

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**RECEPTORES DE PROGESTERONA EN TEJIDO ENDOMETRIAL Y EN  
CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE INNATO DEL ENDOMETRIO DE YEGUAS  
SANAS Y RESISTENTES A ENDOMETRITIS**

**POR**

**Manuela CILINTANO ATRIO**

**TESIS DE GRADO presentada como uno  
de los requisitos para obtener el título  
Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Medicina Veterinaria**

**MODALDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL**

**MONTEVIDEO**

**URUGUAY**

**2012**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:

-----

Dra. Ana Meikle

Segundo miembro (tutor):

-----

Br. Sebastián Acuña

Tercer miembro:

-----

Dr. Danilo Fila

Fecha:

-----

Autor:

-----

Br. Manuela Cilintano Atrio

## **AGRADECIMIENTOS**

Este estudio fue parcialmente financiado por la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEC-Uruguay).

A mi tutor Sebastián Acuña, Asistente del Área de Bioquímica, del Departamento de Biología Molecular y Celular, de la Facultad de Veterinaria por permitirme realizar mi tesis en ésta temática, dirigir mi trabajo y abrirme las puertas al área de investigación.

A la Prof. Dra Elida Fumuso del Departamento de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil-Argentina por la cooperación científica establecida con nuestra casa de estudios. Sin ésta, el presente trabajo no se hubiera podido realizar. Por la crítica y corrección del manuscrito de la tesis. Por su apoyo en la orientación bibliográfica y en particular por la participación en el entrenamiento en la identificación de las células inmunes.

A los funcionarios docentes y no docentes del Área de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria. Muy especialmente a la Dra. Inés Sacchi y Br. Gonzalo D'Anatro que siempre de manera generosa y desinteresada me apoyaron y apoyan. Agradezco también al Preparador del Área Rafael Sauto, por las fotografías tomadas para la evaluación de las células inmunes y por su buena disposición al momento de realizar los ensayos de inmunohistoquímica.

A los Br. María José Nuñez y Br. Sebastián Peralta quienes participaron como evaluadores pares de las biopsias, por formar parte de la discusión de la información generada siendo así actores fundamentales en la generación del trabajo que se presenta.

A mi familia y amigos, quienes brindaron su apoyo en todo momento y sin ellos realmente esto no hubiese sido posible. En particular a Cecilia Vázquez por el apoyo en la escritura y elaboración del presente trabajo.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>3</b>
<b>LISTA DE TABLAS, IMÁGENES Y FIGURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>2. SUMMARY.....</b>	<b>8</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Relevancia del tema.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Aspectos reproductivos de la yegua.....</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Endometrio equino y mecanismo de acción de las hormonas esteroideas sexuales.....</b>	<b>10</b>
<b>3.4 Vínculo inmuno-endócrino-reproductivo de la hembra.....</b>	<b>13</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1 Objetivos generales.....</b>	<b>16</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>6.1 Animales y manejo.....</b>	<b>16</b>
<b>6.2 Biopsias endometriales.....</b>	<b>17</b>
<b>6.3 Determinación de los niveles de progesterona plasmática.....</b>	<b>17</b>
<b>6.4 Determinación de los receptores de progesterona (RP).....</b>	<b>17</b>
<b>6.5 Análisis de imagen.....</b>	<b>18</b>
<b><u>6.5.1 Evaluación de RP en el tejido endometrial.....</u></b>	<b>18</b>
<b><u>6.5.2 Evaluación de RP en células del sistema inmune del endometrio.....</u></b>	<b>19</b>
<b>6.6 Análisis estadísticos.....</b>	<b>19</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>7.1 Niveles de progesterona plasmáticos.....</b>	<b>20</b>
<b>7.2 Receptores de progesterona.....</b>	<b>20</b>

<b><u>7.2.1 Observaciones generales</u></b> .....	<b>20</b>
<b><u>7.2.2 Inmunomarcado a RP en el tejido endometrial</u></b> .....	<b>22</b>
<b><u>7.2.3 Distribución endometrial de PMN, L y M, positivos y negativos a RP</u></b> .....	<b>24</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>8.1 Distribución de RP en el tejido endometrial</b> .....	<b>28</b>
<b>8.2 Distribución endometrial de PMN, L&amp;M, positivos y negativos a RP</b> .....	<b>31</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>33</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>34</b>

## **LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E IMÁGENES**

<b>Figura 1:</b> Principales eventos endócrinos ocurridos durante el ciclo estral de las yeguas (Tomado de Aurich et al,2011).....	10
<b>Figura 2:</b> Representación esquemática del mecanismo de acción de las hormonas esteroideas en las células blanco.....	12
<b>Figura 3:</b> Vínculo inmuno-endocrino entre ovario y útero planteado para humanas. Tomado de Lea et al., 2007.....	14
<b>Figura 4:</b> Posibles mecanismos de acción de estrógenos y progesterona sobre la proliferación del epitelio endometrial.....	30
<b>Gráfico 1:</b> Concentraciones plasmáticas de progesterona en yeguas resistentes a endometritis ciclando.....	20
<b>Gráfico 2:</b> Intensidad de tinción a RP en las localizaciones tisulares superficiales del endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.....	23
<b>Gráfico 3:</b> Intensidad de tinción a RP en las localizaciones tisulares profundas del endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.....	24
<b>Gráfico 4:</b> Porcentaje L&M positivos y negativos a RP, presentes en las diferentes localizaciones tisulares del endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.....	26
<b>Gráfico 5:</b> Porcentaje PMN positivos y negativos a RP, presentes en las diferentes localizaciones tisulares del endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.....	27
<b>Imagen 1:</b> Inmunolocalización de RP en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.....	21
<b>Imagen 2:</b> Distribución de células inmunes positivas y negativas a RP en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.....	22

## **1. RESUMEN**

Los objetivos de éste trabajo fueron caracterizar la presencia, contenido y distribución de receptores de progesterona (RP) en tejido endometrial y evaluar la presencia y distribución de RP en células del sistema inmune del endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis durante el ciclo estral. Se tomaron biopsias endometriales y muestras de sangre de siete yeguas al momento de detectado el estro (Es), en diestro: a las 24 horas post ovulación (D24hPOv) y al día 7 de la misma (D7POv). Las concentraciones de progesterona plasmática fueron determinadas por radioinmunoanálisis. La presencia de RP fue estudiada por inmunohistoquímica en epitelio luminal (EL) y glandular (EG); estrato compacto (EC) y células del tejido conjuntivo interglandular (CiG). Se evaluó la presencia de RP en leucocitos polimorfos nucleares (PMN) y mononucleares: linfocitos (L) y macrófagos (M) del endometrio en EL, EC y estrato esponjoso (EE, en conjunto: EG +CiG). El análisis estadístico de las variables se realizó a través de un modelo mixto de ANOVA (Proc MIXED del SAS 9.2, SAS institute Inc.). La concentración de progesterona plasmática, fue mayor al D7POv en relación a los días Es y D24hPOv y similar entre Es y D24hPOv. El inmunomarcado a RP a los días Es y D24hPOv, fue mayor en EG y CiG, intermedio en EC y menor en EL. Al día D7POv, no se encontraron diferencias en el inmunomarcado a RP entre las diferentes localizaciones tisulares. El inmunomarcado a RP en EL, EG y CiG fue menor día D7POv que a los días Es y D24hPOv. La cantidad de PMN inmunomarcados a RP, fue mayor que la de L y M en los tres momentos del ciclo. El contenido de PMN, L y M inmunomarcados a RP, no presentó cambios en las diferentes localizaciones tisulares ni en su cantidad promedio en ninguno de los tres momentos del ciclo estral.

Las mayores concentraciones de progesterona plasmática al día 7 de la pudieron ejercer un efecto inhibitorio sobre la intensidad de tinción a RP en el tejido epitelial y células del tejido conjuntivo interglandular. La presencia de RP en linfocitos, macrófagos y polimorfos nucleares del endometrio, sugiere que la progesterona podría modular la respuesta inmune en el endometrio vía RP. Estos resultados aportan información en relación al vínculo inmuno-endócrino-celular del endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis ciclando.

## **2. SUMMARY**

Was investigated the distribution of endometrial progesterone receptor (RP) and presence of PR in immune cells in cyclic mares. Endometrial biopsies and blood samples were collected from seven mares resistant to endometritis at the beginning of oestrus (Es), 24 hours post ovulation (D24hPOv) and seven days post ovulation (D7POv). The immunohistochemical technique was used to visualize endometrial RP immunostaining in luminal and glandular epithelium (LE and GE), compact stratum (SC) and interglandular stroma (IS). The presence of RP in nuclear polymorphous (PMN), mononuclear leukocytes: lymphocytes (L) and macrophages (M), were evaluated in LE, SC and stratum spongiosum. Progesterone (P) concentration was determined by radioimmunoassay using directed solid phase. Analysis of variance for repeated measurements was used. Progesterone concentrations were highest at seven days post ovulation. On days ES and D24hPOv, the PR immunostaining, was higher in GE and IS, intermediate in SC and lower in the LE. On day D7POv, no difference was found. The PR endometrial immunostaining in LE, GE and IS, was high on ES and D24hPOv than D7POv. The number of PMN positive to RP was higher than the L and M in all moments. The numbers of PMN, L and M positives to RP were similar between endometrial locations in all moments.

The high P concentration at seven days post ovulation, down-regulated the expression of PR. The presence of PR in endometrium immune cells suggests that the progesterone may modulate the immune response in the endometrium through RP. The results provide information regarding characterization of endometrial molecular immuno-endocrinology and reproductive physiology of the mares healthy and resistant to endometritis

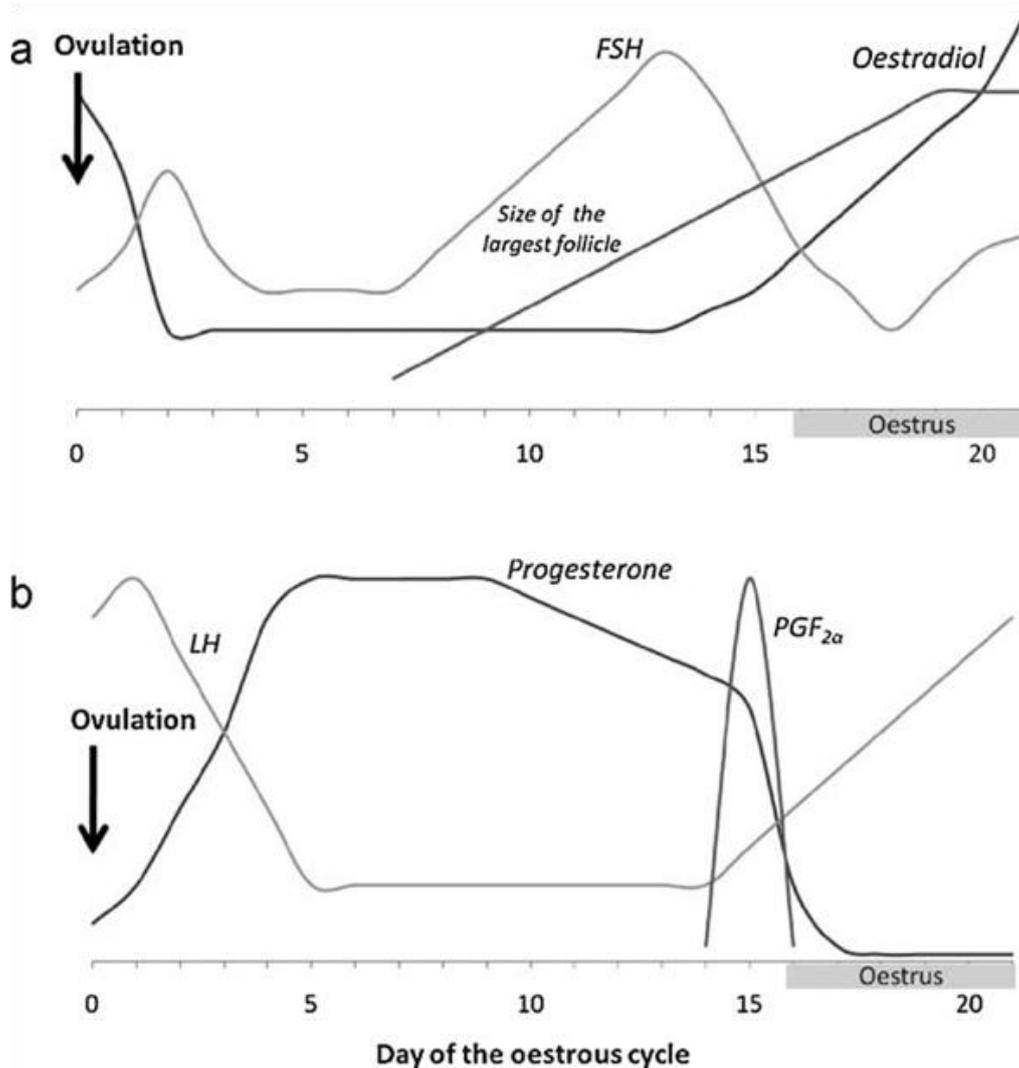
### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 RELEVANCIA DEL TEMA**

La selección para la cría de equinos ha priorizado obtener máximos rendimientos en batallas, salto, carrera, fuerza y otras habilidades deportivas, pero no por aspectos vinculados a la producción-reproducción. Por tales motivos, la yegua se caracteriza por una baja eficiencia reproductiva comparándola con hembras de otras especies domésticas (Sharma et al., 2010). Otras desventajas reproductivas comparativas, son un período de gestación de 11 meses, un 20-30 % de abortos debido a gestaciones gemelares (Neely, 1991) y la susceptibilidad a la endometritis post-coital causante de importantes pérdidas reproductivas y por tanto económicas (Coutinho da Silva, 2008).

#### **3.2 ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LA YEGUA**

Desde el punto de vista reproductivo la yegua es poliéstrica estacional con actividad ovulatoria relacionada a los días largos. El ciclo estral dura en promedio 22 días, con 5-7 días de estro o celo (Aurich, 2011). El estro corresponde a la fase folicular caracterizada por receptividad a la monta, relajación del cervix, presencia de un folículo ovárico dominante y edema endometrial (Neely, 1991, Samper, 2008). Los folículos ováricos producen principalmente estrógenos. Al inicio de la fase folicular, el folículo dominante tiene un diámetro de 2-10 mm y crece hasta llegar aproximadamente a 35-60 mm, dependiendo de la raza, previo a la ovulación. Acompañando el crecimiento del folículo dominante, se incrementan las concentraciones plasmáticas de estrógenos (Neely, 1991, Aurich, 2011). La ovulación ocurre entre 24-48 horas antes que finalice la fase folicular. Luego de la ovulación, en la cavidad del folículo colapsado, se forma el cuerpo lúteo, órgano fundamentalmente productor de progesterona. La formación del cuerpo lúteo, marca el inicio de la fase luteal, que comienza con niveles plasmáticos de progesterona basales de 2,5 ng/mL aproximadamente, entre los días 2-3 post-ovulación, alcanzando picos máximos de 11 ng/mL aproximadamente, a los días 6-7 de la misma; días clave en la yegua preñada por ser el momento en que el embrión arriba al útero (Townson et al., 1989, Neely, 1991). Los niveles plasmáticos de progesterona se mantienen relativamente constantes hasta el día 15 de la ovulación, momento en que ocurre la luteólisis, en caso que la yegua no resulte preñada o momento de reconocimiento materno de la preñez en caso de que la yegua resulte preñada (Neely 1991, Aurich, 2011). En la Figura 1, se representan los eventos endócrinos más relevantes del ciclo estral de la yegua.

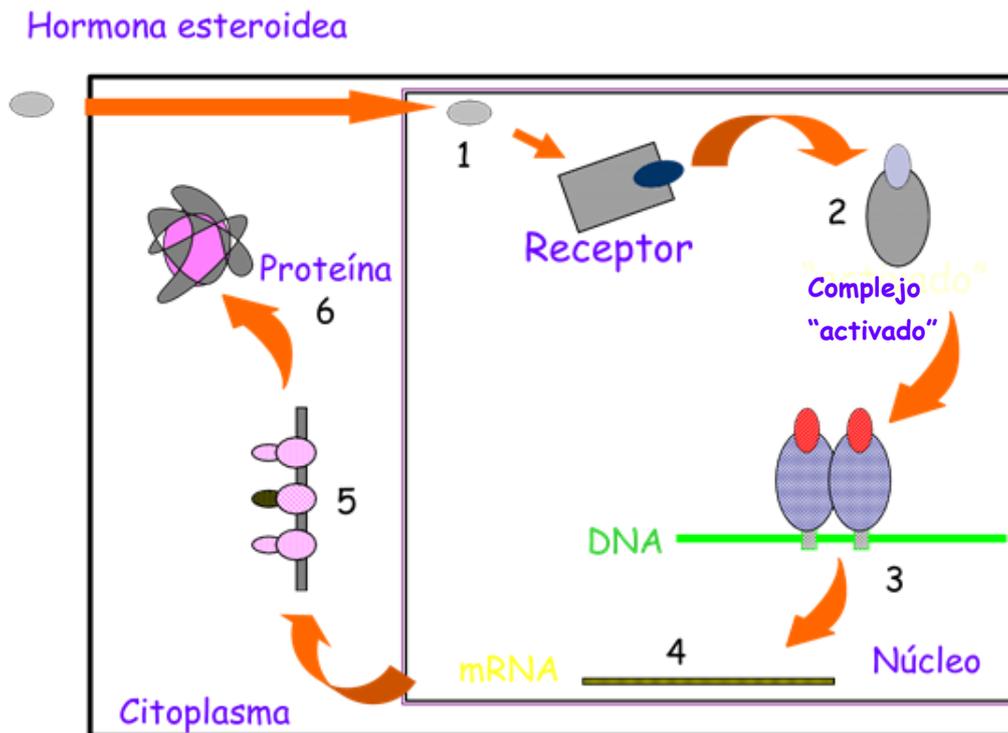


**Figura 1:** Panel (a), concentraciones plasmáticas de FSH y estradiol en asociación con el tamaño del folículo dominante. Panel (b), concentraciones plasmáticas de LH, progesterona y prostaglandina F2 alfa durante el ciclo estral de las yeguas (Tomado de Aurich, 2011).

### 3.3 ENDOMETRIO EQUINO Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SEXUALES

En el endometrio de la yegua, normalmente ocurren cambios histológicos en sincronía con la actividad de eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Kenney, 1978, McDonlad, 1978, Aurich, 2011). El tejido endometrial de la yegua está formado por epitelio luminal superficial, una lámina propia compuesta por tejido conjuntivo, que a su vez se subdivide en tejido conjuntivo denso (estrato compacto, subyacente al epitelio luminal) y tejido conjuntivo menos denso que junto con el epitelio glandular se denomina estrato esponjoso (Van Camp, 1988). Tanto estrógenos como progesterona, están implicadas en la remodelación de éstos tejidos durante el ciclo estral y en la preñez temprana y son fundamentales en el comportamiento y fisiología reproductiva de la yegua (Ginther, 1992, Graham & Clarke, 1997).

En el útero, la progesterona participa en el control de la proliferación y diferenciación celular y tisular, implantación, crecimiento uterino y mantenimiento de la preñez (Rajam & Briskin, 2012, Spencer & Bazer 2004). La progesterona inhibe la contractibilidad del miometrio durante la fase luteal y preñez (Graham & Clarke, 1997). El control de la acción combinada de estrógenos y progesterona en la función uterina, es mediado a través de proteínas receptoras específicas: receptores de estrógenos (RE) y receptores de progesterona (RP). Ambos receptores provienen de la superfamilia de ligandos inducibles por factores de transcripción y comparten características en cuanto a su estructura (Tsai & O'Malley, 1994, Graham & Clarke, 1997). La capacidad de respuesta de los tejidos blanco a la acción de estrógenos y progesterona depende de la concentración plasmática de éstas hormonas, de la presencia, distribución y cantidad ambos receptores presentes en el tejido (Clark et al., 1992). Para RE, se han identificado dos tipos: RE $\alpha$  y RE $\beta$ , codificados por diferentes genes (Kuiper et al., 1997). El tipo  $\alpha$  es el dominante en el útero de hembras adultas y es el principal mediador de los efectos estrogénicos como la estimulación y proliferación tisular, así como en la inducción de la expresión de RP (Ing & Tsai, 1993). Para RP han sido identificadas las isoformas A y B que se expresan a partir de un mismo gen (Ing & Tsai., 1993, Graham & Clarke, 1997). Las proteínas receptoras mencionadas tienen sitios específicos de unión a las hormonas y de unión al ADN nuclear, actuando como factores de transcripción (Tsai & O'Malley, 1994). En ausencia de sus ligandos, los receptores a hormonas esteroideas se encuentran en el núcleo y debido a la naturaleza lipídica de las hormonas esteroideas, éstas atraviesan las membranas celulares encontrando a su propio receptor en el núcleo celular. La unión de la hormona con su receptor provoca la transcripción de genes específicos, que en un proceso de traducción posterior se traduce a una señal específica que se describe como acción genómica (Flint et al., 2002). En la Figura 2, se esquematiza en forma muy simplificada, el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas.



**Figura 2:** La hormona esteroidea atraviesa la membrana plasmática y nuclear de la célula diana (1). En el núcleo la hormona se une a su receptor intracelular activándolo (2). El complejo hormona-receptor activado se fija al ADN (3) y puede actuar como factor de transcripción modulando la síntesis de ARNm (4), que induce a la síntesis de nuevas proteínas (5), provocando una acción fisiológica (6).

Caracterizar la distribución y contenido de RP permitiría establecer patrones de sensibilidad y capacidad de respuesta a esta hormona (en términos de sus receptores) en los diferentes tejidos y tipos celulares que componen el endometrio. Esto es posible utilizando técnicas de inmunolocalización como la inmunohistoquímica con el sistema avidina-biotina-peroxidasa.

En hembras de diferentes especies, ha sido reportado que durante el ciclo estral la expresión de RP uterino, es mayor en fase folicular que en fase luteal. En endometrio de vacas (Boos et al., 1996, Robinson et al., 2001), ovejas (Cherny, R.A, 1991, Spencer & Bazer, 1995), cerdas (Sukjumlong et al., 1995) y perras (Vermeirsh et al., 2002) ciclando, se ha establecido que los mayores niveles de progesterona durante la fase luteal inhiben la expresión de su receptor así como de RE, mientras que mayores niveles de estrógenos estimulan la expresión de ambos receptores. Sin embargo, en endometrio de yeguas, la información en relación a la distribución y cantidad de RE y RP determinada por inmunohistoquímica aún no es concordante.

Watson et al.1992, reportaron en yeguas ciclando que el inmunomarcado a RP en los epitelios, fue similar durante todo el ciclo. En cambio, Aupperle et al., 2000 en un estudio posterior, reportó mayor expresión de RP en epitelio glandular en fase lútea media en relación a la fase lútea tardía y menor inmunoreactividad a RP en epitelio luminal y conductos epiteliales glandulares y mayores scores en células del estroma. Watson et al. (1992), describió en endometrio de yeguas al estro, donde las células del estroma endometrial positivas a RP tendieron a mostrar mayor intensidad de tinción que las del

epitelio glandular y epitelio luminal. Por otro lado, Hartt et al. 2005, reportaron en yeguas ciclando, similar expresión de RP entre las células del epitelio glandular y el stroma durante todo el ciclo estral e indetectable en epitelio luminal durante el diestro. Kalpokas et al., 2010 en un estudio realizado en Uruguay con yeguas ciclando, el cual reportó al día 6 de la ovulación, altos contenidos RP en células epiteliales, siendo mayor en éstas en relación a las células del estroma.

### **3.4 VÍNCULO INMUNO-ENDÓCRINO-REPRODUCTIVO EN LA HEMBRA**

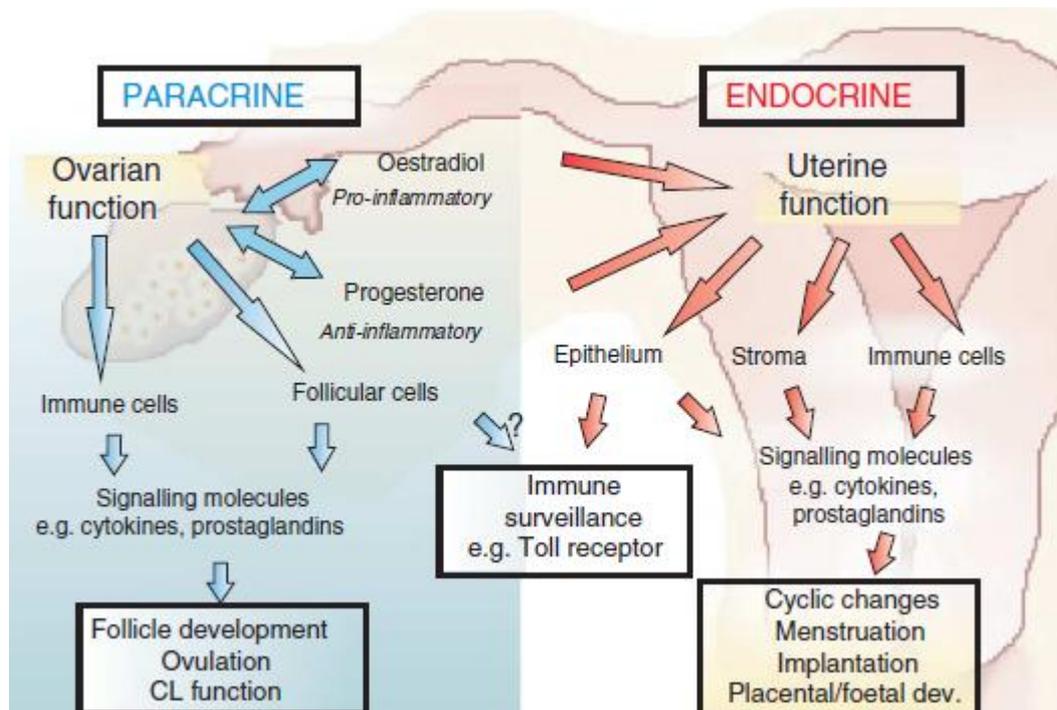
Los estrógenos y la progesterona están involucrados en la regulación del sistema inmune. El aparato reproductor de la hembra (en particular el epitelio luminal), es continuo con el ambiente externo; principalmente durante el estro, encontrándose expuesto a la invasión de microorganismos desde el medio exterior (Hansen et al., 1986). Durante, el apareamiento, se produce la contaminación microbiana del endometrio, porque el pene contiene microorganismos y además los espermatozoides representan un agente externo o antígeno (Alghamdi et al., 2009, Schubert et al., 2008). Cuando una invasión microbiana ocurre, el sistema inmune, representado por fagocitos como macrófagos y neutrófilos, es el primero en responder (Hansen et al., 1986). Como consecuencia, la yegua, normalmente desarrolla una inflamación endometrial o endometritis postcoital que puede resolverse 24-48 horas luego del apareamiento (Allen, 2001). Las yeguas que no resuelven la endometritis, son consideradas como susceptibles a endometritis, mientras que las que la resuelven en ese plazo como resistentes (Huges & Loy, 1969, Peterson et al., 1969, Brinsko et al., 2003). La endometritis postcoital persistente es una de las patologías reproductivas más frecuentes en yeguas adultas que lleva a criadores a tener grandes pérdidas económicas por tratamientos, pérdida de servicios, genética valiosa y disminución en la producción de potrillos (Neely, 1991, Weems et al., 2006, Leblanc et al., 2009).

En yeguas fértiles, los leucocitos polimorfos nucleares del útero durante el estro, presentan mayor actividad fagocítica que en diestro (Liu & Troedsson, 2008). En endometrio de yeguas sanas no fueron encontradas diferencias entre estro y diestro en la cantidad de linfocitos B, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>; sin embargo, yeguas con endometritis presentaron, al estro, mayores cantidades linfocitos en relación con yeguas sanas (Watson & Thomson, 1996). Similares resultados fueron reportados en la cantidad de macrófagos en endometrio de yeguas (Summerfied & Watson, 1998). Estudios en relación a la distribución tisular de polimorfos nucleares y macrófagos en el endometrio, reportaron que la cantidad de éstos, fue afectada por el tipo tisular, encontrándose mayor cantidad de ambos en estrato esponjoso que en estrato compacto y ausencia de estas células en el tejido epitelial, tanto en yeguas sanas como con endometritis (Summerfied & Watson, 1998).

Por otro lado, experimentos realizados en ratonas modificadas genéticamente para bloquear la expresión de receptores de progesterona (RP-knockout) ovariectomizadas, se demostró que el RP tiene un efecto anti-inflamatorio bajo tratamiento simultáneo con estrógenos y progesterona (Magno et al., 1992). En estudios "In Vitro", con cultivos de macrófagos procedentes de mujeres con o sin endometriosis, fue demostrada la presencia de RP en los macrófagos cultivados y que el tratamiento con estrógenos y progesterona al cultivo,

modificó la actividad secretoria de mediadores inflamatorios, lo que establece un claro vínculo entre estrógenos, progesterona y la actividad de los macrófagos (Wira et al., 2010).

En humanas se plantea que la modulación de la respuesta inmune uterina, es debida a acciones estrógenicas pro-inflamatorias y acciones anti-inflamatorias de la progesterona, debido a efectos parácrinos en ovario y endócrinos en útero. En el endometrio los esteroides sexuales participan en la producción de citoquinas y prostaglandinas por parte de las células epiteliales, del estroma y células inmunes residentes. Así, los esteroides sexuales influyen en la capacidad de las células epiteliales para responder a los microorganismos (Lea & Sandra, 2007). La Figura 3, esquematiza el vínculo immuno-endócrino mencionado.



**Figura 3:** Vínculo immuno-endócrino entre ovario y útero planteado para humanas. Tomado de Lea & Sandra (2007). Por detalles ver: Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation, en Reproduction Review.

En yeguas, aún no han sido claramente establecidas las causas immuno-endócrino-celulares implicadas en la susceptibilidad o resistencia a la endometritis. Además, la dificultad en el diagnóstico temprano de la endometritis, se debe en parte a que su curso puede ser subclínico, teniendo mínimas o ninguna manifestación externa (Neely, 1991). Sin embargo, la biopsia endometrial es una herramienta de gran utilidad diagnóstica, ya que a través de su análisis histológico es posible detectar alteraciones tisulares inflamatorias, cambios degenerativos y modificaciones a nivel vascular (VanCamp 1988, Roscanini et al., 2000). En tal sentido, en 1986 Kenny & Doig propusieron un sistema la interpretación pronóstica de preñez en yeguas, de acuerdo al estatus endometrial basado en cuatro categorías histopatológicas, clasificadas de acuerdo al grado de alteraciones tisulares. En humanas, ha sido propuesto que los receptores esteroideos y factores de proliferación celular, presentes en el endometrio, podrían ser utilizados como “biomarcadores” implicados en el control de

la proliferación y diferenciación celular en patologías uterinas asociadas a bajos índices de fertilidad (Loachin ,2005).

El abordaje de la interacción inmuno-endocrina en yeguas con resistencia comprobada a la endometritis post-coital podría aportar patrones de referencia para el estudio de la endometritis y un mayor índice de diagnóstico temprano de ésta patología (McDowell et al., 1999, Hartt et al., 2005, Schalfer, 2007). Además, la yegua es utilizada como modelo experimental extrapolable al humano, para estudiar la reproducción asociada a parámetros inmuno-endócrinos ya que ambas especies son mono-ovulatorias y tienen una larga fase folicular. Las yeguas tienen, ventajas sobre otras especies domésticas en cuanto a la accesibilidad al tracto genital y como fuera ya mencionada, la importancia diagnóstica de la biopsia endometrial (Schlafer, 2007, Carnevale et al., 2008, Ginther, 2009).

El objetivo de la presente tesis es aportar información en relación al vínculo inmuno-endócrino-celular del endometrio de las yeguas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVOS GENERALES**

Aportar información en relación a los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la inmunología de la reproducción de las yeguas.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**4.2.1** Caracterizar la presencia, contenido y distribución tisular de RP en el endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis durante el ciclo estral.

**4.2.2** Evaluar la presencia y distribución de RP en células del sistema inmune del endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis durante el ciclo estral.

## **5. HIPÓTESIS**

La presencia y distribución de RP en el tejido endometrial y en células del sistema inmune presentes en el endometrio de las yeguas sanas y resistentes a endometritis ciclando están modulados por el momento del ciclo estral en que estas se encuentren.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

La selección de las yeguas, obtención de biopsias endometriales y plasma sanguíneo se realizó en el Departamento de Fisiopatología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil-Argentina, a cargo de la Prof. Dra. Elida Fumuso.

### **6.1 ANIMALES Y MANEJO**

Yeguas tipo Criollo, ciclando, de 3-10 años y 330-500 Kg de PV, fueron inseminadas artificialmente con semen muerto luego de detectado el estro para evaluar la susceptibilidad a endometritis. Las yeguas que fueron capaces de eliminar el fluido uterino luego de la inseminación, presentaron citología exfoliativa y cultivo negativo fueron consideradas como yeguas resistentes a endometritis (n=7), en acuerdo con (Brinsko et al., 2003).

Durante el ensayo, las yeguas se mantuvieron a pastoreo, complemento con heno y ración basada en granos para caballos. El agua estuvo disponible ad libitum.

El control del ciclo estral, la dinámica folicular y el estatus uterino fue controlado diariamente por ultrasonografía utilizando un Ecógrafo veterinario Berger LC-2010 plus, con un transductor de 5 MHz.

Se tomaron biopsias endometriales cuando las yeguas presentaron signos de estro y a la ultrasonografía presentaron folículo ovárico dominante  $\geq 30$  mm y edema endometrial. La ovulación se definió como el momento en que el folículo dominante ya no pudo ser identificado por ultrasonografía.

## **6.2 BIOPSIAS ENDOMETRIALES**

Las biopsias fueron tomadas en las siete yeguas en forma repetida en tres momentos de un mismo ciclo estral. Posteriormente fueron colocadas en formol tamponado al 10 % durante 24 horas y luego en etanol al 70 % hasta su procesamiento. Cuando el ensayo finalizó, las biopsias fueron incluidas en parafina, cortadas con micrómetro a 5  $\mu\text{m}$  de espesor y montadas en láminas de vidrio StarFrost®. En el mismo momento en que fueron tomadas las biopsias, fueron extraídas las muestras de sangre para la determinación de progesterona (P) plasmática y registrado el estatus ovárico (medida del tamaño folicular) y uterino (edema, tono y pliegues).

En detalle, se tomaron biopsias y muestras de sangre:

1. Al momento de detectado el estro: presencia de edema endometrial y folículo ovárico dominante  $\geq 30$  mm, (Es, n=7).
2. En diestro, a las 24 horas post ovulación, (D24hPOv, n=7).
3. En diestro, al día 7 de la ovulación, (D7POv, n=7).

## **6.3 DETERMINACIÓN DE NIVELES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA**

La extracción de sangre fue realizada por veno-punción yugular, la sangre fue depositada en tubos heparinizados de 10 mL Vacutainer™. Pasados 15 minutos de la extracción, la sangre fue centrifugada por 10 minutos a 2000 RPM. El plasma fue separado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización del radioinmunoanálisis en fase sólida. La sensibilidad del ensayo fue 0.318 nmol/L.

## **6.4 DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP)**

Para evaluar la presencia y distribución de RP en el tejido endometrial, se utilizó la técnica inmunohistoquímica de la avidina-biotina-peroxidasa puesta a punto en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria para diferentes tejidos y especies (Sosa et al., 2004, Moroni et al., 2007, Acuña et al., 2008). Las secciones de biopsias fueron pretratadas en microondas a 900 W de potencia, sumergidas en citrato de sodio 0,01 M, pH=6,0 por 10 minutos, dejándose enfriar posteriormente durante 20 minutos. Después de un lavado con buffer (PBS 0,01 M, pH 7,5) la actividad inespecífica de las peroxidases endógenas del tejido, fue bloqueada con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 3% en metanol por 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron enjuagadas por 10 minutos en buffer PBS y posteriormente incubadas por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente con suero normal equino (NHS, Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA USA), diluido en buffer PBS, con el fin de disminuir las uniones no específicas. Las secciones fueron incubadas con anticuerpo primario anti-RP diluido en 1:100 PBS (anticuerpo monoclonal de ratón Catálogo 18-0172, Zimed, South San Francisco, CA, USA) por 60 minutos, en cámara húmeda. Los controles negativos se realizaron remplazando el anticuerpo primario por un suero inespecífico de ratón (cat#sc-2025, Santa Cruz, California, USA) diluido en 1:100 PBS. Luego de la unión al anticuerpo primario las secciones fueron incubadas por 60 minutos con una solución de anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón producida en equinos (Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) diluida en suero de caballo 1:200, enjuagadas nuevamente con buffer PBS y posteriormente incubadas por 60 minutos con un complejo avidina-biotina-

peroxidasa (Vectastain Elite; Vector). El sitio de unión del complejo enzimático fue visualizado por medio de 3,3'-diaminobencidina en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB kit, Vector Laboratories), un cromógeno que produce un precipitado de coloración marrón insoluble cuando se incuba junto con la enzima peroxidasa. Las secciones fueron contracoloradas con hematoxilina y deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol antes de ser montadas con cemento sintético. La inmunohistoquímica fue realizada en el mismo ensayo para todas las secciones de biopsias endometriales del diseño experimental.

## **6.5 ANÁLISIS DE IMAGEN**

### **6.5.1 EVALUACIÓN DE RP EN TEJIDO ENDOMETRIAL**

La presencia y distribución RP en el tejido endometrial fue evaluada subjetivamente por dos operadores independientes, quienes no conocían la reseña del animal al momento de evaluar los preparados (método de doble ciego).

La presencia de RP fue estudiada en las siguientes localizaciones tisulares: epitelio luminal (EL), epitelio glandular (EG), estrato compacto (EC) y tejido conjuntivo interglandular (CiG). Se evaluaron un total de 10 campos en lente de inmersión, para cada localización tisular.

El inmunomarcado fue clasificado como positivo o negativo a RP de acuerdo a la presencia de DAB precipitado (coloración marrón) o contracoloración con hematoxilina (coloración azulada). El inmunomarcado positivo a RP fue clasificado según su intensidad como leve, moderado e intenso y llevado en proporción a una escala de 0 a 10 (Thatcher et al., 2003). El promedio ponderado de intensidad de inmunomarcado (PI) fue calculado como:  $(1x n_1 + 2x n_2 + 3x n_3) / 10$ , siendo "n" la proporción de células por campo para cada localización tisular que exhibieron tinción leve (1), moderada (2) e intensa (3) (Boos et al., 1996). El porcentaje total de inmunomarcado positivo a RP (%T, incluye todas las localizaciones tisulares), se obtuvo multiplicando la proporción promedio de células inmunomarcadas por 10.

### 6.5.2 EVALUACIÓN DE RP EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE DEL ENDOMETRIO

Para la evaluación de las células del sistema inmune presentes en el tejido endometrial, se tomaron de cada biopsia, 10 fotografías a 400 x de las siguientes localizaciones tisulares: EL, EC y estrato esponjoso (EE) (Van camp, 1988, Summerfied & Watson, 1998). En cada localización tisular se contaron por separado la cantidad de leucocitos polimorfos nucleares (PMN), linfocitos (L) y macrófagos (M) presentes. Éstos fueron clasificados como positivos o negativos a RP. Fue contabilizada: la cantidad de PMN, L y M negativos a RP (-PMN, -L y -M) y positivos a RP (+PMN, +L y +M) y sumadas ambas para determinar cantidad total de PMN, L, M (positivos más negativos a RP,  $tPMN$ ,  $tL$  y  $tM$ ).

Debido a la dificultad de distinguir por la metodología propuesta, entre los núcleos de L o M de acuerdo a su morfología y orientación del núcleo en el preparado histológico; éstos fueron agrupados como mononucleares (L&M), para su análisis estadístico.

### 6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las variables analizadas estadísticamente fueron: PI, %T, cantidad de células inmunes negativas o positivas a RP así como los niveles de P plasmática.

Se utilizó un modelo mixto de ANOVA con el procedimiento PROC MIXED del SAS 9.2 (Statistical Analysis System, SAS institute Inc., Cary, NC, USA) contemplando las mediciones repetidas. Las concentraciones plasmáticas de P se analizaron por ANOVA, considerando el efecto del momento del ciclo estral.

Para la presencia y distribución de RP en el tejido endometrial, los efectos fijos fueron: observador, momento del ciclo estral (Es, D24hPOv, D7POv), localización tisular (EL, EC, EG y CiG) y su interacción.

Para caracterizar la distribución de células del sistema inmune y la presencia de RP en ellas, los efectos fijos fueron: observador, momento del ciclo estral, localización tisular (EL, EC, EE), tipo celular (PMN, L&M) y su interacción. La cantidad PMN, L&M en cada localización tisular, fue expresada como porcentaje en relación al total de células inmunes contadas para ese momento del ciclo.

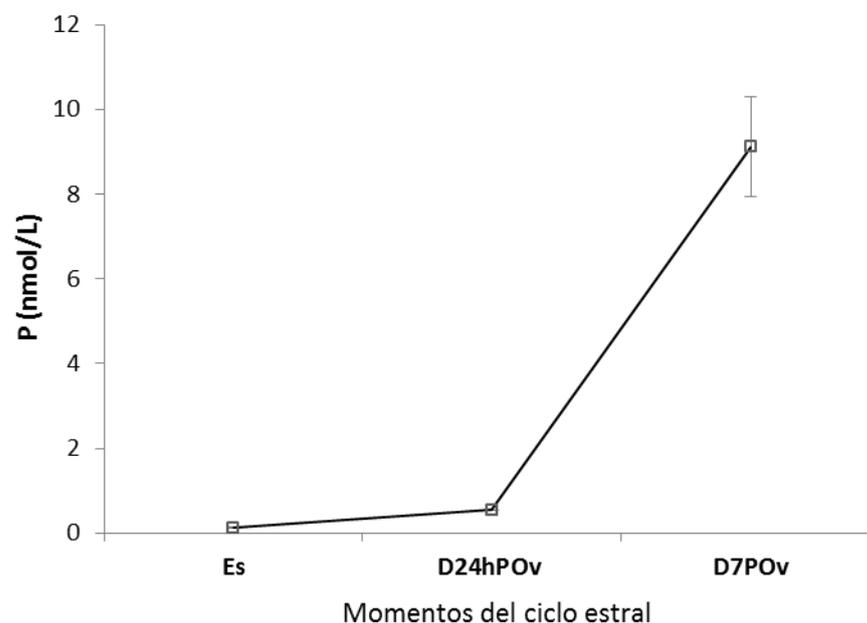
Los resultados se expresan como medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar de la media) y el nivel de significación considerado fue  $P < 0,05$ . Los valores de  $P$  comprendidos entre 0,05 y 0,1 fueron considerados como tendencia.

## **7. RESULTADOS**

Al examen ecográfico, todas las yeguas exhibieron características ováricas y endometriales compatibles con el momento del ciclo estral. La ovulación fue confirmada en todas las yeguas y el edema endometrial fue indicador de la acción de los estrógenos durante el ciclo. Ninguna de las biopsias analizadas mostró signos de inflamación o cambios degenerativos. También se comprobó la ausencia de endometritis o endometriosis u otras lesiones tisulares.

### **7.1 NIVELES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA**

La concentración de P plasmática (nmol/L), fue mayor al D7POv en relación a los días Es y D24hPOv ( $P < 0,001$ ) y similar entre Es y D24hPOv ( $P < 0,796$ ). Los perfiles plasmáticos de P se muestran en el Gráfico 1.



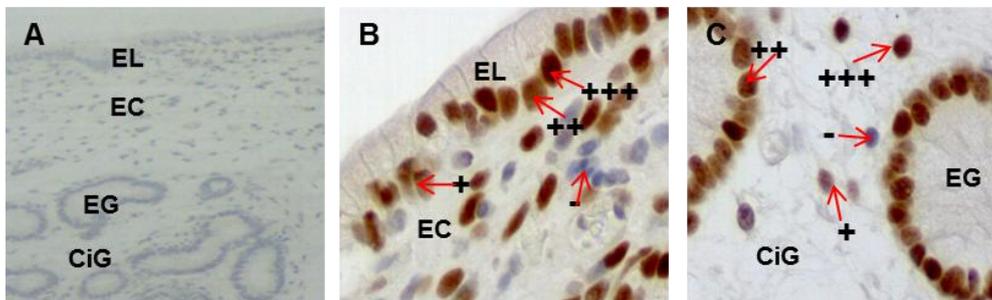
**Gráfico 1:** Concentraciones plasmáticas de progesterona (P, media de los mínimos cuadrados  $\pm$  error estándar medio, nmol/L), en yeguas resistentes a endometritis ciclando ( $n=7$ ), \*  $P < 0,001$ .

### **7.2 RECEPTORES DE PROGESTERONA**

#### **7.2.1 OBSERVACIONES GENERALES**

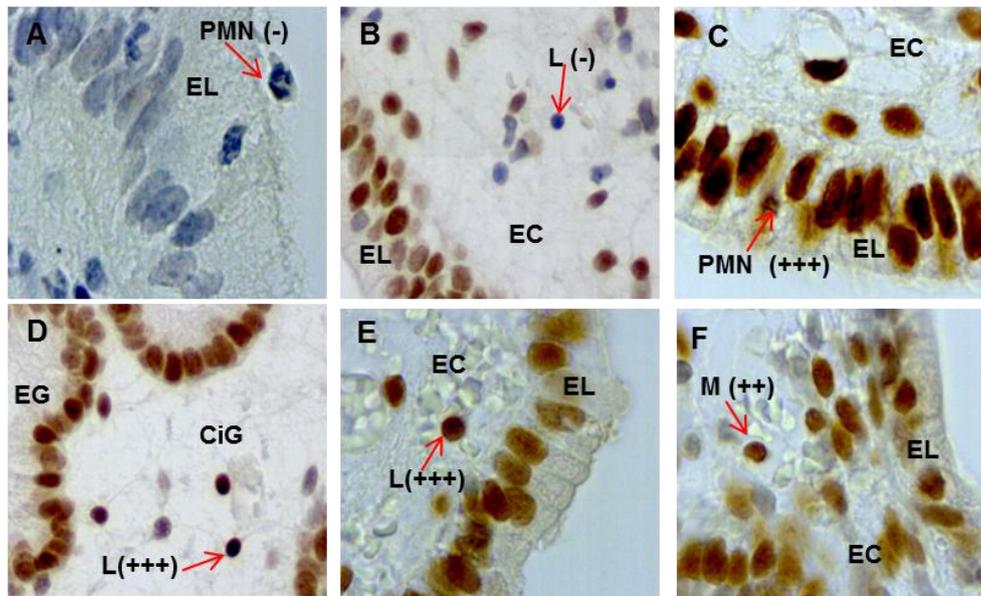
El inmunomarcado a RP fue observado en forma específica en el núcleo celular. En los controles negativos no fue observado inmunomarcado específico a RP. La ausencia de tinción específica en los controles negativos, cuando el anticuerpo monoclonal específico para RP fue sustituido por IgG de ratón no inmunomarcada demostró especificidad para RP. Los núcleos celulares inmunomarcados a RP mostraron diferentes grados de intensidad de tinción, por lo cual fue posible su clasificación en leves, moderados e intensos, tal cual se había previsto. En la Imagen, 1 se muestran ejemplos de controles negativos (Panel A) y

positivos (Paneles B y C) donde se señalan las diferentes localizaciones tisulares evaluadas, así como la clasificación de acuerdo a la intensidad de inmunomarcado.



**Imagen 1:** Inmunolocalización de RP en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Panel A: control negativo (100 x), Paneles B y C: ejemplos de muestras positivas a RP (400 x). Localizaciones tisulares: epitelio luminal (EL) estrato compacto (EC), epitelio glandular (EG) y tejido conjuntivo interglandular (CiG). Clasificación de intensidad de inmunomarcado a RP: núcleos negativos a RP (-), núcleos positivos leves (+), moderados (++) e intensos (+++).

Fueron observados y contabilizados PMN L y M positivos a RP en EL, EC y EE. En la Imagen 2 (Paneles A al F), se muestran ejemplos de posibles PMN, L, M positivos o negativos a RP en las diferentes localizaciones tisulares evaluadas.



**Imagen 2:** Localización de PMN, M y L positivos o negativos a RP en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Panel A: control negativo donde se señala un posible PMN cercano a EL. Panel B: se señala células identificadas por ambos evaluadores como L negativo a RP (L -) en EC. Panel C: se señala un posible PMN con tinción a RP intensa (PMN +++) en el EL. Panel D: se señala un posible L con tinción a RP intensa (L +++) en CiG. Panel F: se señala un posible M con tinción a RP moderada (M ++ ) en el EC. Imágenes tomadas a 400 x.

Además, fue observado inmunomarcado específico a RP en el tejido endotelial de vasos sanguíneos y linfáticos en la mayoría de las biopsias, sin embargo no fueron cuantificados.

### 7.2.2 INMUNOMARCADO A RP EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL

Sobre el porcentaje total de inmunomarcado positivo a RP (%T) no hubo efecto de observador ( $P = 0,1$ ), ni de momento del ciclo estral, siendo similar en todos los días estudiados ( $82,5 \pm 3,23$ ;  $81,02 \pm 3,34$  y  $78,81 \pm 3,23$ , días Es, D24hPOv y D7POv respectivamente, ( $P > 0,6$ ).

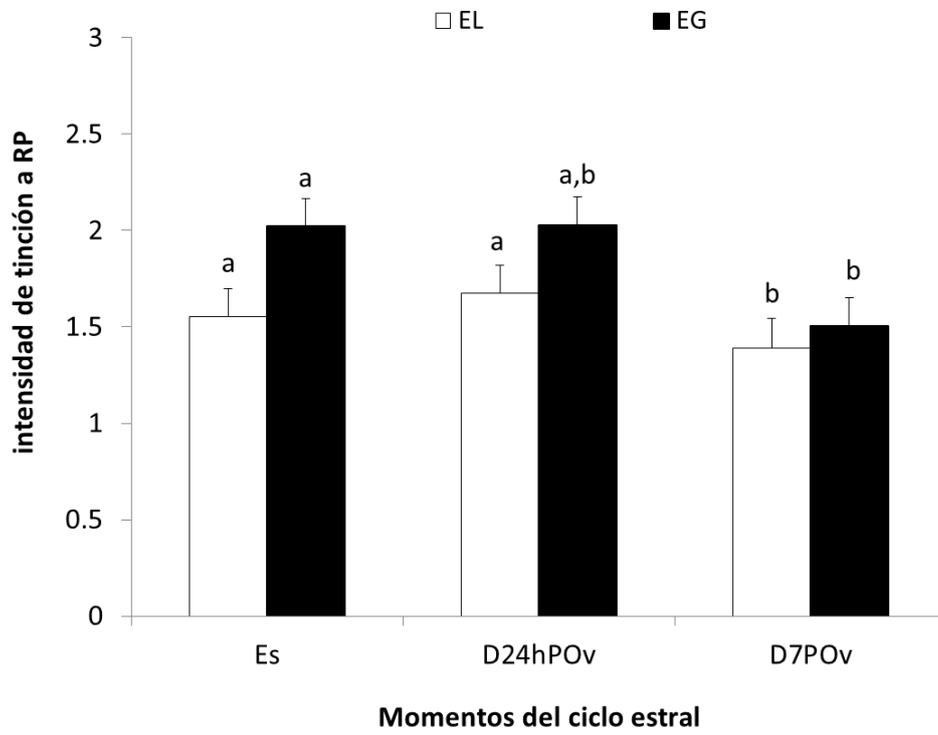
Sobre la inmunomarcado a RP, en los diferentes localizaciones tisulares evaluadas, expresado como promedio ponderado de intensidad de inmunomarcado (PI), hubo tendencia en efecto observador ( $P=0,098$ ) y fueron hallados efectos de momento del ciclo estral ( $P < 0,0001$ ) y localización tisular ( $P=0,0004$ ), sin interacción entre ambos ( $P=0,45$ ).

Al día Es, se encontró mayor PI en EG y CiG, intermedio en EC y menor en EL (EG vs EL,  $P = 0,0135$ ; CiG vs EL,  $P = 0,0123$ ; EC vs EG,  $P = 0,048$ ; EC vs CiG,  $P = 0,045$ ). El PI a RP fue similar entre EL y EC ( $P = 0,604$ ) y entre EG y CiG ( $P = 0,972$ ).

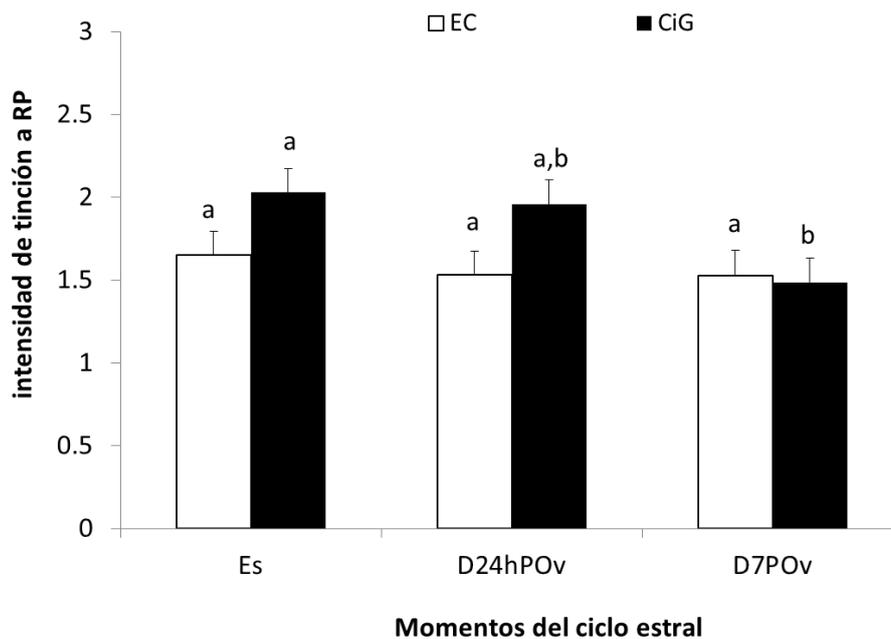
Al día D24hPOv, se encontró mayor PI en EG y CiG en relación a EC (EG vs EC,  $P = 0,008$ ; CiG vs EC,  $P = 0,024$ ). El PI tendió a ser mayor en EG que en EL ( $P = 0,058$ ) y fue similar entre: EL y CiG ( $P=0,130$ ); EG y CiG ( $P = 0,696$ ) y EL y EC ( $P = 0,444$ ).

Al día D7POv, no se encontraron diferencias en el PI entre ninguna de las localizaciones tisulares ( $P > 0,5$ ).

Las diferencias en el PI entre diferentes momentos del ciclo estral y mismas localizaciones tisulares se detallan en el Gráfico 2 (para EL y EG) y Gráfico 3 (para EC y CiG).



**Gráfico 2:** Intensidad de tinción a RP en epitelio luminal (EL) y glandular (EG) en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Momentos del ciclo estral: día detectado el estro (Es), 24horas post ovulación (D24hPOv) y día 7 de la ovulación (D7POv). Los valores corresponden a las medias de mínimos cuadrados  $\pm$  error estándar de la media. Barras con diferentes superíndices indican diferencias entre momentos del ciclo estral para una misma localización tisular,  $P < 0,05$ .



**Gráfico 3:** Intensidad de tinción a RP en estrato compacto (EC) y tejido conjuntivo interglandular (CiG) en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Momentos del ciclo estral: día detectado el estro (Es), 24 horas post ovulación (D24hPOv) y día 7 de la ovulación (D7POv). Los valores corresponden a las medias de mínimos cuadrados  $\pm$  error estándar de la media. Barras con diferentes superíndices indican diferencias entre momentos del ciclo estral para una misma localización tisular,  $P < 0,05$ .

### 7.2.3 DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL DE PMN, L Y M, POSITIVOS Y NEGATIVOS A RP

Se detectó tinción positiva a RP en PMN, L y M y como fuera mencionado, L y M fueron agrupados como mononucleares (L&M). El inmunomarcado a RP en PMN y L&M fue observado en diferentes grados de intensidad en todas las localizaciones tisulares (EL, EC, EE), como se mostró en la Imagen 2 (Paneles A al F).

La cantidad promedio de células inmunes positivas a RP (+PMN y +L&M) fue menor que la cantidad promedio de células inmunes negativas a RP (-PMN y -L&M), en todos los momentos del ciclo y en todas las localizaciones tisulares ( $P < 0,0001$ ).

Se encontró efecto de observador ( $P = 0,04$ ), momento del ciclo estral ( $P = 0,005$ ), localización tisular ( $P = 0,0003$ ) y tipo celular ( $P < 0,0001$ ), sobre la cantidad promedio total de células inmunes positivas y negativas a RP ( $tPMN + tL\&M$ ). El promedio total de células inmunes ( $tPMN + tL\&M$ ) tuvo tendencia a ser mayor al momento de detectado el estro (Es) que al día siete de la ovulación (D7POv), ( $P = 0,06$ ). El promedio total de células inmunes fue mayor en EC, intermedio en EE y menor en EL (EL vs EC,  $P < 0,0001$ ; EL vs EE,  $P = 0,045$ ; EC vs EE,  $P = 0,034$ ). El promedio de  $tPMN$  fue mayor que el promedio de  $tL\&M$  en todos los momentos del ciclo.

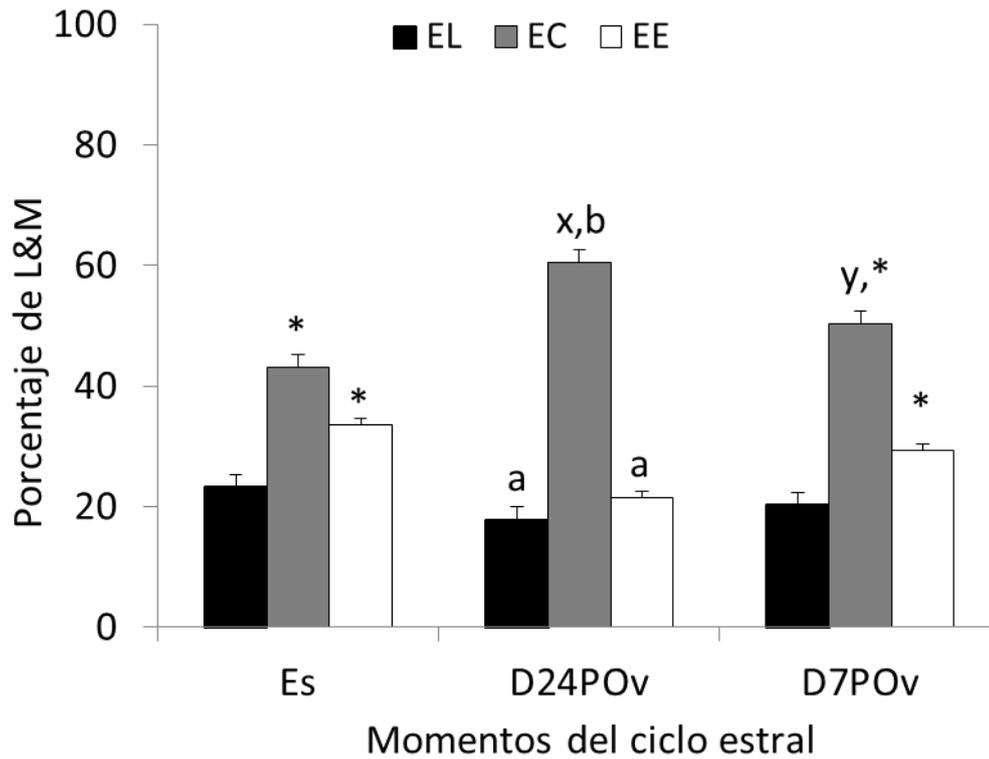
Se encontró efecto de momento del ciclo estral ( $P = 0,01$ ) y de localización tisular ( $P = 0,04$ ) sobre el promedio  $tL\&M$ . Los efectos sobre el promedio de L&M negativos a RP (-L&M) fueron similares a los hallados para el total ( $tL\&M$ ).

Sobre el promedio de L&M positivos a RP (+L&M) no fue encontrado efecto de momento del ciclo estral ni de localización tisular.

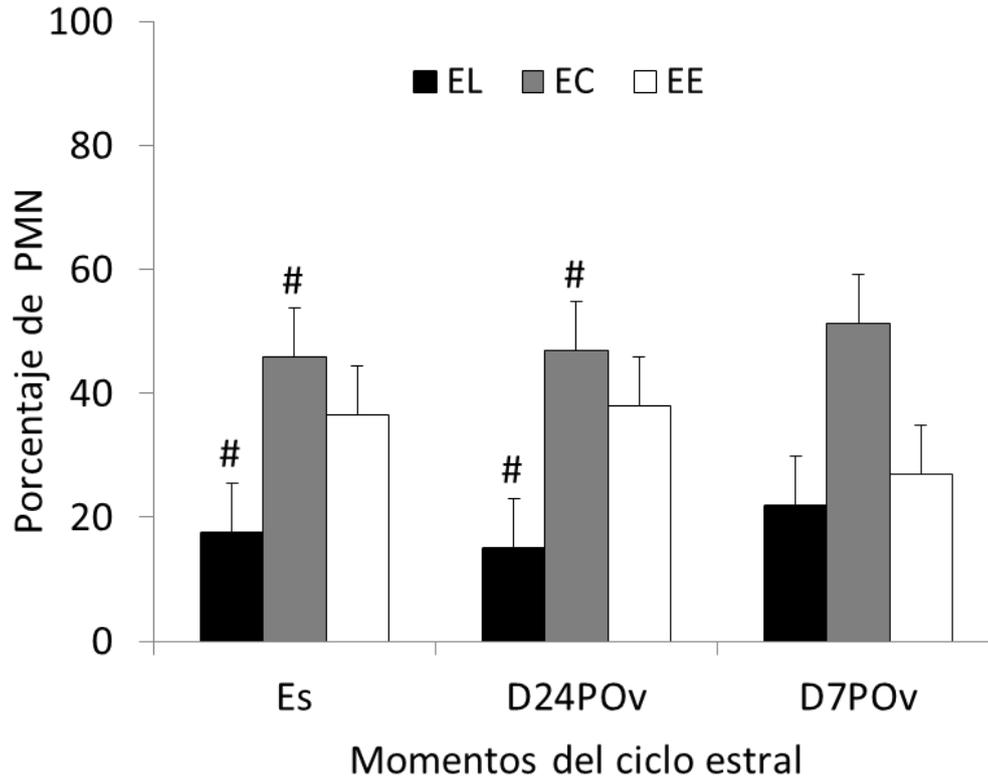
Se encontró efecto de momento del ciclo estral ( $P = 0,04$ ) y de localización tisular ( $P = 0,002$ ) sobre el promedio  $tPMN$ . No hubo diferencias en el promedio de  $tPMN$  entre momentos del ciclo. Los efectos sobre el promedio de PMN negativos a RP (-PMN) fueron similar a lo hallado para el total ( $tPMN$ ).

Sobre el promedio de PMN positivos a RP (+PMN) no fue encontrado efecto de momento del ciclo estral ni de localización tisular.

Las diferencias entre el promedio  $tL\&M$  o  $tPMN$ , entre diferentes momentos del ciclo estral y localizaciones tisulares, expresadas como porcentaje, se detallan en el Gráfico 4 ( $tL\&M$ ) y Gráfico 5 ( $tPMN$ ).



**Gráfico 4:** Porcentaje  $\pm$  error estándar de la media de L&M positivos y negativos (tL&M) a RP, presentes en epitelio luminal (EL), estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE) en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Momentos del ciclo estral: día detectado el estro (Es), 24 horas post ovulación (D24hPOv) y día 7 de la ovulación (D7POv). <sup>a,b</sup>indica diferencias entre localización tisular en un mismo momento del ciclo, <sup>x,y</sup>indica diferencias entre momentos del ciclo en una misma localización tisular ( $P < 0,05$ ), \*indica tendencia para un mismo tipo tisular y diferentes momentos del ciclo.



**Gráfico 5:** Porcentaje  $\pm$  error estándar de la media de polimorfos positivos y negativos (*tPMN*) a RP, presentes en epitelio luminal (EL), estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE) en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Momentos del ciclo estral: día detectado el estro (Es), 24 horas post ovulación (D24hPOv) y día 7 de la ovulación (D7POv). # indica tendencia para un mismo día y diferentes tipos tisulares.

## **8. DISCUSIÓN**

En el presente estudio, se describió la distribución y contenido de RP endometriales, así como la distribución de células del sistema inmune positivas y negativas a RP en endometrio, en asociación con los niveles plasmáticos de progesterona en yeguas ciclando. Éste es, aparentemente, el primer estudio que describe la presencia y distribución de RP en células del sistema inmune en el endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis.

Las concentraciones y los perfiles de progesterona plasmáticos en las yeguas incluidas en este estudio están en acuerdo con lo reportado en yeguas ciclando por otros autores (Towson et al., 1989, Aurich, 2011).

### **8.1 DISTRIBUCIÓN DE RP EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL**

El inmunomarcado a RP en el endometrio, en términos de porcentajes totales (%T), fue similar entre los diferentes momentos del ciclo estral, sin embargo fue hallado efecto de localización tisular y día sobre promedio ponderado de intensidad de inmunomarcado (PI). Estudios previos, realizados por ensayos de unión con hormonas radiactivas en endometrio de yeguas ciclando, demostraron mayores concentraciones de receptores de progesterona en fase folicular que en fase luteal (Tomanelli et al., 1991, Re et al., 1995). Los estudios realizados, por ensayos de unión en endometrio equino, no caracterizaron la distribución tisular de RP de acuerdo a su localización tisular, sin embargo dicha técnica permitió su cuantificación. Estos trabajos son anteriores al desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica para receptores hormonales y aportaron información relevante en relación a la sensibilidad del endometrio a estrógenos y progesterona. Posteriormente, el desarrollo y aplicación de la inmunohistoquímica permitió caracterizar y “semicuantificar” la expresión de receptores hormonales de acuerdo a su localización tisular y celular.

El efecto de localización tisular hallado sobre el promedio ponderado de intensidad de inmunomarcado a RP hallado en este estudio, indica que la expresión de RP en las yeguas ciclando, fue específica del tipo tisular (EL, EG, EC e CiG).

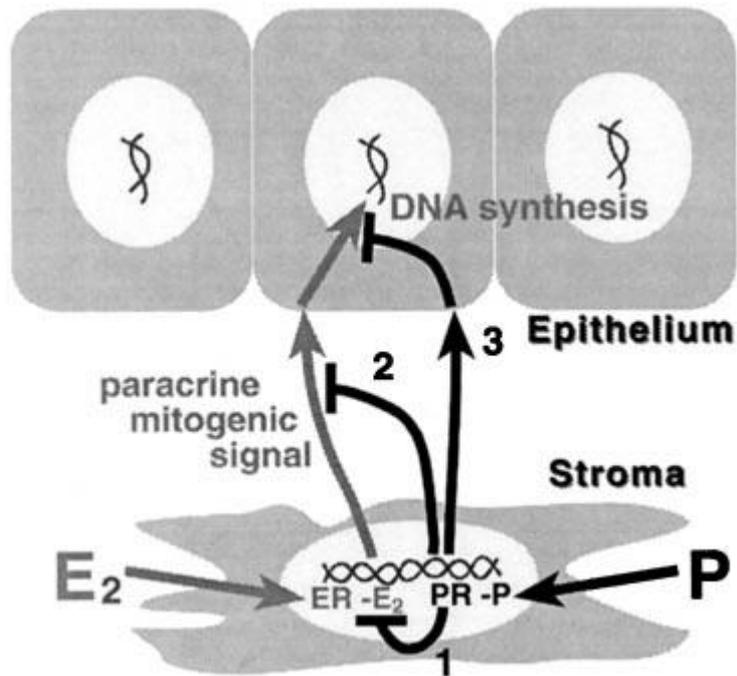
Fue hallado efecto del momento del ciclo estral sobre el PI. En términos generales, el PI disminuyó en el tejido endometrial (excepto en EC), desde los días Es y D24hPOv al día 7 de la ovulación. Estos hallazgos son contrarios, a lo reportado en yeguas ciclando, donde el inmunomarcado a RP en los epitelios, fue similar durante todo el ciclo (Watson et al., 1992). En cambio, un estudio posterior, reportó mayor expresión de RP en epitelio glandular en fase lútea media en relación a la fase lútea tardía (Aupperle et al., 2000). Estos estudios fueron realizados con bajo número de animales y sin diferenciar entre yeguas sanas y yeguas con endometritis en un mismo diseño. Esto podría influir negativamente en establecer claramente la regulación y distribución de receptores esteroides en endometrio de las yeguas ciclando. Sin embargo fueron los primeros abordajes y aportan aún hoy información de relevancia.

En el presente estudio, cuando los niveles de progesterona plasmáticos fueron menores y basales (días Es y D24hPOv), el inmunomarcado a RP en las localizaciones tisulares más profundas (epitelio glandular y conjuntivo interglandular) tendió a ser mayor que en los estratos superficiales (epitelio luminal y estrato compacto). Similares hallazgos, fueron reportados durante todo el ciclo estral por Aupperle et al. (2000), en yeguas ciclando, donde encontraron menor inmunoreactividad a RP en epitelio luminal y conductos epiteliales glandulares y mayores scores en células del estroma. El inmunomarcado a RP hallado al momento de detectado en estro (día Es), difiere de lo reportado por Watson et al. (1992), en endometrio de yeguas al estro, donde las células del estroma endometrial positivas a RP tendieron a mostrar mayor intensidad de tinción que las del epitelio glandular y epitelio luminal. Por otro lado, Hartt et al. (2005), reportaron en yeguas ciclando, similar expresión de RP entre las células del epitelio glandular y el stroma durante todo el ciclo estral e indetectable en epitelio luminal durante el diestro. Contrariamente a estos autores, se encontró alta intensidad de tinción RP en epitelio luminal en diestro, que de hecho no fue diferente de la hallada en el resto de las localizaciones tisulares. Similarmente, en un estudio reciente, realizado en Uruguay con yeguas ciclando, el cual reportó al día 6 de la ovulación, altos contenidos RP en células epiteliales, siendo mayor en éstas en relación a las células del estroma (Kalpokas et al., 2010).

En el presente estudio, el similar inmunomarcado a RP al día 7 de la ovulación en todas las localizaciones evaluadas sugiere que bajo dominio de la progesterona de la fase luteal media, cuando los niveles de ésta hormona aún no son sostenidos en el tiempo, los tejidos del endometrio tienen similar sensibilidad a la progesterona (en términos de su receptor) a diferencia de lo hallado cuando los niveles de progesterona circulantes fueron basales (días Es y D24hPOv). Podría ser necesario más tiempo de dominancia de la progesterona sobre el útero para provocar un estímulo tejido específico en diestro. Para demostrar, esto correspondería tomar biopsias en fase luteal tardía. Sin embargo, en ese momento, bajo predominio de la progesterona, las yeguas son más susceptibles a la infección provocada por la toma de muestra lo cual podría liberar prostaglandinas con el consecuente riesgo de ocasionar luteólisis temprana (Sharp et al., 1997).

En el presente estudio no fueron encontradas diferencias durante el ciclo estral en la intensidad de tinción a RP en el estrato compacto, sin embargo las mayores variaciones cíclicas fueron encontradas en el conjuntivo interglandular. Algunas diferencias entre nuestro estudio y lo reportado previamente por distintos autores, podrían deberse, en parte, a que en éste estudio la expresión de receptores fue estudiada en tejido conjuntivo en forma diferenciada: estrato compacto y conjuntivo interglandular. Lo que hace difícil comparar nuestros resultados con otros investigadores en relación a los cambios cíclicos tisulares de la expresión de RP. Sin embargo, dividir el estudio de la expresión de RP en las diferentes localizaciones del tejido conjuntivos (EC y CiG), podría ser funcionalmente importante en el establecimiento de patrones de regulación parácrina para RP entre diferentes tejidos del endometrio. La regulación parácrina de la expresión de RP, ha sido demostrada en experimentos con ratonas recombinantes y también en humanas, donde el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la proliferación de células epiteliales del útero está mediada por el RP de las células del estroma (Kurita et al., 1998, Rajaram & Briskin, 2012). Además la expresión de RP depende, en parte, de la expresión de receptores de RE $\alpha$  (Ing, N. & Tsai, O. 1993). Aún más, en ratonas y humanas se ha sugerido que el rol antimitótico de la

progesterona contrarresta las señales mediadas por RE $\alpha$  directamente en las células del estroma, y/o indirectamente actuando sobre el epitelio a través de mecanismos parácrinos (Kurita et al., 1998, Rajaram & Brisken, 2012), ver Figura 4.



**Figura 4:** Posibles mecanismos de acción de estrógenos y progesterona en ratonas y humanas, sobre la proliferación del epitelio endometrial. La progesterona contrarresta las señales de proliferación inducida por los estrógenos en tres mecanismos inhibitorios posibles: 1) el RP inhibe la transcripción de RE-dependiente de mediadores parácrinos, 2) la progesterona induce la traducción de moléculas que antagonizan la acción del estradiol en forma parácrina y 3) la progesterona inducida por mediadores parácrinos inhibe directamente la proliferación epitelial. (Tomado de Kurita et al., 1998).

En apoyo a la interdependencia entre RP y RE $\alpha$  y la proliferación celular, en trabajos previos realizados con yeguas ciclando, fue hallada una correlación alta y positiva entre la expresión endometrial de RP, RE $\alpha$  y PCNA (un antígeno de proliferación celular), (Acuña et al., 2012).

En el presente estudio, la intensidad de tinción a RP en todas las localizaciones tisulares del endometrio, fue similar entre los días estro y 24 horas post-ovulación. Al parecer a las 24 horas de la ovulación, el estímulo de los estrógenos de la fase folicular aún predomina sobre el endometrio, en relación a progesterona que de hecho fue similar entre ambos días. Los niveles de progesterona al día 24 del estro, no fueron suficientes para inhibir la expresión de RP. Nosotros atribuimos estos hallazgos a los niveles de progesterona plasmáticos, sin embargo, aunque la concentración de estradiol no fue determinada en este estudio, cabe esperar que durante la fase folicular, los mismos hayan sido más elevados en relación a la fase luteal.

La intensidad de tinción a RP disminuyó en los epitelios y en el conjuntivo interglandular desde el momento de detectado el estro al día 7 de la ovulación, indicando un efecto inhibitorio de los mayores niveles de progesterona plasmática en diestro temprano sobre la intensidad de tinción a RP. El efecto inhibitorio de la progesterona sobre su propio receptor ha sido ampliamente demostrado en endometrio de vacas (Boos et al., 1996, Robinson et al., 2001), ovejas (Cherny, 1991, Spencer & Bazer, 1995), cerdas (Sukjumlong et al., 1995) y perras (Vermeirsh et al., 2002). En yeguas la información reportada es contradictoria y ambigua. Watson et al. (1992) encontraron que el inmunomarcado a RP en epitelio luminal y glandular del endometrio, fue similar durante todo el ciclo. Sin embargo, Hartt et al. (2005), reportaron que el inmunomarcado a RP en epitelio glandular y estroma del endometrio, fue mayor día el de la ovulación y al día 20 de la misma que en los días 11 y 14 de la ovulación, en acuerdo con la regulación positiva que ejercen los estrógenos de la fase folicular y la regulación negativa de la progesterona de la fase luteal.

## **8.2 DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL PMN, L&M, POSITIVOS Y NEGATIVOS A RP**

En el presente estudio, se observó y estudió el inmunomarcado a RP en PMN y mononucleares (L&M). Este hallazgo en yeguas sanas ciclando, indica que estos tipos celulares son blanco de la acción de la progesterona y que la respuesta inmune celular puede ser mediada, en parte a través de RP. Se encontró efecto de momento del ciclo estral, localización tisular y tipo celular sobre la cantidad promedio de polimorfos nucleares y mononucleares positivos y negativos a RP (tL&M y tPMN). El promedio total de células inmunes (tPMN + tL&M) tuvo tendencia a ser mayor al momento de detectado el Es que al día 7 de la ovulación. En desacuerdo con nuestros hallazgos, en endometrio de yeguas sanas no fueron encontradas diferencias entre estro y diestro en la cantidad de linfocitos B, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Watson E. & Thomson R. 1996). Sin embargo, en endometrio de ovejas ciclando, el número de linfocitos fue mayor en fase folicular que en fase luteal (Intan-Shameha et al., 2011). Estas diferencias, en relación con nuestros hallazgos, podrían deberse en parte, a la menor proporción que representaron los mononucleares en relación a los polimorfo-nucleares y por las metodologías de análisis empleadas en los estudios. En este estudio no fue utilizado anticuerpos específicos para la identificación de polimorfo-nucleares y mononucleares (L&M), sino que basamos nuestro estudio en la identificación morfológica en relación al núcleo celular, lo cual lleva a menor exactitud en su identificación. Esto justificaría en parte, el efecto de observador hallado sobre la evaluación de las células inmunes. La técnicas de doble marcado pueden co-localizar la presencia de un receptor en un tipo celular específico. Por ejemplo, Stygar et al., (2001) localizaron en cérvix de humanos RE $\beta$  en leucocitos y propusieron que la regulación de la función leucocitaria en cérvix, podría ser mediada por RE.

En el presente estudio, el promedio total de células inmunes fue mayor en estrato compacto, intermedio en estrato esponjoso y mínimos en epitelio luminal, en desacuerdo con lo reportado por Summerfield & Watson, (1998), en yeguas ciclando, donde encontraron mayor cantidad de macrófagos en estrato esponjoso que en estrato compacto y ausencia en tejido epitelial. En el presente estudio, en términos generales, los efectos encontrados sobre la cantidad total de polimorfo-nucleares y mononucleares (positivos y negativos a RP) acompañaron los efectos hallados sobre la cantidad polimorfos nucleares y mononucleares (L&M) negativos a RP, lo cual no ocurrió para polimorfos nucleares y mononucleares positivos

a receptores de progesterona. Esto podría deberse a la menor proporción de PMN y monucleares positivos a RP y a las limitaciones del sistema de evaluación empleado. Para futuros estudios, creemos fundamental poner a punto el sistema de doble marcado para la identificación de RP o RE en tipos celulares específicos del sistema inmune equino endometrial.

Son necesarios estudios más específicos, para caracterizar en forma adecuada el vínculo inmuno-endócrino-celular en endometrio de yeguas ciclando. La caracterización de dicho vínculo en yeguas sanas con resistencia comprobada a la endometritis, podría ser utilizada como referencia para comprender las bases inmuno-endócrinas de patologías que afectan la fertilidad en yeguas, como la endometritis persistente postcoital.

## **9. CONCLUSIONES**

El presente trabajo caracterizó la expresión de receptores de progesterona en endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis ciclando. Los mayores niveles de progesterona plasmática al día 7 de la ovulación podrían haber ejercido un efecto inhibitorio sobre la intensidad de tinción a RP en el tejido epitelial y células del tejido conjuntivo interglandular.

Además se caracterizó la distribución de linfocitos, macrófagos y polimorfos nucleares presentes en el tejido endometrial. Basados en la morfología celular, se identificó la presencia de receptores de progesterona en estos tipos celulares. Las células inmunes evaluadas, positivas a RP, no presentaron cambios en la distribución endometrial ni en su cantidad promedio durante el ciclo estral.

La presencia de receptores de progesterona en linfocitos, macrófagos y polimorfos nucleares del endometrio, sugiere que la progesterona podría mediar la respuesta inmune en el endometrio.

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1) Acuña, S., Tasende, C., Rivulgo, M., Alzola, R., Felipe, A., Rogan, D., Fumuso, E. (2008). Effect of an immunomodulator on estrogen alpha and progesterone receptor expression in endometrial tissue of healthy, endometritis resistant mares during the estrous cycle *Reproduction in domestic animals*. 43(3): 97-97.
- 2) Acuña, S., Fumuso, E., Silva, D., D'Anatro, G., Marinone, A., Tasende, C. (2011). Impacto de la endometritis bacteriana sobre la distribución de receptores de estrógenos a nivel endometrial. Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal, Viña del Mar-Chile.
- 3) Acuña, S., Redolatti, C., D'Anatro, G., Cilintano, M., Nuñez, M.J., Herrera, M.F., Marinone, A., Fumuso, E. (2012). Endometrial steroid hormone receptors, proliferating nuclear antigen and progesterone profiles in mares resistant to endometritis *Reproduction in Domestic Animals* 47(4): 483
- 4) Alghamdi, A. S., Lovaas, B. J., Bird, S. L.G. Cliff Lambc, Aaron K. Rendahld, Patrick C. Taube, Douglas N. Foster (2009). Species-specific interaction of seminal plasma on sperm–neutrophil binding *Animal Reproduction Science* 114:331–344
- 5) Allen, W.R. (2001). Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy *Reproduction* 121: 513–527.
- 6) Aupperle, H., Ozgen, S., Schoon, H.A., Schoon, D., Hoppen, H.O., Sieme, H., Tannapfel, A. (2000). Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare *Equine Veterinary Journal* 32: 228–232
- 7) Aurich, C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science* 124: 220–228
- 8) Boos, A., Meyer, W., Schwarz, R. and Grunert, E. (1996). Immunohistochemical assessment of estrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle *Animal Reproduction Science*. 44: 11–21
- 9) Brinsko, P., Rigby, S.L., Lindsey, A.C., Blanchard, T.L., Love, C.C., Varner, D.D. (2003). A Practical Method for Recognizing Mares Susceptible to Post-breeding Endometritis. en: *American Association of Equine Practitioners, New Orleans*. pp 363-365
- 10) Carnevale, E.M. (2008). The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* 69: 23-30

- 11) Cherny, R.A. (1991) Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the endometrium of the ewe. *Reproduction Fertility and Development* 3: 321-331
- 12) Clark, J., Schrader, W., O'Malley, B. (1992). Mechanisms of steroid hormones action. En: Wilson & Foster . *Textbook of Endocrinology*. Saunders. Philadelphia. pp: 35-90
- 13) Coutinho Da Silva, M.A. (2008) when should a mare go for assisted reproduction? *Theriogenology* 70: 441-444
- 14) Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., Fisher, P.A. (2002). Ligand-independent activation of steroid receptors. *Domestic Animal Endocrinology* 23: 13-24
- 15) Fumuso, E., D'Anatro, G., Cilintano, M., Nuñez, M.J., Herrera, M.F., Redolatti, C., Marinone, A.I., Acuña, S. (2012). Hormone steroids receptors, proliferating cell nuclear antigen and progesterone profiles in endometrium for mares resistant to endometritis. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(4): 484-484
- 16) Garaham, D., Clarke, C. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine reviews* 18(4): 502-519
- 17) Ginther, OJ. (1992) *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. 2<sup>o</sup> ed. Cross Plains, Wisconsin, USA. pp 6-224
- 18) Ginther, OJ. (2009) Follicle suppression of circulating follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone before versus after emergence of the ovulatory wave in mares. *Theriogenology* 72: 445-452
- 19) Hansen, P.J., Bazer, F.W. & Segerson E.C (1986). Skin graft survival in the uterine lumen of ewes treated with progesterone. *American Journal of Reproductive Immunology* 12: 48
- 20) Hartt, L., Carling, S., Joyce, M., Johnson, G., Vanderwall, D., Ott, T. (2005) Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction*. 130(2):241-50.
- 22) Hughes, J.P., Loy, R.G. (1969). Investigations on the effect of intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare *Proceedings 15th Convention of American Association of Equine Practitioners* pp. 285–289
- 23) Hunt, J., Miller, L., Platt, J. (1998). Hormonal Regulation of Uterine Macrophages. *Developmental Immunology* 6:105-110
- 24) Ing, N & Tsai, S. (1993) *Genes in Mammalian Reproduction. Progesterone and Estrogen*. New York, Wiley-Liss. pp 271-291.

- 25) Intan-Shameha, A.R., Zuki, A.B.Z., Noordin, M.M., Wahid, H.C, Azmi, T.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 Journal of Tropical Agricultural Science*. 34:181-187
- 26) Kalpokas, I., Perdigón, F., Rivero, R., Talmon, M., Sartore, I., Viñoles, C. (2010). Effect of a povidone-iodine intrauterine infusión on progesterone levels and endometrial steroid receptor expression in mares. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52:66
- 27) Kenney, R.M. (1978). The role of endometrial biopsy in fertility evaluation. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*. P 117.
- 28) Kenney, R.M & Doig, P.A. (1986). Equine endometrial biopsy. In Morrow DA (ed): *Current Therapy in Theriogenology 2*. Philadelphia, WB Saunders. P 723.
- 29) Kuiper, GJM., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S & Gustafsson, JA. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 5925-5930.
- 30) Kurita, T., Young, P., Brody, J.R., Lydon, J.P., O'Malley, B.W. & Cunha, G.R. (1998). Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*.139(11):4708-4713.
- 31) Lea, R. G. & Sandra, O. (2007). Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction* 134: 389–404.
- 32) LeBlanc M.M (2003). Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. *International Veterinary Information Service*. En [http://www.ivis.org/advances/Reproduction\\_Ball/leblanc/ivis.pdf](http://www.ivis.org/advances/Reproduction_Ball/leblanc/ivis.pdf)
- 33) LeBlanc, M.M & Causey, R.C. (2009). Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reproduction Domestic Animals*. 44(3): 1-13
- 34) Loachin, E. (2005) Immunohistochemical tumour markers in endometrial carcinoma. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 26: 363-371
- 35) Liu, I.K.M & Troedsson, M.H.T. (2008): The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. *Theriogenology* 70: 415-420
- 36) Magno, W., Hirschfield, L., Bhuiya, T., Harrison, G., Mir, R. (1992). Correlation of proliferative index (PCNA reactivity and Ki-67 reactivity) in primary breast carcinoma with hormone status, lymph node status, and disease-free survival. *Connecticut Medicine* 56: 667-669

- 37) McDonald, L.E (1978). *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*". Interamericana de ediciones. 2ª ed. Georgia-EEUU. pp 294-339
- 38) McDowell, KJ., Adams, MH., Adam, CY. & Simpson, KS. (1999) Changes in equine endometrial oestrogen receptor and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treat with exogenous steroids. *Journal of Reproduction and Fertility*. 117: 135–142
- 39) Moroni, P., Pisoni, G., Savoini, G., Van Lier, E., Acuña, S., Damián, J.P & Meikle, A. (2007) Influence of Estrus of Dairy Goats on Somatic Cell Count, Milk Traits, and Sex Steroid Receptors in the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* 90: 790–797
- 40) Neely, D.P., Liu, I.K.M., Hillman, R.B. (1991). *Reproducción equine*. Ed. Agropecuaria Hemisferio del Sur S.R.L Montevideo- Uruguay. pp 2-21
- 41) Peterson, F.B., McFeely, R.A. and David, J.S.E. (1969). Studies on the pathogenesis of endometritis in the mare. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*. pp. 279–282
- 42) Rajaram, RD., Brisken, C. (2012) Paracrine signaling by progesterone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 357: 80–90.
- 43) Re, G., Badino, P., Novelli, A., Di Renzo, GF., Severino, L., De Liguoro, M.& Ferone, MR. (1995). Distribution of cytosolic oestrogen and progesterone receptors in the genital tract of the mare. *Research in Veterinary Science* 59: 214-218.
- 44) Redolatti, C., Herrera, M., Marinone, A., Acuña, S., Tasende, C., Fumuso E. (2010). Receptores de estrogenos alfa en celulas inmunitarias del endometrio equino. 2ª Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal- INTRA. Argentina.
- 45) Robinson, R., Mann, G., Lamming, G. & Wathes, D. (2001) Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 122: 965-979
- 46) Roscanini, A.S., Merlo, WA., Acuarone, T., Macció, OA. (2000) Correlación de muestras citológicas y biopsias en el endometrio de yeguas como herramienta para el diagnóstico de aptitud reproductiva: resultados preliminares. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*. Universidad Nacional Del Nordeste.
- 47) Samper, JC. (2008). Introduction of estrus and ovulation: Why some mare respond and others not. *Theriogenology* 70: 445-447

- 48) Sharma, S., Dhaliwal, G.S. & Dadarwal D. (2010) Reproductive efficiency of Thoroughbred mares under Indian subtropical conditions: A retrospective survey over 7 years. *Animal Reproduction Science* 117: 241–248
- 49) Schaffler, DH. (2007). Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques. *Theriogenology*. 68(3): 413-422
- 50) Schuberth, HJ., Taylor, U., Zerbe, H. (2008). Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology* 70: 1174–1181
- 51) Sosa, C., Lozano, JM., Viñoles, C., Acuña, S., Abecia, JA., Forcada, F., Forsberg, M., Meikle, A. (2004) Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Animal Reproduction Sciences*. 84 (3-4): 337-48
- 52) Spencer, T. & Bazer, F. (1995) Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Molecular Biology Reports* 53:1527–1543.
- 53) Spencer, TE. & Bazer, FW. (2004) Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2: 49.
- 54) Stygar, D., Wang, N., Sjernholm, Y., Ekman, G., Eriksson, H., Sahlin, L. (2001). Co-localization of estrogen receptor  $\beta$  and leukocyte markers in the human cervix. *Molecular human reproduction* 7: 881-886.
- 55) Sukjumlom, S., Dalin, A., Sahlin, L., & Persson, E. (2005). Immunohistochemical studies on the progesterone receptor (PR) in the sow uterus during the oestrous cycle and in inseminated sows at oestrus and early pregnancy. *Reproduction* 129: 349-59.
- 56) Summerfield, NJ., Watson, ED. (1998). Endometrial macrophage populations in genitally normal mares at oestrus and dioestrus and in mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*. 30: 79-81.
- 57) Thatcher, WW., Guzeloglu, A., Meikle, A., Kamimura, S., Bilby, T., Kowalski, AA., Badinga, L., Pershing, R., Bartolome, J., & Santos, JEP., (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction Supplement* 61: 253–266.
- 58) Tomanelli, RN., Sertich, PL., Watson, ED. (1991). Soluble oestrogen and progesterone receptors in the endometrium of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* 44:267-73
- 59) Townson, DH., Pierson, RA. & Ginther, OJ. (1989) Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. *Theriogenology* 32: 197-204

- 60) Tsai, M.J. & O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry* 63:451-486
- 61) VanCamp, SD. (1988). Endometrial biopsy in the mare. A review and update. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 4(2): 229-245
- 62) Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W., Coryn, M. & Simoens, P. (2002) Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in the canine uterine tube and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reproduction, Fertility and Development*. 14:241-250
- 63) Watson ED, Skolnik SB & Zanecosky HG (1992) Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology* 38: 575–580.
- 64) Watson, E.D. & Dixon, C.E. (1993) An immunohistological study of MHC class II expression and T lymphocytes in the endometrium of the mare. *Equine Veterinary Journal* 25: 120-4.
- 65) Watson, E. & Thomson, R. (1996). Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal* 28: 106-110.
- 66) Weems, CW., Weems, YS., Randel, RD. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary Journal* 171: 206-228.
- 67) Wira, C., Fahey, J., Ghosh, M., Patel, MK., 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. *American Journal Of Reproductive Immunology*. 63: 544-565.