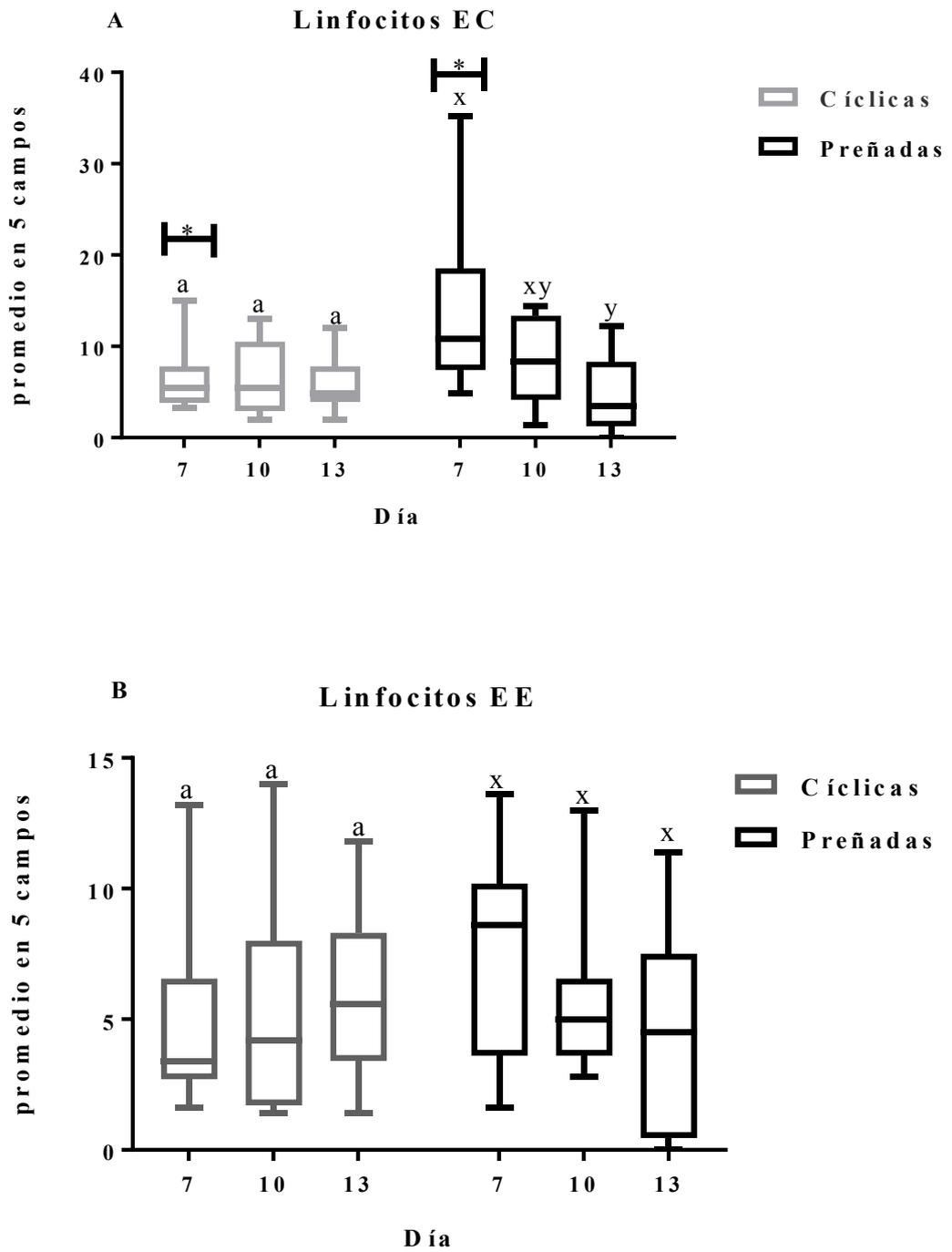


Figura 6. Box-plot del número de linfocitos en el EC (A) y EE (B) del endometrio de yeguas cíclicas y preñadas a los 7, 10 y 13 días después de la ovulación. Letras diferentes (a,b o x, y) representan diferencia significativa dentro del mismo grupo (cíclicas o preñadas). Símbolo diferente (*) representa diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$) en los respectivos días (n=36). EC= Estrato compacto, EE= Estrato esponjoso.

6.3 Perfiles hormonales

Las concentraciones de P4 se vieron influenciadas por el día de muestreo ($P < 0.001$), pero no existieron diferencias entre los grupos de estudio ($P = 0,54$) ni se observó interacción entre grupo y día ($P = 0,98$). La concentración de la P4 aumentó progresivamente hasta el día 5, manteniéndose constante hasta el día 10, momento en que la concentración decayó un 30% hacia el fin del muestreo (Figura 7).

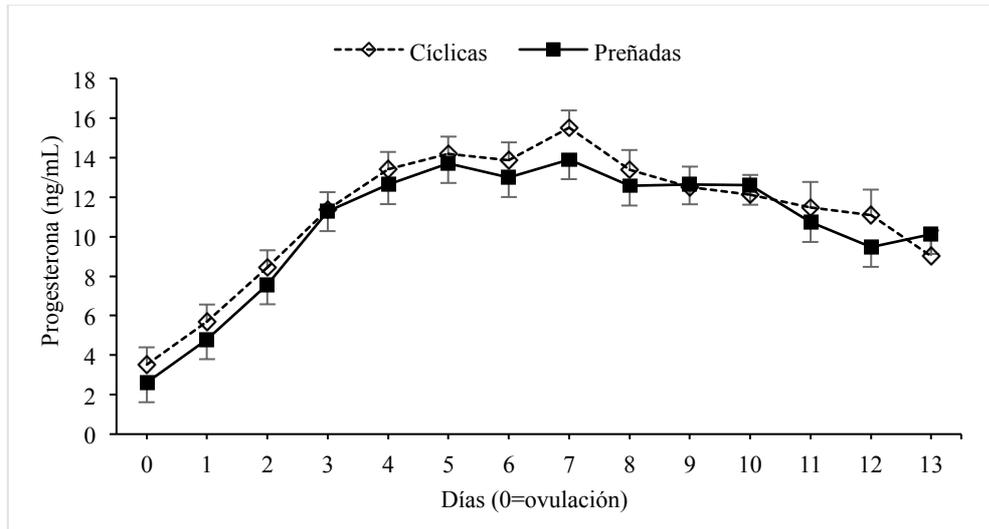


Figura 7. Concentraciones (Media \pm error estándar de la media (EEM)) séricas de P4 (ng/mL) desde la ovulación (día 0) hasta el fin del muestreo (día 13).

Los niveles séricos de E2 fueron afectados por el día de muestreo ($P = 0,02$), pero no por el grupo (cíclicas o preñadas) ($P = 0,41$). Tampoco se observó interacción entre grupo y día. Las concentraciones de E2 fueron más altas los días 0 y 1 que los días 5 al 8 inclusive ($P < 0,05$) (Figura 8).

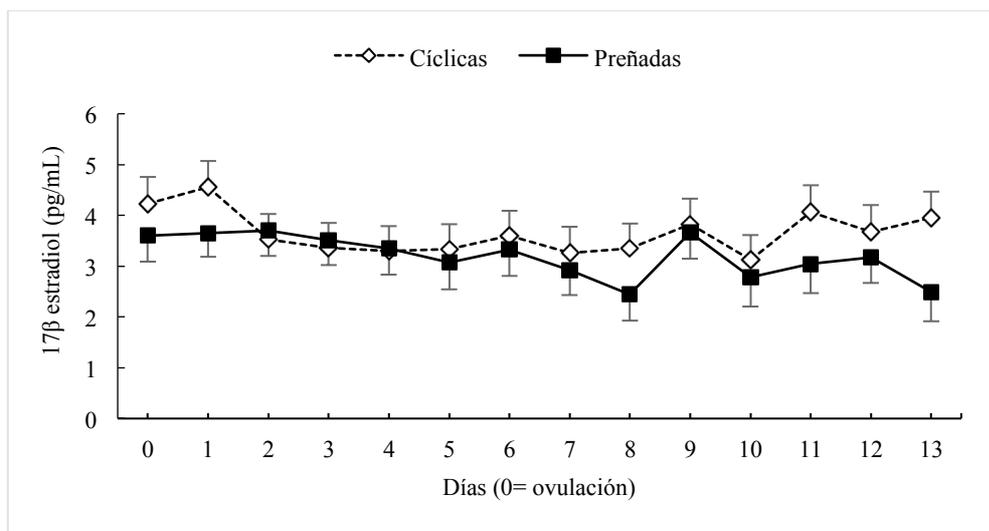


Figura 8. Concentraciones (Media \pm EEM) séricas de E2 (pg/mL) desde la ovulación (día 0) hasta el fin del muestreo (día 13).

Las yeguas cíclicas presentaron una tendencia ($P = 0,07$) a mayor concentración de insulina que las yeguas preñadas, presentando mayor concentración en los días 8 y 12 ($P < 0,05$) y una tendencia en los días el día 6 y 13 ($P = 0,06$). Se observó interacción entre grupo y día ($P = 0,03$) en las concentraciones de la insulina durante los días de muestreo, pero no se observó influencia del día ($P = 0,15$) (Figura 9).

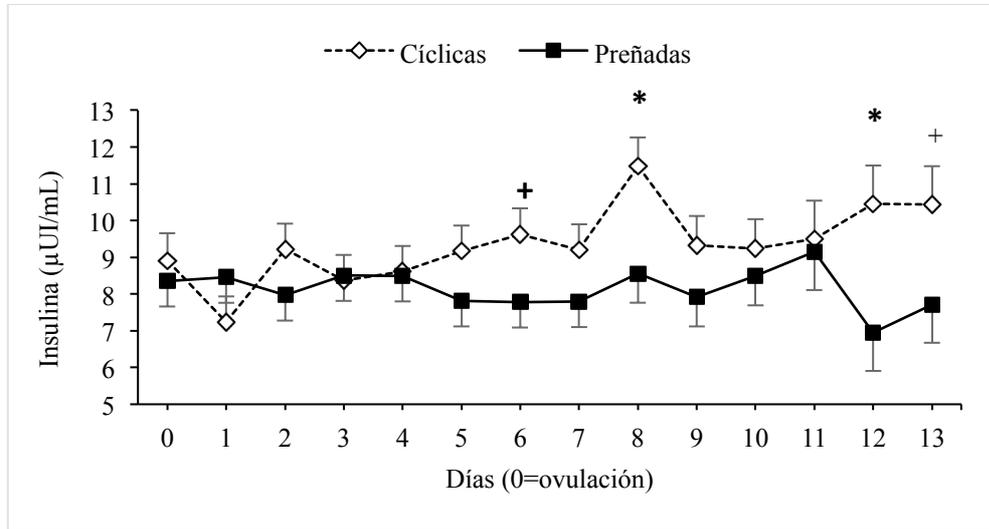


Figura 9. Concentraciones (Media \pm EEM) séricas de insulina (μ UI/mL) desde la ovulación (día 0) hasta el día 13. *: $P < 0,05$; +: $0,050 > P < 0,100$.

Los niveles de IGF-1 se vieron afectados por el día del muestreo ($P = 0,04$), pero no por el grupo (cíclico o preñado) ($P = 1,0$). Tampoco se detectó interacción entre grupo y día ($P = 0,36$). Se registraron valores decrecientes en ambos grupos desde el día de la ovulación (día 0) hasta el fin del muestreo (día 13), momento en que la concentración decayó un 10% con respecto al día 0 (Figura 10).

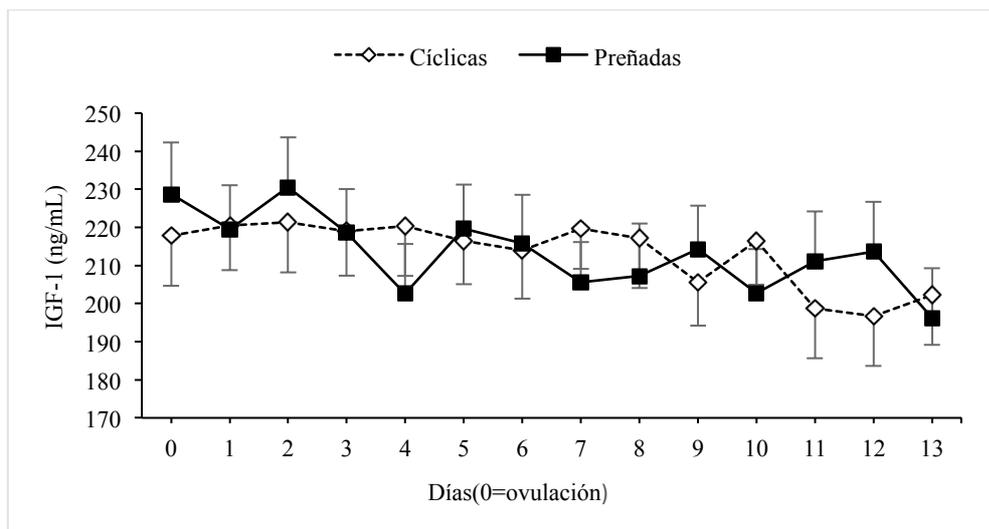


Figura 10. Concentraciones (Media \pm EEM) séricas de Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1; ng/mL) desde la ovulación (día 0) hasta el día 13.

La Figura 11 expresa las concentraciones de leptina sérica en las yeguas cíclicas y preñadas. No se vio influencia de grupo ($P = 0,69$), de día ($P = 0,73$) ni tampoco se observó interacción grupo-día ($P = 0,27$).

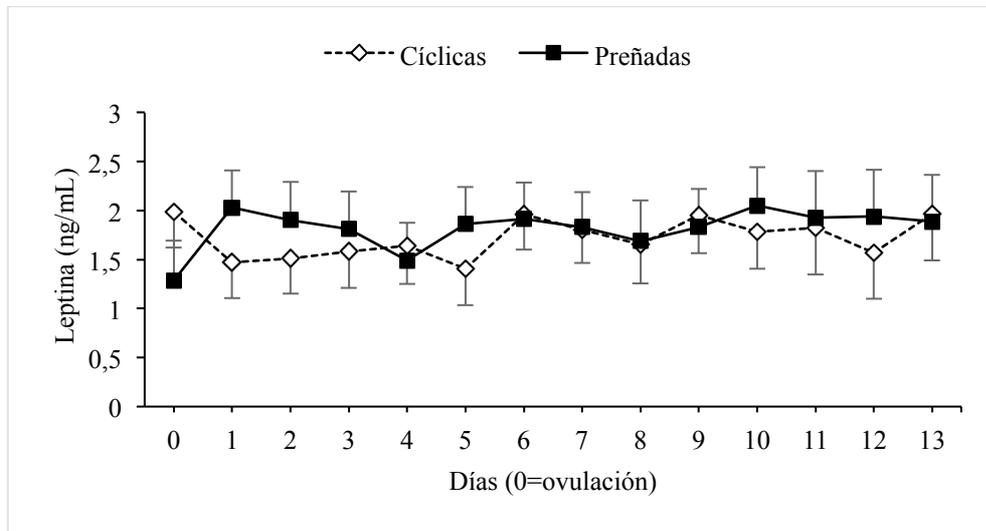


Figura 11. Concentración (Media \pm EEM) séricas de leptina (ng/mL) desde la ovulación (día 0) hasta el día 13.

En la concentración sérica de adiponectina se observaron diferencias por el día del muestreo ($P = 0,03$), pero no por el grupo (yeguas cíclicas o preñadas) ($P = 0,6$) ni se observó interacción grupo x día ($P = 0,6$). Los valores diarios decrecieron 20% hacia el día 9 con respecto al día de la ovulación ($P = 0,03$), manteniéndose en descenso hasta el día 11 y recuperando los valores de día 0 a partir del día 12 (Figura12).

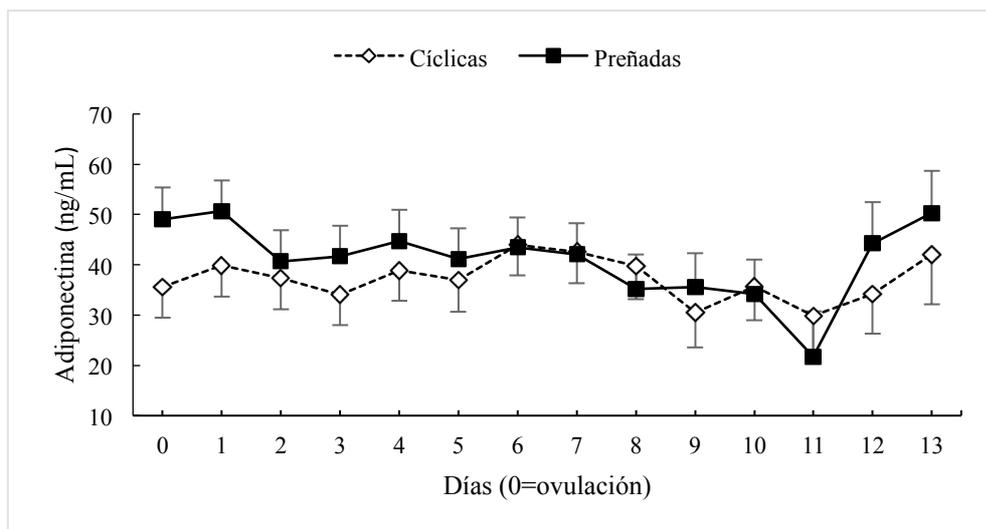


Figura 12. Concentraciones (Media \pm EEM) séricas de adiponectina (ng/mL) desde la ovulación (día 0) hasta el día 13.

6.4 Correlación entre las concentraciones hormonales, las variables histomorfológicas y el número de células inflamatorias

Las correlaciones de las yeguas preñadas se muestran en la tabla I, mientras que las de las yeguas cíclicas se muestran en la tabla II.

En ambos grupos de yeguas se correlacionaron el epitelio y el diámetro glandular con las concentraciones séricas de P4. A su vez se observó una asociación entre el epitelio glandular y el diámetro glandular. En ambos grupos también se observó una correlación entre la altura del epitelio glandular y el número de linfocitos en el EC.

En las yeguas preñadas, el lumen y la secreción glandular se vieron asociadas y ambas variables se correlacionaron negativamente con el epitelio glandular. Las concentraciones séricas de P4 se relacionaron con el número de eosinófilos en ambos estratos. A su vez, los eosinófilos en ambos estratos variaron en relación a la altura del EG.

Tabla I. Correlación entre las variables estudiadas en el grupo de yeguas preñadas (n=36).

	EG	DG	LG	SG	Linf EC	Eos EC	Eos EE
P4	r = 0,33 P = 0,05	r = 0,35 P = 0,04	NS	NS	NS	r = 0,46 P = 0,004	r = 0,43 P = 0,008
EG		r = 0,77 P = 0,0002	r = -0,5 P = 0,03	r = -0,45 P = 0,06	r = 0,5 P = 0,03	r = 0,53 P = 0,002	r = 0,45 P = 0,04
DG			NS	NS	NS	r = 0,51 P = 0,02	r = 0,51 P = 0,02
LG				r = 0,58 P < 0,01	NS	NS	NS
SG					NS	NS	NS
Linf EC						NS	NS
Eos EC							r = 0,88 P < 0,0001

P4: Progesterona; EG: Epitelio glandular; DG: Diámetro glandular; LG: Lumen glandular; SG: Secreción glandular; Eos: Eosinófilos; Linf: Linfocitos; EC: Estrato compacto; EE: Estrato esponjoso; NS: P > 0,05.

Tabla II. Correlación entre las variables estudiadas en el grupo de yeguas cíclicas (n=36).

	EG	DG	LG	SG	Linf EC	Eos EC	Eos EE
P4	r = 0,54 P = 0,01	r = 0,59 P = 0,01	NS	NS	NS	NS	NS
EG		r = 0,85 P < 0,0001	r = 0,39 P = 0,03	NS	NS	NS	NS
DG			NS	NS	NS	NS	NS
LG				NS	NS	NS	NS
SG					NS	NS	NS
Linf EC						NS	NS
Eosin EC							NS

P4: Progesterona; EG: Epitelio glandular; DG: Diámetro glandular; LG: Lumen glandular; SG: Secreción glandular; Eos: Eosinófilos; Linf: Linfocitos; EC: Estrato compacto; EE: Estrato esponjoso; NS: P > 0,05.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio ha demostrado que la preñez temprana se asocia a cambios histomorfológicos en el endometrio y a una invasión inicial de células inflamatorias con una reducción posterior de dichas células con el avance de la gestación. A su vez mostró que la insulina sérica se modificó durante la preñez temprana, mientras que las demás hormonas medidas no sufrieron cambios en relación a las yeguas cíclicas.

Los registros histomorfológicos hallados en las yeguas cíclicas coinciden con lo reportado por otros autores (Kenney, 1978; Keenan et al. 1987). Al comparar los registros endometriales de las yeguas cíclicas con las preñadas observamos primeramente la ausencia de diferencias en el epitelio luminal. Dicha similitud observada entre los grupos coincide con lo publicado por Keenan et al. (1987), en cuyo trabajo no encontraron diferencias en la altura del epitelio luminal a partir del día 6 de gestación y diestro. Sin embargo, en un trabajo realizado con las mismas muestras de éste estudio, Mattos et al. (2015) observaron, mediante microscopía electrónica de barrido, una disminución en el número de células ciliadas en el epitelio luminal de las yeguas preñadas a partir de los 7 días de preñez en comparación con las yeguas en diestro, lo que nos sugiere que a pesar de no ver alteraciones en la altura del mismo es posible que el epitelio igualmente esté sufriendo modificaciones en consecuencia de la preñez.

La detección de diferencias en las medidas glandulares desde el primer día de muestreo nos indica a las últimas como parte fundamental en la adaptación endometrial durante la gestación. Esta idea se ve apoyada en que el ambiente uterino es crítico para el continuo soporte y desarrollo del concepto a partir del día 6 post ovulación (Ball, 1993) y que previo a la implantación, el concepto es soportado únicamente por las secreciones que se acumulan en el lumen uterino (Ashworth 1995), secreciones originadas en las glándulas endometriales. En nuestro trabajo se observó que la preñez se asoció a una dilatación del lumen glandular por la acumulación de secreción intraglandular a través de los días de muestreo, mientras que en las yeguas cíclicas no se observaron modificaciones en ninguna de las dos variables a través de los días. Dicho resultado coincidió con lo reportado por Keenan et al. (1991) quienes, mediante la observación por microscopía electrónica, encontraron una distensión del lumen glandular en consecuencia del acúmulo de secreciones en yeguas al día 12 de preñez, comparándolas con yeguas cíclicas en el mismo día del ciclo. La asociación entre el aumento del lumen y la secreción glandular se ve respaldada en nuestro estudio por la correlación positiva encontrada entre ambas variables en las yeguas preñadas.

Tanto el epitelio como el diámetro glandular decrecieron a través de los días de muestreo en ambos grupos. Los descensos en dichas medidas se asociaron a las concentraciones séricas de P4 tanto en las yeguas preñadas como en las cíclicas; considerando que las estructuras endometriales varían en relación a la concentración de las hormonas esteroideas (Gerstenber et al. 1999), se podría asumir que el efecto mencionado a nivel glandular estaría promovido por las concentraciones circulantes de P4 que decrecen hacia el último día del muestreo. A pesar del descenso de ambas variables en ambos grupos de estudio, en las yeguas preñadas se observó mayor altura del epitelio y del diámetro glandular a partir del día 7 comparándolo con las

yeguas cíclicas en el mismo día. Dichos cambios tempranos en la estructura endometrial estarían reflejando rápidas adaptaciones del endometrio a la preñez si se considera que el embrión equino ingresa al útero entre los 5 y 6 días pos ovulación (Weber et al. 1991), o por el contrario estarían sugiriendo la existencia de un efecto sistémico previo a la entrada del embrión al útero para que cuando éste ingrese se encuentre con un ambiente uterino propicio para su supervivencia. La disminución de ambas variables a través de los días tanto en yeguas preñadas como cíclicas fue reportado previamente (Keenan et al. 1987), sin embargo dichos autores no detectaron diferencias entre los grupos de estudio en los días de muestreo (días 6 a 9 y 12 a 14). Dado que el estudio mencionado presenta una ventana de extracción de las muestras relativamente amplia, no quedando claro los días exactos de extracción, creemos que nuestro trabajo refleja una situación más ajustada a la realidad.

El descenso en la altura del epitelio glandular en las yeguas preñadas se asoció al aumento en el lumen y la secreción glandular. Además del efecto de la P4 mencionado previamente, creemos en la posibilidad de que la presencia del embrión pudiera provocar el aumento de secreción glandular, y que ésta mediante un efecto físico, llevaría a la dilatación de las glándulas con la consecuente disminución del epitelio glandular.

El aumento de la P4 además se vio relacionado en las yeguas preñadas con un aumento en el número de eosinófilos. Dicha asociación se estaría generando en consecuencia de algún factor externo, como podría ser la presencia del embrión, dado que en las yeguas cíclicas se observó la misma concentración de P4 en ausencia del aumento de células inflamatorias. Respaldando lo sucedido en las yeguas cíclicas, Acuña y Fumoso (2013) reportaron una menor cantidad de células inmunes el día 7 pos ovulación, adjudicando un efecto inhibitorio de los mayores niveles de progesterona plasmática hallados ese día. El mayor número de células inflamatorias observadas en las yeguas preñadas en comparación con las cíclicas en el día 7 podría ser indicativo de una respuesta inmunitaria materna ante la presencia del embrión en el útero. Para ese día, el embrión descendió al útero de la trompa uterina y se está completando la formación de la cápsula con la consecuente reducción de la zona pelúcida (Betteridge et al. 1982) que volvería al embrión inmunológicamente activo, considerando que los embriones de mamíferos son inmunológicamente inertes hasta liberarse de la zona pelúcida (Hansen, 2011). Sin embargo, no podemos aseverar este hecho dado que no contamos con un muestreo previo al descenso del embrión al útero o previo a la formación de la cápsula.

Las células inflamatorias observadas en mayor número en el endometrio de las yeguas preñadas en el muestreo inicial fueron los eosinófilos y los linfocitos. Dicha observación fue previamente reportada por Keenan et al. (1987), donde los autores señalan que la presencia de linfocitos puede sugerir una respuesta inmunológica materna hacia el embrión durante el contacto inicial del mismo con el endometrio y que el aumento de eosinófilos puede estar dado para moderar esta respuesta. Posteriormente, a través de los días de muestreo se observa una reducción en el número de ambas células inflamatorias, lo que podría indicar una inmunomodulación en el tejido materno para evitar un posible rechazo ante la presencia de un elemento genéticamente ajeno a la madre. La reducción de células inflamatorias endometriales hacia el día 13 fue reportado previamente; Keenan et al. (1987) detectaron una disminución de dichas células a los 12 a 14 días, y posteriormente Watson et al.

(1993) reportaron que el número de linfocitos T no difiere entre yeguas preñadas y en diestro al día 14. Dicho hallazgo coincide con lo que sucede en otras especies como la cerda en la cual se constata una reducción en el número de linfocitos a partir del día 10 de gestación (King, 1988). El aumento de eosinófilos también coincide con lo hallado en la cerda preñada por Bischof et al. (1995) en la etapa de pre implantación. Además es posible que, como fue postulado en la cerda (Kaeoket et al. 2003), los eosinófilos puedan estar asociados a cambios dinámicos en la estructura y la función endometrial que estaría preparando el ambiente uterino para albergar al embrión.

La inexistencia de diferencias morfométricas y de las células inflamatorias en el endometrio al comparar el cuerno ipsi o contralateral a la ovulación nos lleva a plantearnos la posibilidad de que, dadas las características migratorias únicas del embrión equino (Ginther, 1984), el mismo estaría estimulando la totalidad de la extensión uterina por igual, provocando de ésta manera rápidas transformaciones a nivel endometrial; sin embargo, nuevamente, nos lleva a sospechar de la existencia de procesos sistémicos que estarían preparando al útero para recibir el embrión antes de su entrada.

En relación a los niveles hormonales hallados en las yeguas de este estudio, los niveles séricos de insulina arrojaron resultados novedosos que hasta el momento no se encontraron en ningún estudio previo. Se observaron menores concentraciones de insulina en las yeguas preñadas comparado con las cíclicas a partir del día 6 y 8 pos ovulación, momento que coincide con la blastulación, con el aumento pronunciado del consumo de glucosa por parte del embrión y con una cavidad blastocística en rápida expansión con altas demandas energéticas (Stout, 2009; Lewis et al. 2015). Dada la función facilitadora que ejerce la insulina en el desarrollo embrionario (Rambags et al. 2008a), la teoría de que la insulina materna afecta al embrión directamente aumentando el consumo de glucosa, aminoácidos y proteínas así como la síntesis de proteínas y ARN por el embrión (Lewis et al. 1992), y que posiblemente como sucede en el ratón, la insulina materna pudiera ser internalizada por el embrión pre implantación en el equino (Heyner et al. 1989), se podría pensar que la disminución en los niveles séricos de la insulina materna en las yeguas preñadas podrían ser resultado del consumo de la misma por parte del embrión. Las diferencias en las concentraciones séricas de insulina también podrían generarse en consecuencia del consumo embrionario de la glucosa materna que pudieran provocar el descenso en las concentraciones sistémicas de la hormona; o como una tercera posibilidad, que la insulina pudiera estar siendo utilizada a nivel de las células endometriales, y que como sucede en la rata (Rodrigues de Melo & Valeri, 1980), la hormona estaría estimulando la actividad celular en el endometrio.

Observando los valores séricos de las demás hormonas medidas en el presente trabajo, los perfiles y concentraciones séricas de P4 en ambos grupos de estudio están de acuerdo con lo reportado por otros autores (Allen, 2001; Nagy et al. 2004). En el caso del E2, los patrones de secreción coinciden con lo reportado por Teraqui y Palmer (1979) y por Daels et al. (1991), quienes no encontraron diferencias entre las yeguas preñadas y en diestro dentro de los días de muestreo del presente estudio, sin embargo difieren de lo publicado por Sato et al. (1977) y por Zavy et al. (1979) quienes reportaron valores más bajos en las yeguas preñadas durante el mismo período de estudio.

La falta de diferencias en las concentraciones séricas de IGF-1 entre las yeguas preñadas y cíclicas, sugiere la ausencia de un efecto de la preñez sobre la IGF-1 sistémica. Dicho hallazgo concuerda con lo encontrado por otros autores, Derar et al. (2005) concluyen que los niveles en sangre de IGF-1 durante la preñez temprana no reflejan la alta producción endometrial y embrionaria del factor en éste período. La secreción local ha sido reportada por varios autores, se conoce que tanto el embrión como el endometrio produce cantidades significativas de IGF-1 (Walters et al., 2001), que el péptido se secreta de manera autocrina-paracrina durante el estadio de preñez temprana (Herrler et al., 2000) y que se ha detectado IGF-1 en lavados uterinos de yeguas preñadas a los 12, 13, 14, 16 y 17 días de gestación (Walters et al., 2001; Salute y Tucker, 1992). Derar et al. (2005) resaltan la poca probabilidad de que la IGF-1 materna sistémica se involucre directamente en estimular el crecimiento temprano del concepto durante las primeras etapas de la preñez en la yegua. Paralelamente, a diferencia de lo reportado por Abo El-Maaty et al. (2013) quienes no encontraron diferencias en las concentraciones de IGF-1 entre los 7 y 14 días de la fase lútea, en nuestro trabajo se observó una caída leve en su concentración sérica desde la ovulación hasta el fin del muestreo.

Acerca de los resultados obtenidos de las adipoquinas medidas en suero, la leptina sérica concuerda con lo publicado por Abol El-Maaty et al. (2013), al no encontrar diferencias entre los días y grupos de muestreo. La adiponectina tampoco reveló diferencias entre los grupos, dado que la hormona circula bajo diferentes isoformas (Pajvani et al. 2004), existe la posibilidad que tal como postulan Kleiblova et al. (2006), la actividad biológica de la hormona esté modificada pero que no se observen cambios en su concentración total en suero. Sin embargo creemos más probable que dada la ausencia de diferencias entre las yeguas cíclicas y preñadas en las concentraciones séricas de ambas adipoquinas, y dada la abundancia de información en la bibliografía sobre el rol local de dichas hormonas sobre el endometrio y el embrión, la preñez temprana no estaría generando un efecto sistémico materno sobre su secreción, sino que sus roles serían locales al igual que la IGF-1.

En resumen, de los cambios observados creemos que la disminución de la P4 generó, en ambos grupos de yeguas, una disminución del epitelio glandular y que promovió una disminución del diámetro glandular a través de los días. La disminución en el epitelio glandular en las yeguas preñadas se asoció a su vez a un aumento del lumen y las secreciones glandulares, probablemente en consecuencia de la presencia de un factor externo, como puede ser la presencia del embrión, y por un efecto físico de distensión de la glándula por las secreciones. Por otro lado, el aumento de la P4 asociado a un factor externo (embrión), promovió en las yeguas preñadas el aumento de células inflamatorias, células que disminuyeron a través de los días probablemente en consecuencia de una inmunomodulación materna. Dado que los cambios endometriales se observaron a partir del primer día de muestreo, cuando el embrión ingresó al útero hace apenas horas, nos planteamos la interrogante de que si los cambios observados son producto de la presencia del embrión que está provocando rápidamente modificaciones en la estructura endometrial o si los cambios son producto de procesos sistémicos que preparan al útero para recibir al embrión previo a que éste abandone la trompa uterina e ingrese al útero. Paralelamente detectamos modificaciones en la concentración de la insulina sistémica que nos lleva a sospechar que la misma tiene un rol en la actividad celular embrionaria y/o endometrial.

De las hipótesis planteadas en el trabajo se confirmó la primera al constatar cambios histomorfométricos y en el número de células inflamatorias en el endometrio de las yeguas preñadas en comparación con las cíclicas. Por otro lado, la segunda y tercer hipótesis se confirmaron parcialmente dado que se observó una asociación de la preñez temprana con cambios en los niveles séricos de insulina pero no del resto de las hormonas, y que la correlación encontrada fue entre las variables morfométricas del endometrio y el número de células inflamatorias con las concentraciones séricas P4.

8. CONCLUSIONES

La preñez temprana se asocia a cambios en la estructura glandular. Sin embargo la altura del epitelio luminal no sufre modificaciones desde los 7 hasta los 13 días del ciclo estral y preñez.

Al día 7 existe mayor cantidad de eosinófilos y linfocitos en las yeguas preñadas que en las cíclicas, dichas células que se reducen en las yeguas preñadas para el día 13.

La insulina sérica disminuye en las yeguas preñadas en comparación con las cíclicas desde la ovulación hasta el día 13. En las restantes hormonas determinadas no se observaron diferencias asociadas a la preñez.

La P4 se correlaciona con cambios histomorfométricos en ambos grupos de yeguas y con cambios en las células inflamatorias en las yeguas preñadas. No existe correlación entre las demás hormonas medidas con cambios endometriales. Los cambios glandulares se ven interrelacionados.

9. CONSIDERACIONES FINALES

Hasta el momento no se habían encontrado referencias en los equinos sobre el hallazgo de los cambios en la concentración sérica de insulina durante la preñez temprana, sugiriendo una posible utilización de la insulina materna durante los primeros días de la preñez por parte del sistema embrión endometrio como sucede en otras especies (Rodrigues de Melo & Valeri, 1980; Heyner et al. 1989; Lewis et al. 1992). Por otro lado, ante la ausencia de diferencias entre las yeguas cíclicas y preñadas en las concentraciones séricas de IGF-1, leptina y adiponectina, además de coincidir con los escasos reportes encontrados en las yeguas en dicho período, nos lleva a asumir que la preñez carece de efectos sobre el nivel circulante de dichas hormonas a nivel sistémico, siendo posiblemente sus roles locales en el embrión y/o en el endometrio resultado de la secreción local de las mismas.

Los antecedentes encontrados hasta el momento de trabajos vinculados a cambios en la estructura glandular endometrial y en las células inflamatorias endometriales en equinos durante los primeros días de preñez son escasos y presentan aspectos cuestionables en los protocolos de extracción de muestras. En nuestro trabajo encontramos adaptaciones tempranas del endometrio a la preñez, con cambios a nivel

glandular desde el primer día de muestreo; a su vez confirma lo hallado por Keenan et al. (1987) relacionado al aumento de eosinófilos y linfocitos durante el primer día de muestreo y su reducción posterior, haciendo suponer una reacción inflamatoria inicial con una inmunomodulación posterior en consecuencia de la presencia del embrión. Sin embargo, dado que no contamos con muestreos previos al ingreso del embrión al útero no se puede aseverar.

Por lo tanto entendemos que la información generada aporta datos valiosos que pueden complementar futuros estudios sobre los cambios que ocurren durante los primeros días de la preñez en la yegua. A su vez nos lleva a plantearnos la interrogante de la existencia de cambios estructurales y de células inflamatorias, previo a la entrada del embrión al útero, lo que implicaría que el mismo estaría enviando señales desde la trompa uterina, y que mediante un proceso sistémico se estaría preparando el útero para su supervivencia.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdelnaby EA, Abo El-Maaty AM, Ragab RSA, Seida AA. (2015). Assessment of uterine vascular perfusion during the estrous cycle of mares in connection to circulating leptin, and nitric oxide concentrations. *JEVS* 39:25-32.
2. AboEl-Maaty AM, Shata FYH, Gabr FI, Mahmoud M B-E. (2013). Leptin, Insulin Like growth factor-I, Nitric oxide, thyroid and ovarian hormones in serum of early pregnant and cyclic Arab mares with or without clinical endometritis. *ISIJ* 2(4):1-25.
3. Acuña S, Fumuso E. (2013). Presencia y distribución de receptores esteroides y antígeno de proliferación celular en células del sistema inmune del endometrio equino. *InVet* 15(1):29-36.
4. Adesanya OO, Zhou J, Bondy CA. (1996). Sex steroid regulation of insulin-like growth factor system gene expression and proliferation in primate myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 81(5):1967-1974.
5. Albiñ A, Waelchli RO, Samper J, Oriol JG, Croy BA, Betteridge KJ. (2003). Production of capsular material by equine trophoblast transplanted into immunodeficient mice. *Reproduction* 125:855–863.
6. Albrecht ED, Babischkin JS, Lidor Y, Anderson LD, Udoff LC, Pepe GJ. (2003). Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. *Hum Reprod* 18(10):2039-2047.
7. Alexander SL, Irvine CHG. (1982). Radioimmunoassay and in-vitro bioassay of serum LH throughout the equine oestrous cycle. *J Reprod Fertil Suppl* 32: 253–260.
8. Alexenko AP, Leaman DW, Li J, Roberts RM. (1997). The antiproliferative and antiviral activities of IFN-s variants in human cells. *J Interferon Cytokine Res* 17:769–779.
9. Allen WR. (2000). The physiology of early pregnancy in the mare. In *Proc Am Assoc Equine Pract* 46:338-354.
10. Allen WR. (2001). Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction* 121(4):513-527.
11. Allen WR, Stewart F. (2001). Equine placentation. *Reproduction, Fertility and Development* 13(8):623-634.
12. Allen WR. (2005). Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. *Anim Reprod* 2(4): 209-223.
13. Angelidis G, Dafopoulos K, Messini C I, Valotassiou V, Tsikouras P, Vrachnis N, Messinis I E. (2012). The emerging roles of adiponectin in female reproductive system-associated disorders and pregnancy. *Reprod Sci* 00:1-10.
14. Ashworth CJ. (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livest Prod Sci* 44(2):99-105.

15. Aurich C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Anim Reprod Sci* 124: 220-228.
16. Aurich C, Budik S. (2015). Early pregnancy in the horse revisited—does exception prove the rule?. *J Anim Sci Biotechnol* 6:50.
17. Bacon SJ, Ellis SA, Antczak DF. (2002). Control of expression of major histocompatibility complex genes in horse trophoblast. *Biol Reprod* 66(6):1612-1620.
18. Bae SE, Watson ED. (2003). A light microscopic and ultrastructural study on the presence and location of oxytocin in the equine endometrium. *Theriogenology* 60(5):909-921.
19. Ball BA. (1988). Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes, and diagnostic considerations. *Vet Clin North Am Equine Pract* 4(2):263-290.
20. Ball BA. (1993). Embryonic death in mares. En: McKinnon AO, Voss JL. (1993) *Equine Reproduction*. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia, Cap. 61, pp.517-531.
21. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. (1996). Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137(7):3144-3147.
22. Bazer FW, Spencer TE, Ott TL. (1997). Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 37:412–420.
23. Beckelmann J, Budik S, Helmreich M, Palmc F, Walter I, Aurich C. (2013). Sex-dependent insulin like growth factor-1 expression in preattachment equine embryos. *Theriogenology* 79:193–199.
24. Berg SL, Ginther OJ. (1978). Effect of estrogens on uterine tone and lifespan of the corpus luteum in mares. *J Anim Sci* 47:203–208.
25. Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R. (1982). Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *J Anat* 135(1):191-209.
26. Bishof RJ, Brandon MR, Lee CS. (1995). Cellular response in the pig uterus during pregnancy. *J Reprod Immunol* 29:161–178.
27. Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Brinsko SP, Rigby SL. (2003). *Manual of equine reproduction*. Ed. Fathman EM. Mosby. 2^a ed. St. Louis.
28. Boerboom D, Brown KA, Vaillancourt D, Poitras P, Goff AK, Watanabe K, Sirois J. (2004). Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biol Reprod* 70(2):391-399.
29. Budak E, Fernández Sánchez M, Bellver J, Cerveró A, Simón C, Pellicer A. (2006). Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil Steril* 85(6):1563-1581.
30. Bhushan S, Palta P, Bansal N, Sharma V, Manik RS. (2005). Effect of insulin on the proliferation of and progesterone production by buffalo granulosa cells in vitro. *Vet Rec* 157:746–747.

31. Card C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology* 64(3):580-588.
32. Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pellicer A, Simon C. (2005). Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 10:217–223.
33. Chappaz E, Albornoz MS, Campos D, Che L, Palin MF, Murphy BD, Bordignon V. (2008). Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domest Anim Endocrinol* 35(2):198-207.
34. Clarke IJ, Horton RJ, Doughton BW. (1990). Investigation of the mechanism by which insulin-induced hypoglycemia decreases luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 127:1470–1476.
35. Consiglio AL, Dell'Aquila ME, Fiandanese N, Ambruosi B, Cho YS, Bosi G, Cremonesi F. (2009). Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. *Reprod Biol Endocrinol* 7(1):113.
36. Craig JA, Zhu H, Dyce PW, Wen L, Li J. (2005). Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 229:141-147.
37. Crossett B, Allen WR, Stewart F. (1996). A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. *Biochem J* 320:137-143.
38. Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C. (2006). Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev* 214:161–185.
39. Daels PF, Ammon DC, Stabenfeldt GH, Liu IKM, Hughes JP, Lasley BL. (1991). Urinary and plasma estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in nonpregnant and early pregnant mares. *Theriogenology* 35(5):1001-1017.
40. Dafopoulos K, Sourlas D, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE. (2009). Blood ghrelin, resistin, and adiponectin concentrations during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 92(4):1389-1394.
41. Deichsel K, Aurich J, Parvizi N, Bruckmaier RM, Aurich C. (2006). LH and IGF-1 release during oestrus and early luteal phase in lactating and non-lactating horse mares. *Anim Reprod Sci* 91:97-106.
42. Derar R, Haramaki S, Hoque S, Hashizume T, Osawa T, Taya K, Watanabe G, Miyake Y. (2005). Insulin-Like Growth Factor-I as a Follicular Growth Promoter during Early Pregnancy in Thoroughbred Mares. *J Vet Med Sci* 67(1):19-23.
43. Derar DR, Taya K, Watanabe G, Miyake YI. (2012). Characterization of immunoreactive IGF-1 pattern during the peri-ovulatory period of the oestrous cycle of thoroughbred mares and its relation to other hormones. *Reprod Domest Anim* 47(1):151-156.

44. Doig PA, Waelchli R. (1993). Endometrial biopsy. En: McKinnon AO, Voss JL. (1993) Equine Reproduction. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia, pp 225-233.
45. Dos Santos E, Serazin V, Morvan C, Torre A, Wainer R, de Mazancourt P, Dieudonné MN. (2012). Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertil Steril* 97(3):771-8.
46. Douglas RH, Ginther OJ. (1976). Concentration of prostaglandins F in uterine venous plasma of anesthetized mares during the estrous cycle and early pregnancy. *Prostaglandins* 11(2):251-260.
47. Duna Mansour G, Reis Ferreira A, Tavares Fernandes F, Henry M. (2004). Histomorphometry of epithelial structures of the mare's endometrium. *R bras Ci Vet* 11:44-48.
48. Engelhardt H, King GJ. (1995). Uterine natural killer cells in species with epitheliochorial placentation. *Natural immunity* 15(1):53-69.
49. Engelhardt H, Croy BA, King GJ. (1997). Role of immune cells in early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 52:115-131.
50. Engelhardt H, Croy BA, King GJ. (2002). Conceptus influences the distribution of uterine leukocytes during early porcine pregnancy. *Biol Reprod* 66:1875-1880.
51. Ferrari A, Sader M, Perez F, Lopez D, Recuero M. (2012). Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay. Informe del Instituto de Promoción de Inversiones y Exportaciones de Bienes y Servicios. Uruguay XXI. <http://www.uruguayxxi.gub.uy/es/el-sector-ecuestre-en-uruguay>.
52. Ferreira-Dias G, Claudino F, Carvalho H, Agrícola C, Alpoim-Moreira J, Robalo Silva J. (2005). Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status. *Dom Anim Endocrinol* 29:203-213.
53. Flood PF, Betteridge KJ, Irvine DS. (1978). Oestrogens and androgens in blastocoelic fluid and cultures of cells from equine conceptuses of 10-22 days gestation. *J Reprod Fertil Supplement* 27:413-420.
54. Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. (1991). Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology* 36(5):823-830.
55. Friedman JM, Halaas JL. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.
56. Galvão A, Tramontano A, Rebordão MR, Amaral A, Pinto Bravo P, Szóstek A, Skarzynski D, Mollo A, Ferreira-Dias G. (2014). Opposing Roles of Leptin and Ghrelin in the Equine Corpus Luteum Regulation: An In Vitro Study. *Mediat Inflamm* 2014:1-13.
57. Garcia MR, Amstalden M, Williams SW, Stanko RL, Morrison CD, Keisler DH, Williams GL. (2002). Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J Anim Sci* 80(8):2158-2167.

58. Gebhardt , 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.
59. Geisert RD, Zavy MT, Moffatt RJ, Blair RM, Yellin T. (1990). Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 40:293–305.
60. Gentry LR, Thompson DL Jr., Gentry GT Jr., Davis KA, Godke RA, Cartmill JA. (2002). The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *J Anim Sci* 80: 2659-2703.
61. Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F. (1999). Cell proliferation pattern in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. *J Reprod Fert.* 116: 167-175.
62. Gigli I, Russo A, Aguero A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Inv Vet* 8(1):183-204.
63. Ginther OJ, Garcia MC, Squires EL, Steffenhagen W P. (1972). Anatomy of vasculature of uterus and ovaries in the mare. *Am J Vet Res* 33(8):1561-1568.
64. Ginther OJ. (1979) Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects. Ed Equiservices. Cross Plaines, Wisconsin.
65. Ginther OJ, Pierson RA. (1984). Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology.* 21(3): 505-516.
66. Ginther OJ. (1984). Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mares. *Theriogenology* 21(4):633-644.
67. Ginther OJ. (1992). Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects. Ed. Equiservices 2^a ed. Wisconsin.
68. Ginther OJ, Hannan MA, Beg MA. (2011). Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF₂ α , progesterone, LH, and estradiol in mares. *Domest Anim Endocrinol* 41(4):174-184.
69. Ginther OJ. (2012). The end of the tour de force of the corpus luteum in mares. *Theriogenology* 77(6):1042-1049.
70. Goff AK, Pontbriand D, Sirois J. (1987). Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13, 14-dihydro prostaglandin F-2 alpha during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 35:253-260.
71. Goff AK, Leduc S, Poitras P, Vaillancourt D. (1993). Steroid synthesis by equine conceptuses between days 7 and 14 and endometrial steroid metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 10(3):229-236.
72. Gross LT, Le Blanc M. (1984). Seasonal variation of histomorphologic features of equine endometrium. *JAVMA* 184(11):1379-1382.
73. Hanada M, Maeda Y, Oikawa MA. (2012). Equine endometrial gland density and endometrial thickness vary among sampling sites in thoroughbred mares. *J Equine Sci* 23(3): 35-40.

74. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Gazit R. (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine* 12(9):1065-1074.
75. Hansen P J. (2011). The immunology of early pregnancy in farm animals. *Reprod Domest Anim.* 46(3):18-30.
76. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. (1997). Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol* 47:101-106.
77. 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.
78. Harvey MB, Kaye PL. (1988): Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. *Endocrinology* 122:1182–1184.
79. Hayes M, Quinn BA, Lillie B, Côté O, Bienzle D, Waelchli R, Betteridge KJ. (2012). Changes in various endometrial proteins during cloprostenol-induced failure of early pregnancy in mares. *Anim Reprod Sci* 9:723-41.
80. Heidler B, Parvizi N, Sauerwein H, Bruckmaier RM, Heintges U, Aurich JE. (2003). Effects of lactation on metabolic and reproductive hormones in Lipizzaner mares. *Dom Anim Endocrinol* 25:47-59.
81. Herrera C, Revora M, Vivani L, Miragaya MH, Losinno L, Quintans C, Pasqualini RS (2008). Effect of high glucose concentrations during in vitro culture of equine embryos. *Proc 7th international symposium on equine embryo transfer*, Cambridge, UK, P52-53.
82. Herrid M, Palanisamy SKA, Ciller UA, Fan R, Moens P, Smart NA, Mcfarlane JR. (2014). An updated view of leptin on implantation and pregnancy: a review. *Physiol Res* 63:543-557.
83. Herrler A, Krusche CA, Beier HM. (1998). Insulin and Insulin-like Growth Factor-I Promote Rabbit Blastocyst Development and Prevent Apoptosis. *Biol Reprod* 59(6):1302-1310.
84. Herrler A, Pell JM, Allen WR, Beier HM, Stewart F. (2000). Horse Conceptuses Secrete Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 3. *Biol Reprod* 62:1804-1811.
85. Heyner S, Rao LV, Jarett L, Smith RM. (1989). Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Dev Biol* 134:48-58.
86. Huff NK, Thompson Jr. DL, Gentry LR, Depew CG. (2008). Hyperleptinemia in mares: Prevalence in lactating mares and effect on rebreeding success. *JEVS* 28(10):579-586.
87. Hunt J, Miller L, Platt J. (1998). Hormonal Regulation of Uterine Macrophages. *Dev Immunol* 6:105-110.
88. Intan-Shameha A, Zuki A, Noordin M, Wahid H, Azmi I. (2011). The effects of oestrogen and progesterone on lymphocyte and plasma cell population in

- the oviduct and uterine mucosae during follicular and luteal phases in ewes. *Pertanika J Trop Agric Sci* 34:181-187.
89. Jeziorska M, Salamonsen LA, Wolley DE. (1995). Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod* 53:312–320.
 90. Kaeoket K, Persson E, Dalin AM. (2003). Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow endometrium. *Anim Reprod Sci* 75(1):55-71.
 91. Kainer RA. (2011). Internal reproductive anatomy. En: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011) *Equine Reproduction*. Ed. Wiley Blackwell 2^a ed. United Kindom, Cap.165, pp.1581-1597.
 92. Kastelic JP, Adams GP, Ginther OJ. (1987). Role of progesterone in mobility, fixation, orientation, and survival of the equine embryonic vesicle. *Theriogenology* 27(4):655-663.
 93. Kaye PL. (1997). Preimplantation growth factor physiology. *Rev Reprod* 2:121–127.
 94. Kearns CF, McKeever KH, Roegner V, Brady SM, Malinowski K. (2006). Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. *Vet J* 172(3):460-465.
 95. Keenan LR, Forde D, McGeady T, Wade J, Roche JF. (1987). Endometrial histology of early pregnant and non-pregnant mares. *J Reprod Fert Suppl* 35:499-504.
 96. Keenan LR, Forde D, McGeady T, Quinn PJ, Roche F. (1991). Ultrastructure of the endometrium of mares in anoestrus, oestrus, diestrus and early pregnancy. *J Reprod Fert Suppl* 44:695-696.
 97. Kenney RM (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy with a note on early embryonic death. *JAVMA* 172(3):241-262.
 98. Kenney RM, Doig PA. (1986). Equine endometrial biopsy. En: Morrow DA. (1986) *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Reproductive Diseases in Small and Large Animals*. Ed. Saunders 2^a ed. Philadelphia, Cap.8, pp.723-729.
 99. Kiezun M, Maleszka A, Smolinska N, Nitkiewicz A, Kaminski T. (2013). Expression of adiponectin receptors 1 (AdipoR1) and 2 (AdipoR2) in the porcine pituitary during the oestrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 5:11-18.
 100. Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE. (1981). Progesterone, prostaglandin F-2 alpha, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. *J Reprod Fert Suppl* 32:353-359.
 101. King GJ. (1988). Reduction in uterine intra-epithelial lymphocytes during early gestation in pigs. *J Reprod Immunol* 14(1):41-46.
 102. Kleiblova P, Springer D, Haluzik M. (2006). The influence of hormonal changes during menstrual cycle on serum adiponectin concentrations in healthy women. *Physiol Res* 55(6):661-666.

103. Klein C, Troedsson MHT. (2011). Maternal recognition of pregnancy in the horse: a mystery still to be solved. *Reprod Fertil Dev* 23(8):952-963.
104. Klein C. (2016a). Early pregnancy in the mare: old concepts revisited. *Domest Anim Endocrinol* In Press.
105. Klein C. (2016b). Maternal Recognition of Pregnancy in the Context of Equine Embryo Transfer. *JEVS* In press.
106. Lane M, O'Donovan MK, Squires GE, Seidel Jr. GE, Gardner DK. (2001). Assessment of metabolism of equine morulae and blastocyst. *Mol Reprod Dev* 59:33-37.
107. Leishman D, Miller RB, Doig PA. (1982). A quantitative study of the histological morphology of the endometrium of normal and barren mares. *Can J Comp Med* 46:17-20.
108. Lewis AM, Kaye PL, Lising R, Cameron RD. (1992). Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin in vitro. *Reprod Fertil Dev* 4:119-123.
109. Lewis N, Sturmev RG. (2015). Embryo metabolism: what does it really mean?. *Anim Reprod* 12(3):521-528.
110. Losordo DW, Isner JM. (2001). Estrogen and angiogenesis a review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(1):6-12.
111. Love C. (2011). Endometrial Biopsy. En: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011) *Equine Reproduction*. Ed. Wiley Blackwell 2^a ed. United Kindom, Cap. 205, pp.1929-1939.
112. Low BG, Hansen PJ. (1988). Actions of steroids and prostaglandins secreted by the placenta and uterus of the cow and ewe on lymphocyte proliferation in vitro. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18:71-75.
113. Maillard V, Uzbekova S, Guignot F, Perreau C, Ramé C, Coyral-Castel S, Dupont J. (2010). Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reprod Biol Endocrinol* 8:23.
114. Malschitzky E, Schilela A, Meirelles LS, Mattos AG, Gregory RM, Mattos RC. (2001). Artificial Photoperiod in Pregnant Mares and its Effect on Pregnancy Length and Postpartum Reproductive Performance. *Pferdeheilkunde* 17:565-569.
115. Manaster I, Mizrahi S, Goldman-Wohl D, Sela HY, Stern-Ginossar N, Lankry D, Yagel S. (2008). Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* 181(3):1869-1876.
116. Mann GE, Lamming GE. (1999). The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Domest Anim* 34:269-274.
117. Mattos RC, Fiala-Rechsteiner SM, Martinez MN, Camozzato GC, de Souza AM, Winter GHZ. (2015). O endométrio no transporte espermático e durante a gestação precoce. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 39(1):111-116.
118. McCue PM, Scoggin CF, Lindholm ARG. (2011). Estrus. En: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011) *Equine Reproduction*. Ed. Wiley Blackwell 2^a ed. United Kindom, Cap. 179, pp.1716-1727.

119. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79(2):263-323.
120. McDowell KJ, Sharp DC, Grubaugh W, Thatcher WW, Wilcox CJ. (1988). Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol Reprod* 39(2):340-348.
121. McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011) *Equine Reproduction*. Ed. Wiley Blackwell 2^a ed. United Kindom.
122. McMeen LS (2002). Follicular growth and development and gonadotropin response of mares treated with dihydrotestosterone and estradiol benzoate. Tesis de Maestría, Faculty of the Louisiana State University, Louisiana, USA.
123. McRae AC. (1988). The blood–uterine lumen barrier and exchange between extracellular fluids. *J Reprod Fertil* 82(2):857-873.
124. Merkl M, Ulbrich SE, Otzdorff C, Herbach N, Wanke R, Wolf E, Bauersachs S. (2010). Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. *Biol Reprod* 83(5):874-886.
125. Michalakis KG, Segars JH. (2010). The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertil Steril* 94(6):1949-57.
126. Modi DN, Bhartiya P. (2015). Physiology of embryo-endometrial cross talk. *Biomed Res J* 2:83-104.
127. Murphy LJ, Ghahary A. (1990). Uterine Insulin-Like Growth Factor-1: Regulation of Expression and Its Role in Estrogen-Induced Uterine Proliferation. *Endocr Rev* 11(3):443-453.
128. Nagy P, Huszenicza G, Reiczigel J, Juhász J, Kulcsár M, Abaváry K, Guillaume D. (2004). Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. *Theriogenology* 61(2):203-214.
129. Noronha LE, Antczak DF. (2010). Maternal immune responses to trophoblast: the contribution of the horse to pregnancy immunology. *Am J Reprod Immunol* 64(4):231-244.
130. Oriol JG, Sharom FJ, Betteridge KJ. (1993). Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. *J Reprod Fertil* 99(2):653-664.
131. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE. (2004). Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279(13):12152-12162.
132. Pearson, L. (2015). Adiponectin in equine reproduction. Disertación académica: 2, Noviembre, Veterinary Clinical Sciences, Washington State University, EEUU.
133. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Maymó J, Dueñas JL, Varone C, Sánchez-Margalet V. (2015). Role of leptin in female reproduction. *Clin Chem Lab Med* 53(1):15–28.

134. Pollard JW, Jahan M, Butterworth PJ. (1990). Characterization and expression of uterine and placental alkaline phosphatases in the mouse. *J Reprod Fertil* 89(2):735-742.
135. Rambags BPB, van Rossem AW, Block EE, Graaf-Roelfsema E, Kindahl H, Van der KolK JH, Stour TAE. (2008a) Effects of exogenous insulin on luteolysis and reproductive cyclicity in the mare. *Reprod Dom Anim* 43:422-428.
136. Rambags BPB, van Tol HTA, Van den Eng MM, Colenbrander B, Stout TAE. (2008b). Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. *Theriogenology* 69:366-375.
137. Reilas T (2001). Uterine luminal environment of the mare. *Disertación académica: 23, Noviembre, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Helsinki, Finlandia.*
138. Ricketts SW. (1975). The technique and clinical application of endometrial biopsy in the mare. *Equine Vet J* 7(2):102-108.
139. Rodrigues de Melo V, Valeri V. (1980). Morphological evidence for the stimulatory effect of insulin on vaginal and endometrial cells of rats. *Cells Tissues Organs* 106(3):378-386.
140. Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, Castaño JP, Malagon MM. (2006). Regulation of Pituitary Cell Function by Adiponectin. *Endocrinology* 148(1):401–410.
141. Ruiz Arboleda JL, Uribe-Velásquez LF, Osorio JH. (2011). Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. *Vet Zootec* 5(2):68-81.
142. Rutanen EM, Pekonen F, Makinen T. (1988). Soluble 34K binding protein inhibits the binding of insulin-like growth factor 1 to its cell receptor in human secretory phase endometrium: evidence for autocrine-paracrine regulation of growth factor action. *J Clin Endocrinol Metab* 66:173-180.
143. Salute ME, Tucker KE. (1992). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in yolk sac fluid, uterine flush and conceptus conditioned media during early pregnancy in mares. *Biol Reprod* 46(1): 68 (Abstract).
144. Samper JC. (2009) *Equine breeding management and artificial insemination.* Ed. Saunders 2^a ed. St. Louis, Missouri.
145. Samuel CA, Ricketts SW, Rossdale PD, Steven DH, Thurley KW. (1979). Scanning electron microscope of endometrium of cyclic mare. *J Reprod Fert Suppl* 27:287-292.
146. Samuelsson B, Granström E, Green K, Hamberg M, Hammarström S. (1975). Prostaglandins. *Annu Rev Biochem* 44:669 –95.
147. Sato K, Miyake M, Yoshikawa T, Kambegawa A. (1977). Studies on serum oestrogen and progesterone levels during the oestrous cycle and early pregnancy in mares. *Equine Vet J* 9(2):57-60.
148. Short RV. (1969). Implantation and the maternal recognition of pregnancy. En: Wolstenholme GEW, O'Connor M. (1969) *Foetal Autonomy.* Ed. J A Churchill. London, Churchill, pp.2–26

149. Simmen RC, Green ML, Simmen FA. (1995). IGF system in periimplantation uterus and embryonic development. En: Dey SK (1995) *Molecular and Cellular Aspects of Periimplantation Processes*. Ed Springer Verlag. New York, Cap 12, pp.185-204
150. Squires EL, Ginther OJ. (1975) Follicular and luteal development in pregnant mares. *J Reprod Fertil Suppl* 23:429–33.
151. Starbuck GR, Stout TAE, Lamming GE, Allen WR, Flint APF. (1998). Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Fertil* 113(2):173-179.
152. Stevenson KR, Parkinson TJ, Wathes DC. (1991). Measurement of oxytocin concentrations in plasma and ovarian extracts during the oestrous cycle of mares. *J Reprod Fertil* 93(2):437-441.
153. Stewart F, Charleston B, Crossett B, Barker PJ, Allen WR. (1995). A novel protein that associates with the embryonic capsule in equids. *J Reprod Fertil* 105:65 – 70.
154. Stout TAE (1997). Maternal recognition of pregnancy in the mare. Tesis doctoral, Departamento de Medicina Veterinaria Clinica, Universidad de Cambridge, Cambridge, Reino Unido.
155. Stout TA, Allen WR. (2001). Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Reproduction* 121(5):771-775.
156. Stout TA, Allen WR. (2002). Prostaglandin E2 and F2a production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction* 123:261–268.
157. Stout TAE, Rambags BPB, Van Tol HTA, Colenbrander B. (2004). Low molecular weight proteins secreted by the early equine conceptus. *Havemeyer Found Monogr Ser* 16:50–52.
158. Stout TAE, Meadows S, Allen WR. (2005). Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. *Anim Reprod Sci* 87(3):269-281.
159. Takemura Y, Osuga Y, Harada M, Hirata T, Koga K, Morimoto C, Taketani Y. (2005). Serum adiponectin concentrations are decreased in women with endometriosis. *Hum Reprod* 20(12):3510-3513.
160. Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Yano T. (2006). Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology* 147(7):3203-3210.
161. Terqui M, Palmer E. (1979). Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 27:441-446.
162. Tetzke TA, Ismail S, Mikuckis G, Evans JW. (1986). Patterns of oxytocin secretion during the oestrous cycle of the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 35:245-252.
163. Thiessen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15:80-101.

164. Tremoleda JL, Stout TA, Lagutina I, Lazzari G, Bevers MM, Colenbrander B, Galli C. (2003). Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol Reprod* 69:1895–1906.
165. Troedsson MHT, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci* 68(3):273-278.
166. Vanderwall DK, Woods GL, Weber JA, Lichtenwalner AB. (1994). Corpus luteal function in non-pregnant mares following intrauterine administration of prostaglandin E2 or estradiol-17b. *Theriogenology* 42:1069–1083.
167. Vanderwall DK, Silvia WJ, Fitzgerald BP. (1998). Concentrations of oxytocin in the intercavernous sinus of mares during luteolysis: temporal relationship with concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α . *J Reprod Fertil* 112(2):337-346.
168. Vanderwall DK. (2008). Early Embryonic Loss in the Mare. *JEVS* 28(11):691-702.
169. Vanderwall DK. (2011). Progesterone. En: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011) *Equine Reproduction*. Ed. Wiley Blackwell 2^a ed. United Kindom, Cap. 170, pp.1637-1641.
170. Vernon MW, Zavy MT, Asquith RL, Sharp DC. (1981) Prostaglandin F2 α in the equine endometrium: steroid modulation and production capacities during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 25:581–589.
171. Walters KW, Roser JF, Anderson GB. (2001). Maternal–conceptus signalling during early pregnancy in mares: oestrogen and insulin-like growth factor I. *Reproduction* 121:331–338.
172. Watson E, Stokes C, Bourne F. (1987) Influence of administration of ovarian steroids on the function of neutrophils isolated from the blood and uterus of ovariectomized mares. *J Endocrinol* 112:443-448.
173. Watson ED, Sertich PL. (1989). Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. *J Reprod Fertil* 87(1):331-336.
174. Watson ED, Dixon CE. (1993). An immunohistological study of MHC class II expression and T lymphocytes in the endometrium of the mare. *Equine Vet J* 25(2):120-124.
175. Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. (1991). Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biol Reprod* 45(4):540-543.
176. Wilsher S, Kolling M, Allen WR. (2006). The effects of estrogen during early pregnancy in the mare on serum progesterone and IGF-1 levels and embryonic growth. *Anim Reprod Sci* 94:381-382.
177. Wilsher S, Allen WR. (2011). Intrauterine administration of plant oils inhibits luteolysis in the mare. *Equine Vet J* 43(1):99-105.

178. Wira C, Fahey J, Ghosh M, Patel M.K, Hickey D, Ochiel D. (2010). Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: The role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am J Reprod Immunol* 63:544-565.
179. Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ. (2003). Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52:1355–1363.
180. Zavy MT, Mayer R, Vernon MW, Bazer FW, Sharp DC. (1979). An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *J Reprod Fert* 27:403–411.