

Presencia y distribución de receptores esteroides y antígeno de proliferación celular en células del sistema inmune del endometrio equino

Presence and distribution of steroid receptors and antigen of cell proliferation in immune cells in endometrium of mare

ACUÑA, S.¹ Y FUMUSO, E.²

¹Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay, CP 11600. ²Laboratorio de Clínica y Reproducción Equina, CIVETAN, Facultad de Ciencias Veterinarias, Tandil, Argentina.

RESUMEN

Se estudió la distribución endometrial de células inmunes y la presencia en las mismas de receptores de estrógenos alfa, de progesterona y de antígeno de proliferación celular en yeguas sin antecedentes de endometritis. Se tomaron muestras de sangre y biopsias endometriales en yeguas con endometrio sano al inicio de la fase folicular, a las 24 h después, a las 24 h post-ovulación y al día 7 post-ovulación. Las biopsias fueron teñidas con hematoxilina-eosina o sometidas a inmunohistoquímica para determinar la presencia de receptores de estrógeno α , progesterona o antígeno nuclear de proliferación celular en células polimorfonucleares o mononucleares. Se detectaron los siguientes cambios estadísticamente significativos al día 7 pos-ovulación, comparado con los otros días: aumento de la concentración de progesterona plasmática, disminución de la cantidad total de células inmunes y una reducción del número de polimorfonucleares inmunomarcados para receptores de estrógenos alfa. Se concluye así que los altos niveles de progesterona plasmática al día 7 pos-ovulación modularon en forma negativa la cantidad de células inmunes y la cantidad de polimorfonucleares inmunomarcados para receptores de estrógeno alfa.

Palabras clave: (polimorfonucleares), (mononucleares), (receptores de estrógeno α), (yeguas).

Correspondencia *e-mail*: Sebastián Acuña saap22@adinet.com.uy

Recibido: 02-12-2013

Aceptado: 18-07-2014

SUMMARY

Alpha estrogen receptors, progesterone receptors, and cell proliferation antigen were studied in endometrial immune cells of mares free of endometritis. Endometrial biopsies and blood samples were taken in healthy mares in four moments: at the start of the follicular phase, at 24 hours after estrus detection, at 24 hours post-ovulation and on day 7 post-ovulation. Biopsies were stained with hematoxylin-eosin or subjected to immunohistochemistry to determine the presence of RE α , RP or PCNA in mononuclear or polymorphonuclear cells. Statistically significant changes were detected at day 7 post-ovulation, compared to other moments. High levels of plasmatic progesterone were associated to a decrease in the total amount of immune cells and a reduction in the number of polymorphonuclear for estrogen receptor alpha. It is concluded that high plasma progesterone levels at 7 post-ovulation negatively modulated the number of immune cells and the number of polymorphonuclear immunelabeled for estrogen receptor alpha.

Key words: (Immune cells), (Steroid receptors), (Mares).

INTRODUCCIÓN

Los estrógenos y la progesterona tienen efectos sobre la función inmune. La capacidad de respuesta celular a estrógenos y progesterona depende de la concentración circulante de éstas y de la presencia y cantidad de sus receptores (RE y RP respectivamente) en las células blanco¹. Para RE, se han identificado dos isoformas: RE α y RE β ². El RE α predomina en útero de hembras adultas y es el principal mediador de efectos estrogénicos como estimulación y proliferación celular y la inducción de la expresión de RP³.

Diversos estudios sugieren la participación de receptores de estrógenos y progesterona (RE y RP) en la inmunidad celular. En células linfoides endometriales y en leucocitos cervicales de mujeres, se determinó la presencia de RE^{4,5}. Deficiencias en la expresión de RE α en roedores con lupus resultó en una disminución significativa de la enfermedad⁶. En cultivos de macrófagos procedentes de mujeres con o sin endometriosis fue demostrada la presencia de RE y RP y que el tratamiento con estrógenos o progesterona modificó la secreción de mediadores inflamatorios⁷. En experimentos realizados en ratonas ovariectomizadas y modificadas genéticamente para bloquear la expresión de RP (RP knockout), se observó que el tratamiento con E + P, antagoniza la capacidad de los E de reclutar macrófagos y neutrófilos en ratones

knockout, mientras que el mismo tratamiento no afectó dicha capacidad en los ratones salvajes (RP positivos), demostrando que el RP tiene efecto antiinflamatorio. En yeguas ciclando, los estrógenos de la fase folicular, indujeron la expresión de RE y RP del estroma endometrial en sincronía con el aumento en la expresión de Ki-67, un marcador de proliferación celular⁹. Similarmente, en endometrio humano en fase folicular, se ha demostrado que la expresión de RE y RP se correlaciona con la expresión de un antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)¹⁰.

El estudio de la expresión de receptores esteroides ováricos y la proliferación celular en poblaciones leucocitarias del endometrio de yeguas podría aportar información referente al vínculo inmuno-endócrino. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la dinámica de las células inmunes, los niveles de progesterona plasmática y la presencia de RE α , RP o PCNA en dichas células, en endometrio de yeguas sin antecedentes de endometritis y con endometrio sano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

La selección de las yeguas se realizó durante la estación reproductiva en el Departamento de Fisiopatología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil-Argentina

(Latitud 37°S, 59°W y altitud 188 m), bajo la supervisión del Comité de Bienestar Animal. Se seleccionaron siete yeguas sanas, de raza Criolla, de 3 a 10 años y 330 a 500 Kg. La condición de sana se comprobó a través de la citología exfoliativa, cultivo bacteriológico negativo y la capacidad de eliminar el fluido a las 48 h luego de la inseminación artificial con semen inactivado durante el estro¹¹. La presencia de fluido libre en útero, de edema en pared uterina, la dinámica folicular y la presencia de cuerpo lúteo fueron estudiadas por ultrasonografía con un ecógrafo veterinario Berger LC-2010 plus, 5 MHz. Un segundo ciclo estral fue inducido mediante 2 inyecciones i.m. de prostaglandina (500µg, Estroplan®, Clorprostenol sódico) con 14 días de diferencia. Las yeguas fueron consideradas en fase folicular cuando hubo tono uterino flácido, edema endometrial, folículo ovárico dominante ≥ 30 mm.

Progesterona plasmática

Se tomaron muestras de sangre por venopunción yugular, fueron extraídas al inicio de la fase folicular (folículo ovárico dominante ≥ 30 mm, fuído y edema uterino, Es), a las 24 h del inicio de Es (24hPEs), a las 24 h de la ovulación (24hPOv) y al día 7 de la ovulación (d7POv). La determinación de progesterona plasmática fue realizada por RIA en fase sólida.

Biopsias endometriales

Los mismos días en los que se extrajo la sangre, se tomaron biopsias endometriales de la unión cuerpo-cuerno uterino. Éstas, se colocaron en formol tamponado al 4 % durante 24 h, se incluyeron en parafina y se cortaron a 5 µm. Posteriormente, fueron teñidas con hematoxilina-eosina para evaluar si los endometrios sufrieron cambios inflamatorios a lo largo del estudio de acuerdo a la escala de Kenney y Doig, (1986)¹² y para determinar la cantidad y distribución endometrial de las células inmunes.

Inmunohistoquímica

Para evaluar la presencia y distribución

de RE α , RP o PCNA en las células inmunes del endometrio, se utilizó la técnica inmunohistoquímica de la avidina-biotina-peroxidasa^{13, 14}. Se utilizaron anticuerpos primarios anti-RE α (C-311 cat# sc-787; Santa Cruz, CA, USA), anti-RP (Zymed cat # 18-0172, South San Francisco, CA, USA) o anti-PCNA (F-2, cat # 25280, Santa Cruz, California, USA) diluido 1:50, 1:100 y 1:25 en PBS. Los controles negativos se realizaron reemplazando el anticuerpo primario por suero inespecífico de ratón (cat#sc-2025, Santa Cruz, California, USA) diluido PBS. Como anticuerpo secundario biotinilado se usó anti-IgG de equino anti-ratón (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) diluida en suero equino 1:200. El sistema de detección fue 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). Las secciones se tiñeron con hematoxilina como coloración de contraste.

Análisis de imágenes

Para evaluar la cantidad de células inmunes y presencia de RE α , RP o PCNA en éstas, se tomaron de cada biopsia, 10 fotografías a 400 X del epitelio luminal, estrato compacto y estrato esponjoso. En las fotografías de las biopsias tenidas con hematoxilina-eosina, se contabilizaron células polimorfonucleares (PMN) linfocitos (L) y macrófagos (M), y en las fotografías de las biopsias sujetas a inmunohistoquímica se contabilizaron los PMN, L y M inmunomarcados a RE α , RP o PCNA. Los L y M fueron agrupados como mononucleares (LM) para su análisis estadístico.

Análisis estadísticos

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 para evaluar las diferencias en la cantidad de células inmunes entre los días del

ciclo y sus localizaciones endometriales. Las variables analizadas fueron el promedio de células inmunes (PMN o LM), la localización endometrial y días del ciclo (Es, 24hPEs, 24hPOv o d7POv). Las concentraciones plasmáticas de progesterona se analizaron por ANOVA, considerando el efecto del día del ciclo. El nivel de significación considerado fue $P < 0,05$.

RESULTADOS

En ninguna biopsia se detectaron signos de inflamación o cambios degenerativos.

La concentración de progesterona fue mayor al d7POv en relación a Es, 24hPEs y 24hPOv y similar entre Es, 24hPEs y 24hPOv. Las concentraciones (ng/mL, media de los mínimos cuadrados \pm error estándar), fueron: $0,12 \pm 0,01$; $0,18 \pm 0,04$, $0,54 \pm 0,10$ y $9,01 \pm 1,18$, para Es, 24hPEs, 24hPOv y d7POv respectivamente. 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.

Sobre el total de células inmunes (LM y PMN, $121,84 \pm 7,13$, corresponde al 100 %) se encontró efecto de día, de localización endometrial ($P < 0,0001$) y de tipo celular ($P < 0,0001$). El total de células inmunes fue menor al d7POv que en Es, 24hPEs y 24hPOv (24.02, 30.78, 25.50, y 19.63, porcentajes para d7POv, Es, 24hPEs y 24hPOv respectivamente) Sobre el total de PMN o LM se encontró efecto de día y de localización endometrial ($P < 0,0001$). En la Figura 1, se muestran las diferencias en los porcentajes de células inmunes en función de los días del y localizaciones endometriales.

El inmunomarcado específico a RE α , RP o PCNA fue observado en el núcleo de las células inmunes, Figura 2. No fueron encontradas diferencias significativas en la cantidad de PMN o LM inmunomarcados a RP o PCNA en los diferentes días del ciclo ni diferentes localizaciones endometriales. La cantidad de PMN inmunomarcados a RE α ($18,97 \pm 2,69$) fue mayor que la de LM inmunomarcados a RE α ($2,27 \pm 0,56$) en los cuatro días evaluados ($P < 0,0001$). La cantidad

de PMN inmunomarcados a RE α fue menor en d7POv que en Es ($3,75 \pm 1,67$; $5,63 \pm 1,67$; d7POv y Es, respectivamente). A los días Es y d7POv, el promedio de LM inmunomarcados a RE α tendió a ser mayor en EE que en EL ($P = 0,06$).

DISCUSIÓN

Los perfiles y concentraciones plasmáticas de progesterona hallados en las yeguas de este estudio están en acuerdo con lo reportado por otros autores^{15, 16}.

La menor cantidad de células inmunes halladas al día 7 de la ovulación podría deberse a un efecto inhibitorio de los mayores niveles de progesterona plasmática hallados ese día. Dicho efecto fue específicamente observado sobre los PMN y LM del estrato compacto. Efectos inhibitorios de la progesterona sobre células del sistema inmune han sido reportados en útero de ratona¹⁷, mujeres¹⁸ y ovejas¹⁹. Asimismo, Watson y cols (1987)²⁰ demostraron en yeguas ovariectomizadas, que la migración de PMN hacia el útero, así como su actividad fagocítica fue deprimida por el tratamiento con progesterona. Sin embargo, en endometrio de yeguas sanas ciclando, la misma autora reportó mayores cantidades de células MHC II positivas al estro que en diestro, pero sin variaciones cíclicas en las cantidades de macrófagos, linfocitos B y T^{21, 22, 23}. La mayor cantidad de células inmunes presentes en el estrato compacto en días de la fase folicular y diestro temprano (Es y 24hPEs y 24hPOv), cuando las concentraciones de progesterona fueron basales, podría estar vinculado a una influencia de los estrógenos foliculares sobre la irrigación y permeabilidad capilar endometrial. En yeguas ovariectomizadas el tratamiento con estrógenos provocó una invasión masiva de leucocitos al útero²⁰. Hallazgos similares han sido reportados en yeguas²⁴, cerdas²⁵ y ovejas¹⁹.

El inmunomarcado a RE α y RP hallado en células inmunes del endometrio, sugiere que los receptores a hormonas esteroides ováricas, median la función inmunológica celular. La presencia de PCNA en células inmunes del endometrio, indica que ésta proteína continúa

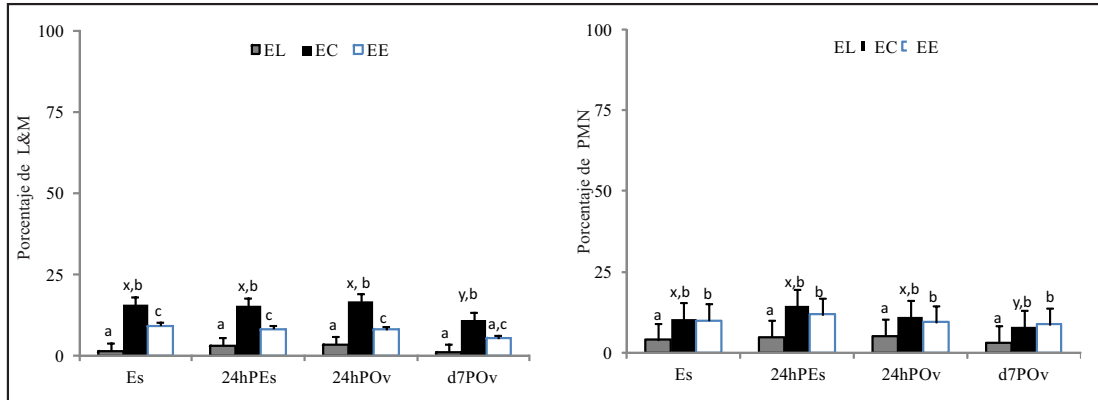


Figura 1. Porcentaje \pm error estándar medio de LM (Panel Izquierdo) y PMN (Panel Derecho) identificados con tinción de HE presentes en epitelio luminal (EL), estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE) en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. Días del ciclo estral: inicio de la fase folicular (Es), 24 h post Es (24hPEs), 24 h post ovulación (24hPOv) y día 7 de la ovulación (d7POv). a,b,c diferencias entre localización endometrial en un mismo día del ciclo, x,y diferencias entre días del ciclo en una misma localización endometrial ($P < 0,05$).

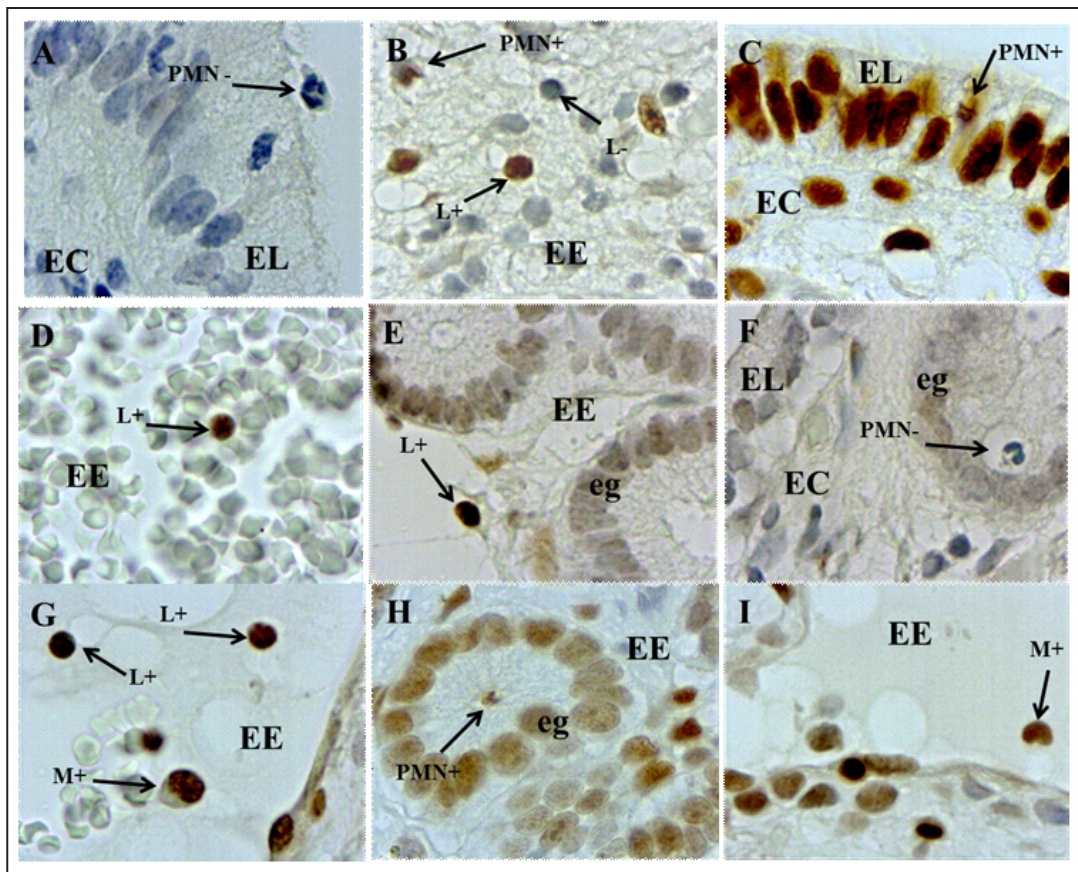


Figura 2. Inmunohistoquímica para la determinación de RE α , RP o PCNA en células inmunes en endometrio de yeguas resistentes a endometritis ciclando. (EL = epitelio luminal, EC = estrato compacto, EE = estrato esponjoso, eg = epitelio glandular, PMN = polimorfo nuclear, M = macrófago, L = linfocito). (A) Control negativo. Se señala un PMN negativo a RE α (PMN-); (B): se señala un PMN y L inmunomarcados a RE α (PMN+, L+) y un L negativo a RE α (L-); (C) se señala un PMN positivo a RE α (PMN+); (D) se señala un L positivo a RP (L+) dentro de un vaso sanguíneo; (E) se señala un L positivo a PCNA (L+); (F) se señalan dos L y un M inmunomarcados a PCNA (L+, M+); (H) se señala un PMN positivo a PCNA (PMN+) dentro de una glándula; (I) se señala un M positivo a PCNA (M+). Fotos tomadas a 400 X.

expresándose en el endometrio aun después de la salida de los tejidos hematopoyéticos. En el presente estudio no hay elementos que demuestren que en endometrio de las yeguas los leucocitos estén sujetos a actividades de mitosis y proliferación celular, a pesar de expresar PCNA. La presencia de receptores esteroides asociada a la proliferación celular en células inmunes ha sido demostrada. En cultivos de células precursoras de monocitos y en macrófagos de mujeres, fue demostrada la presencia de RE y RP y que el tratamiento con estrógenos y progesterona modificó la expresión de ambos receptores así como la diferenciación y proliferación celular^{7, 26}. Asimismo, en el cérvix de mujeres, a través de técnicas de doble marcado, fue demostrada la presencia de RE en leucocitos⁴. Posteriormente, el mismo autor reporta que en ratas los leucocitos del útero y en sangre periférica expresan RE y que éste podría participar de la inflamación y remodelación de la matriz extracelular⁵. En ratonas, ensayos con agonistas selectivos de RE demostraron que el RE α al unirse a su ligando puede modificar la respuesta inmune en términos de expresión de citoquinas e inmunomodulación²⁷.

Por otro lado, es conocido que los estrógenos estimulan la síntesis y expresión tisular de ambos receptores, mientras que la progesterona regula en menos ambos receptores²⁸. La mayor cantidad PMN inmunomarcados a RE α hallados en el endometrio de yeguas en fase folicular temprana en relación al día 7 de la ovulación, sugiere un estímulo directo y positivo de los estrógenos sobre la inmunidad celular. Sin embargo, no fueron encontradas variaciones cíclicas en la cantidad y distribución endometrial de células inmunes inmunomarcadas a RP, lo cual podría deberse a una sensibilidad temporal diferente de las células inmunes a estrógenos y progesterona (en términos de RE y RP). En apoyo con esto, ha sido reportado que el RE es el primero en responder al estímulo estrogénico y que la expresión de RP y PCNA depende en parte de RE^{3, 10, 29}. Además, la progesterona tiene un rol anti-mitogénico que contrarresta la acción proliferativa del RE α , y es mediado por señales

directamente sobre las células del estroma, y/o indirectamente, al actuar sobre el epitelio a través de mecanismos parácrinos incluyendo la liberación de citoquinas^{27, 30}. Los mecanismos mencionados, podrían explicar en parte, la menor cantidad de PMN endometriales que expresaron RE α al día 7 de la ovulación, cuando los niveles de progesterona plasmáticos fueron mayores. Por otro lado, la similar cantidad de células inmunes inmunomarcadas a PCNA, sugiere que en endometrio de yeguas sanas, el PCNA se expresa de forma constitutiva, sin vínculo aparente con la proliferación celular ni con la influencia hormonal sobre la actividad mitótica de las mismas. Sin embargo, el PCNA favorece la síntesis de ADN, al actuar como cofactor de la ADN polimerasa delta. Además, cuando existen daños en el ADN, el PCNA participa en la vía de reparación del ADN³⁰. La presencia de PCNA en los leucocitos en endometrio, podría estar relacionada con actividades de reparación del ADN y síntesis de mediadores de la inflamación a través de la replicación de genes específicos.

La utilización de técnicas de doble marcado que puedan co-localizar receptores hormonales en un tipo de célula inmune específica, podría aportar patrones más precisos en relación a la regulación endócrina sobre la inmunidad celular. La caracterización del sistema inmuno-endocrino endometrial de las yeguas con endometrio sano y sin antecedentes de endometritis, podría aportar patrones de referencia para el estudio de la endometritis en yeguas.

CONCLUSIONES

Los mayores niveles de progesterona al día 7 de la ovulación podrían haber tenido un efecto inhibitor sobre la cantidad de células inmunes. La presencia de RE α , RP o PCNA en células inmunes endometriales, establece un vínculo inmuno-endocrino relacionado a la proliferación celular, que podría ser modulado por hormonas esteroides sexuales.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente financiado

por la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDECA, Uruguay). Los autores desean agradecer a la Vet. C. Redolatti, Ve MF Herrera, por la colaboración en la toma y acondicionamiento de las muestras. A la Dra. M. Amoedo por ceder el anticuerpo para la determinación de PCNA y especialmente la colaboración del Br. S. Peralta, Dra. M.J. Nuñez, Dra. M. Cilintano y Lic. R. Sauto por la asistencia técnica en los ensayos de inmunohistoquímica y el procesamiento y análisis de imagen.

BIBLIOGRAFÍA

- Clark J, Schrader T, O'Malley B. Mechanisms of steroid hormones action, En: Wilson J. y Foster D., *Textbook of Endocrinology*. W. B. Saunders, Philadelphia, 1992: 35–90.
- Kuiper G, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93: 5925-5930.
- Ing N y Tsai S. Progesterone and Estrogen. En: Ed. R.B.L. Gwatkin, *Genes in Mammalian Reproduction*, Wiley-Liss Inc.:New York, USA 1993;. pp. 271-291.
- Stygar D, Masironi B, Eriksson H, Sahlin L. Studies on estrogen receptor (ER) α and β responses on gene regulation in peripheral blood leukocytes in vivo using selective ER agonists. *J Endocrinol* 2007; 194: 101-119.
- Stygar D, Wang N, Sjernholm Y, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. Co-localization of estrogen receptor β and leukocyte markers in the human cervix. *Mol Reprod* 2001; 7: 881-886.
- Cunningham M, Gilkeson G. Estrogen Receptors in Immunity and Autoimmunity. *Clin Rev Allerg Immunol* 2011; 40: 66–73.
- Khan K, Masuzaki H, Fujishita A, *et al.* Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20: 2004–2013.
- Tibbetts T, Conneely O, O'Malley B. Progesterone via Its Receptor Antagonizes the Pro-Inflammatory Activity of Estrogen in the Mouse Uterus. *Biol Reprod* 1999;.60: 1158–1165.
- Aupperle H, Ozgen S, Schoon H, *et al.* Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine vet J* 2000; 32: 228–232.
- Amalinei C, Cianga C, Balan R, Cianga P, Giusca S, Caruntu I. Immunohistochemical analysis of steroid receptors, proliferation markers, apoptosis related molecules, and gelatinases in non-neoplastic and neoplastic endometrium. *Ann Anat* 2011; 193: 43–55.
- Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Brinsko SP, Rigby SL. Breeding soundness examination of the mare. En: Fathman EM, *Manual of equine reproduction*. 2nd edition. St. Louis: Mosby 2003: 31–42.
- Kenney R, Doig P. Equine endometrial biopsy. En Morrow DA (ed): *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia, WB Saunders 1986: 723-729.
- Moroni P, Pisoni G, Savoini G, *et al.* Influence of Estrus of Dairy Goats on Somatic Cell Count, Milk Traits, and Sex Steroid Receptors in the Mammary Gland. *J Dairy Sci* 2007; 90: 790–797.
- Sosa C, Abecia A, Carriquiry M, *et al.* Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21: 869–81.
- Aurich C. Reproductive cycles of horses. *Anim Reprod Sci* 2011; 124: 220–228.
- Nagy P, Huszenicza G, Reiczigel J, *et al.* Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. *Theriogenology* 2004;. 61: 203-214.
- Hunt J, Miller L, Platt J. Hormonal Regulation of Uterine Macrophages. *Dev Immunol* 1998;. 6:105-110.
- Wira C, Fahey J, Ghosh M, Patel M.K, Hickey D, Ochiel D. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with

- Protection Against Sexually Trasmitted Pathogens. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 544-565.
19. Intan-Shameha A, Zuki A, Noordin M, Wahid H, Azmi I. The effects of oestrogen and progesterone on lymphocyte and plasma cell population in the oviduct and uterine mucosae during follicular and luteal phases in ewes. *Pertanika J Trop Agric Sci.* 2011; 34:181-187.
 20. Watson E, Stokes C, Bourne F. Influence of administration of ovarian steroids on the function of neutrophils isolated from the blood and uterus of ovariectomized mares. *J Endocrinol* 1987; 112: 443-448.
 21. Watson E, Dixon C. An immunohistological study of MHC class II expression and T lymphocytes in the endometrium of the mare. *Equine vet J* 1993; 25: 120-4.
 22. Watson E, Thomson R. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares susceptible to endometritis. *Equine vet J* 1996; 28: 106-110.
 23. Summerfield N, Watson E. Endometrial macrophage populations in genitally normal mares at oestrus and dioestrus and in mares susceptible to endometritis. *Equine vet J* 1998; 30: 79-81.
 24. Dickson W, Bosc J, Locatelli A. Effect of estrogen and progesterone on uterine blood flow of castrate sows. *Am. J Physiol* 1969; 5: 1431-1434.
 25. Keys J, King G. Morphological evidence for increased uterine vascular permeability at the time of embryonic attachment in the pig. *Biol Reprod* 1988; 39: 473-487.
 26. Vegeto E; Pollio G; Pellicciari C, Maggi A. Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis. *Faseb J* 1999; 13: 793-803.
 27. Li J, McMurray R. Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on immune functions in ovariectomized mice. *Int Immunopharm* 2006; 6: 1413-1423.
 28. Clark J y Mani S. Actions of ovarian steroid hormones, En: Knobil, E. y Neill, J. D. *The physiology of Reproduction.* Raven Press, New York 1994: 1011-1046.
 29. Qiu C, Shan L, Yu M, Snyderwine G. Steroid hormone receptor expression and proliferation in rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis* 2005; 26:763-769.
 30. Kurita T, Young B, Brody J, Lydon J, O'Malley B, Cunha G. Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 1998; 139: 4708-4713.
 31. Zhang G, Gibbs E, Kelman Z, O'Donnell M, Hurwitz J. Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999; 5:1869-1874.