

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**EFFECTO DE LA INMUNOMODULACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA
CICLOOXIGENASA 2 Y EL CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS
INMUNES EN ENDOMETRIO DE YEGUAS RESISTENTES A ENDOMETRITIS**

Por

Ana María DEARMAS MÉNDEZ
Victor Sebastián PERALTA VENTURINO

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
2014

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor Sebastián Acuña, Asistente del Área de Bioquímica, del Departamento de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria. Por sus críticas constructivas, dedicación y compromiso en nuestra 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, sin la cual, este trabajo no hubiera sido posible. A la Dra. Marcela Herrera por sus aportes y correcciones a este trabajo.

A funcionarios docentes y no docentes del Área de Bioquímica de Facultad de Veterinaria. En particular al preparador del área, Lic. Rafael Sauto y al Dr. Gonzalo D'Anatro, que colaboraron de forma desinteresada para la realización de esta tesis.

A las funcionarias de Biblioteca y Referencias Bibliográficas que no fallaron nunca a nuestros pedidos, por la buena voluntad no sólo durante la realización de ésta tesis, sino durante la carrera.

A nuestros familiares, amigos y compañeros, quienes estuvieron a nuestro lado en el transcurso de la carrera y nos apoyaron siempre.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS, TABLAS, IMÁGENES Y GRÁFICOS	5
1. RESUMEN	6
2. SUMMARY	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
3.1 RELEVANCIA DEL TEMA EN EL URUGUAY	8
3.2 ESTACIONALIDAD Y CONTROL ENDÓCRINO DEL CICLO ESTRAL DE LA YEGUA	8
3.3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN UTERINA.....	10
3.4 BIOPSIA ENDOMETRIAL.....	12
3.5 SISTEMA INMUNE EN ENDOMETRIO DE YEGUAS Y SU RELACIÓN CON EL CICLO ESTRAL.....	13
3.6 RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A LA ENDOMETRITIS EN YEGUAS..	14
3.7 PROSTAGLANDINAS Y CICLOOXIGENASAS.....	15
3.8 INMUNOMODULADORES.....	16
4. OBJETIVOS	18
5. HIPÓTESIS	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1 ANIMALES Y MANEJO.....	18
6.2 DETERMINACIÓN DE COX2	19
6.3 ANÁLISIS DE IMAGEN.....	20
6.3.1 EVALUACIÓN DE COX-2 EN TEJIDO ENDOMETRIAL.....	20
6.3.2 EVALUACIÓN DE PMN Y LM EN TEJIDO ENDOMETRIAL.....	20
6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
7. RESULTADOS.....	21
7.1. EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DE COX-2	21
7.1.1 OBSERVACIONES GENERALES.....	21
7.2 CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL DE PMN Y LM	24
8. DISCUSIÓN.....	27
8.1 EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DE COX-2.....	28
8.2 CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL DE PMN y LM	32
9. CONCLUSIONES.....	35
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE FIGURAS, TABLAS, IMÁGENES Y GRÁFICOS

Figura 1: Principales cambios en la concentración de hormonas plasmáticas durante el ciclo estral de la yegua.....	10
Figura 2: Diagrama esquemático de las capas del útero equino.....	11
Figura 3: Estructura de la pared celular de <i>Mycobacterium</i>	17
Tabla 1: Sistema propuesto por Kenney & Doig (1986). Interpretación de cambios endometriales para el pronóstico de preñez en yeguas.....	13
Imagen 1: Inmunolocalización de COX-2 en endometrio de yeguas.....	22
Imagen 2: Células inmunes en el endometrio de yeguas.....	25
Gráfico 1: Intensidad de tinción a COX-2 en epitelio luminal, epitelio glandular superficial y epitelio glandular profundo profundo en yeguas ciclando resistentes a endometritis	24
Gráfico 2: Porcentaje de PMN en el epitelio luminal, estrato compacto y estrato esponjoso en yeguas ciclando resistentes a endometritis	26
Gráfico 3: Porcentaje de LM en el epitelio luminal, estrato compacto y estrato esponjoso en yeguas ciclando resistentes a endometritis.....	27

1. RESUMEN

Se estudió el efecto del tratamiento intrauterino de un extracto de pared celular de *Mycobacterium phlei* (MCC-V, inmunomodulador) sobre la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) y el contenido y distribución de células inmunes en endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis. Catorce yeguas Criollas, fueron asignadas a dos grupos: Grupo 1 (n = 7), tratado con MCC-V y Grupo 2 (n = 7), sin tratamiento o control. Fueron tomadas cuatro biopsias endometriales de cada yegua, en un mismo ciclo estral. La primera fue tomada al inicio de la fase folicular (Es), momento en que a las yeguas del Grupo 1 se les administró MCC-V, la segunda fue tomada a las 24 horas de declarado el inicio de la fase folicular (24hPEs), la tercera a las 24 horas de la ovulación (24hPOv) y la cuarta al día 7 de la ovulación (d7POv). Las biopsias fueron fijadas en paraformaldehído. La expresión de COX-2 se determinó por inmunohistoquímica y el contenido de células inmunes por evaluación morfológica en preparados coloreados con Hematoxilina y Eosina. Los resultados fueron analizados por ANOVA. El inmunomarcado a COX-2 fue observado exclusivamente en citoplasma del tejido epitelial endometrial. En ambos grupos, la expresión de COX-2 fue mayor en el epitelio luminal que en los epitelios glandulares y la cantidad total de células inmunes fue mayor en estrato compacto que en estrato esponjoso y epitelio luminal. En 24hPEs, la expresión de COX-2 y la cantidad de células inmunes fueron mayores en el Grupo 1 que en el Grupo 2. Dichos parámetros permanecieron similares entre ambos grupos desde 24hPOv hasta d7POv. El tratamiento con el MCC-V provocó una respuesta inflamatoria endometrial, rápida y breve en el tiempo. Los resultados de esta investigación sugieren que el MCC-V podría ser utilizado como tratamiento profiláctico en yeguas durante el estro, con el objetivo de preparar al endometrio frente al desafío inmunológico que implica la monta natural o la inseminación artificial.

2. SUMMARY

Intrauterine treatment with a cell wall extract from *Mycobacterium phlei* (MCC-V, immunomodulator) on the cyclooxygenase 2 (COX-2) enzyme expression and the immune cells content and distribution in endometrium of cycling mares resistant to endometritis, was studied. Fourteen Criollo mares were assigned to either of two groups: Group 1 (n = 7), treated with MCC-V and Group 2 (n = 7), untreated or control. Four endometrial biopsies from each mare in the same estrus cycle, were taken. The first one was taken at the beginning of follicular phase (Es), moment in which MCC-V was administrated to Group 1 mares, the second one was taken at 24 hours of the onset of follicular phase (24hPEs), the third at 24 hours after ovulation (24hPOv) and the fourth at day seven after ovulation (d7POv). The biopsies were fixed in paraformaldehyde. COX-2 expression was determined by immunohistochemistry and the immune cells content by morphological evaluation of Hematoxylin and Eosin-stained slides. Results were analyzed by ANOVA. COX-2 immunostaining was exclusively observed in cytoplasm of the endometrial epithelia. In both groups, COX-2 expression was higher in luminal epithelium than in glandular epithelia and the total number of immune cells was higher in stratum compactum than in stratum spongiosum and luminal epithelium. At 24hPEs, COX-2 expression and immune cells quantity were higher in Group 1 than in Group 2. Both parameters remained similar between 24hPOv to d7POv groups. The treatment with MCC-V caused a fast and short inflammatory endometrial response over time. The results of this research suggest that the MCC-V could be used as a prophylactic treatment in mares during estrus, in order to prepare the endometrium to the immune challenge that involves natural mating or artificial insemination.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 RELEVANCIA DEL TEMA EN EL URUGUAY

El stock equino a nivel mundial alcanza los 57 millones de cabezas. Los países con mayor población equina son E.E.U.U., México, Brasil y Argentina. Uruguay ocupa el puesto 21 y el segundo puesto en cuanto a la relación habitantes por caballo. En Uruguay, la cantidad de caballos se agrupa en función de su uso, en los siguientes porcentajes: deportes ecuestres 4-5 %, razas funcionales 7-8 %, agro y servicios 87 %, turismo y enseñanza 1-2 %. Los caballos que se comercializan están destinados a la faena y a actividades ecuestres (Ferrari et al., 2012).

El Sector equino, genera un valor agregado bruto para la economía Uruguaya de casi un punto del PBI, aportando más de US\$ 330 millones al año, US\$ 29 millones en exportaciones, US\$ 106 millones en empleo, distribuidos en 18.000 puestos de trabajo directo (Ferrari et al., 2012). La poca explotación del sector equino en relación con las otras especies domésticas se debe, entre otros factores, a que es una especie con baja eficiencia reproductiva. Su pubertad ocurre entre el primer y el segundo año de vida, 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 de edad de la yegua aproximadamente (Sharma et al., 2010; Aurich, 2011). Además, las yeguas presentan tasas de aborto por gestación gemelar de alrededor de un 90 % y alta susceptibilidad a endometritis post-coital, causante de grandes pérdidas reproductivas y por tanto económicas (Zent et al., 1998; Coutinho da Silva, 2008).

En Uruguay, existen pocos estudios que hayan abordado aspectos inmuno-endócrino-reproductivos relacionados a las yeguas. En 2010, fue evaluado el efecto del tratamiento intrauterino con iodopovidona sobre la expresión endometrial de receptores esteroideos en yeguas ciclando (Kalpokas et al., 2010). Posteriormente, en 2012, se caracterizó la expresión de receptores de progesterona y se estudió la distribución de linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares presentes en el endometrio de yeguas ciclando, sanas y resistentes a endometritis (Cilintano, 2012). Por último, en 2013, se caracterizó la presencia y distribución tisular de receptores de estrógenos endometriales en leucocitos polimorfonucleares y mononucleares en endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis (Nuñez, 2013).

Los estudios a nivel reproductivo que se realicen en yeguas podrían contribuir a mejorar la eficacia reproductiva en esta especie.

3.2 ESTACIONALIDAD Y CONTROL ENDÓCRINO DEL CICLO ESTRAL DE LA YEGUA

Las yeguas son reproductoras poliéstricas estacionales de día largo, por lo cual presentan actividad ovárica máxima en primavera y verano, cuando las horas luz son mayores. Durante el invierno, la actividad ovárica es reducida o nula, lo que se conoce como anestro estacional. El factor determinante de la actividad ovárica es la duración del período luz/día, proceso conocido como fotoperiodo. En el caso de las yeguas, estas son fotoperiodo positivas. Sin embargo, otros factores como nutrición, temperatura y estado sanitario pueden alterar los patrones cíclicos estacionales y la edad de entrada a la pubertad (Romano, 1998; Aurich, 2011). La pubertad de la hembra equina ocurre entre los 12 y 18 meses de vida. Cuando se incrementan las

horas con luz, cesa el efecto inhibitorio de la melatonina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. El aumento en la secreción de GnRH hipotalámica promueve la liberación hipofisaria de FSH y LH que controlan la actividad ovárica y de esta manera, comienzan a producirse ciclos reproductivos o estrales (Neely et al., 1991; Arthur, 1991). El ciclo estral, se define como el período entre dos ovulaciones. La duración del ciclo estral en las yeguas es de 21 días en promedio, de los cuales 5 a 7 días corresponden a la fase folicular o estro y 15 a 17 días a la fase luteal o diestro. La fase folicular se caracteriza por la presencia de folículo ovárico dominante y elevadas concentraciones de estrógenos plasmáticos que provocan receptividad a la monta, relajación del cérvix y edema en el tracto reproductivo. Posteriormente, durante la fase luteal, que se caracteriza por la presencia de un cuerpo lúteo y elevados niveles de progesterona plasmática, se produce estrechamiento cervical, desaparición del edema del tracto reproductivo y rechazo a la monta (Aurich, 2011).

La FSH es la encargada de inducir la emergencia de ondas foliculares y de mantener el desarrollo continuo de los folículos. Presenta dos picos plasmáticos característicos en las yeguas, uno asociado al pico de LH y otro hacia la mitad del diestro, el cual prepararía la nueva generación de folículos del siguiente ciclo (Blanchard et al., 2003; Ginther et al., 2005; Aurich, 2011). El crecimiento folicular ovárico se presenta en ondas con dos patrones típicos: una onda folicular mayor, que posee folículos dominantes y subordinados, pudiendo normalmente iniciarse en la segunda mitad del ciclo estral y terminar con la posterior ovulación y una onda folicular menor, donde el folículo mayor no alcanza el diámetro necesario para promover la divergencia entre los futuros folículos subordinados, iniciándose al final del estro hasta el inicio del diestro (Andrade Souza et al., 2011). Al comienzo de la fase folicular, el diámetro de los folículos ováricos es de 10 a 30 mm y al momento de la ovulación, el folículo dominante puede alcanzar un diámetro de 70 mm (Neely et al., 1991; Aurich, 2011). Sin embargo, la mayoría de las yeguas ovulan folículos entre 40-45 mm, 24-48 horas antes del final de la fase folicular. El folículo dominante suprime las concentraciones circulantes de FSH, probablemente debido al aumento en la síntesis folicular de estrógenos e inhibina (Aurich, 2011). El incremento de la concentración sérica de LH ocurre de forma lenta y sostenida, alcanzando una concentración máxima 24 horas post-ovulación (Andrade Souza et al., 2011; Aurich, 2011). El aumento en la producción de 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. Poco antes del pico post-ovulatorio de LH, hay un pico de estrógenos, el cual produce una retroalimentación positiva sobre la liberación de LH (Aurich et al, 2011). A su vez, el aumento del tamaño folicular está relacionado con un aumento en la concentración de estrógenos plasmáticos de origen tecal. Las concentraciones plasmáticas de estrógenos, son máximas entre los dos días pre-ovulación y los dos días post-ovulación (Arthur et al, 1991; Aurich, 2011). Las yeguas pueden mostrar fuertes signos de celo hasta 48 horas post-ovulación (Samper, 1997). Por otra parte, la progesterona comienza con niveles plasmáticos basales entre los días uno y tres post-ovulación, alcanzando niveles máximos alrededor del día seis post-ovulación, día clave en la yegua preñada por ser el momento en que el embrión arriba al útero (Townson et al., 1989; Neely et al., 1991). Luego, 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

(PGF_{2α}), en caso que la yegua no resulte preñada (Arthur, 1991; Aurich, 2011). En la Figura 1, se representan los eventos endócrinos más relevantes del ciclo estral de la yegua, asociados a los perfiles hormonales en plasma.

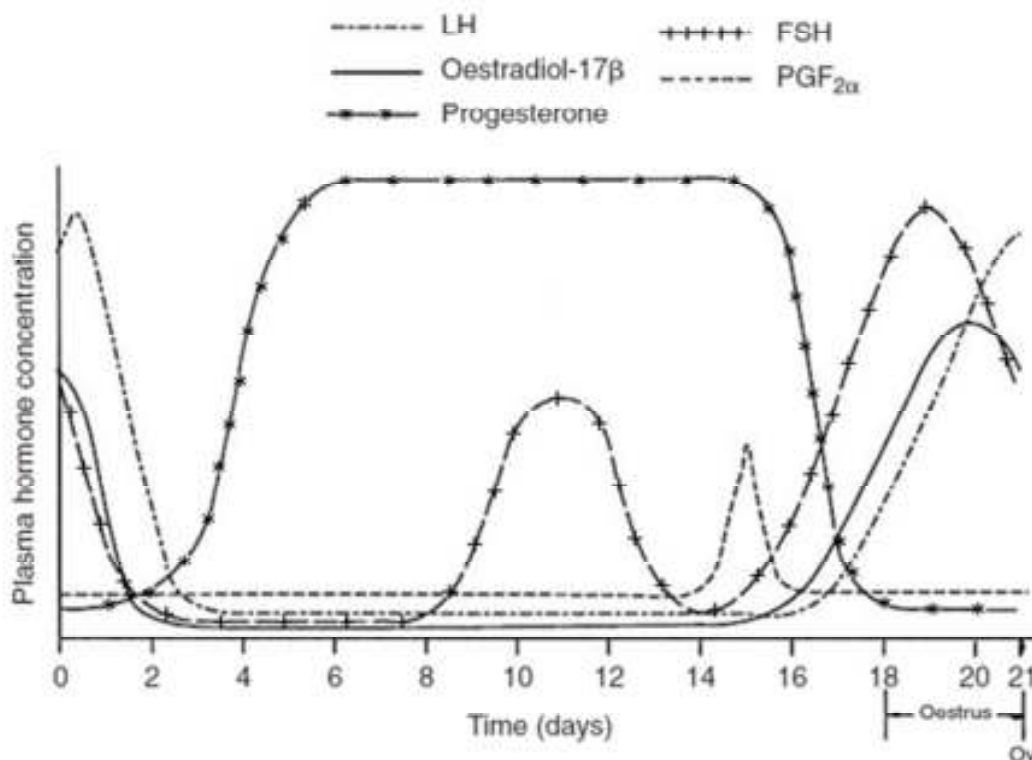


Figura 1: Principales cambios en la concentración de hormonas plasmáticas durante el ciclo estral de la yegua. Tomado de Davies Morel (2003).

3.3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN UTERINA

El útero es un órgano musculo-tubular que está unido hacia caudal al cérvix y hacia craneal a las trompas uterinas (Davies Morel, 2003). En la yegua, los cuernos uterinos están situados por completo en la cavidad abdominal y divergen considerablemente entre sí. El cuerpo uterino está localizado en su parte craneal en el abdomen y en su parte caudal en la pelvis (Dyce K. M., 1999). El tamaño del útero está afectado por la edad y parición; yeguas más viejas y con múltiples partos, tienden a tener el útero más grande (Davies Morel, 2003).

La estructura histológica uterina se organiza en tres capas: perimetrio o serosa externa, que se continúa con los ligamentos anchos, miometrio o capa muscular central, que consiste en dos capas de músculo liso (una longitudinal y otra transversal) y endometrio, que es el revestimiento mucoso interno (Davies Morel, 2003). El endometrio está compuesto por epitelio luminal, estroma, glándulas y sus conductos. En el estroma, se puede distinguir un estrato compacto sub-epitelial con alta celularidad y un estrato esponjoso con menos celularidad, que contiene las glándulas endometriales (Ricketts, 1975; Kenney & Doig, 1986). En la Figura 2, se muestra la estructura histológica del útero equino.

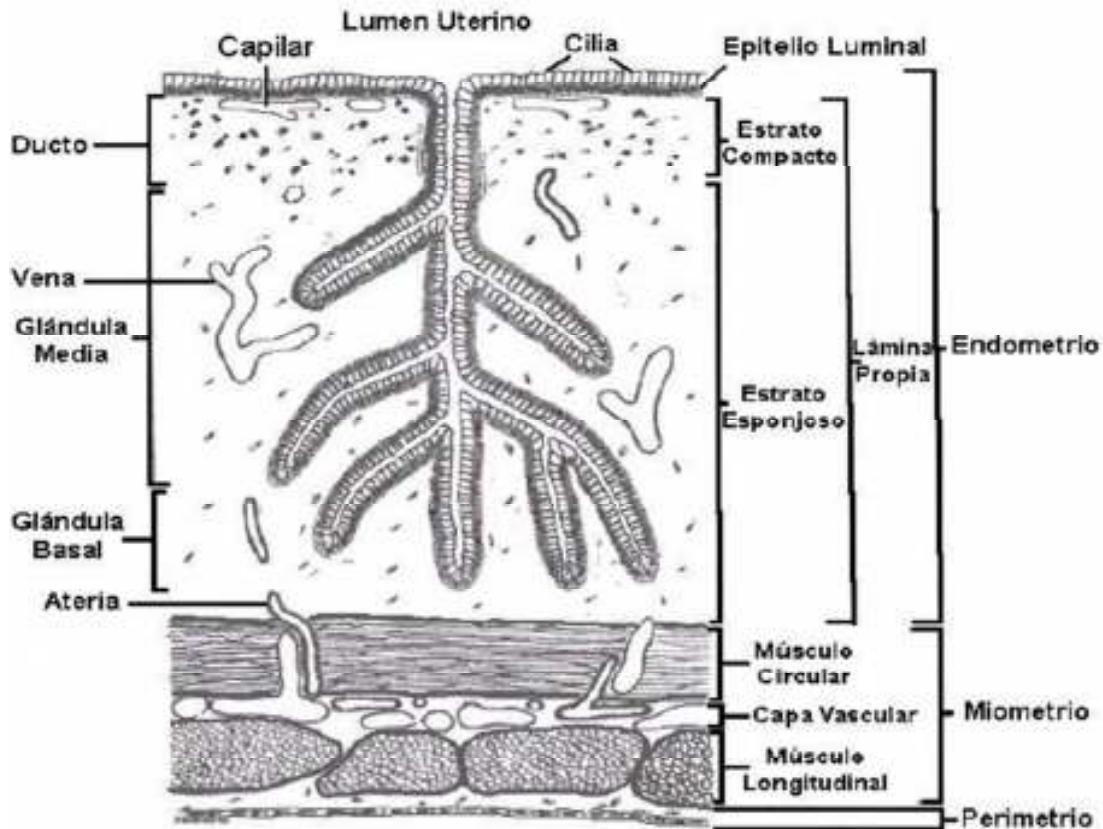


Figura 2: Diagrama esquemático la estructura histológica del útero equino. Tomado de Kenney & Doig (1986).

Las características histológicas endometriales varían con la estación del año y resultan de cambios en los niveles circulantes de esteroides ováricos (Kenney & Doig, 1986). El epitelio luminal, que consiste en una hilera única de células, varía en altura desde cúbicas altas a cilíndricas altas, siendo cilíndrico durante la fase folicular y cuboidal durante la fase luteal (Kenney & Doig, 1986; Van Camp, 1988). El estroma endometrial durante la fase folicular se observa edematoso, parece menos denso y las glándulas se observan elongadas y en poca cantidad. El epitelio glandular en esta etapa es alto. En la fase luteal, hay menos edema presente, por lo que el estroma parece más denso. Esto otorga a las glándulas un aspecto más concentrado y tortuoso. El epitelio glandular disminuye su altura (Van Camp, 1988). Por lo tanto, la tortuosidad glandular puede ser útil para estimar la etapa del ciclo. El endometrio en anestro, es caracterizado por epitelio luminal y glandular cuboidales y glándulas rectas, más que tortuosas (Kenney & Doig, 1986).

Las variaciones citológicas y vasculares del útero 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 porción materna de la placenta. En la preñez temprana, durante los primeros días que el blastocisto se une al endometrio, las células conjuntivas fusiformes del estroma se transforman en grandes células deciduales pálidas que contienen en su citoplasma abundante glucógeno y lípidos (Fawcett, 1995). Al día 35 de la gestación, aparecen las copas

endometriales, que son responsables de secretar gonadotrofina 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 & Hafez, 2002).

3.4 BIOPSIA ENDOMETRIAL

El análisis histológico del útero, realizado a través de la biopsia endometrial, es una herramienta de gran utilidad diagnóstica, ya que permite detectar alteraciones tisulares inflamatorias, cambios degenerativos y modificaciones a nivel vascular, así como para emitir pronóstico de gestación (Kenney & Doig, 1986; Rosciani et al., 2000). Sin embargo, el diagnóstico clínico de una patología o la predicción de la capacidad de gestación exitosa, no debe basarse sólo en la interpretación de la biopsia, sino en el contexto de la historia clínica reproductiva, exámenes rectales y vaginoscópicos, cultivos de raspados endometriales y citología endometrial (Kenney & Doig, 1986).

Dada la facilidad de dilatación del cérvix equino, el procedimiento puede ser realizado en cualquier estadio del ciclo estral y fuera de éste. Independientemente del momento, la persona que evalúa la biopsia debería ser informada del estadio del ciclo reproductivo y de los hallazgos físicos de las posibles patologías al momento en que la muestra sea obtenida (Kenney & Doig, 1986). Si no se presentan anomalías uterinas durante el examen físico del útero, la biopsia debería ser obtenida en la unión del cuerpo con los cuernos uterinos, sitio de implantación del embrión, siendo una única muestra representativa del endometrio como un todo, salvo cuando se aprecian áreas variables mediante palpación, con lo cual se debería tomar una muestra de dichas áreas, además de una muestra de un área uniforme. La muestra debe tener un tamaño de 20 x 3 x 3 mm (Van Camp, 1988).

El efecto de la biopsia endometrial sobre el ciclo reproductivo de la yegua ha sido investigado. Hurtgen & Whitmore demostraron en 1979, que la biopsia endometrial podría ser responsable del mejoramiento del diestro prolongado asociado con un cuerpo lúteo persistente, posiblemente a través de la liberación de prostaglandinas endógenas; mientras que la luteólisis prematura fue inducida mediante la extracción de biopsias en el día 4 post-ovulación. Baker y col. mostraron en 1981 que este efecto que produce la biopsia podría ser prevenido con antibióticos como el sulfato de gentamicina en el momento de la biopsia. También, en relación a la infección al realizar biopsia endometrial, es importante que la muestra se tome en condiciones de esterilidad, previa asepsia de la zona perineal y utilizando instrumentos estériles; además se sabe que el útero de la yegua en estro es más resistente a la introducción accidental de bacterias durante estos procedimientos (Van Camp, 1988).

En 1986, Kenney & Doig propusieron un sistema para la interpretación predictiva de preñez en yeguas de acuerdo al estatus endometrial, basado en cuatro categorías histopatológicas, clasificadas según el grado de alteraciones tisulares. Este sistema de clasificación histopatológica es utilizado en la actualidad. Tabla 1.

<i>Clasificación Histopatológica de Kenney y Doig</i>
<p>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.</p>
<p>Categoría II: 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. <i>Categoría IIB:</i> En ella se incluyen las muestras con más de uno de estos cambios.</p>
<p>Categoría III: Inflamación severa difusa, generalizada; fibrosis periglandular generalizada; lagunas linfáticas palpables e hipoplasia endometrial</p>

Tabla 1: Clasificación histopatológica del endometrio de yeguas, propuesto por Kenney & Doig (1986). Tomado de Rosciani et al. (2000).

Según la categoría histopatológica a la que se le asigna, de acuerdo a la escala Kenney & Doig, el porcentaje de preñez es el siguiente; Categoría I: 80-90 %. Categoría IIA: 50-80 %. Categoría IIB: 10-50 %. Categoría III: 10 % (Van Camp, 1988).

3.5 SISTEMA INMUNE EN ENDOMETRIO DE YEGUAS Y SU RELACIÓN CON EL CICLO ESTRAL

El tracto reproductor presenta barreras físicas y químicas, así como defensas celulares y humorales, encargadas de mantener el normal funcionamiento y tendientes a prevenir la entrada de agentes infecciosos provenientes del medio externo (Wira et al., 2010).

En diferentes especies, ha sido demostrado que las células inmunes del endometrio presentan cambios temporales y espaciales durante el ciclo estral, influidos por los niveles de esteroides sexuales (Hunt et al., 1998; Wira et al., 2010). Los estrógenos y la progesterona influyen sobre la migración de macrófagos, linfocitos B y T, afectando la expresión de factores quimiotácticos y moléculas de adhesión. Además, estas hormonas participan en la producción de citoquinas y prostaglandinas por parte de células epiteliales, células del estroma y células inmunes presentes (Wira et al., 2010). En yeguas, los linfocitos y polimorfonucleares endometriales durante la fase folicular, presentan mayor actividad fagocítica que en fase luteal (Liu & Troedsson, 2008). En endometrio de yeguas sanas no fueron encontradas diferencias entre estro y diestro con respecto a la cantidad de linfocitos B, CD4+ y CD8+; sin embargo, yeguas con endometritis presentaron al estro, mayores cantidades de linfocitos en relación a yeguas sanas (Watson & Thomson, 1996). Por otro lado, se encontró mayor cantidad de polimorfonucleares y macrófagos en

estrato esponjoso que en estrato compacto y ausencia de estas células en el tejido epitelial, tanto en yeguas sanas como en yeguas con endometritis (Summerfield & Watson, 1998).

Las células endometriales, en respuesta al contacto con espermatozoides y plasma seminal, sintetizan y liberan citoquinas, como por ejemplo las interleuquinas (IL) y otros mediadores involucrados en la quimiotaxis de polimorfonucleares (Katila, 2012). Es conocido que dentro de los mediadores inflamatorios, las citoquinas son los más importantes y que los esteroides ováricos controlan la expresión de las mismas en el endometrio (Kelly et al., 2001; Katila, 2012). A su vez, células endoteliales, células epiteliales, polimorfonucleares y mononucleares producen IL-8 que es una potente citoquina pro-inflamatoria. Además, fue demostrado que en yeguas ciclando resistentes a endometritis, los niveles IL-8 e IL-10 son mayores en la fase folicular a predominio de estrógenos que en la fase luteal, donde predomina la progesterona (Fumuso et al., 2007).

3.6 RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A LA ENDOMETRITIS EN YEGUAS

En la yegua, el semen es depositado en el útero y luego de la monta natural o inseminación artificial, se desarrolla una inflamación endometrial. Esta inflamación es una respuesta fisiológica del tejido endometrial a la entrada de elementos exógenos al organismo, como lo son el semen o los microorganismos invasores (Troedsson et al., 2001; Robertson, 2007). Cuando las células epiteliales del endometrio toman contacto con el semen o los microorganismos invasores, se producen y liberan citoquinas pro-inflamatorias y prostaglandinas, provocando un aumento de neutrófilos polimorfonucleares, los cuales son responsables de la fagocitosis de bacterias y espermatozoides (Troedsson et al., 2001; Katila, 2012). La respuesta inflamatoria generada es necesaria para la remoción de detritos, bacterias y exceso de fluidos, así como espermatozoides de la luz uterina (Troedsson, 2006). De esta manera, permite al organismo volver a la homeostasis.

Las yeguas pueden ser clasificadas como resistentes o susceptibles a endometritis post-coital de acuerdo a su capacidad de resolver dicha inflamación. Yeguas consideradas como resistentes son capaces de resolver la endometritis dentro de las 48 horas luego de la monta o inseminación artificial, mientras que yeguas susceptibles no resuelven la inflamación en dicho plazo o la resolución se encuentra demorada (Katila, 1995; Brinsko et al., 2003). Una depuración uterina comprometida causada por actividad miometrial deficiente, que conduce a acumulación de fluido y respuesta inflamatoria sostenida, parece ser el factor clave en la patogénesis de la endometritis persistente (Troedsson et al., 1993).

Se debe tener presente que el embrión arriba al útero alrededor del día 6 post-ovulación, por lo tanto la inflamación uterina debe ser controlada a las 96 horas post-ovulación para la supervivencia del embrión (Card, 2005). Si el proceso inflamatorio no se resuelve en dicho plazo, el aumento en la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, mediador de la respuesta inflamatoria, puede causar una luteólisis prematura y la subsecuente pérdida del embrión (Troedsson, 1999).

3.7 PROSTAGLANDINAS Y CICLOOXIGENASAS

Las prostaglandinas actúan como mediadores químicos durante el proceso inflamatorio, produciendo vasodilatación y activación de los leucocitos (Vane et al., 1998; Tizard, 2009). Tienen como precursor directo al ácido araquidónico, fosfolípido presente en la membrana celular que se convierte en prostaglandina a través de la acción de las enzimas ciclooxigenasas (Vane et al., 1998). Las prostaglandinas son lípidos insaturados, que tienen un anillo con oxígeno y dos cadenas alifáticas y junto a los tromboxanos forman parte de la familia de los prostanoides (Martínez Canabal & Ribas Arancibia, 2005). Las prostaglandinas se pueden dividir en tres series biológicas (1, 2 y 3), dependiendo de sus características estructurales y su precursor específico (Vane et al., 1998). La serie 2 es la más importante en mamíferos por sus funciones y se caracteriza por ser moléculas de vida media corta, que actúan como mensajeros autócrinos, parácrinos y endócrinos (Martínez Canabal & Ribas Arancibia, 2005).

Las enzimas ciclooxigenasas son proteínas ensambladas y transportadas en el retículo endoplásmico, que luego se insertan en las membranas celulares y allí forman complejos funcionales llamados hemodímeros; cada proteína de este complejo cuenta con un canal de acceso por donde entra el ácido araquidónico (Vane et al., 1998). Las ciclooxigenasas presentan dos isoformas (1 y 2), que tienen un origen común y son muy similares en estructura, pero con diferencias desde el punto de vista de su distribución en los tejidos y de su función específica (Vane et al., 1998; González Pérez et al., 2002). La ciclooxigenasa 1, considerada una enzima constitutiva, realiza funciones de homeostasia, manteniendo el normal funcionamiento del riñón y la integridad de la mucosa gástrica (Vane et al., 1998). La ciclooxigenasa 2 (COX-2), puede ser expresada prácticamente por cualquier célula o tejido y es considerada una enzima inducible, es decir, capaz de incrementar sus niveles frente a estímulos fisiológicos, inflamatorios o farmacológicos (González Pérez et al., 2002). Entre los factores que pueden estimular la COX-2 y funcionar por lo tanto como inductores de la misma, están las interleuquinas, el factor de crecimiento de los fibroblastos β , el factor de crecimiento de transformación beta, el factor de necrosis tumoral alfa y los lipopolisacáridos (Delgado et al., 2001). A su vez, existen diferentes fármacos utilizados en la clínica tradicional que también pueden modular la respuesta inflamatoria a través de la COX-2, un claro ejemplo de esto son los antiinflamatorios no esteroideos -AINEs-, que actúan impidiendo la transformación del ácido araquidónico a prostaglandina por su selectividad hacia la ciclooxigenasa (Vane et al., 1998). En tal sentido, se ha comprobado que la administración de flunixin de meglumine (AINE), inhibe la respuesta inflamatoria en endometrio de yeguas receptoras de embriones, aumentando así el éxito de la transferencia de embriones. El flunixin de meglumine disminuyó la cantidad de células teñidas positivamente a COX-2 en el epitelio endometrial de yeguas receptoras de embriones, lo que representó un marcado descenso en las concentraciones de prostaglandina, provocando una menor respuesta inflamatoria del endometrio (Koblischke et al., 2008).

Diversos trabajos han abordado el estudio de la expresión y distribución de COX-2 y su rol en el proceso inflamatorio en endometrio. En yeguas a las que se les administró diferentes diluyentes de semen y desarrollaron respuesta inflamatoria, el mensajero de COX-2 fue mayor que en los controles sin inflamación endometrial

(Palm et al., 2008). En burras inseminadas con semen sin plasma seminal, se reportó un aumento en la cantidad de polimorfonucleares, asociado a una mayor expresión endometrial de COX-2, mientras que la inseminación con semen con plasma seminal no aumentó la expresión de COX-2 en relación a los controles (Vilés et al., 2013). En Shetland pony, al momento del parto, se observó un aumento significativo en la expresión de COX-2 en el alantocorion, sugiriendo que el proceso inflamatorio que se produce en esta membrana fetal puede ser clave en el parto (Palm et al., 2013).

Por otro lado, los niveles de COX-2 en endometrio pueden ser modulados por las hormonas sexuales. Durante el ciclo estral en yeguas sanas, la COX-2 se mantuvo en valores constantes, pero al día 15 del ciclo, la expresión de esta enzima aumentó de manera significativa en yeguas no preñadas, lo que incrementa la producción de PGF2 α por parte del endometrio dando lugar al proceso de luteólisis (Aurich, 2011). Tal es así, que diversos estudios han comprobado que los cambios en la síntesis de prostaglandina endometrial, son precedidos por la modulación de la expresión de COX-2 y que la síntesis de COX-2 y PGF2 α son localizadas mayormente en células epiteliales del endometrio, sugiriendo que estas células son clave en la síntesis de prostaglandinas (Boerboom et al., 2004). Por lo tanto, la cuantificación de la expresión de COX-2, es una medida indirecta de la cantidad de prostaglandina sintetizada por el endometrio.

3.8 INMUNOMODULADORES

La endometritis en las hembras domésticas ha sido tratada en forma tradicional utilizando antibióticos, oxitocina y lavajes uterinos. Los antibióticos son considerados un factor importante para la resolución de dicha patología. Sin embargo, la utilización de los mismos puede provocar resistencia bacteriana, disminución de los mecanismos de defensa, además de tener alto costo y dejar residuos (Singh et al., 2000). En tal sentido, desde hace algunos años, se buscan alternativas terapéuticas para la prevención o resolución de endometritis; entre dichas alternativas se ha estudiado el uso de inmunomoduladores (Fumuso et al., 2007; Christoffersen et al., 2012).

En vacas, la infusión intrauterina en estro de lipopolisacáridos de *E.coli* (estimulador del sistema inmune), resultó en un aumento del 100 % del total de leucocitos intraluminales y un aumento significativo en las tasas de concepción en vacas tratadas durante los celos siguientes (Singh et al., 2000). Por otro lado, se demostró que el uso de interleuquina humana recombinante en vacas, fue efectiva atrayendo neutrófilos y favoreciendo su migración dentro del útero (Zerbe et al., 2003).

En yeguas sanas, los lipopolisacáridos de *E.Coli* usados en infusión intrauterina, produjeron un aumento de influjo de neutrófilos dentro del lumen uterino (Williamson et al., 1987). En yeguas con endometritis, se demostró la capacidad de la dexametasona para restaurar el ambiente uterino a través de la regulación de citoquinas tanto pro-inflamatorias como antiinflamatorias (Christoffersen et al., 2012). Los inmunomoduladores no específicos, como el extracto de pared de *Mycobacterium phlei*, son moléculas completamente ajenas a los vertebrados que tras su aplicación tienen un efecto inductor sobre los macrófagos los cuales producen mayor cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, estimulando una respuesta inmune mediada por células (Lunn & Rush, 2004). El *Mycobacterium phlei* contiene

tres formas de ácido micólico, siendo los α micolatos los que se encuentran en mayor proporción. Los micolatos oxigenados (keto y metoximicolatos) tienen un anillo de ciclopropano que se ubica en configuración cis o trans y se encuentran unidos en forma covalente a la línea de arabinogalactano, la cual se une a la línea de peptidoglicano. Además, el extracto de pared celular de *Mycobacterium* contiene lípidos como los acilglicopéptidos, sulfolípidos y lípidos libres, posee también lipoarabinomannano, que se presenta unido a la membrana plasmática con una unión fosfodiéster (Figura 3). Estos componentes estructurales del extracto de pared celular de *Mycobacterium phlei* son considerados potentes patrones moleculares asociados a patógenos y provocan una respuesta en el sistema inmune tras su aplicación (Underhill et al., 1999).

Se ha estudiado cada componente estructural de este inmunomodulador y se sabe que el lipoarabinomannano estimula la síntesis de factor de necrosis tumoral y de varias citoquinas, además de ser una sustancia de quimiotaxis para mononucleares y polimorfonucleares. El ácido micólico produce una rápida estimulación de los polimorfonucleares además de estimular el factor de necrosis tumoral, interferón gamma, IL-6, IL-2 y disminuir la síntesis de IL-10 (Korf et al., 2005).

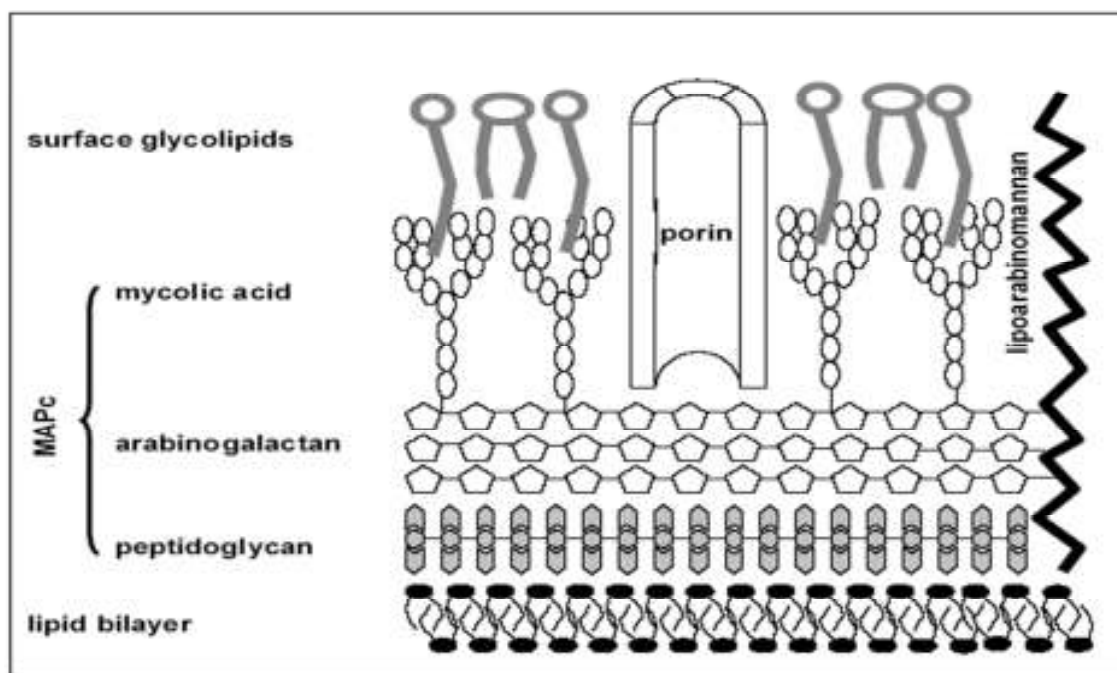


Figura 3: Estructura de la pared celular de *Mycobacterium*. Tomado de: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/roese-lars-2004-06-09/HTML/chapter1.html>

El extracto de pared celular de *Mycobacterium phlei* aplicado de forma intrauterina en yeguas susceptibles a endometritis, provocó parámetros inmunológicos similares al encontrado en yeguas resistentes, medido a través de la expresión de IL-8, IL-10, Complejo Mayor de Histocompatibilidad II y cantidad de linfocitos T y polimorfonucleares encontrados en el tejido endometrial (Fumuso et al., 2007). Además, ha sido utilizado en yeguas susceptibles a endometritis y se ha demostrado su efecto modulador sobre el acúmulo de fluido intrauterino (Christoffersen et al., 2012).

Hasta el momento, no ha sido estudiado el efecto del extracto de pared celular de *Mycobacterium phlei* en términos de la expresión de COX-2 o el contenido y distribución de células inmunes en el endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis. Este estudio pretende investigar si la aplicación intrauterina de un extracto de pared celular de *Mycobacterium phlei*, produce cambios en la expresión de la COX-2 y en las poblaciones de células inmunes presentes en el endometrio. De esta forma, se intenta obtener mayor conocimiento sobre el mecanismo de acción y efecto del extracto de pared celular de *Mycobacterium phlei*.

4. OBJETIVOS

Estudiar el efecto del tratamiento de un inmunomodulador intrauterino sobre la expresión de la COX-2 en endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis.

Estudiar el efecto del tratamiento de un inmunomodulador intrauterino sobre el contenido y distribución de células del sistema inmune en endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis.

5. HIPÓTESIS

La expresión de COX-2 y el contenido y distribución de células inmunes en endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis son afectados por el tratamiento con un inmunomodulador intrauterino.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ANIMALES Y MANEJO

La selección de las yeguas y la obtención de biopsias endometriales fue realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil-Argentina (37° S, 59° E y altitud 188 m snm), a cargo de la Prof. Dra. Elida Fumuso y bajo la supervisión del Comité de Bienestar Animal.

Durante la estación reproductiva, yeguas Criollas de 3 a 12 años y 330 a 500 Kg de peso vivo, fueron inseminadas artificialmente con semen muerto luego de detectado el estro, con el objetivo de evaluar la susceptibilidad a la 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 (Brinsko et al., 2003). Las yeguas seleccionadas (n = 14), estuvieron libres de enfermedades mientras se desarrolló el estudio. Las mismas fueron mantenidas con pastura y suplementadas con heno y alimento peleteado. El agua estuvo disponible ad-libitum.

El estatus ovárico y uterino fue seguido diariamente por ultrasonografía transrectal con Ecógrafo veterinario Berger LC-2010 plus, utilizando un transductor de 5 MHz. El estro fue inducido por 2 inyecciones intramusculares de prostaglandina de 500 µg (Estroplan® Clorprostenol sódico) con 14 días de diferencia entre dosis. A través de palpación transrectal y ultrasonografía se confirmó la presencia de cérvix dilatado acompañado de tono uterino flácido, edema endometrial, folículo ovárico 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.

Para el desarrollo de esta tesis, las yeguas fueron asignadas a dos grupos. Un grupo fue tratado con una emulsión de extracto de pared celular purificado de *Mycobacterium phlei* (MCC-V, SETTLE™, Bioniche Animal Health, USA), al momento del estro (Grupo 1, n = 7) mientras que al grupo control no se le realizó tratamiento (Grupo 2, n = 7).

Las biopsias fueron tomadas para cada grupo de yeguas en cuatro momentos diferentes de un mismo ciclo estral. Dos biopsias fueron tomadas durante la fase folicular y las otras dos en la fase luteal. Las mismas se extrajeron de la unión del cuerpo con los cuernos uterinos. En el mismo momento en que fueron tomadas las biopsias, fue registrado el estatus ovárico (medida del tamaño folicular) y uterino (edema, tono y pliegues).

En ambos grupos de yeguas, la primer biopsia fue tomada al inicio de la fase folicular (Es), momento en que las yeguas presentan edema endometrial y folículo ovárico dominante > 30 mm. En ese mismo momento las yeguas del Grupo 1 fueron tratadas. El tratamiento consistió en 1,5 mg de MCC-V administrado en 25 mL de diluyente Kenney en forma intrauterina. La segunda biopsia fue tomada a las 24 horas de declarado el inicio de la fase folicular (24hPEs). La tercera biopsia fue tomada a las 24 horas de la ovulación (24hPOv), momento en que no se detectó folículo dominante y se observó un cuerpo hemorrágico. Finalmente la cuarta biopsia fue tomada al día 7 de la ovulación (d7POv).

Todas las biopsias fueron colocadas en paraformaldehído al 4 % por 24 horas y almacenadas en alcohol 70 %, hasta su procesamiento histológico. Se realizó la inclusión en bloques de parafina y los mismos se cortaron en secciones de 5 μ m que luego fueron montadas en láminas de vidrio StarFrost®.

Las biopsias fueron coloreadas con Hematoxilina y Eosina para evaluarlas de acuerdo con la escala de Kenney & Doig (1986) y para la determinación de células inmunes. Posteriormente se realizaron ensayos de inmunohistoquímica, para la determinación endometrial de COX-2.

6.2 DETERMINACIÓN DE COX-2

Para evaluar la presencia y distribución de COX-2 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 y adaptada para COX-2 de acuerdo con Palm et al. (2013).

Las secciones de biopsias, fueron desparafinadas con xilol durante 10 min, rehidratadas con etanol y tratadas 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) se realizó el bloqueo de la actividad inespecífica de las peroxidasas endógenas del tejido, con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3 % en metanol por 10 min a temperatura ambiente.

Las secciones fueron enjuagadas por 10 min en buffer PBS y posteriormente fueron incubadas por 30 min en cámara húmeda con suero bloqueante de burro (Stocking serum, ABC-Staining Sistem, Lot # E2212, Santa Cruz Biotechnology) al 1,5 % diluido en buffer PBS con el fin de disminuir las uniones no específicas.

Luego de realizar un nuevo lavado con buffer PBS con tritón al 0,1 %, las secciones fueron incubadas en cámara húmeda con un anticuerpo primario policlonal de cabra anti-COX-2 (N-20: sc-1746; Santa Cruz, CA, USA) diluido 1/250 en PBS por 60 min. En paralelo se realizaron controles negativos de los ensayos utilizando IgG no inmunomarcada (cat#sc-2025, Santa Cruz, California, USA).

Luego de la unión al anticuerpo primario, se realizó un lavado con buffer PBS con tritón, las secciones fueron incubadas por 60 min en cámara húmeda con una solución de IgG biotinilado de burro anti-cabra (ABC-Staining Sistem, Lot # E2212, Santa Cruz Biotechnology) diluida en suero bloqueante de burro 1/150.

Posteriormente fueron incubadas por 60 min con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC kit, Elite; Vector) dilución 1/50.

Para la visualización del sitio de unión del complejo enzimático, se realizó la coloración con 3,3' diaminobenzidina en H₂O₂ (DAB kit, cat# sk-4100 Vector Laboratories), un cromógeno que produce un precipitado de coloración marrón insoluble cuando se incubaba junto con la enzima peroxidasa.

Las secciones fueron contracoloradas con Hematoxilina y deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol antes de ser montadas con cemento sintético. La inmunohistoquímica fue realizada en el mismo ensayo para todas las secciones de biopsias endometriales del diseño experimental.

6.3 ANÁLISIS DE IMAGEN

6.3.1 EVALUACIÓN DE COX-2 EN TEJIDO ENDOMETRIAL

La expresión de COX-2 en las biopsias endometriales, fue estimada por dos observadores independientes, quienes no conocían la reseña de los animales al momento de evaluar los preparados (método de doble ciego). La intensidad del inmunomarcado fue evaluada en las localizaciones endometriales donde se detectó tinción en forma específica: epitelio luminal (EL), epitelio glandular superficial (EGs) y epitelio glandular profundo (EGp). Para ello se utilizó el microscopio óptico Olympus BX41, instalado en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria.

Diez campos de cada localización tisular fueron evaluados en lente de inmersión a 1000 aumentos. El inmunomarcado fue clasificado como positivo o negativo, de acuerdo a la presencia o ausencia de tinción específica. El positivo fue clasificado según su intensidad como leve, moderado e intenso y llevado en proporción en una escala de 0 a 10. El promedio 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 que exhibieron tinción leve (1), moderada (2) e intensa (3). Adaptado de Boos et al. (1996). El porcentaje total de inmunomarcado (%T, incluye todas las localizaciones endometriales), se obtuvo multiplicando la proporción promedio de inmunomarcado (sin tener en cuenta la intensidad de tinción) por 10.

6.3.2 EVALUACIÓN DE POLIMORFONUCLEARES Y MONONUCLEARES EN TEJIDO ENDOMETRIAL

En cada biopsia, previamente coloreada con Hematoxilina y Eosina, se evaluaron por separado la presencia de polimorfonucleares (PMN), linfocitos (L) y macrófagos (M) en

los estratos endometriales: epitelio luminal (EL), estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE).

Un total de 10 imágenes para cada estrato endometrial fueron tomadas a 400 aumentos, utilizando el software compatible con la cámara Capture Infinity: Infinity Capture Imaging instalado en el microscopio óptico del Área de Bioquímica.

En cada imagen, se contaron y registraron en planillas previamente elaboradas, los PMN, L y M, teniendo en cuenta la reseña y localización tisular. Esto fue realizado por el método de doble ciego. Los L y M fueron agrupados como mononucleares (LM) en razón de su morfología.

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El porcentaje total (%T) y el promedio de intensidad (PI) a COX-2 fueron analizados por ANOVA, incluyendo efecto observador, momento del ciclo estral, localización endometrial e interacción entre ellos.

Los polimorfonucleares y mononucleares, fueron analizadas por ANOVA, incluyendo efecto observador, momento del ciclo estral, estrato endometrial, tipo celular e interacción entre ellos.

Los resultados se expresaron como media \pm EE y el nivel de significación considerado fue $P < 0,05$.

La cantidad de polimorfonucleares y mononucleares se expresaron como porcentajes. Éstos no se expresaron en función de las células de sostén del tejido conjuntivo o epitelial. Se expresaron en función de la cantidad total de lo contabilizado en el ensayo.

7. RESULTADOS

Al examen ecográfico, todas las yeguas exhibieron características ováricas y endometriales compatibles con la fase del ciclo estral. La ovulación fue confirmada en todas las yeguas y el edema endometrial fue indicador de la acción de los estrógenos durante la fase folicular. Se comprobó la ausencia de endometritis, endometriosis u otras lesiones tisulares. Todas las biopsias fueron incluidas en Categoría I, de acuerdo a la escala de Kenney & Doig (1986).

7.1 EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DE COX-2

7.1.1 OBSERVACIONES GENERALES

El inmunomarcado a COX-2 fue observado en forma específica en el citoplasma del tejido epitelial. En los controles negativos no fue observado inmunomarcado específico a COX-2. La ausencia de tinción específica en los controles negativos, cuando el anticuerpo específico para COX-2 fue sustituido por IgG no inmunomarcada, demostró especificidad a COX-2.

El inmunomarcado a COX-2 mostró diferentes grados de intensidad de tinción, por lo que fue posible su clasificación en leve, moderado e intenso, tal como se había previsto. Imagen 1.

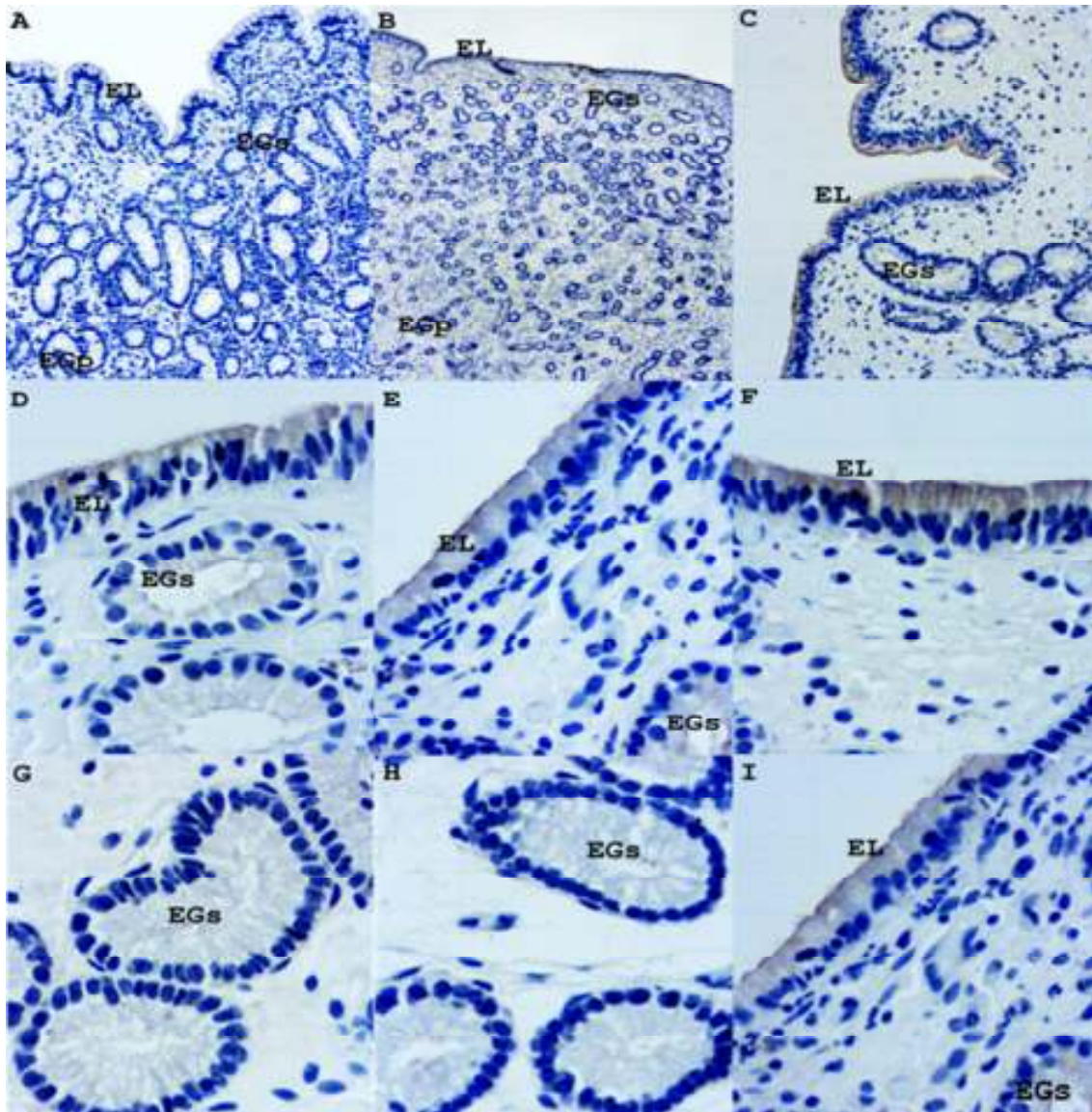


Imagen 1: Inmunolocalización de COX-2 en endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis. (A) Control negativo. (B-I) muestras positivas a COX-2. Localizaciones tisulares: epitelio luminal (EL), epitelio glandular superficial (EGs), epitelio glandular profundo (EGp). Fotos A y B: se observan las tres localizaciones endometriales. Fotos A-C: 100 aumentos; Fotos D-I: 400 aumentos.

Sobre el porcentaje total de inmunomarcado a COX-2 (%T) no hubo efecto de observador, ni de momento del ciclo estral, siendo similar en los cuatro momentos estudiados.

Sobre el promedio de intensidad de inmunomarcado a COX-2 (PI), no fue hallado efecto de observador y fueron hallados efecto de grupo ($P = 0,0005$), de momento del

ciclo ($P < 0,0001$), de localizaciones endometriales ($P < 0,0001$) e interacción entre grupo, momento del ciclo y localizaciones endometriales ($P < 0,0001$).

En el grupo control, el PI a COX-2, fue mayor en el epitelio luminal que en los epitelios glandulares en los cuatro momentos del ciclo ($P < 0,0001$). A los momentos Es y 24hPEs, el PI a COX-2 tuvo tendencia a ser mayor en EGs que en EGp, mientras que a los momentos 24hPOv y d7POv fue similar entre ambos.

En el grupo control, el PI a COX-2 en EL, fue similar entre Es y 24hPOv y ambos fueron mayores que al d7POv (Es vs 24hPOv, $P = 0,93$; Es vs d7POv, $P = 0,0002$; 24hPOv vs d7POv, $P = 0,0003$). El PI a COX-2 en EL tuvo tendencia a ser menor en 24hPEs, en relación a los momentos Es y 24hPOv (24hPEs vs Es, $P = 0,064$; 24hPEs vs 24hPOv, $P = 0,053$), y tuvo tendencia a ser mayor que al d7POv ($P = 0,08$). No hubo diferencias significativas en el PI a COX-2 entre momentos del ciclo, en los epitelios glandulares.

En el grupo tratado, el PI a COX-2, fue mayor en EL, intermedio en EGs y menor en EGp en los momentos Es, 24hPEs y 24hPOv ($P < 0,03$). Al momento d7POv, el PI a COX-2 fue mayor en EL que en los epitelios glandulares ($P < 0,0001$) y similar entre ellos ($P = 0,41$). El PI a COX-2 en los epitelios superficiales (EL y EGs), fue mayor a las 24 horas después del tratamiento con MCC-V (24hPEs), en relación al resto de los momentos del ciclo ($P < 0,003$). El PI a COX-2 en EL al momento d7POv, fue menor que al día Es ($P = 0,003$) y similar al momento 24hPOv ($P = 0,2$). El PI a COX-2 en el EGs, fue similar entre los momentos Es, 24hPOv y d7POv. El PI a COX-2 en EGp, fue similar en los cuatro momentos del ciclo.

Las diferencias en el PI a COX-2 entre el grupo control y tratado, se muestran en el gráfico 1.

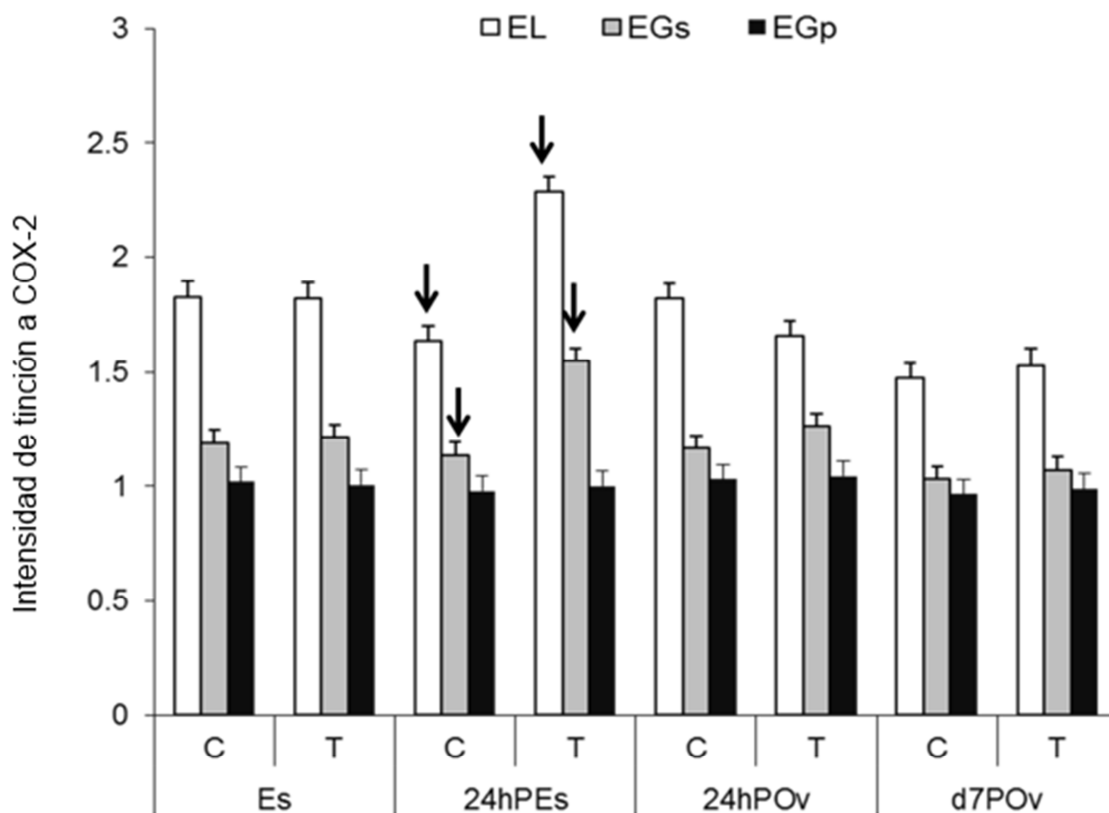


Gráfico 1: Intensidad de tinción a COX-2 en epitelio luminal (EL), epitelio glandular superficial (EGs) y epitelio glandular profundo (EGp), en endometrio de yeguas tratadas (T) o sin tratar (Control-C). Momentos del ciclo estral: inicio de la fase folicular (Es); 24 horas de declarado el inicio de la fase folicular o del tratamiento con MCC-V (24hPEs), 24 horas de la ovulación (24hPOv), día 7 de la ovulación (d7POv). Las flechas indican diferencias significativas ($P < 0,05$), en la intensidad de tinción a COX-2 entre el grupo tratado y el grupo control, para el mismo momento del ciclo y localización endometrial.

7.2 CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL DE PMN Y LM

Se encontró efecto de grupo ($P < 0,005$), de estrato endometrial ($P < 0,0001$) y de tipo celular ($P < 0,0001$), sobre el total de células inmunes (PMN y LM). El total de células inmunes fue menor al d7POv que en Es, 24hPEs y 24hPOv ($P < 0,001$) y similar entre Es, 24hPEs y 24hPOv. La cantidad total de PMN y LM fue mayor en el estrato compacto, intermedio en el estrato esponjoso y menor en el epitelio luminal ($P < 0,05$). La cantidad total de PMN fue mayor que la de LM ($P < 0,0001$).

En la imagen 2 se muestran los diferentes estratos endometriales estudiados y las células inmunes observadas en los mismos.

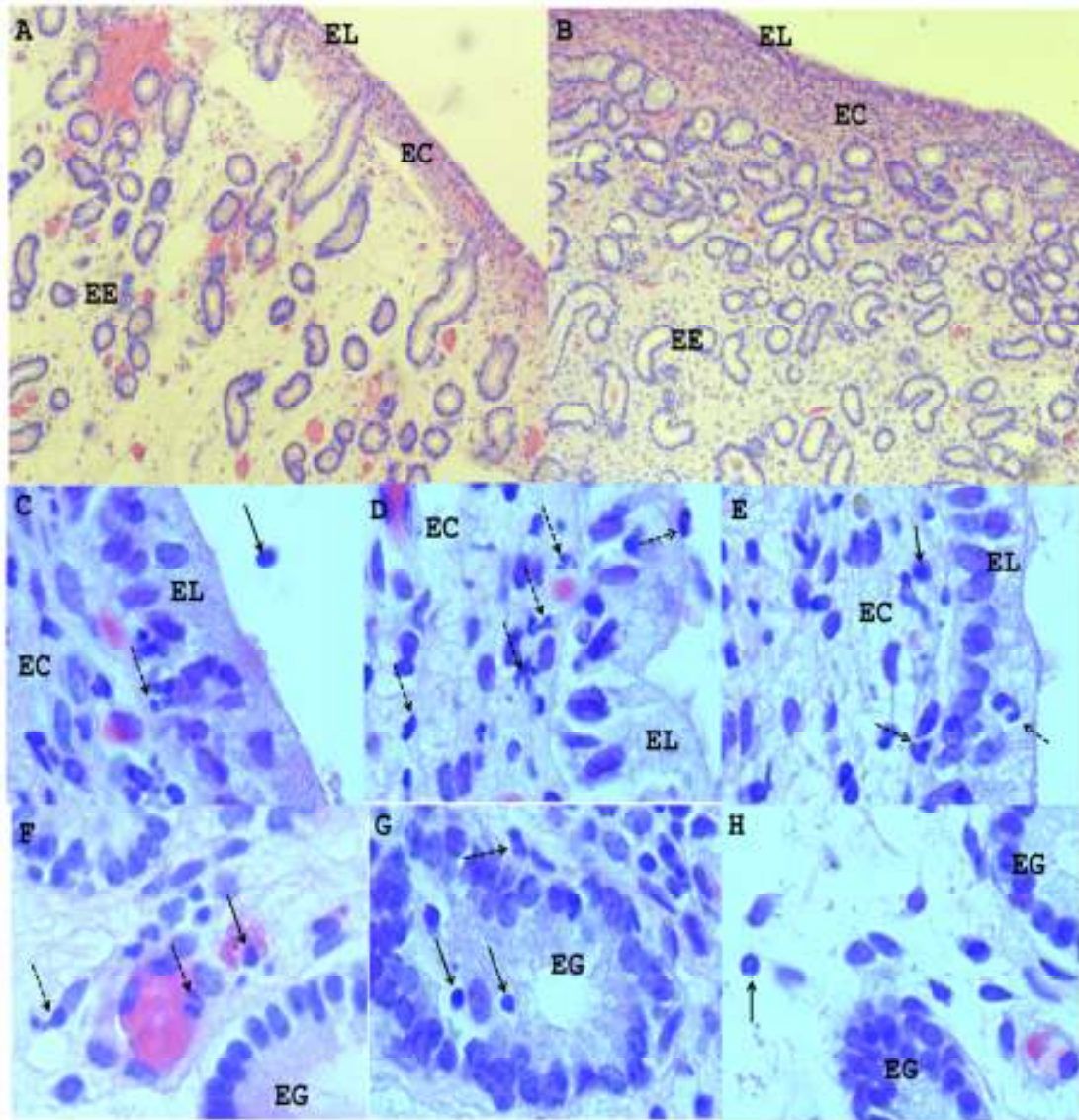


Imagen 2: Células inmunes en el endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis. Fotos A-B: estratos endometriales: epitelio luminal (EL), estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE). Fotos C-H: flechas punteadas: polimorfonucleares y flechas continuas: mononucleares. Fotos A-B: 100 aumentos; Fotos C-H: 400 aumentos.

En los gráficos 2 y 3, se muestran los perfiles de PMN y LM encontrados en las yeguas ciclando resistentes a endometritis.

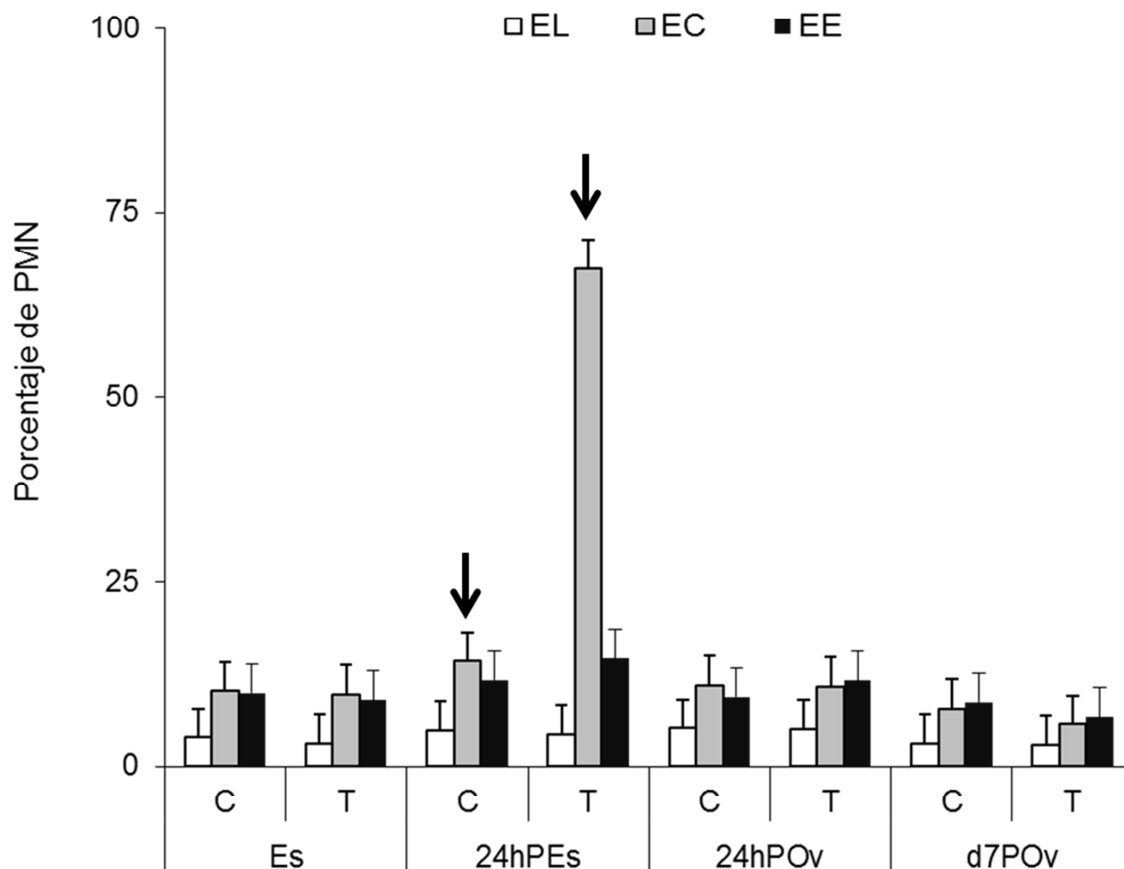


Gráfico 2: Porcentaje de PMN en epitelio luminal (EL), estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE), en yeguas ciclando resistentes a endometritis tratadas (T) o sin tratar (C) con MCC-V. Momentos del ciclo estral: inicio de la fase folicular (Es), 24 horas de declarado el inicio de la fase folicular (24 horas del tratamiento con MCC-V, para T, 24hPEs), 24 horas de la ovulación (24hPOv), día 7 de la ovulación (d7POv). Las flechas indican diferencias en el porcentaje de PMN entre el grupo tratado y el grupo control, para el mismo momento de ciclo y estrato endometrial.

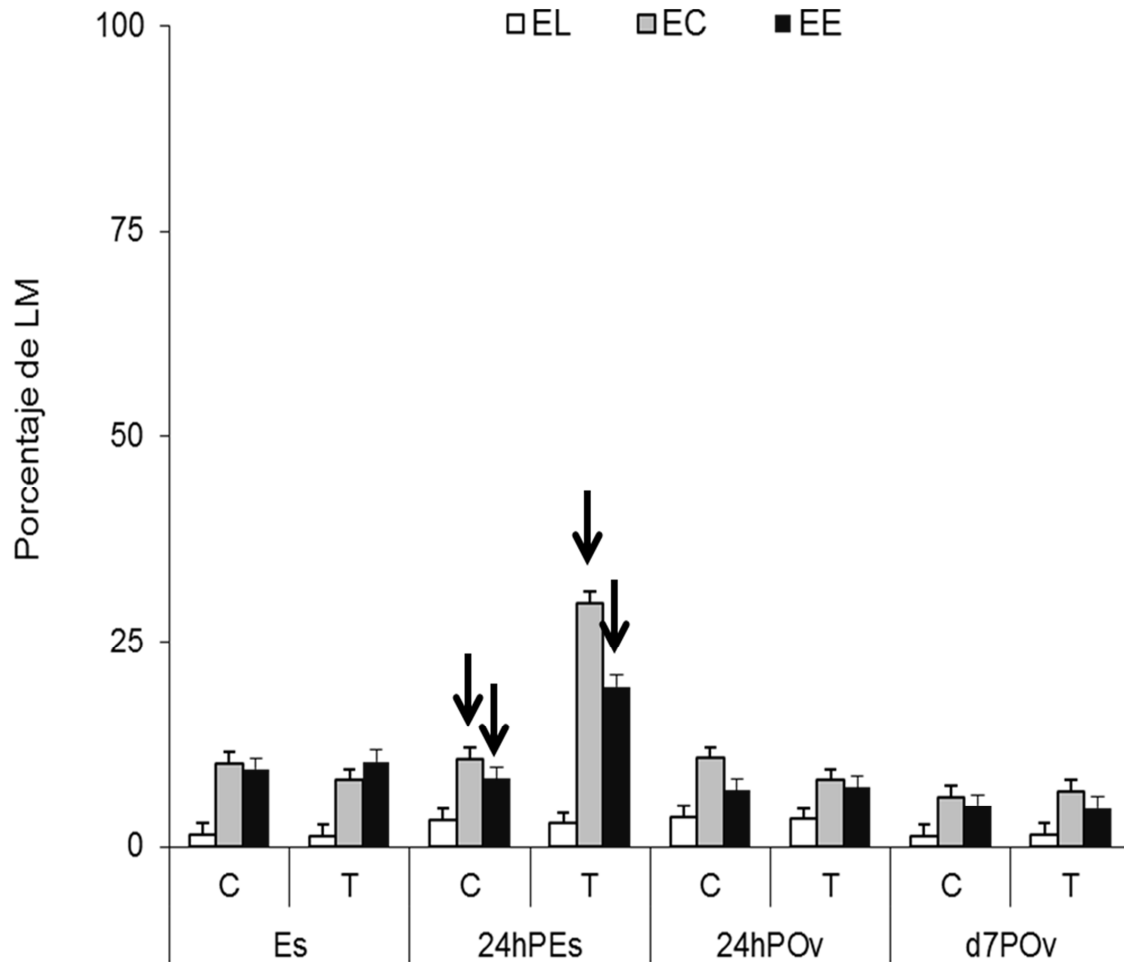


Grafico 3: Porcentaje de LM en epitelio luminal (EL), estrato compacto (EC) y estrato esponjoso (EE), en yeguas ciclando resistentes a endometritis tratadas (T) o sin tratar (C) con MCC-V. Momentos del ciclo estral: inicio de la fase folicular (Es), 24 horas de declarado el inicio de la fase folicular (24 horas del tratamiento con MCC-V, para T, 24hPEs), 24 horas de la ovulación (24hPOv), día 7 de la ovulación (d7POv). Las flechas indican diferencias en el porcentaje de LM entre el grupo tratado y el grupo control, para el mismo momento de ciclo y localización tisular.

8. DISCUSIÓN

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que reporta los cambios en las poblaciones de células inmunes en relación con la expresión de COX-2, en el endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis, tratadas con un inmunomodulador intrauterino (MCC-V).

La mayor intensidad de inmunomarcado a COX-2 y la mayor cantidad de polimorfonucleares y mononucleares endometriales a las 24 horas del tratamiento con MCC-V, en las yeguas tratadas en relación al control, indican una respuesta de

tipo inflamatorio generada por la administración de dicho inmunomodulador. Esta inflamación fue de corto tiempo y al análisis histológico todas las biopsias fueron incluidas en la escala I de Kenney & Doig (1986), indicando un endometrio saludable después del tratamiento con MCC-V.

8.1 EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DE COX-2

En el presente estudio, el inmunomarcado a COX-2 fue observado en citoplasma de las células epiteliales del endometrio, en acuerdo con lo reportado por otros investigadores. En endometrio de ovejas ciclando o preñadas, fue detectado por medio de hibridación in situ e inmunohistoquímica, el mensajero de COX-2 y su proteína únicamente en el tejido epitelial (Kim et al., 2003). Posteriormente, en endometrio de yeguas durante el diestro y la preñez temprana utilizando Northern Blotting e inmunohistoquímica, Boerboom et al. (2004), demostraron la presencia del mensajero de COX-2 y su proteína en las células epiteliales. Mediante inmunohistoquímica y PCR en tiempo real, fue demostrada la proteína de COX-2 y su mensajero en el citoplasma epitelial del endometrio de yeguas preñadas y en el tejido trofoblástico de sus embriones respectivamente (Willmann et al., 2011). Similares resultados, fueron reportados en membranas fetales y endometrio en yeguas pony al momento del parto (Palm et al., 2013). Aunque gran parte de los investigadores han reportado la presencia de COX-2 en el tejido epitelial del endometrio, dicha enzima también ha sido observada en células del estroma endometrial de yeguas con endometritis subclínica tratadas con antiinflamatorios no esteroideos y de burras inseminadas artificialmente (Koblischke et al., 2008; Vilés et al., 2013).

Los reportes demuestran que la expresión de COX-2 puede ser modificada por estímulos inflamatorios endógenos y exógenos. En la revisión de Gonzalez Pérez et al. (2002), los autores mencionan que la COX-2 es una enzima inducible que puede ser expresada prácticamente por cualquier célula o tejido. La COX-2, expresada en células del estroma del endometrio de burra y yegua, así como el gen de COX-2 hallado en macrófagos, células endoteliales y condrocitos, responden a estímulos inflamatorios (Delgado et al., 2001; Koblischke et al., 2008; Vilés et al., 2013). En contraste con estos reportes, en el presente estudio no hemos detectado inmunomarcado específico a COX-2 en células o tejidos diferentes al epitelio endometrial, ni siquiera tras la aplicación del MCC-V.

El inmunomarcado a COX-2 hallado en citoplasma de las células epiteliales del endometrio de las yeguas, concuerda con el ensamblaje, transporte y sitio de acción de esta proteína. La COX-2 es ensamblada en el retículo endoplásmico y transportada a través del citoplasma hacia las membranas celulares, donde forma complejos funcionales para catalizar el pasaje de ácido araquidónico a prostaglandina (Vane et al., 1998). Hay considerable información que sugiere que la síntesis endometrial de prostaglandinas es regulada por la actividad y expresión de COX-2, siendo el tejido epitelial, el encargado de la mayor producción de prostaglandinas (Asselin et al., 1997; Arosh et al., 2002; Boerboom et al., 2004; Atli et al., 2010). En yeguas en diestro tardío cercano a la luteólisis, aumentos en la expresión COX-2 y PGF₂ α endometrial fueron positivamente correlacionados. Las proteínas COX-2 y PGF sintasa fueron co-localizadas en las células epiteliales del endometrio (Boerboom et al., 2004). Similares correlaciones entre la expresión de

COX-2 y la síntesis de PGF2 α , fueron demostradas en endometrio de yeguas tratadas con antiinflamatorios no esteroideos (Palm et al., 2008; Koblishke et al., 2008). En el presente estudio, no fueron determinados niveles de prostaglandinas endometriales; sin embargo, apoyándonos en los reportes mencionados, los cambios en el inmunomarcado a COX-2 en el epitelio endometrial de las yeguas incluidas en este estudio, deberían resultar en cambios en la síntesis de prostaglandinas.

En el presente estudio, no fue encontrado efecto de momento del ciclo estral sobre porcentaje de células positivas a COX-2 (%T). Sin embargo, fueron encontrados efectos altamente significativos de momento del ciclo estral y de localización endometrial, sobre la intensidad de inmunomarcado a COX-2 (PI). Estos efectos sugieren que la expresión de COX-2, dependió del tipo y localización de tejido endometrial (epitelio luminal, o epitelio glandular superficial o glandular profundo) y respondieron en forma diferencial y específica a los cambios endócrinos del ciclo estral. En términos generales, el PI a COX-2 en el epitelio luminal fue mayor que en epitelio glandular en todos los momentos del ciclo estral, en ambos grupos de yeguas. Similares resultados fueron reportados en endometrio de yeguas al día 15 de la ovulación, donde mayores niveles de COX-2 fueron detectadas en epitelio luminal en relación al epitelio glandular (Boerboom et al., 2004). En yeguas con endometritis subclínica, el porcentaje de células positivas a COX-2 fue mayor en epitelio luminal que en epitelio glandular (Koblishke et al., 2008). En llamas ciclando, al momento de la ovulación el inmunomarcado a COX-2 fue mayor en epitelio glandular que en epitelio luminal, mientras que a los días 8, 10, y 12 de la ovulación fue mayor en epitelio luminal que en epitelio glandular (Bianchi et al., 2013). La mayor expresión de COX-2 en el epitelio luminal, en contraparte con la menor expresión de COX-2 en el epitelio glandular profundo, sugiere una función específica del tejido epitelial de revestimiento del endometrio, en términos de respuesta inflamatoria.

La expresión de COX-2, síntesis de prostaglandinas y su vínculo con el epitelio luminal del endometrio en la respuesta inflamatoria y eventos reproductivos como la luteólisis, han sido reportados en diversas especies. En yeguas, el contacto del semen o microorganismos con el epitelio luminal de revestimiento del endometrio, promueve la liberación de citoquinas y prostaglandinas, las cuales a su vez inducen aumentos en la expresión epitelial de COX-2 (Troedsson et al., 2001; Katila, 2012). En epitelio luminal del endometrio de mujeres, los antígenos son reconocidos por receptores denominados toll-like (TLR). Éstos, actúan en la protección inmune a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos e inducen la secreción de quimioquinas y citoquinas, que regulan la presencia y actividad de células inmunes (Wira et al., 2005). Las citoquinas son mediadores inflamatorios que inducen la expresión de COX-2 en las células o tejidos produciendo el aumento en la síntesis de prostaglandinas (Martinez Canabal & Rivas Arancibia, 2005). En nuestro estudio, similarmente a lo reportado, el aumento en la expresión de COX-2 en los epitelios y el aumento en la cantidad de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares, provocados por el tratamiento intrauterino con MCC-V, pudo haber sido mediado a través de receptores similares a TRL y quimioquinas y citoquinas. Aún no ha sido estudiado en células equinas, sin embargo se ha demostrado que uno de los mecanismos de acción del MCC-V es la

unión a los TRL-2 y TRL-4, lo cual induce señales para la producción de citoquinas pro- inflamatorias (Underhill et al., 1999).

Por otro lado, no puede obviarse que la función de las células epiteliales en endometrio es regulada a través de las hormonas sexuales en forma directa sobre las mismas e indirecta, a través de señales parácrinas, desde las células del estroma (Wira et al., 2005; Lea & Sandra 2007; Ochiel et al., 2008). Además del tratamiento con MCC-V, las variaciones cíclicas de las hormonas esteroideas plasmáticas, pueden haber influido sobre la expresión de COX-2 y poblaciones leucocitarias del endometrio. En el presente estudio, fue encontrado efecto del momento del ciclo estral sobre el PI a COX-2, indicando que las variaciones en los niveles cíclicos en las hormonas sexuales, influyeron sobre la expresión de COX-2 endometrial. Esto podría explicar por qué en el grupo control, el PI a COX-2 en el epitelio luminal, fue mayor en fase folicular que al día 7 de la ovulación. Sin embargo no hubo diferencias significativas en el PI a COX-2 entre momentos del ciclo, en los epitelios glandulares. Estos resultados sugieren una especificidad tisular en respuesta a las hormonas sexuales, en términos de COX-2.

Los estrógenos y la progesterona ejercen su acción a través de sus receptores específicos (RE y RP), que pueden actuar como factores de transcripción y regular la actividad celular (De Franco, 2002). En estudios previos, no fueron encontradas variaciones cíclicas en la distribución tisular de RE α en endometrio de yeguas ciclando con endometritis, sin embargo en yeguas resistentes a endometritis tanto RE como RP, tuvieron mayor expresión en el epitelio glandular y estroma interglandular a las 24 horas de detectado el estro en relación al día 7 de la ovulación (Acuña et al., 2011; Nuñez et al., 2013).

El rol de las hormonas sexuales y sus receptores ha sido ampliamente abordado en el mecanismo luteolítico en diversas especies. Si bien las biopsias endometriales de las yeguas del presente estudio no fueron tomadas cercano al momento de la luteólisis, la influencia de los estrógenos y la progesterona sobre la expresión de COX-2 debe ser tomada en cuenta. El papel de RE y RP, comunicaciones autócrinas y parácrinas endometriales con la participación de células epiteliales para la liberación de oxitocina, COX-2 y PGF2 α , han sido documentados en relación a la regulación endócrina de la luteólisis de rumiantes (Spencer & Bazer 1995; Robinson et al., 2001; Kim et al., 2003). En endometrio de vacas ciclando, Asselin et al. (1997), reportaron que la oxitocina sobre-regula la expresión génica del mensajero de COX-2 y que la respuesta a la oxitocina se limita al epitelio. En yeguas, al momento de la luteólisis, las mayores concentraciones de oxitocina circulantes estimulan la expresión de COX-2 endometrial, vía receptores de oxitocina (ROx) en el epitelio, con el consecuente aumento y liberación de PGF2 α epitelial (Starbuck et al., 1998; Aurich, 2011). Sharp et al. (1997), encontraron en yeguas una correlación positiva entre la liberación de PGF2 α , la concentración de ROx endometrial y la concentración plasmática de oxitocina, sugiriendo que el aumento de PGF2 α , fue inducido por la oxitocina y mediado por ROx endometriales. Asimismo, Penrod et al. (2013), utilizando cultivos de células endometriales de yeguas, demostraron que la secreción epitelial de PGF2 α puede ser inhibida a través de un antagonista ROx (Atosiban), sugiriendo que la activación de ROx desencadena la cascada de síntesis de PGF2 α , a través de COX-2. En un estudio previo, realizado en yeguas ciclando resistentes a endometritis, se encontró que al día 7 post-ovulación, el tejido epitelial del endometrio, tuvo menor expresión de RP y ROx en relación a la fase folicular,

sugiriendo que los mayores niveles de progesterona al día 7 post-ovulación, inhibieron la expresión de ambos receptores, como ha sido documentado para rumiantes y equinos (Acuña et al., 2011). En el presente estudio, la menor expresión de COX-2 hallada en el epitelio luminal del endometrio de las yeguas control al día 7 post-ovulación, podría estar relacionado al vínculo entre RE, RP y ROx. Además ha sido reportado que cuando la progesterona se encuentra en altas concentraciones plasmáticas, la expresión de COX-2 y síntesis de prostaglandina disminuyen (Kelly & Smith, 1987; Ishihara et al., 1995). Ha sido sugerido que la progesterona estimula la prostaglandina 15 deshidrogenasa, la cual cataliza la oxidación de la prostaglandina, lo que resulta en su inactivación, mientras que los estrógenos estimulan la expresión de PGF2 α (Graham & Clarke, 1997).

Pero, ¿cómo desestimamos la influencia hormonal sobre la expresión endometrial de COX-2 al momento de evaluar la respuesta al tratamiento con MCC-V? ¿Podemos descartar que el MCC-V no modificó la sensibilidad del endometrio a hormonas sexuales? En el presente estudio se determinó el efecto del tratamiento con MCC-V intrauterino sobre la expresión endometrial de COX-2, al ser comparadas con yeguas control a las cuales no se les administró MCC-V. Se observó aumento en el PI a COX-2 en el epitelio luminal y glandular superficial del endometrio, a las 24 horas del tratamiento con MCC-V en las yeguas tratadas en comparación con las yeguas del grupo control. Como fuera mencionado, los cambios en los epitelios superficiales reafirman la importancia de éstos en respuesta a la inflamación. Además, la similar expresión de COX-2, hallada en el epitelio glandular profundo a lo largo del ciclo estral, al ser comparados ambos grupos de yeguas, sugiere que en esta localización la expresión de COX-2 no fue modulada por las hormonas ováricas.

Los cambios en el PI a COX-2 en epitelio luminal, provocados por el tratamiento con MCC-V, pueden haber sido mediados a través de citoquinas que modifican la expresión de COX-2 y síntesis de prostaglandinas. Al comparar la respuesta al tratamiento intrauterino con MCC-V entre yeguas susceptibles y yeguas resistentes a endometritis, fue observado que la expresión endometrial de IL-10 fue mayor en yeguas susceptibles que en yeguas resistentes, mientras que la IL-8 fue mayor en yeguas resistentes (Fumuso et al., 2003). Las yeguas resistentes a endometritis incluidas en el presente estudio, respondieron a la inmunomodulación provocada por el tratamiento con MCC-V, aumentando la expresión de COX-2 y el número de células inflamatorias, probablemente debido a los patrones moleculares asociados a patógenos aportados por el extracto de pared celular del *Mycobacterium*. El lipoarabinomano presente en el MCC-V, se une a TLR-2 epiteliales, provocando su activación y aumentando la síntesis de factor de necrosis tumoral y la liberación de citoquinas, también actúa como factor de quimiotaxis para polimorfonucleares y mononucleares (Underhill et al., 1999; Briken et al., 2004). El ácido micólico, también presente en el MCC-V, produce una rápida estimulación de los polimorfonucleares, además de estimular el factor de necrosis tumoral, interferón gamma, IL-6, IL-2 y disminuir la síntesis de IL-10 (Korf et al., 2005). Las citoquinas pro-inflamatorias tienen efectos sobre la síntesis de prostaglandinas (Erkinheimo et al., 2000). El aumento en la expresión de COX-2 epitelial podría haber sido mediado a través de la modificación de citoquinas provocadas por el MCC-V, lo cual podría llevar al aumento en la síntesis de prostaglandinas. En el presente estudio, tales eventos debieron ser breves en el tiempo ya que el tratamiento con MCC-V provocó una

respuesta inflamatoria endometrial de tiempo corto, debido a que la expresión de COX-2 a las 24 horas post-ovulación, al día 7 post-ovulación y al inicio de la fase folicular, fueron similares. Los efectos provocados por el MCC-V, podrían resultar beneficiosos para el ambiente uterino al momento de la monta natural o inseminación artificial y cuando el embrión arriba al útero alrededor del día 6 de la ovulación.

8.2 CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN ENDOMETRIAL DE PMN y LM

En el presente estudio, sobre la cantidad total de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares, se encontró efecto de estrato endometrial, lo que sugiere una distribución específica de estas células en el tejido endometrial. Fue encontrada mayor cantidad de polimorfonucleares y mononucleares en el estrato compacto, en comparación con el estrato esponjoso y el epitelio luminal, en todos los momentos del ciclo estral y en ambos grupos de yeguas. Estos resultados están en acuerdo con lo hallado por Nuñez (2013), quien encontró mayor cantidad de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares en estrato compacto, en relación al estrato esponjoso y el epitelio luminal, en endometrio de yeguas sanas ciclando. Además, en endometrio de yeguas sanas, fue reportado que la cantidad de linfocitos CD4+ y CD8+ en estrato compacto fue mayor que en estrato esponjoso (Watson & Thompson, 1996). En 1986, Kenney & Doig, describieron en endometrio de yegua mayor celularidad en el estrato compacto en relación al estrato esponjoso. Asimismo, Priedkalns (1993), menciona en su descripción del tejido endometrial, que el estrato superficial del endometrio, consta de tejido conjuntivo laxo vascularizado, con abundantes fibroblastos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos. Las células inmunes residentes, en determinado momento ingresan al endometrio a través del torrente sanguíneo. Por otro lado la capa profunda del endometrio (estrato esponjoso), consta de tejido conjuntivo laxo, con menor celularidad que el estrato superficial. La mayor cantidad de células inmunes presentes en el estrato superficial del endometrio de la yegua, podría estar vinculada a los mecanismos de defensa inmune frente a la invasión por microorganismos o semen provocados por la monta. En el presente estudio, en las yeguas control, fue encontrada mayor cantidad de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares endometriales en fase folicular y 24 horas post-ovulación, en relación al día 7 post-ovulación. Estos resultados están en acuerdo con el efecto estimulador de los estrógenos sobre el sistema inmune y el efecto depresor de la progesterona sobre el mismo. Los estrógenos tienen efecto pro-inflamatorio en el útero, generando un influjo de leucocitos y aumento de citoquinas pro-inflamatorias; mientras que la progesterona tiene efecto antiinflamatorio (Lea & Sandra, 2007). La progesterona tiene acción sobre la proliferación, diferenciación y tráfico de leucocitos y puede actuar como modulador negativo de la actividad de macrófagos, reduciendo su migración en el útero (Hunt et al., 1998; Wira et al., 2010), mientras que los estrógenos, aumentan la migración y la actividad fagocítica de polimorfonucleares (Wira et al., 2010). Inthan-Sheameha et al. (2010), reportaron en endometrio de ovejas ciclando, mayor número de linfocitos en fase folicular en relación con la fase luteal. En endometrio de yeguas ciclando resistentes a endometritis, fue reportada mayor cantidad de linfocitos y polimorfonucleares en estrato, en relación al diestro (Fumuso et al., 2007). Sin embargo, previamente en desacuerdo con lo reportado, Watson & Thomson (1996),

encontraron similares cantidades de linfocitos en estro y en diestro en endometrio de yeguas sanas. En el presente estudio, el mayor contenido de células inmunes halladas a las 24 horas post-ovulación, en relación al día siete de la misma, podría deberse al efecto estimulador de los mayores niveles de estrógenos foliculares, que se continúa aún a las 24 horas de comenzado el diestro. En apoyo a esto, en yeguas, las concentraciones máximas de estrógenos se mantienen hasta el día dos post-ovulación (Athur et al., 1991; Aurich 2011). La mayor expresión de COX-2 y cantidad de leucocitos hallados en fase folicular en endometrio de las yeguas del grupo control, podrían estar vinculados al efecto pro-inflamatorio que ejercen los estrógenos sobre el endometrio (Lea & Sandra, 2007).

Ha sido sugerido que el control hormonal del sistema inmune, podría ser mediado a través de los receptores hormonales presentes en células inmunes. La presencia de receptores de estrógenos fue demostrada en células linfoides del endometrio de mujeres, sugiriendo que los estrógenos pueden regular directamente la actividad de células inmunes en los tejidos reproductivos (Tabibzadeh & Satyaswaroop, 1989; Stygar et al., 2001). La presencia de receptores de estrógenos y de progesterona, fue reportada en polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos del endometrio de yeguas sanas y resistentes a endometritis (Cilintano, 2012; Nuñez, 2013).

En el presente estudio, hubo efecto de grupo sobre la cantidad de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares, indicando que el tratamiento con MCC-V modificó la cantidad de células inmunes del endometrio. A las 24 horas de la administración intrauterina del MCC-V, en las yeguas tratadas, la cantidad de polimorfonucleares en estrato compacto y de mononucleares en estratos compacto y esponjoso fue mayor que en el endometrio de las yeguas del grupo control. La respuesta al MCC-V fue más importante en estrato compacto que en estrato esponjoso probablemente por vía de administración intrauterina del mismo. Estos hallazgos podrían relacionarse con el aumento en la expresión de COX-2 hallada en las yeguas tratadas en relación con sus controles. El aumento de la expresión de COX-2 sugiere un aumento en la síntesis de prostaglandina endometrial (Boerboom et al., 2004). La prostaglandina posee diversos efectos en el sistema inmune, sobre leucocitos produce su activación y favorece su migración (Vane et al., 1998). En acuerdo con esto, yeguas tratadas con antiinflamatorios no esteroideos, los cuales disminuyeron la síntesis de COX-2 y por lo tanto la cantidad de prostaglandina sintetizada, presentaron menor cantidad de polimorfonucleares en el tejido endometrial (Koblichke et al., 2008), mientras que yeguas que fueron inseminadas utilizando diferentes diluyentes, presentaron mayores niveles de expresión de COX-2 en el endometrio, acompañado de un aumento en la cantidad total de células inmunes (Palm et al., 2013).

La respuesta inflamatoria endometrial en término de células inmunes, provocada por el tratamiento con inmunomoduladores, ha sido reportada en vaca y yegua. Estudios realizados en vacas durante el estro, tratadas con lipopolisacáridos de *E. Coli* e IL-8 humana recombinante, detectaron aumento en la cantidad de polimorfonucleares endometriales en relación a los controles sin tratamiento (Singh et al., 2000; Zerbe et al., 2003). En acuerdo con el mecanismo de acción propuesto para el MCC-V, la inmunoestimulación hallada en las yeguas del presente estudio podría deberse al efecto directo del MCC-V sobre los leucocitos o efectos indirectos a través de la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios. En forma directa, los acilglicopéptidos presentes en el MCC-V prolongan la sobrevivencia y estimulan la

movilización de macrófagos hacia los tejidos, mientras que el ácido micólico provoca un rápido estímulo de la actividad de polimorfonucleares (Korf et al., 2005). En acuerdo con esto, en el presente estudio, el aumento en la cantidad de polimorfonucleares y mononucleares fue evidente a las 24 horas después del tratamiento con MCC-V. Además, se ha sugerido que la administración del MCC-V en yeguas produce activación de leucocitos mononucleares del endometrio, los cuales a su vez aumentan la síntesis y liberación de citoquinas (Fumuso et al., 2003). En tal sentido, fue demostrado que en cultivo de macrófagos de roedores, la administración del lipoarabinomanano presente en el MCC-V, provocó un efecto pro-inflamatorio, mediante el aumento en la liberación de citoquinas las cuales a su vez podrían inducir el aumento en la síntesis de COX-2 (Vane et al., 1998; Briken et al., 2004).

Los efectos producidos por el MCC-V sobre la expresión de mediadores inflamatorios, como las interleuquinas, han sido objeto de estudio por varios investigadores. En tejidos respiratorios tratados con ácido micólico y acilglicopéptidos, fue hallado una activación directa de macrófagos y un estímulo en la secreción de interleuquinas (Korf et al., 2005). La IL-8 es responsable de la quimiotaxis, migración y activación de polimorfonucleares, monocitos y linfocitos en tejido inflamado (Miller & Krangel, 1992). En yeguas ciclando, se reportó el aumento en la expresión de IL-8 endometrial tras la administración del MCC-V (Fumuso et al., 2003). En acuerdo con lo reportado y en función del aumento en la cantidad de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares y en la expresión de COX-2 endometriales, a las 24 horas de aplicado el MCC-V en las yeguas tratadas, sugiere que efectos directos e indirectos de los componentes del inmunomodulador, pueden haber operado en el endometrio de las yeguas de este estudio.

La mayor estimulación de los polimorfonucleares encontrada luego de la aplicación de MCC-V, está en acuerdo con lo reportado por Nash et al. (2010), quienes encontraron mayor cantidad de polimorfonucleares en relación a mononucleares, en respuesta al inoculado intrauterino de semen inactivado, en yeguas fértiles. Los polimorfonucleares son las primeras células inmunes que arriban a los tejidos en respuesta a la inflamación mediada a través de citoquinas y factores quimiotácticos (Katila, 2012).

La respuesta inflamatoria al tratamiento con MCC-V, en términos celulares y moleculares, fue acotada a las 24 horas post-ovulación. Los perfiles en la cantidad y distribución de las células inmunes y expresión de COX-2 en endometrio de las yeguas tratadas, fueron similares entre los días 24 horas post-ovulación y día 7 post-ovulación. Además, en estos días ambos parámetros fueron similares entre yeguas tratadas y yeguas control. Estos resultados sugieren que el MCC-V, aplicado previo al momento de la inseminación artificial o monta natural, genera un estímulo inflamatorio corto en el tiempo, que podría favorecer la remodelación celular y las condiciones uterinas. El adecuando ambiente uterino hallado al día 7 de la ovulación es favorable para el desarrollo del embrión, que llega al útero alrededor del día 6 post-ovulación.

9. CONCLUSIONES

El tratamiento intrauterino con MCC-V a yeguas sanas y resistentes a endometritis, provocó una respuesta de tipo inflamatorio en términos de expresión de COX-2 y contenido de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares.

La respuesta inflamatoria endometrial, provocada por el MCC-V, fue rápida y breve en el tiempo.

Los resultados de esta investigación sugieren que el MCC-V podría ser utilizado como tratamiento profiláctico en yeguas durante el estro, con el objetivo de preparar al endometrio frente al desafío inmunológico que implica la monta natural o inseminación artificial.

Son necesarios más estudios para caracterizar los mecanismos inmuno-endócrinos involucrados en la respuesta endometrial, frente al tratamiento con MCC-V.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) 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. 1º Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal, Viña del Mar-Chile; p: 484.
- 2) Andrade Souza F., Perez Osorio J., D' Oliveira-Souza A., Riveiro do Vale Filho V., Marc H., Chacón J L., A. Arias S. (2011). Foliculogénesis y ovulación en la especie equina Revista de Medicina Veterinaria; 22: 43-50.
- 3) Asselin E, Drolet P, Fortier MA (1997). Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F_{2α} production in endometrial epithelial cells in vitro: role of cyclooxygenase-2. *Endocrinology*; 138 (11): 4798–4805.
- 4) Arosh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA (2002). Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*; 67: 161–169.
- 5) Arthur G.H. (1991). Ciclo estral y su control. En: Arthur G.H. Reproducción y obstetricia en veterinaria. 6º ed., Barcelona, McGraw-Hill Interamericana; p: 3-49.
- 6) Atli MO, Kurar E, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, Celik S, Guzeloglu A. (2010) Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Animal Reproduction Science*; 122: 124–132.
- 7) Aurich C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*; 124: 220–228.
- 8) Bianchi CP, Meikle A, Alvarez MA, Benavente MA, Cavilla MV, Rodríguez E, Aba MA (2013). Oestrogen, Progesterone and Oxytocin Receptors and COX-2 Expression in Endometrial Biopsy Samples from the Induction of Ovulation to Luteolysis in Llamas (*Lama glama*). *Reproduction in Domestic Animals*; 48 (4): 681-690.
- 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. En: Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Brinsko S.P., Rigby S.L. *Manual of equine reproduction*. 2ª ed., St. Louis, Mosby; p: 31-42.
- 10) Boerboom D, Brown KA, Vaillancourt D, Poitras P, Goff AK, Watanabe K, Doré M, Sirois J. (2004). Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biology of Reproduction*; 70: 391–399.
- 11) Boos A., Meyer W., Schwarz R., Grunert E. (1996). Immunohistochemical assessment of estrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy

- samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Animal Reproduction Science*; 44: 11–21.
- 12) Briken Volker, Porcelli Steven A., Besra Gurdyal S., Kremer Lauren (2004). Mycobacterial Lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology*; 53 (2): 391-403.
 - 13) Brinsko S.P., Rigby S.L., Varner D.D. Blanchard T.L. (2003) A Practical Method for Recognizing Mares Susceptible to Post-breeding Endometritis. New Orleans. American Association of Equine Practitioners; 4p.
 - 14) Card C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*; 64: 580-588.
 - 15) 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; 44 p.
 - 16) Christoffersen M., Woodward E.M., Bojesen A.M., Petersen M.R., Squires E.L., Lehn-Jensen H., Troedsson M.H.T. (2012). Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology*; 78: 991-1004.
 - 17) Coutinho Da Silva, M.A. (2008). When should a mare go for assisted reproduction?. *Theriogenology*; 70: 441-444.
 - 18) Davies M.C. (2005). Fisiología de la reproducción de los équidos, cría y manejo de la yeguada. 2° ed., Zaragoza, Acribia; 417 p.
 - 19) De Franco (2002). Navigating Steroid Hormone Receptors through the Nuclear Compartment. *Molecular Endocrinology*; 16 (7): 1449–1455.
 - 20) Delgado S., Vargas C., Torrego M., Gutierrez I., Adrián E., Mataix A., García-Lerín A. (2001). ¿Qué aportan los nuevos inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2?. *Gerencia Atención Primaria. Área XI. Madrid, Insalud*; pp: 296-302. Disponible en: www.elmedicointeractivo.com/ap1/emiold/publicaciones/centrosalud5/296-302.pdf. Fecha de consulta: 18/06/2014.
 - 21) Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G., Rodriguez Veiga E., Camón Urgel J. (1999). Pelvis y órganos reproductores del caballo. En: Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G., Rodriguez Veiga E., Camón Urgel J. *Anatomía veterinaria*. 2° ed., México D.F., McGraw-Hill Interamericana; p: 601-626.
 - 22) Erkinheimo T., Saukkonen K., Narko K, Jalkanen J., Ylikorkala O., Ristimaki A., (2000). Expression of Cyclooxygenase-2 and Prostanoid Receptors by Human Myometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 85 (9): 3468-3475.

- 23) Fawcett W. (1995). Sistema reproductor femenino. En: Fawcett W. Tratado de histología. 12° ed. Madrid, McGraw-Hill Interamericana; p: 909-922.
- 24) Ferrari A, Mayid S, Pérez F, López D, Recuero M (2012). Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay. Uruguay XXI. pp150. Disponible en: <http://www.uruguayxxi.gub.uy/wpcontent/uploads2012/04/Sector%20Ecuestre.pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2013.
- 25) Fumuso, E., Giguère, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I., Bowden, R., (2003). Endometrial IL-1 b, IL-6 and TNF-a, mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis; effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 96: 23–41.
- 26) Fumuso EA, Aguilar J, Giguère S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D. (2007) Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent postbreeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 118: 30-39.
- 27) Ginther O.J., Gastal E., Gastal M., Beg M.A. (2005). Regulation of Circulating Gonadotropins by the Negative Effects of Ovarian Hormones in Mares. *Biology of Reproduction*; 73: 315–323.
- 28) González Pérez R., Poza Guedes P., Vives R., Canto G. (2002). Antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) *Alergol Inmunología Clínica*; 17: 247-254.
- 29) Graham J. Dinny, Clarke Christine L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*; 18 (4): 502-519.
- 30) Hafez, E.S.E., Hafez, B. (2002). Anatomía del aparato reproductor de la hembra. En: Hafez, E.S.E., Hafez, B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7ª ed., México D.F., McGraw-Hill Interamericana; p: 13-29.
- 31) Hunt J., Miller L., Platt J. (1998). Hormonal Regulation of Uterine Macrophages. *Developmental Immunology*; 6: 105-110.
- 32) 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.
- 33) Ishihara Osamu, Matsuoka Kikumi, Kinoshita Katsuyuki, Sullivan Mark H.F., Elderf Murdoch G. (1995) Interleukin-1P-Stimulated PGEZ Production from Early First Trimester Human Decidual Cells Is Inhibited by Dexamethasone and Progesterone. *Prostaglandins*; 49: 15-26.

- 34) Kalpokas, I., Perdigón, F., Rivero, R., Talmon, M., Sartore, I., Viñoles, C. (2010). Effect of a povidone-iodine intrauterine infusion on progesterone levels and endometrial steroid receptor expression in mares. *Acta Veterinaria Scandinavica*; 52: 66-74.
- 35) Katila, T. (1995). Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology Reproduction Monography*. 1: 515-517.
- 36) Katila T. (2012). Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. *Reproduction of Domestic Animals*; 47 (5): 31-41.
- 37) Kelly R.W., Smith S.K. (1987). Progesterone and antiprogestins, a comparison of their effect on prostaglandin production by human secretory phase endometrium and decidua. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*; 29: 181-186.
- 38) Kelly Rodney.W., King Anne E., Critchley Hilary O.D. (2001). Cytokine control in human endometrium. *Reproduction*; 121: 3-19.
- 39) Kenney R.M., Doig P.A (1986): Equine endometrial biopsy. En: Morrow DA (ed): *Current Therapy in Theriogenology 2*. Philadelphia, WB Saunders; p 723-728.
- 40) Kim S, Choi Y, Spencer TE, Bazer FW (2003). Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 1: 58-67.
- 41) Koblischke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm F, Walter I, Kolodziejek J, Nowotny N, Hoppen H-O, Aurich C. (2008) Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology*; 70:1147–1158.
- 42) Korf, J., Stoltz, A., Verschoor, J., De Baetselier, P., Grooten, J., 2005. The Mycobacterium tuberculosis cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses. *European Journal of Immunology*; 35: 890–900.
- 43) Lea Richard G, Sandra O (2007). Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Society for Reproduction and Fertility*; 134: 389–404.
- 44) 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.
- 45) Lunn D.P., Rush B.R. (2004). Immunomodulation: Principles and Mechanisms. *50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*; 6p.
- 46) Martínez Canabal A., Rivas-Arancibia S. (2005) Funciones de la prostaglandina en el sistema nervioso central. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*; 48 (5): 210-216.

- 47) Miller Michael D., Krangel Michael S. (1992). The human cytokine I-309 is a monocyte chemoattractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences. (USA)*; 89: 2950-2954.
- 48) Nash D.M., Sheldon I.M., Heath S., Lane E.A. (2010). Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Animal Reproduction Science*; 119: 31-39.
- 49) Neely D.P., Liu I.K.M., Hillman R.B. (1989). Influencia de la estación sobre la ciclicidad ovárica. En: Neely D.P., Liu I.K.M., Hillman R.B. *Reproducción Equina*. Montevideo, Agropecuaria Hemisferio Sur; p: 13-25.
- 50) Nuñez M.J. (2013). Receptores de estrógenos alfa en endometrio de yeguas resistentes a endometritis: vínculo inmuno-endócrino. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria UDELAR, Montevideo - Uruguay; 46 p.
- 51) Ochiel Daniel O., Fahey John V., Ghosh Mimi, Haddad Severina N., Wira Charles R. (2008). Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: Role of Sex Hormones in Regulating Uterine Epithelial Cell Protection Against Pathogens. *Current Womens Health Reviews*; 4 (2): 102-117.
- 52) Palm F., Walter I., Budik S., Kolodziejek J., Nowotny N., Aurich C. (2008). Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1b, IL-6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology*; 70: 843–851.
- 53) Palm F., Walter I., Nowotny N., Budik S., Helmreich M., Aurich C. (2013) Progesterin treatment does not affect expression of cytokines, steroid receptors, oxytocin receptor, and cyclooxygenase 2 in fetal membranes and endometrium from pony mares at parturition. *Theriogenology*; 79: 59–68.
- 54) Penrod Leah V, Allen Ronald E, Rhodas Michelle L, Limesand Sean W, Arns Mark J (2013). Oxytocin stimulated release of PGF2- α and its inhibition by a cyclooxygenase inhibitor and an oxytocin receptor antagonist from equine endometrial cultures. *Animal Reproduction Science*; 139: 69-75.
- 55) Priedkalns J. (1993). Sistema reproductor femenino En: Dellmann D. *Histología Veterinaria*. 2° ed., Zaragoza, Acribia; p: 279-280.
- 56) Ricketts, S.W. (1975). The technique and clinical application of endometrial biopsy in the mare. *Equine Veterinary Journal*; 7 (2): 102–109.
- 57) Robertson S.A. (2007). Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *Journal of Animal Science*; 85: E 36-E 44.
- 58) 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.

- 59) Rogan D., Fumuso E., Rodriguez E., Wade J., Sánchez Bruni S. F. (2007). Use of a Mycobacterial Cell Wall Extract (MCWE) in Susceptible Mares to Clear Experimentally Induced Endometritis With *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Equine Veterinary Science*; 27 (3): 112-117.
- 60) Romano M A, Mucciolo R G, Feliciano, Silva A E D. (1998). Reproductive biology of the mare: oestrus cycle and ovulation time. *Brazilian Journal of Veterinary Research. and Animal Science*; 35(1):25-28.
- 61) Rosciani 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*. 3p.
- 62) Samper J.C. (1997). Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares. *American Association of Equine Practitioners Proceedings* 43: 189-191.
- 63) 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.
- 64) Sharp C., Thatcher J., Salute M., Fuchs A. (1997). Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F2 alfa release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. *Journal of Reproduction and Fertility*; 109: 137-144.
- 65) Singh, J., Sidhu, S.S., Dhaliwal, G.S., Pangaonkar, G.R., Nanda, A.S., Grewal, A.S. (2000). Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Animal Reproduction Science*; 59: 159–166.
- 66) 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.
- 67) Starbuck, G., Stout, T., Lamming, G., Allen, W., Flint, A. (1998). Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*; 113: 173-179.
- 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 (9): 881-886.

- 69) 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 (1): 79-81.
- 70) Tabibzadeh, S.S., Satyaswaroop, P.G. (1989). Sex steroid receptors in lymphoid cells of human endometrium. *American Journal of Clinical Pathology*; 91 (6): 656-663.
- 71) Tizard I. (2009). Cómo se activa la inflamación. En: Tizard I. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8ª ed., Barcelona, Elsevier; p: 11-27.
- 72) Townson D.H., Pierson R.A., Ginther O.J. (1989). Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. *Theriogenology*; 32 (2): 197-204.
- 73) Troedsson Mats H.T., Liu Irwin K.M., Thurmond Mark (1993). Uterine and Blood-Derived Polymorphonuclear Neutrophils in Mares Susceptible and Resistant to Chronic Uterine Infection: Phagocytosis and Chemotaxis. *Biology of Reproduction*; 49: 507-514.
- 74) Troedsson Mats H.T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*; 52:461-471.
- 75) 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.
- 76) Troedsson, M.H.T. (2006). Interaction between spermatozoa and the mare's reproductive tract is mediated by biochemical, physical, and inflammatory mechanisms. *Pferdeheilkunde*; 22:160-164.
- 77) Underhill, D., Ozinnsky, K., Smith, K., Aderem, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*; 96 (25): 14459–14463.
- 78) VanCamp S.D. (1988). Endometrial biopsy in the mare. A review and update. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*; 4 (2): 229-245.
- 79) Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*; 38: 97–120.
- 80) Vilés K., Rabanal R., Rodríguez-Prado M., Miró J. (2013). Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the Jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. *Animal Reproduction Science*; 143: 57-63.

- 81) Watson E., Thomson R. (1996). Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*; 28: 106-110.
- 82) Williamson P., Munya S., Martin R., Penhale J. (1987). Dynamic of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*; 35: 317–325.
- 83) Willmann C, Budik S, Walter I, Aurich C. (2011). Influences of treatment of early pregnant mares with progestin altrenogest on embryonic development and gene expression in the endometrium and conceptus. *Theriogenology*; 76:61–73.
- 84) Wira C.R., Fahey J.V., Sentman C.L., Pioli P.A., Shen L. (2005). Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunological Reviews*; 206: 306–335.
- 85) 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.
- 86) 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 American Association of Equine Practitioners*; 44: 64-65.
- 87) Zerbe, H., Schuberth, H.J., Engelke, F., Frank, J., Klug, E., Leibold, W., (2003). Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology*; 60 (2): 209–223.