

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA EN EL ENDOMETRIO DE YEGUAS
RESISTENTES A ENDOMETRITIS: VÍNCULO INMUNO-ENDÓCRINO**

por

María José NÚÑEZ PINTADO

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

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: _____
nombre completo y firma

Segundo miembro (Tutor): _____
nombre completo y firma

Tercer miembro: _____
nombre completo y firma

Fecha: _____

Autores: _____
nombre completo y firma

nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente financiado por la Comisión de Investigación y desarrollo Científico (CIDEDEC, Facultad de Veterinaria, Montevideo-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 la 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 su apoyo en la orientación bibliográfica y en particular por la participación en el entrenamiento de la identificación de las células inmunes.

A funcionarios docentes y no docentes del Área de Bioquímica de Facultad de Veterinaria. A los preparadores del área, el Sr. Rafael Sauto y a la Sra. Perla Rubianes, que colaboraron de forma desinteresada para la realización de esta tesis.

A la Dra. Manuela Cilintano quien participó como evaluadora par de las biopsias, por formar parte de la discusión de la información generada siendo así una actora fundamental en la generación del trabajo que hoy presento.

A mi familia y amigos, quienes brindaron su apoyo desde un principio

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	3
Este estudio fue parcialmente financiado por la Comisión de Investigación y desarrollo Científico (CIDEAC, Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay).	3
LISTA DE FIGURAS, IMÁGENES Y GRÁFICOS.....	5
1. RESUMEN	6
2. SUMMARY.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
3.1 RELEVANCIA DEL TEMA EN EL URUGUAY.....	8
3.2 FUNCIÓN Y ESTRUCTURA UTERINA	8
3.3 CONTROL ENDÓCRINO DEL CICLO ESTRAL DE LA YEGUA.....	9
3.4 RECEPTORES A HORMONAS ESTEROIDEAS SEXUALES	11
3.5 SISTEMA INMUNE EN ENDOMETRIO Y SU VÍNCULO CON LAS HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES	13
4. ANTECEDENTES DEL EXPERIMENTO.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
5.1 OBJETIVOS GENERALES.....	17
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
6. HIPÓTESIS.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
7.1 ANIMALES Y MANEJO.....	17
7.2 BIOPSIAS ENDOMETRIALES.....	18
7.3 DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA PLASMÁTICA.....	19
7.4 DETERMINACIÓN DE RE α	20
7.5 ANÁLISIS DE IMAGEN.....	20
7.5.1 EVALUACIÓN DE RE α EN TEJIDO ENDOMETRIAL.....	20
7.5.2 EVALUACIÓN DE RE α EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE DEL ENDOMETRIO.....	21
7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
8. RESULTADOS.....	22
8.1 NIVELES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA.....	22
8.2 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA.....	22
8.2.1 OBSERVACIONES GENERALES.....	22
8.2.2 INMUNOMARCADO A RE α EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL	24
8.2.3 DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL DE PMN, L Y M.....	27
9. DISCUSIÓN.....	31
9.1 DISTRIBUCIÓN DE RE α EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL	31
9.2 DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL PMN, L&M.....	33
10. CONCLUSIONES.....	37
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE FIGURAS, IMÁGENES Y GRÁFICOS

AGRADECIMIENTOS.....	3
Este estudio fue parcialmente financiado por la Comisión de Investigación y desarrollo Científico (CIDEC, Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay).	3
LISTA DE FIGURAS, IMÁGENES Y GRÁFICOS.....	5
1. RESUMEN	6
2. SUMMARY.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
3.1 RELEVANCIA DEL TEMA EN EL URUGUAY.....	8
3.2 FUNCIÓN Y ESTRUCTURA UTERINA	8
3.3 CONTROL ENDÓCRINO DEL CICLO ESTRAL DE LA YEGUA.....	9
3.4 RECEPTORES A HORMONAS ESTEROIDEAS SEXUALES	11
3.5 SISTEMA INMUNE EN ENDOMETRIO Y SU VÍNCULO CON LAS HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES	13
4. ANTECEDENTES DEL EXPERIMENTO.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
5.1 OBJETIVOS GENERALES.....	17
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
6. HIPÓTESIS.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
7.1 ANIMALES Y MANEJO.....	17
7.2 BIOPSIAS ENDOMETRIALES.....	18
7.3 DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA PLASMÁTICA.....	19
7.4 DETERMINACIÓN DE RE α	20
7.5 ANÁLISIS DE IMAGEN.....	20
7.5.1 EVALUACIÓN DE RE α EN TEJIDO ENDOMETRIAL.....	20
7.5.2 EVALUACIÓN DE RE α EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE DEL ENDOMETRIO.....	21
7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
8. RESULTADOS.....	22
8.1 NIVELES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA.....	22
8.2 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA.....	22
8.2.1 OBSERVACIONES GENERALES.....	22
8.2.2 INMUNOMARCADO A RE α EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL	24
8.2.3 DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL DE PMN, L Y M.....	27
9. DISCUSIÓN.....	31
9.1 DISTRIBUCIÓN DE RE α EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL	31
9.2 DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL PMN, L&M.....	33
10. CONCLUSIONES.....	37
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. RESUMEN

Se caracterizó la presencia, contenido y distribución de receptores de estrógenos alfa ($RE\alpha$) en tejido endometrial y en células del sistema inmune en endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis ciclando. Se tomaron biopsias endometriales y muestras de sangre de siete yeguas al inicio de la fase folicular (Es), a las 24 horas post ovulación (D24hPOv) y al día 7 de la misma (D7POv). Las concentraciones de progesterona plasmática (P), fueron determinadas por radioinmunoanálisis. La presencia de $RE\alpha$ fue estudiada por inmunohistoquímica en epitelio luminal (EL) y glandular (EG), estrato compacto (EC) y en tejido conjuntivo interglandular (CiG). Se evaluó la presencia de $RE\alpha$ en leucocitos mononucleares: linfocitos y macrófagos (L&M) y polimorfonucleares (PMN) presentes en: EL, EC y estrato esponjoso (EE, en conjunto: EG + CiG). El análisis estadístico se hizo con un modelo mixto de ANOVA. La concentración de P, fue mayor al día D7POv en relación a los días Es y D24hPOv y similar entre Es y D24hPOv. El inmunomarcado a $RE\alpha$ en EL y EG a los días Es fue similar al hallado al día D7POv y mayor al día D24hPOv en relación al día D7POv. En EC, el inmunomarcado fue similar en todos los días. En CiG, el inmunomarcado disminuyó desde Es hacia el D7POv. Fue detectado inmunomarcado a $RE\alpha$ en PMN, L y M. A los días Es y D7POv la cantidad de L&M inmunomarcados a $RE\alpha$ tendió a ser mayor en EE que en EL. La cantidad de PMN positivos a $RE\alpha$, fue mayor al día Es que al día D7POv. El similar inmunomarcado a $RE\alpha$ hallado en EL y EG a los días Es sugiere que los mayores niveles de P de la fase luteal previa al inicio de la nueva fase folicular mantuvo el efecto inhibitorio sobre $RE\alpha$. El mayor inmunomarcado encontrado en EL, EG y CiG al día D24hPOv en relación al día D7POv sugiere que el estímulo estrogénico de la fase folicular se mantuvo incluso hasta 24 horas post ovulación y que el mayor nivel de P hallado al D7POv tuvo un efecto inhibitorio sobre la expresión de $RE\alpha$. La expresión diferencial de $RE\alpha$ hallada en el tejido endometrial, podría estar asociada a la regulación de la función celular por los estrógenos. El perfil de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares positivos a $RE\alpha$, sugiere que la P moduló la cantidad y distribución de células del sistema inmune y tuvo un efecto inhibitorio sobre la expresión de $RE\alpha$ en PMN Y L&M. El inmunomarcado a $RE\alpha$ en leucocitos mononucleares y polimorfonucleares sugiere un vínculo entre los estrógenos y el sistema inmune que podría ser mediado por $RE\alpha$.

2. SUMMARY

We evaluated the presence, content and distribution of alpha estrogen receptors (ER α) in endometrium tissue and immune cells of the endometrium in cyclic healthy mares resistant to endometritis. Endometrial biopsies and blood samples were taken from seven mares at the beginning of follicular phase, at 24 hours post ovulation (D24hPOv) and 7 days post ovulation (D7POv). Plasma progesterone concentrations (P) were determined by radioimmunoassay. The ER α was studied by immunohistochemistry in luminal (LE) and glandular (GE) epitheliums; stratum compactum (SC) and interglandular tissues (CiG). The presence of ER α in polymorphs (PMN) and mononuclear (lymphocytes and macrophages, L&M) cells were evaluated in: LE, SC and spongy tissue (EE, GE + CiG). Statistical analysis was performed with a mixed ANOVA model. Progesterone concentration was higher on day D7POv than on Es and D24hPOv and similar between Es and D24hPOv. The ER α immunostaining in LE and GE was similar between D7POv and days, in CiG decreased from Es at D7POv on Es was similar to those found on D7POv and higher on D24hPOv related to D7POv. Immunostaining in SC was similar every day. Immunostaining diminished in CiG from Es towards D7POv. Immunostaining to ER α was detected in PMN; L and M on days Es and D7POv the quantity of immunostained L&M to ER α tended to be higher in EE than in LE. PMN positives to ER α , were higher on Es than in D7POv. The ER α immunomarker similar found in LE and GE on Es days, suggest higher P levels in luteal phase previous to follicular phase maintained the inhibitory effect on ER α . The higher immunomarker found in LE; GE; and CiG on D24hPOv related to D7POv suggest that follicular phase oestrogen stimulation was maintained up to 24 hours post ovulation and that P higher level found on D7POv had an inhibitory effect on the ER α expression. The differential ER α expression found in endometrial tissue may be associated with the regulation of cells function by estrogen. The profile of PMN and L&M positive to ER α suggests that P modulated the amount and distribution of immune system and had an inhibitory effect on the expression of ER α . The immunolabeling to RE α in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes suggests a link between estrogen and the immune system that could be mediated by ER α .

3. INTRODUCCIÓN

3.1 RELEVANCIA DEL TEMA EN EL URUGUAY

El sector equino uruguayo clasifica a los animales en función del uso al que son destinados. Sus principales destinos son deportes ecuestres, agro y turismo (Ferrari et al., 2012). Tanto en Uruguay como en el resto del mundo, los equinos han sido seleccionados para tales actividades y escasamente por aspectos productivos o reproductivos (Engelken, 1999). A la fecha, en Uruguay existen solamente tres establecimientos habilitados para la faena de equinos. En 2012, la faena de equinos fue de 39.867 cabezas, mientras que en igual período, la faena de vacunos fue 1.807.743 cabezas. Durante 2012, las toneladas de carne exportada por Uruguay fueron: 226.597 vacunas, 11.076 ovinas, y 13.172 aves, 6.132 equina (<http://www.inac.gub.uy>). De esta información se desprende que la explotación equina en Uruguay es sensiblemente menos relevante que la de otras especies domésticas.

Varias características reproductivas de la yegua explican la poca explotación del sector equino. Es la especie menos eficiente desde el punto de vista reproductivo, en relación con las otras especies domésticas. La pubertad de la yegua ocurre entre el primer y segundo año, sus primeros celos suelen ser anovulatorios y tiene una gestación de 11 meses por lo cual no se puede obtener una cría hasta los tres años aproximadamente (Sharma y col., 2010; Aurich, 2011). A favor de la ineficiencia reproductiva, las yeguas presentan tasas de aborto por gestación gemelar alrededor de un 90% y alta susceptibilidad a endometritis post coital causante de grandes pérdidas reproductivas y por tanto económicas (Zent y col., 1998; Coutinho da Silva, 2008).

Hasta el presente, en Uruguay, ha sido documentado en yeguas, un solo estudio vinculado a aspectos endócrinos-reproductivos. Yeguas ciclando fueron tratadas con iodopovidona en forma intrauterina para evaluar los cambios provocados por el tratamiento sobre la expresión de receptores esteroides en el endometrio (Kalpokas et al., 2010). Más estudios, son necesarios a fin de fomentar la importancia de la reproducción equina en nuestro país y desarrollar un futuro polo de investigación local, cumpliendo así con los pilares de docencia, investigación y extensión que rigen a la Universidad de la República.

3.2 FUNCIÓN Y ESTRUCTURA UTERINA

El útero está formado principalmente por dos capas de tejido muscular liso (miometrio) y una mucosa que se proyecta hacia la luz uterina denominada endometrio (Bacha W. & Bacha L.M., 2001). El útero sufre una diferenciación, regida por las hormonas esteroides ováricas entre otras, quedando apto para aceptar selectivamente el blastocisto permitiendo así la implantación (Hafez, 2002). Éste

sufre transformaciones citológicas y vasculares que le permiten proporcionar sustento al embrión durante la preñez, participando de la recepción del blastocisto, su implantación y nutrición, así como la formación de la parte materna de la placenta (Bloom & Fawcett, 1995). Además, el endometrio se encuentra asociado a tejido linfóide, el cual está bajo la influencia de los cambios en los niveles plasmáticos de estrógenos y progesterona y que afectan a las poblaciones leucocitarias (Schuberth et al., 2008).

El epitelio luminal del endometrio, es columnar durante la fase folicular y cuboidal durante la fase luteal (Hafez, 2002). El epitelio luminal se continúa con la lámina propia del tejido conjuntivo subyacente, que a su vez suele subdividirse en tejido conjuntivo denso (estrato compacto) y en tejido conjuntivo menos denso que junto con el epitelio glandular componen al estrato esponjoso (Van camp, 1988). En la yegua es frecuente encontrar espermatozoides agregados a las glándulas endometriales, pero se desconoce la importancia fisiológica e inmunológica de este fenómeno (Hafez, 2002).

Los estrógenos y la progesterona ejercen poderosas acciones sobre la estructura y función del endometrio (Graham & Clarke 1997). Durante la fase folicular (cuando los estrógenos están elevados), las glándulas endometriales son relativamente rectas y es normal observar células con gran actividad mitótica. Hacia el final de la fase folicular, las glándulas aumentan progresivamente de longitud, haciéndose más sinuosas y sus células comienzan a acumular glucógeno (Bacha W. & Bacha L.M., 2001). En la fase luteal, ocurre un engrosamiento de la mucosa endometrial, debido al aumento del edema del estroma y la acumulación de secreción en las glándulas que se hacen más arrolladas y tortuosas a medida que aumentan los niveles de progesterona (Blanchard et al., 2003). En la preñez temprana, durante los primeros días que el blastocisto se une al endometrio, las células conjuntivas del estroma fusiformes se transforman en grandes células deciduales pálidas que contienen en su citoplasma abundante glucógeno y lípidos (Bloom & Fawcett, 1995). Al día 35 de la gestación aparecen las copas endometriales, que son responsables de secretar gonadotropina coriónica equina, encargada de la formación del cuerpo lúteo suplementario y mantener el resto de la preñez (Blanchard et al., 2003).

Cuando el endometrio equino está alterado por patologías tales como endometritis, se ve afectado el normal desarrollo de la gestación, dado que el trofoblasto en yeguas es no invasivo y las secreciones uterinas son esenciales para el mantenimiento, crecimiento y supervivencia del embrión (Arthur, 1991; Hafez, 2002). Por otro lado, 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 (Roscanini et al., 2000). En tal sentido, Kenny & Doig (1986) propusieron un sistema para la interpretación pronóstica de preñez en yeguas, de acuerdo al estatus endometrial basado en cuatro categorías histopatológicas, clasificadas según el grado de alteraciones tisulares.

3.3 CONTROL ENDÓCRINO DEL CICLO ESTRAL DE LA YEGUA

La yegua es reproductora poliéstrica estacional, con actividad sexual cíclica desde la primavera al otoño (Neely, 1991; Davies, 2005; Aurich, 2011). Cuando se incrementa

la cantidad de horas de luz, la GnRH hipotalámica promueve la liberación de FSH y LH que controlan el desarrollo folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo durante el ciclo estral (Neely, 1991; Arthur, 1991). Durante el ciclo, la FSH tiene dos picos plasmáticos: uno asociado al pico de LH y otro hacia la mitad del diestro, el cual prepararía la nueva generación de folículos del siguiente celo (Blanchard et al., 2003; Aurich, 2011).

En la yegua, el ciclo estral dura 22 días promedio, de los cuales cinco a diez días corresponden al celo o fase folicular, caracterizada por receptividad a la monta, relajación del cérvix, presencia de un folículo ovárico dominante, edema endometrial y elevadas concentraciones de estrógenos plasmáticos. Posteriormente, presenta una fase luteal, de 15 a 17 días caracterizada por estrechamiento cervical, rechazo a la monta y elevados niveles de progesterona plasmática (Neely, 1991; Samper, 2008)

Al comienzo de la fase folicular, el diámetro de los folículos ováricos es 10 a 30 mm y el folículo dominante puede alcanzar un diámetro de 70 mm al momento de la ovulación (Neely, 1991; Aurich, 2011). El aumento del tamaño folicular está relacionado con un aumento en la concentración de estrógenos plasmáticos de origen teçal. Poco antes del pico preovulatorio de LH, hay un pico de estrógenos, el cual a su vez produce una retroalimentación positiva sobre la liberación de LH, responsable de la ovulación (Aurich, 2011). Las concentraciones plasmáticas de estrógenos, son máximas entre los dos días antes y los dos días después de la ovulación, la cual ocurre entre 24 a 48 horas antes de finalizar el celo (Arthur, 1991; Aurich, 2011). El aumento de la LH, estimula a las células de la granulosa a producir progesterona y al desarrollo del cuerpo lúteo en la cavidad del folículo colapsado. Este evento marca el final del celo y el inicio de la fase luteal, que comienza con niveles plasmáticos basales de progesterona de 2,5 ng/mL aproximadamente, entre los días dos y tres de la ovulación, alcanzando picos máximos de 11 ng/mL aproximadamente entre los días seis y siete 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 de progesterona se mantienen relativamente constantes hasta el día 15 de la ovulación, momento en que ocurre la luteólisis, debido a la secreción endometrial de prostaglandina F2 alfa, en caso que la yegua no resulte preñada (Arthur, 1991). Al inicio y final de la estación reproductiva, los celos suelen ser irregulares, sin embargo son regulares en la mitad de la misma (Aurich, 2011).

En la Figura 1, se representan los eventos endócrinos más relevantes del ciclo estral de la yegua.

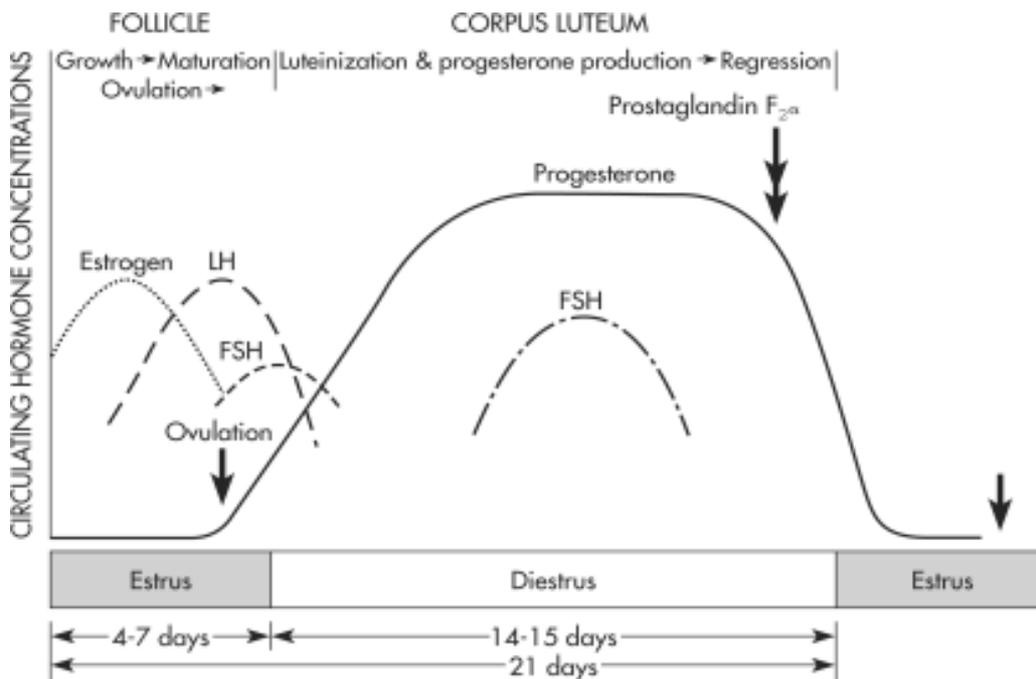


Figura 1: Perfiles plasmáticos de FSH, LH, estrógenos y progesterona y momento de acción de la PGF_{2α} durante el ciclo estral de las yeguas en asociación con la actividad cíclica ovárica (Tomado de Blanchard et al., 2003).

3.4 RECEPTORES A HORMONAS ESTEROIDEAS SEXUALES

La capacidad de respuesta de los tejidos a la acción de estrógenos y progesterona, depende de la concentración plasmática de éstas y de la presencia, distribución y cantidad de proteínas receptoras específicas (RE y RP respectivamente), (Clark et al., 1992). 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). Para RE, se han identificado dos isoformas: RE α y RE β , codificados por diferentes genes (Kuiper et al., 1997). La isoforma α es la 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 et al., 1993). Las dos isoformas, presentan 96 % de homología en la composición de aminoácidos, entre las regiones DBD (dominio de unión al ADN) y LBD (dominio de unión al ligando) existe una similitud del 53 % y además cada uno de ellos tiene una afinidad diferente por sus ligandos (Pérez-Rivero et al., 2005). Para RP han sido identificadas las isoformas A y B que se expresan a partir de un mismo gen (Ing et al., 1993; Graham & Clarke, 1997). Tanto RE como RP pueden actuar como factores de transcripción (Tsai & O'Malley, 1994). El complejo hormona-receptor, interacciona con los factores de transcripción para estabilizar a la ARN polimerasa II, que fosforila el dominio carboxilo terminal y

finalmente se lleva a cabo la transcripción genética (Pérez-Rivero et al., 2005). Los receptores a hormonas esteroideas se encuentran en el núcleo celular y debido a la naturaleza lipídica de las hormonas esteroideas, éstas atraviesan las membranas celulares encontrando a su receptor en el núcleo. La unión de la hormona con su receptor provoca la transcripción de genes específicos, que en un proceso de traducción posterior resultará en una acción genómica, como por ejemplo la síntesis de proteínas (Flint et al., 2002). En la Figura 2, se esquematiza el mecanismo general de acción de las hormonas esteroideas.

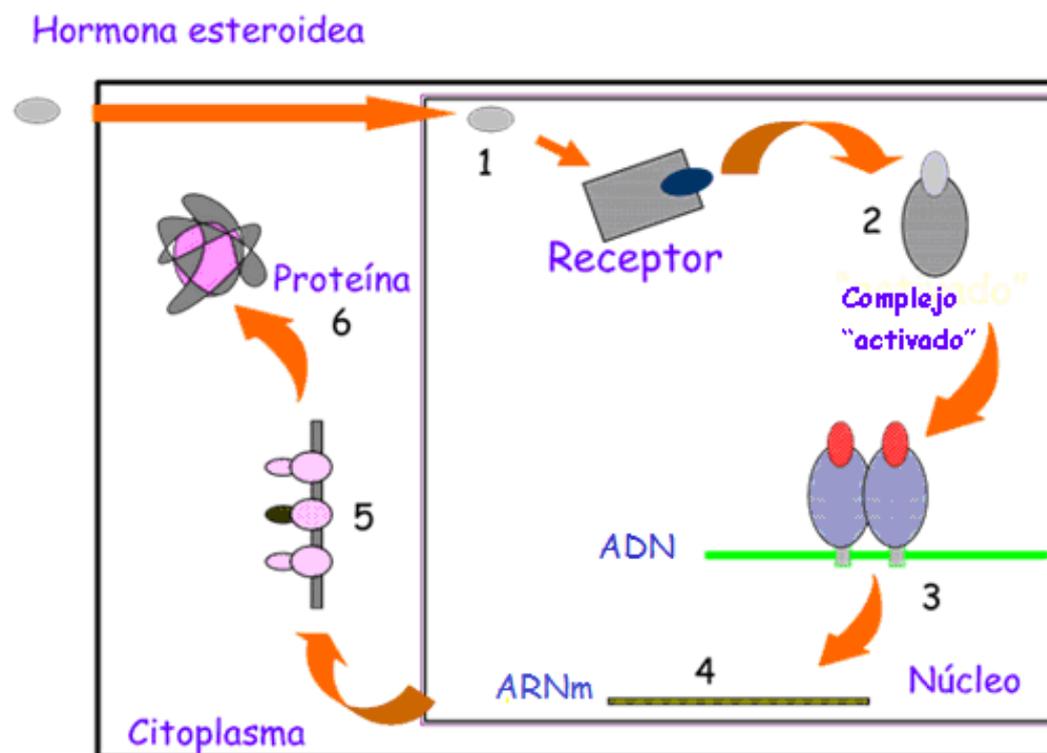


Figura 2: Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas, la hormona atraviesa la membrana plasmática y nuclear de la célula diana (1). En el núcleo la hormona se une a su receptor activándolo (2) para luego dimerizar y fijarse al ADN (3) y puede actuar como factor de transcripción modulando la síntesis de ARNm (4), que induce o reprime la síntesis de nuevas proteínas (5), provocando una acción fisiológica (6).

Investigaciones realizadas en endometrio de vacas (Boos et al., 1996, Robinson 2001), ovejas (Cherny et al., 1991, Spencer & Bazer, 1995), cerdas (Sukjumlong et al., 1995) y perras (Vermeirsh et al., 2002) ciclando, concluyeron que los mayores niveles de estrógenos plasmáticos durante la fase folicular estimulan la expresión de RE y RP, mientras que mayores niveles de progesterona de la fase luteal inhiben la expresión de ambos receptores. En general, las evidencias son consistentes en relación a la regulación positiva en la expresión de RE debido a la acción de los estrógenos y una regulación negativa por la progesterona (Clark & O'Malley, 1992). En yeguas ciclando, aún hay reportes discordantes en tal sentido, tal vez debido a las técnicas utilizadas para determinar la expresión de RE y a los días del ciclo estral

utilizados en el muestreo. Tomanelli et al., (1991), reportaron en yeguas ciclando mayor concentración de sitios de unión a RE realizando estudios de unión hormona-receptor con hormonas radioactivas (Binding) en estro, que en diestro temprano, mientras que Re et al., (1995) no encontraron ninguna diferencia en la concentración uterina de RE entre estro y diestro. Mediante ensayos de inmunohistoquímica la inmunotinción de células epiteliales del endometrio equino no reveló diferencias en la cantidad de RE entre estro y mitad del diestro (Watson et al., 1992). Aupperle et al., (2000) reportaron que la expresión de RE en epitelio glandular del endometrio fue mayor al día cinco que al día 13 de la ovulación. Posteriormente Hartt et al., (2005) a través de hibridación in situ e inmunohistoquímica reportaron que el RE α no se expresó en epitelio luminal durante el diestro, pero si hubo mayor expresión de RE α en células del estroma y epitelio glandular al momento de la ovulación y al día 20 posterior a la ovulación, comparado con los días 11 y 14 posteriores a la ovulación. Interessantemente, en yeguas con endometriosis se observó menor expresión de RE en las células del estroma fibrótico en comparación con un estroma sin alteraciones, sugiriendo un rol de RE en la salud endometrial (Hoffmann et al., 2009)

Caracterizar la distribución tisular de RE α endometrial, utilizando la técnica de inmunolocalización como la inmunohistoquímica con el sistema avidina-biotina-peroxidasa, 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.

3.5 SISTEMA INMUNE EN ENDOMETRIO Y SU VÍNCULO CON LAS HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES

Durante la monta natural o inseminación artificial la contaminación del útero por bacterias y/o componentes del fluido seminal puede resultar en inflamación endometrial o endometritis (Troedsson et al., 2001). La inflamación es caracterizada por un influjo de leucocitos polimorfonucleares al endometrio, los cuales son responsables de la fagocitosis de bacterias y espermatozoides (Troedsson et al., 2001). Esta inflamación puede resolverse entre las primeras 36 a 48 horas post coito (Katila, 1995). Experimentalmente, con la inoculación intrauterina de semen inactivado o con *Streptococcus zooepidemicus* es posible caracterizar a las yeguas de acuerdo a la susceptibilidad o resistencia a la endometritis. Las yeguas que resuelven la inflamación en el plazo 36 a 48 horas, son consideradas como resistentes a endometritis, mientras que las yeguas que no la resuelven o su resolución se halla demorada, son consideradas como susceptibles a endometritis (Brinsko et al., 2003).

La vigilancia inmune del tracto genital de la hembra presenta barreras físicas y químicas que intentan mantener la homeostasis previniendo infecciones desde el ambiente externo. En especies donde el eyaculado se deposita en la vagina (rumiantes), el ambiente vaginal ofrece la primera defensa contra la posible contaminación (Scott, 2000). En la yegua, tanto en la monta natural como en la inseminación artificial, el semen es depositado en el útero por lo cual se desestima la vagina como primera barrera de defensa contra la contaminación post coital (Schubert et al., 2008). El estroma subyacente al epitelio luminal del endometrio

(estrato compacto) contiene células inmunes que presentan cambios temporales y espaciales durante el ciclo estral y preñez, de acuerdo a los niveles de progesterona y estrógenos plasmáticos. Esto es un indicador claro de la regulación que ejercen los esteroides sexuales sobre la cantidad y actividad de las células inmunes (Hunt et al., 1997; Wira et al., 2010). Estudios realizados en útero de ratona, demostraron que el número de macrófagos y neutrófilos aumentó alrededor del estro y disminuyó durante el diestro (Tibbets et al., 1997). Lo mismo sucedió en endometrio de ovejas, donde en fase folicular el número de linfocitos fue mayor que en fase luteal (Intan-Shameha et al., 2011). Además, en ratonas ovariectomizadas tratadas con progesterona o estrógenos, fue demostrado que la progesterona antagoniza la habilidad de los estrógenos para reclutar macrófagos y neutrófilos hacia el útero (Tibbets et al. 1997). En yeguas fértiles, los linfocitos y polimorfonucleares del útero, durante el estro, presentan mayor actividad fagocítica que en diestro (Liu & Troedsson, 2008). En endometrio de yeguas sin endometritis no fueron encontradas diferencias entre estro y diestro en la cantidad de linfocitos B, CD4⁺ y CD8⁺. Sin embargo, yeguas con endometritis presentaron al estro, mayores cantidades de linfocitos en relación con yeguas sin endometritis (Watson & Thomson, 1996). Similares resultados fueron reportados en la cantidad de macrófagos endometriales (Summerfield & Watson, 1998). Estudios en relación a la distribución tisular de polimorfonucleares y macrófagos en el endometrio, reportaron que la cantidad de éstos, fue afectada por la localización tisular, encontrándose mayor cantidad de ambos tipos celulares en estrato esponjoso que en estrato compacto y ausencia de estas células en el tejido epitelial, tanto en yeguas sanas como con endometritis (Summerfield & Watson, 1998).

En estudios con células precursoras de monocitos humanos, se determinó la presencia de RE α y RE β , observándose que en monocitos predomina el RE β y en macrófagos predomina el RE α (Mor et al., 2003). Paharkova et al., (2004) demostraron la presencia de RE α y RE β en células dendríticas de la médula ósea de murinos y que la diferenciación de dichas células fue inhibida en ausencia de estradiol y restaurada tras la administración de éstas. En sangre periférica humana, Phiel et al., (2005) demostraron la presencia de RE α en linfocitos T CD4⁺, RE β en linfocitos B y ambos receptores en linfocitos T CD8⁺.

En mujeres se plantea que la modulación de la respuesta inmune uterina, es debida a acciones estrógenicas pro-inflamatorias y acciones anti-inflamatorias de la progesterona, con efectos parácrinos en ovario y endócrinos en útero (Lea & Olivier, 2007). En el endometrio, los esteroides sexuales participan en la producción de citoquinas y prostaglandinas por células epiteliales, del estroma y células inmunes residentes (Wira et al., 2010). Los mismos autores afirman que los estrógenos y la progesterona tienen influencia sobre la migración de macrófagos, linfocitos B y T, factores quimiotácticos y moléculas de adhesión (2010). Además los esteroides sexuales influyen en la capacidad de las células epiteliales para responder a los microorganismos (Lea & Olivier, 2007). 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).

En yeguas, aún no han sido claramente establecidas las causas inmuno-endócrino-moleculares 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 (Blanchard, 2003).

El abordaje de la interacción inmuno-endócrina-celular en endometrio de 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 esta patología (McDowell et al. 1999, Hartt et al. 2005, Schaffler, 2007). La yegua es un modelo extrapolable al humano, para estudiar la reproducción asociada a parámetros inmuno-endócrinos, ya que ambas son mono-ovulatorias y tienen fase folicular larga. Esta especie tiene ventajas sobre otras especies en cuanto a la accesibilidad al tracto genital y como fuera ya mencionada la importancia diagnóstica de la biopsia endometrial (Ginther et al. 2009, Schaffler, 2007, Carnevale et al. 2008).

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

4. ANTECEDENTES DEL EXPERIMENTO

En el Área de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, en conjunto con el Departamento de Clínica de la Facultad de Veterinaria de Tandil-Argentina, se estudia desde 2007 la expresión de RE y RP en endometrio de yeguas. Se ha investigado la expresión endometrial de RE y RP en yeguas con endometritis y resistentes a endometritis, tratadas con un inmunomodulador (MCC-V) en forma intrauterina. La endometritis en las yeguas susceptibles fue provocada por la inoculación intrauterina de *Streptococcus zooepidemicus* al momento de detectado el estro. A las 48 horas post infección, la expresión endometrial de RE α en los epitelios y el tejido conjuntivo disminuyó. Estos hallazgos fueron contrarios a lo esperado, ya que conforme avanza la fase folicular, generalmente, la expresión endometrial de RE α aumenta. La disminución en la expresión de RE α podría deberse al efecto de la infección (Acuña et al., 2011). Las yeguas con endometritis ciclando, no presentaron variaciones cíclicas en la expresión endometrial de RE α (Acuña et al., 2011), mientras que las tratadas con el inmunomodulador resolvieron la endometritis y presentaron un aumento en la expresión de RE α en el epitelio glandular al diestro (Acuña et al., 2012). Los cambios en la expresión endometrial de RE α provocadas por la infección y el tratamiento con el inmunomodulador en las yeguas susceptibles a endometritis, permiten establecer un vínculo entre los RE α , la respuesta inflamatoria y la resolución de la infección. En las yeguas resistentes a endometritis ciclando, tratadas por el inmunomodulador, la expresión endometrial de RE α no fue modificada, lo cual sugiere que el tratamiento profiláctico con el inmunomodulador no altera la sensibilidad endometrial a estrógenos (Acuña et al., 2008). Posteriormente, en yeguas resistentes y susceptibles tratadas con MCC-V se evaluó la expresión de RE α en células del sistema inmune. Fue detectada tinción positiva a RE α en linfocitos, mononucleares y polimorfonucleares del endometrio, siendo al momento de detectado el estro, mayor la cantidad de mononucleares positivos a RE α en yeguas resistentes a endometritis que en yeguas susceptibles, lo cual podría estar vinculado a la condición de resistentes o susceptibles endometritis (Redolatti et al., 2010). En yeguas con endometritis, el tratamiento con un inmunomodulador aumentó la cantidad de polimorfonucleares positivos a RP en relación a las yeguas control sin tratamiento. Sin embargo, igual tratamiento con el inmunomodulador, disminuyó la cantidad de polimorfonucleares positivos RE α (Fumuso et al., 2012). Hasta el momento no ha sido caracterizada la expresión endometrial de RE α , ni la presencia de dicho receptor en las células del sistema inmune de yeguas sanas y resistentes a endometritis post coital ciclando, sin tratamientos con inmunomoduladores.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

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

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar la presencia y distribución tisular de RE α en el endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.

Evaluar la presencia y distribución de RE α en células del sistema inmune innato del endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.

6. HIPÓTESIS

La presencia y distribución de RE α en el tejido endometrial y en células del sistema inmune del endometrio de las yeguas resistentes a endometritis ciclando están moduladas por los niveles de progesterona plasmática.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

La selección de las yeguas se realizó durante la estación reproductiva, así como la obtención de biopsias endometriales y plasma sanguíneo fue realizada 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.

7.1 ANIMALES Y MANEJO

Yeguas tipo Criollo, ciclando, de 3 a 10 años y 330 a 500 Kg de peso fueron inseminadas artificialmente con semen inactivado luego de detectado el estro para evaluar la susceptibilidad a endometritis. Las yeguas que fueron capaces de eliminar el fluido 48 horas luego de la inseminación, presentaron citología exfoliativa y cultivo negativo fueron consideradas como yeguas resistentes a endometritis (n=7) (Brinsko et al., 2003). Las yeguas seleccionadas estaban sanas y libres de enfermedades sistémicas mientras se desarrolló el estudio.

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

La presencia de fluido uterino, edema en pared uterina, dinámica folicular y presencia de cuerpo lúteo determinaron el estado uterino y la actividad ovárica, los cuales fueron estudiadas a diario por ultrasonografía utilizando un ecógrafo veterinario Berger LC-2010 plus, con un transductor de 5 MHz.

El estro fue inducido por 2 inyecciones im de prostaglandina de 500 μ g (Estroplan[®], Clorprostenol sódico) con 14 días de diferencia. A través de palpación transrectal y

ultrasonografía se confirmó la presencia de cérvix dilatado acompañado de tono flácido uterino, edema endometrial, folículos ováricos dominante ≥ 30 mm con lo cual las yeguas fueron consideradas en fase folicular. Posteriormente, la ausencia del folículo dominante y presencia del cuerpo hemorrágico determinó la ovulación y declaró el inicio de la fase luteal.

7.2 BIOPSIAS ENDOMETRIALES

Las biopsias fueron tomadas del cuerpo uterino en las siete yeguas en forma repetida en la misma estación reproductiva, en tres momentos de un mismo ciclo estral. Posteriormente fueron colocadas en formol al 10 % durante 24 h y luego en etanol al 70 % hasta su procesamiento. Cuando el ensayo finalizó, las biopsias fueron incluidas en parafina, cortadas con microtomo a 5 μm de espesor y montadas en láminas de vidrio StarFrost®.

En el mismo momento en que fueron tomadas las biopsias, fueron extraídas también las muestras de sangre para la determinación de progesterona plasmática y registrado el estatus ovárico (medida del tamaño folicular) y uterino (edema, tono y pliegues). Las biopsias fueron teñidas con hematoxilina y eosina para evaluarlas de acuerdo con la escala de Kenney & Doig, (1986).

Clasificación Histopatológica de Kenney y Doig	
Categoría I:	El endometrio no presenta cambios patológicos (como inflamación ó fibrosis) y si los tiene son muy leves y esporádicos. No se encuadra dentro de esta categoría un endometrio hipoplásico ó atrófico.
Categoría II:	<p>Presencia de infiltrado inflamatorio difuso, de leve a moderado en el estrato compacto; ó focos inflamatorios dispersos pero frecuentes del estrato compacto y el esponjoso. Cambios fibróticos aislados, con grado variable de severidad (de 2 a 3 capas alrededor de nidos glandulares).Lagunas linfáticas palpables y atrofia endometrial parcial, tardía en la estación reproductiva fisiológica.</p> <p><i>Categoría IIA:</i> La presencia de uno de estos cambios ubica al endometrio estudiado en esta categoría.</p> <p><i>Categoría IIB:</i> En ella se incluyen las muestras con más de uno de estos cambios.</p>
Categoría III:	Inflamación severa difusa, generalizada; fibrosis peri glandular generalizada; lagunas linfáticas palpables e hipoplasia endometrial

En detalle, se tomaron biopsias endometriales y muestras de sangre en tres diferentes días:

1. al inicio de la fase folicular, con presencia de edema endometrial y folículo ovárico dominante ≥ 30 mm, (Es, n=7).
2. a las 24 h post ovulación, (D24hPOv, n=7).
3. al día 7 de la ovulación, (D7POv, n=7).

7.3 DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA PLASMÁTICA

La extracción de sangre fue realizada por veno-punción yugular y depositada en tubos Vacutainer™ heparinizados de 10 mL. Pasados 15 min de la extracción, la sangre fue centrifugada por 10 min a 2000 RPM. El plasma fue separado y almacenado a -20°C hasta la realización del radioinmunoanálisis en fase sólida. La sensibilidad del ensayo fue 0,1 ng/mL, el coeficiente de variación intra-ensayo fue 13 % para concentraciones entre 0,1 y 40 ng/mL.

7.4 DETERMINACIÓN DE RE α

Para evaluar la presencia y distribución de RE α 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 de Uruguay para diferentes tejidos y distintas especies (Sosa et al., 2004; Moroni et al., 2007; Acuña et al., 2008). Las secciones de biopsias, fueron pretratadas en microondas a 900 Wts de potencia, sumergidas en citrato de sodio 0,01 M, pH= 6,0 por 10 min, dejándose enfriar posteriormente durante 20 min. Después de un lavado con buffer (PBS 0,01 M, pH= 7,4) la actividad inespecífica de las peroxidases endógenas del tejido, fue bloqueada con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3 % en metanol por 10 min a temperatura ambiente. Las secciones fueron enjuagadas por 10 min en buffer PBS y posteriormente incubadas por 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente con suero de caballo (Vectastain ABC kit, Elite, cat # PK-6102; 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 RE α diluido en 1:25 PBS (anticuerpo monoclonal de ratón anti-bovino, ER C-311 cat# sc-787; Santa Cruz, CA, USA) por 60 min, en cámara húmeda. Los controles negativos se realizaron reemplazando el anticuerpo primario por 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 min con una solución de anticuerpo biotinilado anti-IgG de equino anti-ratón (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) diluida en suero de caballo 1:200, 2 enjuagadas nuevamente con buffer PBS y posteriormente incubadas por 60 min con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC kit, Elite; Vector). El sitio de unión del complejo enzimático fue visualizado por medio de 3,3' diaminobencidina en H₂O₂ (DAB kit, cat# sk-4100 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.

7.5 ANÁLISIS DE IMAGEN

7.5.1 EVALUACIÓN DE RE α EN TEJIDO ENDOMETRIAL

La presencia y distribución de RE α fue evaluada subjetivamente por dos observadores independientes, quienes no conocían la reseña del animal al momento de evaluar los preparados (método de doble ciego).

La presencia y cantidad de RE α 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 a 1000 x, para cada localización tisular.

El inmunomarcado a RE α fue clasificado como positivo o negativo de acuerdo a la presencia de DAB precipitado (coloración marrón) o contracoloración con hematoxilina (coloración azulada) en el núcleo celular. El inmunomarcado positivo a RE α 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 RE α (%T, incluye todas las localizaciones tisulares), se obtuvo multiplicando la proporción promedio de células inmunomarcadas en la biopsia por 10.

7.5.2 EVALUACIÓN DE RE α 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; Summerfield & Watson, 1998). Las fotografías fueron tomadas por el preparador del Área de Bioquímica quien tuvo un entrenamiento previo en relación a la estructura del endometrio equino, pero desconocía que se evaluarían células inmunes. En cada fotografía se contaron por separado la cantidad de leucocitos polimorfonucleares (PMN), linfocitos (L) y macrófagos (M) presentes. Éstos fueron clasificados como positivos o negativos a RE α . Fue contabilizada: la cantidad de PMN, L y M negativos a RE α (PMN-, L- y M-) y positivos a RE α (PMN+, L+ y M+) y sumadas ambas para determinar cantidad total de PMN, L & M (positivos más negativos a RE α , tPMN, tL y tM). La evaluación de las células inmunes fue realizada por los mismos observadores que evaluaron la presencia de RE α en el tejido endometrial. En el presente trabajo no fueron asociadas las cantidades de células inmunes residentes en el endometrio con las células propias del tejido endometrial.

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.

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las variables analizadas estadísticamente fueron: PI, %T, cantidad de células inmunes negativas o positivas a RE α y los niveles de progesterona plasmáticos.

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 progesterona se analizaron por ANOVA, considerando el efecto del momento del ciclo estral.

Para la presencia y distribución de RE α 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 RE α 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 de células inmunes se expresan como porcentajes. Éstas no se expresan en función de las células de sostén del tejido conjuntivo o epitelial. Se expresa en función de la cantidad total de lo contabilizado en el ensayo.

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.

8. 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 indicador de la acción de los estrógenos durante la fase folicular. Ninguna de las biopsias analizadas mostró signos de inflamación o cambios degenerativos. Se comprobó la ausencia de endometritis, endometriosis u otras lesiones tisulares. Todas las biopsias fueron categorizadas con escala I de acuerdo a Kenney & Doig, (1986).

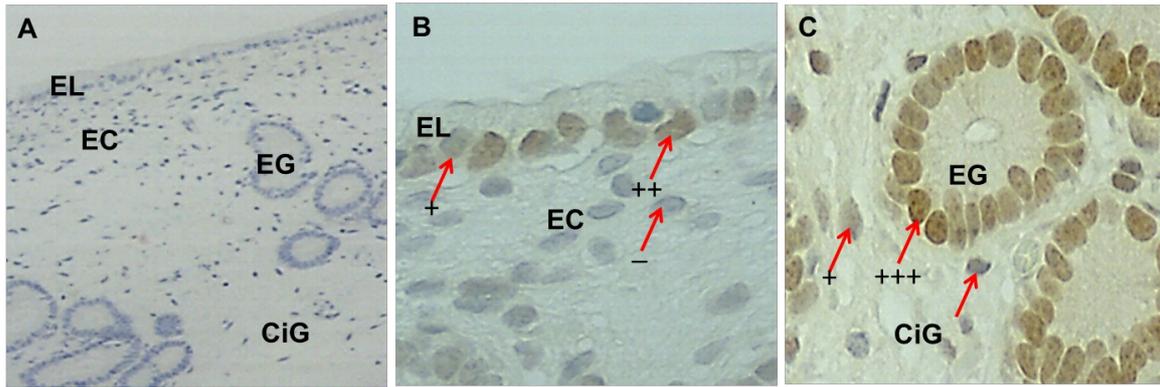
8.1 NIVELES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA

La concentración de progesterona plasmática, fue mayor al D7POv en relación a los días Es y D24hPOv ($P < 0,001$) y similar entre Es y D24hPOv ($P = 0,796$). Las concentraciones (ng/mL, media de los mínimos cuadrados \pm error estándar), fueron: $0,12 \pm 0,01$; $0,54 \pm 0,10$ y $9,01 \pm 1,18$, para los días Es, D24hPOv y D7POv respectivamente.

8.2 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA

8.2.1 OBSERVACIONES GENERALES

El inmunomarcado a RE α fue observado en forma específica en el núcleo celular. En los controles negativos no fue observado inmunomarcado específico a RE α . La ausencia de tinción específica en los controles negativos, cuando el anticuerpo monoclonal específico para RE α fue sustituido por IgG de ratón no inmunomarcada, demostró especificidad para RE α . Los núcleos celulares inmunomarcados a RE α mostraron diferentes grados de intensidad de tinción, por lo cual fue posible su clasificación en leves, moderados e intensos, tal como se había previsto. En la Imagen 1 se muestran ejemplos de controles negativos (foto A) y positivos (fotos B y C) donde se señalan las diferentes localizaciones tisulares evaluadas, así como la clasificación de acuerdo a la intensidad de inmunomarcado.



±+
CiG

Imagen 1: Localización de REα en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.

Foto A: ejemplo del control negativo (100 x), fotos B y C: ejemplos de muestras positivas a REα (400 x). Localizaciones tisulares: epitelio luminal (EL) estrato compacto (EC), epitelio glandular (EG) y tejido conjuntivo interglandular (CiG). Clasificación de intensidad de inmunomarcado a REα: núcleos negativos a REα (-), núcleos positivos leves (+), moderados (++) e intensos (+++).

±+
CiG

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

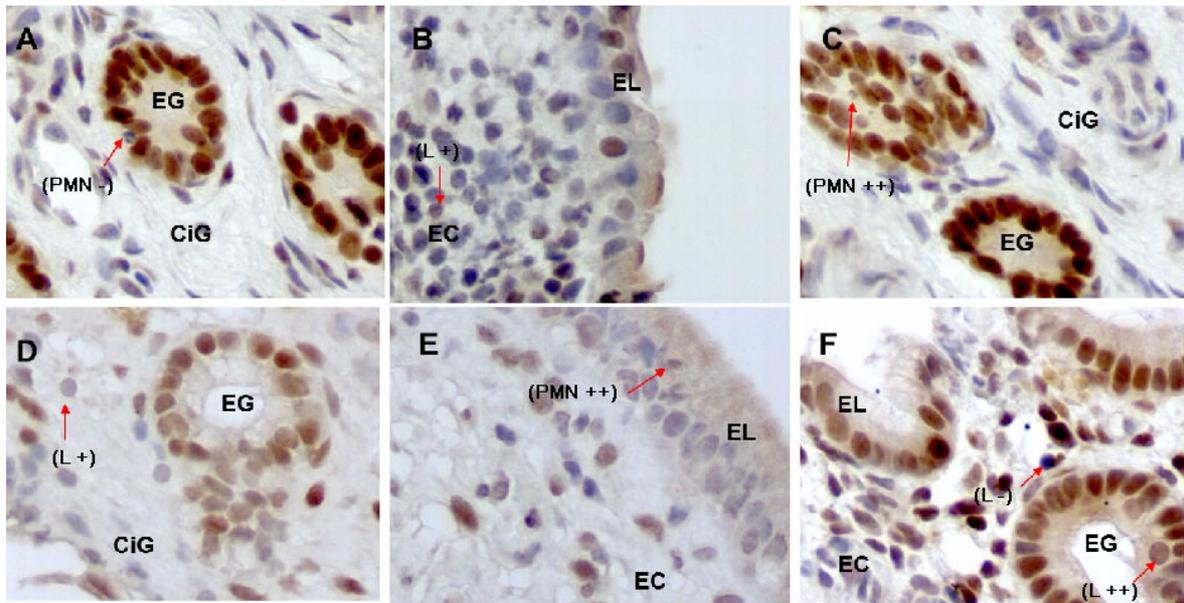


Imagen 2: **Localización de PMN, L y M positivos o negativos a RE α en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando.** Foto A: se señala un posible PMN negativo a RE α (PMN-) en EG. Foto B: se señala un posible linfocito con tinción a RE α leve (L+) en EC. Foto C: se señala un posible PMN con tinción a RE α moderada (PMN++) en EG. Foto D: se señala un posible L con tinción a RE α leve (L+) en CiG. Foto E: se señala un posible PMN con tinción a RE α moderada (PMN++) en el EL. Foto F se señala posible L con tinción a RE α moderada (L++) en EG y otro negativo a RE α (L-) en EC. Fotografías tomadas a 400 x.

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

8.2.2 INMUNOMARCADO A RE α EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL

Sobre el porcentaje total de inmunomarcado a RE α (%T) no hubo efecto de observador ($P > 0,1$), ni de momento del ciclo estral, siendo similar durante el ciclo ($75,38 \pm 3,37$; $72,42 \pm 3,37$; $71,54 \pm 3,37$); Es, D24hPOv y D7POv respectivamente ($P = 0,42$).

Sobre el inmunomarcado a RE α , en las diferentes localizaciones tisulares evaluadas, expresado como promedio ponderado de intensidad de inmunomarcado (PI), no hubo efecto observador ($P = 0,11$) y fueron hallados efectos de momento del ciclo estral ($P < 0,0001$), localización tisular ($P < 0,0001$) y tendencia a ser diferente la interacción entre ambos ($P = 0,057$).

En todos los momentos del ciclo el PI fue menor en EL que en EG ($P \leq 0,01$).

Al día Es, el PI a RE α fue menor EL que en EG y EiG (EL vs EG, $P = 0,0003$; EL vs EiG, $P = 0,0007$). El PI tuvo tendencia a: ser menor en EL que en EC ($P = 0,07$); menor en EC y EG ($P = 0,05$) y menor en EC que en EiG ($P = 0,1$) y similar entre EG y EiG ($P = 0,77$).

Al día D24hPOv, el PI en EG fue mayor en relación al resto de las localizaciones tisulares (EG vs EL, $P = 0,0008$; EG vs EC, $P < 0,0001$; EG vs CiG, $P = 0,0003$) y fue similar entre EL, EC y CiG ($P > 0,4$).

Al día D7POv, el perfil de PI fue similar al hallado al día D24hPOv.

Las diferencias en el PI entre diferentes momentos del ciclo estral y mismas localizaciones tisulares se detallan en el Gráfico 1 (para epitelios: EL y EG) y Gráfico 2 (para tejido conjuntivo: EC y CiG)

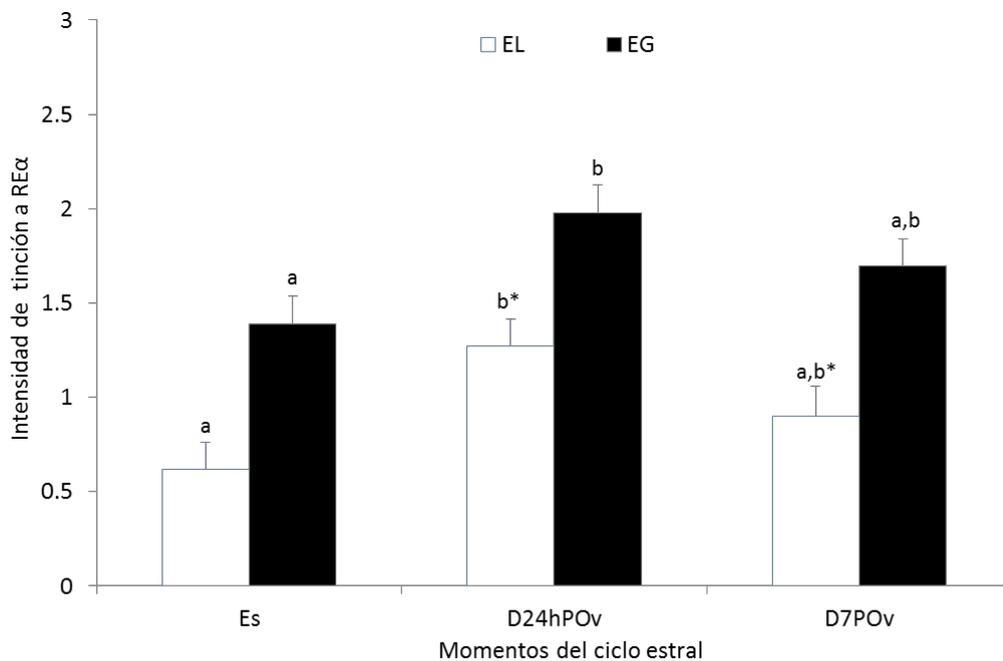


Gráfico 1: Intensidad de tinción a RE α en epitelio luminal (EL) y glandular (EG) en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Momentos del ciclo estral: inicio de la fase folicular (Es), 24 horas post ovulación (D24hPOv) y día 7 de la ovulación (D7POv). Los valores corresponden a las 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, $P < 0,05$. *indica tendencia para una misma localización tisular y diferentes momentos del ciclo.

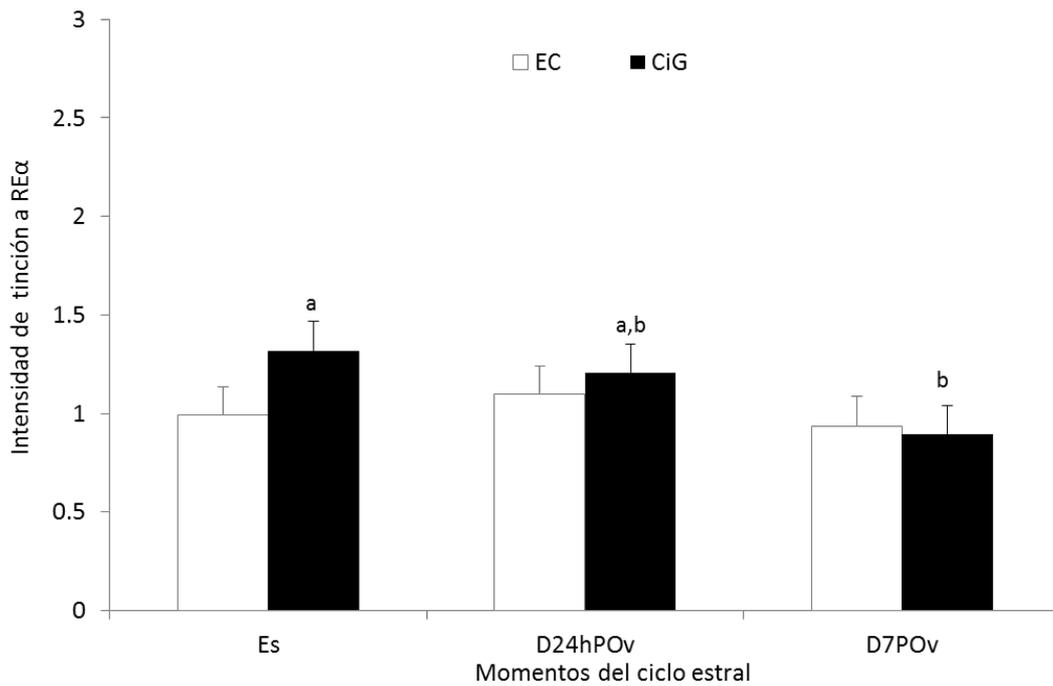


Gráfico 2: Intensidad de tinción a RE α en estrato compacto (EC) y tejido conjuntivo interglandular (CiG) en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Momentos del ciclo estral: inicio de la fase folicular (Es), 24 horas post ovulación (D24hPOv) y día 7 de la ovulación (D7POv). Los valores 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, $P < 0,05$.

8.2.3 DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL DE PMN, L Y M

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

En la Tabla 1, se resumen los principales efectos encontrados en el análisis de las células inmunes presentes en el endometrio de las yeguas ciclando.

La cantidad total de células inmunes (tPMN + tL&M), fue menor al D7POv que a los días Es y D24hPOv y similar entre ambos (D7POv vs Es, $P = 0,004$; D7POv vs D24hPOv, $P = 0,0007$; Es vs D24hPOv, $P = 0,83$). La cantidad total de células inmunes fue menor en EL que en EC y EE (EL vs EC, $P < 0,0001$; EL vs EE, $P = 0,0002$) y hubo tendencia a ser mayor en EC en relación a EE ($P = 0,055$).

La cantidad total de polimorfonucleares (tPMN) fue mayor que la de linfocitos y macrófagos (tL&M) en todos los momentos del ciclo ($P < 0,0001$).

El perfil de células inmunes negativas a RE α (PMN- y L&M-), fue similar a lo descrito para la cantidad total de células inmunes (tPMN + tL&M).

La cantidad células inmunes positivas a RE α (PMN+ y L&M+) fue menor que la cantidad promedio de células inmunes negativas a RE (PMN- y L&M-), en todos los momentos del ciclo y en todas las localizaciones tisulares ($P < 0,0001$). La cantidad total de células inmunes positivas a RE α , fue menor al D7POv que al día Es, ($P = 0,02$). La cantidad de PMN positivos a RE α (PMN+) fue mayor que la de L&M positivos a RE α (L&M+), en todos los momentos del ciclo ($P < 0,0001$).

Al día Es, la cantidad total de tL&M, fue mayor en EC que en EL ($P = 0,03$) y similar entre EC y EE ($P = 0,11$) y entre EL y EE ($P = 0,54$). Al día D24hPOv, la cantidad total de L&M, fue mayor en EC que en EL y EE y similar entre EL y EE (EC vs EL, $P < 0,002$; EC vs EE, $P = 0,002$; EL vs EE; $P = 0,94$). Al día D7POv no hubo diferencias en la cantidad total de L&M entre los diferentes localizaciones tisulares.

El perfil de L&M negativos a RE α (L&M-), fue similar a lo descrito para la cantidad total de L&M (positivas más negativas a RE α).

A los días Es y D7POv el promedio de L&M positivos a RE α tendió a ser mayor en EE que en EL ($P = 0,09$ y $P = 0,05$; días Es y D7POv respectivamente).

Al día Es, la cantidad total de PMN, fue menor en EL que en EC y EE (EL vs EC, $P < 0,02$; EL vs EE, $P = 0,003$) y similar entre EC y EE ($P = 0,90$). Al día D24hPOv, la cantidad total de PMN, fue mayor en EE que en EL y EC (EE vs EL, $P < 0,0008$; EE vs EC, $P = 0,02$) y similar entre EL y EC ($P = 0,25$). Al día D7POv la cantidad total de PMN tuvo tendencia a ser mayor en EC que en EL ($P = 0,08$).

A los días Es y D24hPOv la cantidad de PMN negativos a RE α (PMN-), fue menor en EL que en EC y EE ($P < 0,02$) y similar entre EC y EE ($P < 0,2$). Al día D7POv la cantidad de PMN negativos a RE α , fue similar entre las diferentes localizaciones tisulares.

La cantidad de PMN positivos a RE α (PMN+), fue mayor al día Es que al día D7POv ($P = 0,03$).

Tabla 2: Tabla de efectos fijos incluidos en el modelo para el análisis de las células inmunes presentes en el endometrio de las yeguas resistentes a endometritis ciclando. Variables: total de células inmunes positivas y negativas a RE α (tPMN + tL&M), total de células inmunes negativas a RE α (PMN- y L&M-), total de células inmunes positivas a RE α (PMN+ y L&M+), total de mononucleares positivos a RE α (L&M+), total de PMN positivos a RE α (PMN+). Efectos fijos: observador (Obs.), momento del ciclo estral (mom. ciclo), localización tisular (Loc. Tis.), tipo celular (Tipo cel.) y las interacciones entre ellos.

Variables	Obs.	Mom. ciclo	Loc. Tis.	Tipo cel	Mom. Ciclo x Loc.Tis.x Tipo cel.	Mom. ciclo x Loc. Tis.
(tPMN+ tL&M)	*	**	**	**	0,08	-
(PMN- y L&M-)	*	**	**	**	0,08	-
(PMN+ y L&M+)	*	0,06	NS	**	NS	-
(L&M+)	*	NS	NS	-	-	NS
(PMN+)	*	0,09	NS	-	-	NS

* $P < 0,05$; ** $P < 0,0001$; NS: no significativo.

Las diferencias entre el promedio tL&M o tPMN, entre diferentes momentos del ciclo y mismas localizaciones tisulares, expresadas como porcentaje, se detallan en el Gráfico 3 (tL&M) y Gráfico 4 (tPMN).

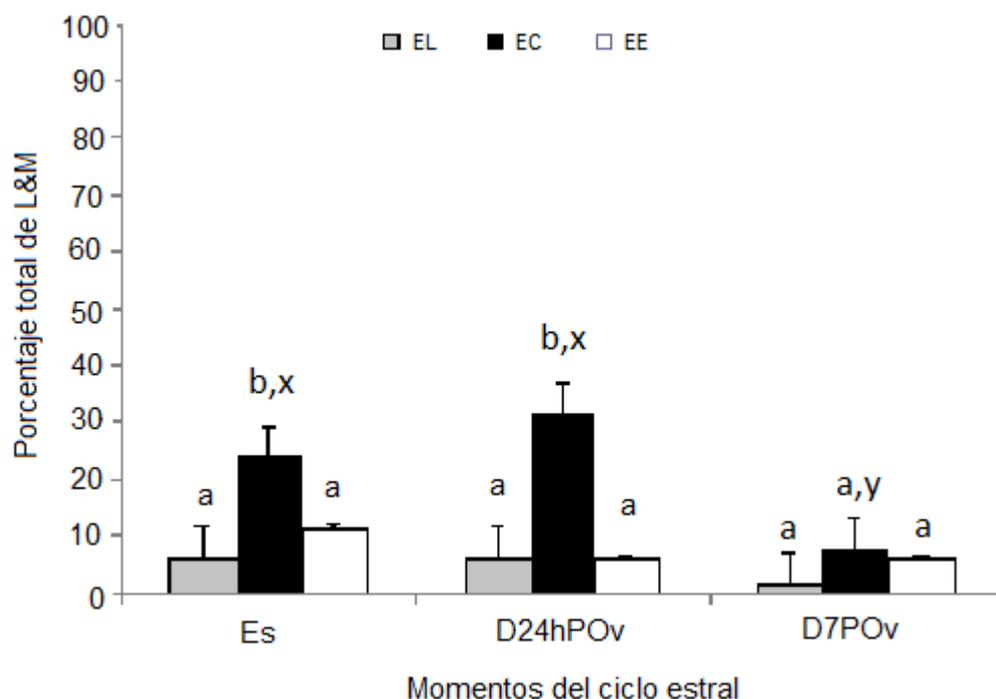


Gráfico 3: Porcentaje \pm error estándar de la media de L&M positivos y negativos (tL&M) a RE α , presentes en epitelio luminal (EL), estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE) en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Momentos del ciclo estral: inicio de fase folicular (Es), 24 horas post ovulación (D24POv) y día 7 de la ovulación (D7POv). ^{a,b} indica diferencias para mismo momento del ciclo y diferente localización tisular; ^{x,y} indica diferencias para misma localización tisular y diferentes momentos del ciclo, $P < 0,05$.

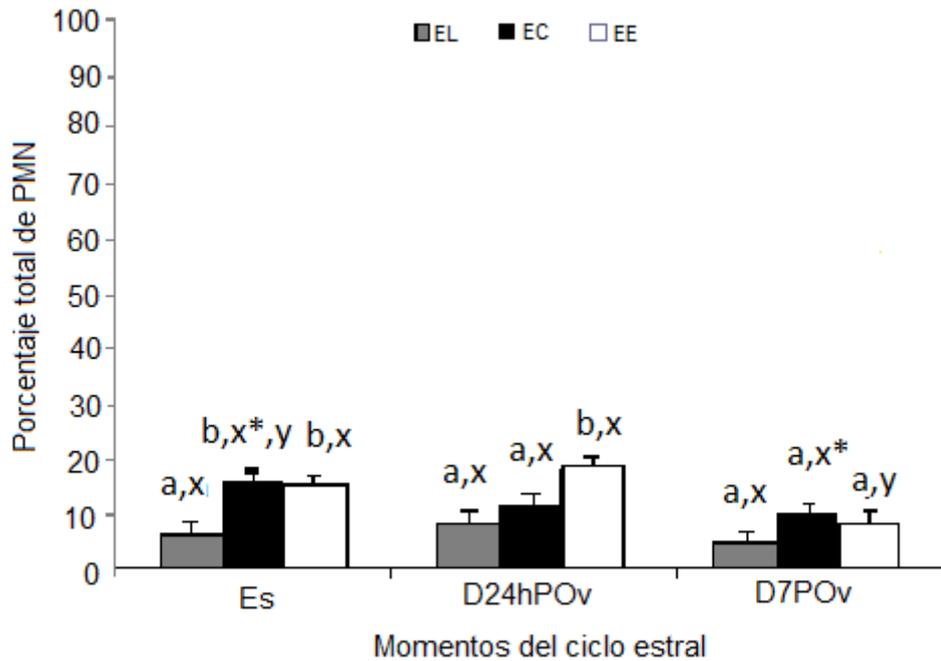


Gráfico 4: Porcentaje \pm error estándar de la media de PMN positivos y negativos (tL&M) a RE α , presentes en epitelio luminal (EL), estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE) en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Momentos del ciclo estral: inicio de fase folicular (Es), 24 horas post ovulación (D24hPOv) y día 7 de la ovulación (D7POv). ^{a,b} indica diferencias para mismo momento del ciclo y diferente localización tisular; ^{x,y} indica diferencias para misma localización tisular y diferentes momentos del ciclo, $P < 0,05$. *indica tendencia para una misma localización tisular y diferentes momentos del ciclo.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se describió la distribución de RE α en el tejido endometrial y la presencia y distribución de células mononucleares y polimorfonucleares positivos y negativos a RE α en endometrio en asociación con los niveles plasmáticos de progesterona en yeguas resistentes a endometritis ciclando.

Este es, aparentemente, el primer estudio que caracteriza la presencia y distribución de RE α en células del sistema inmune en endometrio de yeguas ciclando con resistencia comprobada a endometritis post coital.

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

9.1 DISTRIBUCIÓN DE RE α EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL

El porcentaje total de inmunomarcado a RE α en endometrio, fue similar entre los diferentes momentos del ciclo estral y no hubo efecto de momento del ciclo ni de localización tisular. Estos hallazgos contrastan con lo reportado en un estudio realizado por ensayos de unión con hormonas radioactivas (binding), en útero de yegua, donde se encontró mayor concentración de sitios de unión a estrógenos al día 3 de detectado el estro, ovulación y días 3 y 6 de la ovulación en relación a los días 10 y 15 de la ovulación (Tomanelli et al., 1991). Sin embargo, Re et al., (1995) no encontraron diferencias en la concentración de los sitios de unión a estrógenos en útero de yeguas con niveles bajos de progesterona plasmática (0,4 ng/mL) en relación a yeguas con mayores niveles (7,2 ng/mL), similarmente a los resultados en relación al porcentaje total de inmunomarcado obtenidos en nuestro trabajo. En su conjunto, los resultados sobre el contenido total de RE, determinados por binding o inmunohistoquímica (porcentaje total de inmunomarcado a RE α) resultan contradictorios. Esto podría deberse a los días del muestreo, a las metodologías utilizadas, a la condición de resistentes o susceptibles a endometritis o a una sumatoria de tales variables.

La determinación de RE α por inmunohistoquímica, permite establecer diferencias en la sensibilidad tisular a estrógenos (en términos del contenido y distribución de RE). En tal sentido, en el presente estudio, fue hallado efecto de momento de ciclo estral y localización tisular sobre el promedio ponderado de intensidad de inmunomarcado, indicando que la expresión endometrial de RE α en cada momento del ciclo, fue específica de localización tisular. Al inicio de la fase folicular y 24 horas post ovulación, el inmunomarcado a RE α , fue mayor en epitelio glandular que en epitelio luminal, similarmente a lo reportado por Aupperle et al., (2000) en endometrio de yeguas ciclando. Fue hallado que al inicio de la fase folicular y a las 24 horas post ovulación, el inmunomarcado a RE α , tuvo mayor intensidad en los tejidos más profundos del endometrio (epitelio glandular y tejido conjuntivo interglandular) en relación a los tejidos más superficiales (epitelio luminal y estrato compacto), en acuerdo con lo reportado por Watson et al., (1992) y Aupperle et al., (2000). Sin

embargo, Hartt et al., (2005) durante el diestro no encontraron diferencias en la tinción a RE entre células del estroma y epitelio luminal, siendo en este último indetectable. Tal vez, diferencias halladas en la expresión tisular de RE, se deban a los momentos del ciclo en que fueron tomadas las muestras o a la forma en que se clasificaron los diferentes compartimentos tisulares para su estudio. Además, ninguno de estos autores especifica que isoforma ($RE\alpha$ o $RE\beta$) fue determinada e incluyen en sus diseños yeguas con endometrio en diferentes grados histopatológicos y/o escaso número de animales.

En el presente estudio no fueron encontradas variaciones en la intensidad de inmunomarcado a $RE\alpha$ en el estrato compacto entre los diferentes momentos del ciclo. Esto sugiere que el estrato compacto es menos sensible a los cambios cíclicos hormonales, en relación al tejido conjuntivo interglandular y epitelial, donde sí fueron hallados cambios significativos en la expresión del inmunomarcado a $RE\alpha$. La intensidad de inmunomarcado a $RE\alpha$ en el tejido conjuntivo interglandular disminuyó desde el inicio de la fase folicular hasta el día 7 de la ovulación, en acuerdo con lo reportado por otros autores, sugiriendo que la progesterona de la fase luteal inhibe la expresión del RE en células del estroma (Watson et al., 1992; Aupperle et al., 2000). Sin embargo, estos autores no estudiaron por separado el tejido conjuntivo en compacto o interglandular, por lo cual parte de las diferencias halladas entre nuestros resultados y lo reportado previamente, podría deberse a la forma en que fue caracterizada la expresión de $RE\alpha$ en el tejido conjuntivo tal como se mencionó arriba. La intensidad de inmunomarcado a $RE\alpha$ en ambos epitelios fue mayor a las 24 horas de la ovulación en relación al inicio de la fase folicular, lo cual sugiere un estímulo de los estrógenos de la fase folicular que se mantuvo incluso 24 horas después de la ovulación. La regulación positiva que ejercen los estrógenos sobre la expresión de RE, fue reportado en epitelio glandular del endometrio de yeguas ciclando por Watson et al., (1998) y Hartt et al (2005), sin embargo Aupperle et al., (2000), encontró mayor expresión de RE al día cinco de la ovulación en relación al momento de la ovulación e inicio de la fase folicular. La similar expresión de $RE\alpha$ hallada en los epitelios y el tejido compacto entre el día 7 de la ovulación e inicio de la fase folicular en el presente estudio, sugieren que los niveles de progesterona plasmáticos de la fase luteal previa al momento de detectado el estro (ciclo estral anterior) mantuvo el efecto inhibitorio sobre $RE\alpha$ hasta el momento en que se detectó el estro en el segundo ciclo estral. En su conjunto los resultados reportados y junto con los hallados en el presente estudio indican que los epitelios y el tejido conjuntivo responden de manera diferentes a los mismos niveles hormonales.

En estudios previos, en las mismas yeguas, fue determinada la presencia y distribución de RP endometriales (Tesis de Grado. Dra. Manuela Cilintano, 2012). Similarmente a los presentes resultados para $RE\alpha$, el porcentaje total de inmunomarcado a RP no fue afectado por el momento del ciclo, pero sí hubo efecto de momento del ciclo y localización tisular sobre la intensidad de inmunomarcado a RP. Interesantemente, en este diseño, fueron halladas altas y positivas correlaciones entre $RE\alpha$, RP y la proliferación celular (medida a través del inmunomarcado a PCNA), sugiriendo que en las yeguas resistentes a endometritis ciclando, la proliferación y remodelación del tejido endometrial podría ser mediada a través de ambos receptores (Acuña et al., 2012). En apoyo a esto, los estrógenos estimulan la

proliferación de los epitelios uterinos, mientras que la progesterona inhibe dicha proliferación y estimula la diferenciación celular (Cunha et al., 2004). En yeguas ciclando la cuantificación de la proliferación celular por inmunomarcado de la proteína Ki-67 estimada en el endometrio fue más intensa al momento del estro, posiblemente por la influencia de los estrógenos secretado por los folículos ováricos (Gerstenberg et al., 1999). En nuestro estudio, el mayor inmunomarcado a RE α encontrado en las localizaciones más profundas del endometrio podría relacionarse con estímulo de la proliferación celular.

Los cambios cíclicos en la inmunotinción endometrial a RE α , en las diferentes localizaciones tisulares, hallados en el presente estudio, podrían estar relacionados a la función tisular específica dentro del endometrio y/o a posibles mecanismos de regulación parácrina para RE α . En útero de ratonas con tejido recombinante para RE α (knock-out a RE α y positivas a RE α), fue demostrado que el epitelio knock-out a RE α , presentó actividad mitótica cuando fue recombinado con estroma positivo a RE α , asociados a tratamientos con estrógenos. Sin embargo, cuando el estroma fue knock-out a RE α y el epitelio fue positivo a RE α , el tratamiento con estrógenos, no provocó actividad mitótica en el epitelio (Cooke et al., 1997). El estroma es suficiente y necesario para la mitogénesis y la secreción epitelial estimulada por estrógenos, probablemente esto ocurra a través de factores de crecimiento parácrinos (Cooke et al., 1998). Aún más, se ha sugerido que la progesterona tendría rol antimitótico contrarrestando, las señales mediadas por RE α directamente en las células del estroma y/o indirectamente actuando sobre el epitelio a través de mecanismos parácrinos (Kurita et al., 1998; Cooke et al., 1998). La importancia de las relaciones entre el tejido epitelial y conjuntivo reafirma la necesidad de caracterizar la distribución de los RE en el tejido endometrial. En tal sentido, en yeguas con endometriosis, no fue encontrada expresión de RE en las glándulas rodeadas de tejido fibrótico, sugiriendo que la ausencia de RE puede ser debida a fallas en la regulación parácrina que ejerce el estroma sobre las células del tejido epitelial (Hoffman et al., 2009).

En suma, el estatus endócrino del endometrio depende de un exquisito mecanismo regulado por hormonas reproductivas, sus receptores, células y mediadores específicos. El estudio de la sensibilidad endometrial a hormonas esteroides en yeguas con resistencia comprobada a la endometritis post coital podría aportar patrones de referencia para el estudio de la endometritis (Aupperle et al., 2000; Hart et al., 2005; Schaffler, 2007)

9.2 DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL PMN, L&M

En el presente estudio, fue analizada la distribución de células inmunes positivas y negativas a RE α . El inmunomarcado a RE α hallado en mononucleares y polimorfonucleares, establece un claro vínculo entre el sistema inmune y endócrino. Similares hallazgos han sido reportados en diferentes tipos de células del sistema inmune tanto innato como adaptativo en humanos y en ratones, en diferentes tejidos y con distintas funciones (Pierdominici et al., 2010; Stygar et al., 2001; Stygar et al., 2007).

La cantidad total de células inmunes fue menor al día 7 de la ovulación que al inicio de la fase folicular y a las 24 horas post ovulación, sugiriendo que los mayores niveles de progesterona plasmática hallados al día 7 de la ovulación disminuyeron las poblaciones leucocitarias. Similares efectos inhibitorios de la progesterona sobre el sistema inmune ha sido descrito en útero de ratona (Tibbets et al., 1997), de mujeres (Wira et al., 2010) y de ovejas (Intan-Shameha et al., 2011). Sin embargo, en endometrio de yeguas sanas fueron reportadas similares cantidades de linfocitos B, CD4⁺ y CD8⁺ en estro y diestro (Watson & Thomson, 1996). Estas discrepancias, en relación a lo reportado en equinos podrían deberse a que nosotros evaluamos las células inmunes de acuerdo a su morfología, en cambio Watson & Thomson, utilizaron marcadores específicos de tipo celular.

Fue hallado efecto de tipo celular sobre el conteo de células inmunes, siendo la cantidad total de polimorfonucleares superior a la de mononucleares. Estos hallazgos están en acuerdo con lo reportado en yeguas fértiles, donde se evaluó la respuesta inmune frente al inoculado intrauterino de semen inactivado y fue encontrada mayor cantidad de polimorfonucleares en relación a mononucleares (Nash et al., 2010). La presencia de mayor número de polimorfonucleares en los tejidos en respuesta al estímulo inmunológico ha sido reportada, sin embargo dicha presencia es breve en el tiempo cuando se la compara con la presencia más prolongada de los macrófagos (MacKay et al., 2000). En el presente estudio, no hubo desafío inmunológico y además el mayor número de polimorfos en relación a mononucleares no se mantuvo hasta el día 7 de la ovulación ya que las cantidades de ambos tipos celulares en las localizaciones tisulares evaluadas fue similar (datos no mostrados). El mayor número de células inmunes halladas al inicio de la fase folicular y a las 24 h post ovulación, podría estar vinculado a la influencia de los estrógenos sobre la permeabilidad capilar y mayor irrigación del endometrio. Tales efectos estrogénicos contribuirían a la mayor extravasación de dichas células a los tejidos, tal como ha sido demostrado en cerdas (Dickson et al., 1969; Keys & King, 1988) y sugerido en ovejas (Inthan-Shameha et al., 2010).

En el presente estudio, fue hallada mayor cantidad de células inmunes en el estrato compacto, intermedio en estrato esponjoso y menor en epitelio luminal en los tres días estudiados. Similares resultados fueron reportados en yeguas sanas sobre la cantidad de linfocitos, sin embargo estos autores reportaron que la presencia de linfocitos en los epitelios fue infrecuente (Watson & Thomson, 1996). Contrariamente, en un estudio posterior en yeguas sanas, fue hallada mayor cantidad de macrófagos en estrato esponjoso que en estrato compacto (Summerfield & Watson, 1998). Nuevamente, las diferencias entre nuestros resultados y lo reportado podrían deberse a la metodología utilizada, así como a los días de muestreo.

En el presente estudio fue hallada mayor cantidad de células inmunes negativas en relación a las positivas a RE α , lo cual explicaría los similares perfiles entre el total de células inmunes (positivas y negativas a RE α) y el total de células inmunes negativas a RE α . Aun así, sobre el total contabilizado en el endometrio, fue hallada mayor cantidad de células inmunes positivas a RE α al inicio de la fase folicular y a las 24 horas post ovulación en relación al día 7 de la misma, sugiriendo que la expresión de RE α en mononucleares y polimorfonucleares es estimulada por los estrógenos de la fase folicular e inhibida por los mayores niveles de progesterona de

la fase luteal, tal como se encontró en células propias del endometrio (epitelio y estroma). Similares influencias de estrógenos y progesterona sobre la presencia de RE y RP en células del sistema inmune del endometrio ha sido demostrada en roedores y humanos (Stygar, et al., 2007; Cunningham & Gilkeson, 2011). Sin embargo, previamente, con las mismas yeguas de este estudio, no fueron encontradas variaciones cíclicas en la cantidad y distribución endometrial de mononucleares y polimorfonucleares positivos a RP (Tesis de Grado Dra. Manuela Cilintano, 2012), lo cual sugiere una sensibilidad diferencial a las hormonas esteroideas (en términos de RE y RP) en células del sistema inmune.

Fueron halladas diferencias en los perfiles de distribución endometrial en las células inmunes positivas o negativas a RE α . La cantidad de mononucleares positivos a RE α tendió a ser mayor en estrato esponjoso que en las demás localizaciones, mientras que la cantidad de polimorfonucleares positivos a RE α fue similar en las diferentes localizaciones. Estos perfiles contrastan con la mayor cantidad de mononucleares (positivos y negativos a RE α) hallados al inicio de la fase folicular y 24 horas post ovulación en el estrato compacto en relación a las otras localizaciones evaluadas. Las diferencias halladas en la distribución endometrial entre mononucleares positivos y negativos a RE α , sugieren diferencias de tipo tisular y celular específicas en la regulación que ejercen los estrógenos foliculares sobre los tejidos y las células blanco de su acción. Nosotros no tenemos una explicación a tales hallazgos, sin embargo varios factores deben ser tenidos en cuenta, tales como efectos parácrinos, tipos celulares (linfocitos B, CD4⁺ o CD8⁺), irrigación y extravasación tisular de células inmunes a los tejidos. Además la regulación de la expresión de RE α en células inmunitarias podría ser ejercida antes que éstas lleguen al tejido endometrial. En apoyo a esto, en ratonas ovariectomizadas, fueron observados RE α y RE β en leucocitos de sangre periférica demostrando que este tipo celular es blanco de la acción de estrógenos antes de arribar a los tejidos reproductivos (Stygar et al., 2007).

Es escasa la información en relación a la influencia directa de los estrógenos sobre las células inmunes a través de su receptor. Además en yeguas no hemos encontrado reportes. En estudios previos realizados en el Área de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, en conjunto con el Departamento de Clínica de la Facultad de Veterinaria de Tandil-Argentina, fue encontrado durante la fase folicular, que yeguas resistentes a endometritis tuvieron mayor cantidad de linfocitos endometriales RE α -positivos que yeguas susceptibles a endometritis, lo cual podría relacionarse con la capacidad de las yeguas resistentes de resolver los procesos inflamatorios del útero (Redolatti et al., 2010). Los estrógenos influyen la diferenciación, maduración y migración de linfocitos. En ensayos con agonistas selectivos de RE se estableció que el RE α al unirse a su ligando puede modificar la respuesta inmune en términos de expresión de citoquinas e inmunomodulación (Li & McMurray, 2006). En estudios previos, ha sido sugerido que el endometrio de las yeguas con endometritis es sensible a la inmunoregulación en términos RE α y RP. En yeguas con endometritis, el tratamiento con un inmunomodulador intrauterino aumentó la cantidad de polimorfonucleares positivos a RP en relación a las yeguas control sin tratamiento y disminuyó la cantidad de polimorfonucleares positivos RE α , lo cual sugiere un patrón diferente de inmunoregulación para cada receptor y por lo tanto un rol diferencial de la misma en términos de estrógenos y progesterona

(Fumuso et al., 2012). Como fuera mencionado en endometrio de yeguas resistentes a endometritis, no fueron encontradas variaciones cíclicas en la cantidad y distribución endometrial de mononucleares y polimorfonucleares positivos a RP (Tesis de Grado Dra. Manuela Cilintano, 2012). Al parecer, la condición de resistencia y susceptibilidad a endometritis influye sobre la participación de los receptores en la regulación del sistema inmune. Más aún, podría ser que diferencias en la inmunoregulación mediada por receptores esté en la base molecular de la condición de resistencia o susceptibilidad a la endometritis post coital de las yeguas. Más estudios son necesarios para caracterizar la presencia y distribución de receptores a hormonas esteroides en células inmunes. Nosotros no utilizamos anticuerpos específicos para la identificación de PMN y L&M, sino que basamos nuestro estudio en la identificación morfológica de dichos tipos celulares, lo cual podría llevar a una menor exactitud en la identificación de cada tipo celular. A futuro sería interesante utilizar técnicas de doble marcado que pueden co-localizar la presencia de un receptor en un tipo celular específico (Stygar et al., 2001)

10. CONCLUSIONES

En este estudio se aportó información en relación a los vínculos moleculares y celulares de la inmunología de la reproducción de las yeguas. Se caracterizó la presencia y distribución tisular de RE α endometriales y en leucocitos mononucleares y polimorfonucleares en el endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando, a través del estudio realizado por dos observadores independientes entrenados en la visualización de las diferentes intensidades de los núcleos positivos a RE α y en la identificación morfológica de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares.

El similar inmunomarcado a RE α hallado en los epitelios al inicio de la fase folicular y día 7 de la ovulación, sugiere que en esta localización tisular el efecto inhibitorio de la progesterona de la fase luteal previa al momento de detectado el estro mantuvo el efecto inhibitorio sobre RE α hasta el momento en que se detectó el estro en el segundo ciclo estral. El mayor inmunomarcado encontrado en los epitelios a las 24 horas post ovulación en relación al día 7 de la misma sugiere que en el tejido epitelial el estímulo estrogénico de la fase folicular se mantuvo incluso hasta 24 horas post ovulación y que el mayor nivel de progesterona hallado al día 7 de la ovulación tuvo un efecto inhibitorio sobre la expresión de RE α . En el estrato compacto no hubo variaciones cíclicas en el inmunomarcado a RE α , mientras que en el tejido conjuntivo interglandular el inmunomarcado a RE α disminuyó desde el inicio de la fase folicular hacia el día 7 de la ovulación. Esto sugiere una expresión diferencial de RE α que podría estar asociada a la regulación de la función celular por los estrógenos.

El inmunomarcado hallado a RE α en leucocitos mononucleares y polimorfonucleares del endometrio sugiere un vínculo entre los estrógenos y el sistema inmune que podría ser mediado por RE α . El perfil de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares positivos o negativos a RE α , hallados en este estudio sugiere que la progesterona moduló la cantidad y distribución de células del sistema inmune y tuvo un efecto inhibitorio sobre la expresión de RE α en ellas.

Éste es el primer trabajo que reporta la presencia de receptores de estrógenos en células del sistema inmune en endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis post coital.

Este trabajo permitió conocer los perfiles fisiológicos de los RE α , lo que a futuro podría ser utilizado como patrón para el estudio de la sensibilidad a estrógenos en el endometrio de yeguas con endometritis.

11. 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. 1° 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.I, 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) Acuña S., Herrera M.F., Silva D., Redolatti C., Marinone A.I., Rogan D., Fumuso E. (2012). Estrogen alpha and progesterone receptors (ER α and PR) in endometrial immune cells of mares with endometritis, effect of immunomodulation. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (4): 484-484.
- 5) Arthur G.H. (1991). *Reproducción y obstetricia en veterinaria*, 6° ed., Barcelona España, McGraw-Hill. 3-49
- 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) Bacha W.J, Linda M. (2001). *Atlas color de histología veterinaria*, 2°ed., Buenos Aires, Inter-médica. 223-245.

- 9) Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Brinsko S.P., Rigby S.L. (2003). Breeding soundness examination of the mare. In: Manual of equine reproduction. 2^a ed, Ed: Fathman, E.M. St. Louis: Mosby, pp 31-42.
- 10) 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 Reproductive Science*, 44: 11–21.
- 11) Brinsko P., Rigby S.L., Lindsey A.C., Blanchard T.L., Love C.C., Varner D.D. (2003). Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally-guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology*, 59: 1001-1009.
- 12) Carnevale, E.M. (2008). The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* 69: 23-30
- 13) Cherny R. A. (1991). Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the endometrium of the ewe. *Reproduction Fertility and Development*, 3: 321-331.
- 14) Cilintano, M. (2011). Receptores de progesterona en tejido endometrial y en células del sistema inmune innato del endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria UDELAR, Montevideo-Uruguay. pp: 44
- 15) Clark, J.; Schrader W.; O`Malley B. (1992). Mechanisms of steroid hormones action. EN: Wilson & Foster (Eds). *Textbook of Endocrinology*. Philadelphia Saunders., pp: 35-90.
- 16) Cooke P.S., Buchanan D.L., Young P., Setiawan T., Brody J., Korach K.S. & Cunha, G.R. (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (12), 6535-6540.
- 17) Cooke P.S, Buchanan D.L, Lubahn D.B & Cunha, G.R (1998). Mechanism of Estrogen Action: Lessons from the Estrogen Receptor a Knockout Mouse. Review. *Biology of Reproduction*, 59: 470–475.
- 18) Coutinho Da Silva, M.A. (2008). When should a mare go for assisted reproduction?. *Theriogenology*, 70: 441-444.

- 19) Cunha G. R., Cooke P. S., & Kurita T. (2004). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Archives of Histology and Cytology*, 67(5), 417-434.
- 20) Cunningham, M., & Gilkeson, G. (2011). Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 40 (1): 66-73.
- 21) Davies M.C. (2005). Fisiología de la reproducción de los equinos, cría y manejo de la yeguada. 2°ed. Zaragoza. Acribia. 31- 43.
- 22) Dickson, W. M., Bosc, M. J., & Locatelli, A. (1969). Effect of estrogen and progesterone on uterine blood flow of castrate sows. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 217 (5), 1431-1434.
- 23) Engelken, T. J. (1999): Reproductive health programs for beef herds: analysis of records for assessment of reproductive performance. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Youngquist, R. S., Eds.), W B Philadelphia Saunders, pp. 451-456.
- 24) Fawcett W. (2005). *Tratado de histología de Bloom Fawcett*. 12° ed. Madrid. Interamericana –McGraw-Hill. 909-922.
- 25) Ferrari A, Mayid S, Pérez F, López D y Recuero M. (2012). Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay. *Uruguay XXI*. pp150.
- 26) Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., Fisher, P.A. (2002). Ligand-independent activation of steroid receptors. *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 13-24.
- 27) 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.
- 28) Gerstenberg, C., Allen, W.R. and Stewart, F. (1999). Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116: 167-175.
- 29) Ginther, O.J. (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.
- 30) Graham, D., Clarke, C. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, 18 (4): 502-519.

- 31) Hafez, E.S.E.; Hafez, B. (2002). Ciclos reproductivos. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª Ed. Interamericana McGraw-Hill, México p. 56-69.
- 32) 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):241-250.
- 33) Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., & Schoon, H. A. (2009). Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Expression patterns for mares suffering from endometriosis. *Theriogenology*, 71(2): 264-274.
- 34) Hunt J., Miller L., Platt J. (1998). Hormonal Regulation of Uterine Macrophages. *Developmental Immunology*, 6:105-110.
- 35) Instituto Nacional de carnes. Anuario estadístico (2012). Disponible en <http://www.inac.gub.uy/innovanet/macros/SearchResult.jsp> Fecha de consulta: 18/03/2013.
- 36) Ing N., Tsai S. (1993). Genes in Mammalian Reproduction. Progesterone and Estrogen. Wiley-Liss, Inc.:New York. Ed: Gwatkin, R.B.L. pp 271-291.
- 37) 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
- 38) 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
- 39) Katila, T. (1995). Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. Society for the Study of Reproduction.
- 40) Kenney R.M., Doig P.A (1986): Equine endometrial biopsy. En Morrow DA (ed): *Current Therapy in Theriogenology 2*. Philadelphia, WB Saunders, p 723.

- 41) Keys, J. L., & King, G. J. (1988). Morphological evidence for increased uterine vascular permeability at the time of embryonic attachment in the pig. *Biology of Reproduction*, 39 (2): 473-487.
- 42) Kuiper G.J.M., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S. & Gustafsson J.A (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 5925-5930.
- 43) 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.
- 44) Lea R.G. & Sandra O. (2007). Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction*, 134: 389–404.
- 45) Li, J. & McMurray, R.W. (2006). Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on immune functions in ovariectomized mice. *International immunopharmacology*, 6 (9): 1413-1423.
- 46) 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.
- 47) Loachin E. (2005). Immunohistochemical tumour markers in endometrial carcinoma. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 26: 363-371.
- 48) MacKay, R. (2000). Inflammation. In: Lunn, P., Horohov, D. (Eds.), *Veterinary Clin. North Am. Equine Pract: Immunology*, 16: 15–27.
- 49) McDowell K.J., Adams M.H., Adam C.Y. & Simpson K.S. (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
- 50) Mor G., Sapi, E., Abrahams V. M., Rutherford T., Song J., Hao X. Y., & Kohen F. (2003). Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. *The Journal of Immunology*, 170 (1): 114-122.
- 51) 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

- 52) Nash D. M., Sheldon I. M., Herath S., Lane E. A. (2010). Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Animal Reproduction Science*, 119 (1): 31-39.
- 53) Neely D.P., Liu I.K.M., Hillman R.B. (1991). Reproducción equine. Ed. Agropecuaria Hemisferio del Sur S.R.L .Montevideo. 13-25.
- 54) Paharkova-Vatchkova V., Maldonado R., & Kovats S. (2004). Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c + CD11b intermediate dendritic cells from bone marrow precursors. *The Journal of Immunology*, 172 (3): 1426-1436.
- 55) Pérez-Rivero, J. J., Aguilar-Setién, Á., Villa-Godoy, A., & Serrano, H. (2005). Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroidales: Receptores estrogénicos. *Vet. Mex*, 36: 4 : 112-126.
- 56) Phiel K.L, Henderson R.A, Adelman S.J, Elloso M.M. (2005). Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunology Letters*, 97 (1): 107–113.
- 57) Pierdominici, M., Maselli, A., Colasanti, T., Giammarioli, A. M., Delunardo, F., Vacirca, D. & Ortona, E. (2010). Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. *Immunology letters*, 132 (1): 79-85.
- 58) 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.
- 59) Redolatti C., Herrera M., Marinone A., Acuña S., Tasende C., Fumuso E. (2010). Receptores de estrógenos alfa en células inmunitarias del endometrio equino. 2º Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal- INTRA. Argentina. 73
- 60) 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
- 61) Roscanini A.S., Merlo W.A., Acuarone T., Macció O.A. (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*. 26

- 62) Samper, J.C. (2008). Introduction of estrus and ovulation: Why some mare respond and others not. *Theriogenology*, 70: 445-447.
- 63) Schaffler, D.H. (2007). Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques. *Theriogenology*, 68 (3): 413-422.
- 64) Schuberth H.J., Taylor U., Zerbe H. (2008). Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology*, 70: 1174–1181.
- 65) Scott, M. A. (2000). A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science*, 60: 337-348.
- 66) 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.
- 67) Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (1995). Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biology of Reproduction*, 53 (6): 1527-1543.
- 68) Stygar, D., Wang, N., Sjernholm, Y., Ekman, G., Eriksson, H., Sahlin, L. (2001). Co-localization of estrogen receptor β and leukocyte markers in the human cervix. *Molecular Human Reproduction*, 7: 881-886.
- 69) Stygar, D., Masironi, B., Eriksson, H., & Sahlin, L. (2007). Studies on estrogen receptor (ER) α and β responses on gene regulation in peripheral blood leukocytes in vivo using selective ER agonists. *Journal of Endocrinology*, 194 (1): 101-119.
- 70) Sosa C., Abecia A., Carriquiry M., Vázquez M., Fernández-Foren A., Talmon C., Forcada F. and Meikle, A. (2009). Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reproduction, Fertility and Development* 21: 869–881.
- 71) Sukjumlong 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.

- 72) Summerfield N.J., Watson E.D.(1998). Endometrial macrophage populations in genitally normal mares at oestrus and dioestrus and in mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, 30: 79-81.
- 73) Thatcher W.W., Guzeloglu A., Meikle A., Kamimura S., Bilby T., Kowalski A.A., Badinga L., Pershing R., Bartolome J., & Santos J.E.P., (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction Supplement*, 61: 253–266.
- 74) Tibbetts, T. A., Conneely, O. M., & O'Malley, B. W. (1999). Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biology of Reproduction*, 60 (5): 1158-1165.
- 75) Tomanelli R.N, Sertich P.L, Watson E.D. (1991). Soluble oestrogen and progesterone receptors in the endometrium of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, 44:267-73.
- 76) Townson D.H., Pierson R.A. & Ginther O.J. (1989). Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. *Theriogenology*, 32: 197-204.
- 77) Troedsson M. H. T., Loset K., Alghamdi A. M., Dahms B., & Crabo B. G. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*, 68 (3): 273-278.
- 78) 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.
- 79) VanCamp S.D. (1988). Endometrial biopsy in the mare. A review and update. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 4(2): 229-245.
- 80) 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.
- 81) Watson E.D., Skolnik S.B. & Zanecosky H,G. (1992). Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology*, 38: 575–580.

- 82) Watson, E. & Thomson, R. (1996). Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, 28: 106-110.
- 83) 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. *American Journal Of Reproductive Immunology*, 63: 544-565.
- 84) Zent W.W., Troedsson M.H., & Xue J.L. (1998). Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 44: 64-65.