



***UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS***

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS – SALUD ANIMAL

***“METALOPROTEASAS Y SUS INHIBIDORES EN LA
REESTRUCTURACIÓN ENDOMETRIAL POSPARTAL EN VACAS
LECHERAS: SU RELACIÓN CON EL LOGRO DE LA PREÑEZ
INMEDIATA POSTERIOR”***

Autor: M.V. Laura Guadalupe Grötter

**Tesis presentada para optar por el grado académico de
Magíster en Ciencias Veterinarias**

Esperanza, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS – SALUD ANIMAL

**“METALOPROTEASAS Y SUS INHIBIDORES EN LA
REESTRUCTURACIÓN ENDOMETRIAL POSPARTAL EN VACAS
LECHERAS: SU RELACIÓN CON EL LOGRO DE LA PREÑEZ
INMEDIATA POSTERIOR”**

Autor: M.V. Laura Guadalupe Grötter

**Tesis presentada para optar por el grado académico de
Magíster en Ciencias Veterinarias**

Directora: Dra. Natalia Carolina Gareis

Codirectora: Dra. Melisa María del Luján Velázquez

Miembros del Jurado Evaluador:

TITULARES:

- **Dra. Laura Vanina MADDOZ (FCV - UNLP)**
- **Dr. Raúl Delmar CERUTTI (FCV – UNL)**
- **Dra. Elizabet Amanda Lorena PEREYRA (FCV – UNL)**

Esperanza, 2023

Agradecimientos

A mis padres, por darme esta vida, por ser cimiento y recorrido, y celebrarme siempre, aún en mis tropiezos y más allá de mis logros.

A mis hermanas, por ser y acompañar, desde la palabra y el silencio, y desde la sutil certeza de su incondicional presencia.

A Marco, por su inquebrantable calma, y por ser refugio y nido, donde tantas veces me reconstruí en este camino.

A Natalia Gareis, por aparecer cuando más lo necesitaba, por ser directora, colega, amiga y maestra, con la misma dedicación, con la misma paciencia. Por su inmensa ayuda. Por su espíritu de lucha. Mis gracias eternas.

A Melisa Velázquez, quien supo ser guía y mentora, brindándose en cada paso. Sosegando mis dudas y escoltando cada una de las etapas. Confiando en el proceso, en los resultados, y en mí. Gracias.

A Sofia Cainelli, por su ayuda desinteresada, por enseñar, alentar, y responder siempre desde su genuina sabiduría y entrega. Mi mejor compañera de mesada. La amiga que esta maestría me regaló. Pequeña gigante, gracias.

A mis compañeros de la cátedra de Teriogenología, Fabián, Martín, Luciano, Nacho. Por ser parte y respetar los tiempos, por ayudarme, aconsejarme y cubrir mis ausencias. Por ser maestros en los encuentros y más aún en los desencuentros. Por guardarme siempre para los miércoles una anécdota más. Gracias.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, y a la Universidad Nacional del Litoral, por darme la posibilidad de seguir formándome como profesional.

Al Sr. Decano que acompaña el cierre, y al Sr. Decano que acompañó el inicio, M.V. Sergio Parra y Mgter. M.V. Humberto Occhi. Pilares fundamentales de esta alta casa de

estudios, de toda esta formación, y principalmente, de mi grata sensación de orgullo y pertenencia.

Al Dr. Hugo Ortega y la Dra. Natalia Salvetti, por permitirme realizar este proyecto de tesis dentro de las instalaciones del Icivet, brindándome inmejorables recursos, condiciones de trabajo y equipo humano. Gracias.

A quienes fueron mis compañeros en este sendero, y me aceptaron y recibieron como una más dentro del Instituto, gracias por las charlas, los almuerzos al sol y el eterno buen humor. Gracias por ser Equipo. Belu Peralta, Aye Amweg, Lucas Etchevers, Cami Becaria, Anto Stassi, Emma Angeli, Mati Belotti, Flor Olmos, Nati Velázquez, Silvi Pirola, Luci Cattaneo, Pauli Silvestrini, Caro Engler.

A Ernesto Quercia y a todo el personal de La Cabañita, quienes muy gentilmente nos permitieron realizar el muestreo de esta tesis.

A Marcelo Signorini, por su apoyo y excelente predisposición ante cada consulta estadística.

A tantos de los docentes y personal de la FCV, quienes incluso sin darse cuenta, con cada consejo de pasillo, con cada palabra de aliento, me sostuvieron y contuvieron en todo este proceso, Marcelo Ruíz, Dana Plaza, Pablo Díaz, Indiana Diez Rodríguez, Rafael Althaus, Negro Bertoli, Sebastián Recce, María Laura Gasparotti, Antonio Sciabarrasi, Alejandra Sosa.

A mis amigos y amigas de la vida, mi gran familia del corazón, quienes durante todos estos años, han escuchado, entendido, secado lágrimas y expandido abrazos. Me han querido, cobijado y elegido. Y por, sobre todo, han sido trampolín y pileta llena. Gracias. A todos y cada uno, no hubiese podido, sin que ustedes creyeran que yo podía.

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µm	Micra
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CC	Condición corporal
DEL	Días en lactancia
DPP	Días posparto
EDTA	Ácido etilenodiaminatetraacético
EG	Epitelio Glandular
EL	Epitelio Luminal
Es	Estroma
FF	Fase Folicular
FL	Fase Lútea
g	Fuerza centrífuga relativa
GAG	Glicosaminoglicanos
hs	Horas
IA	Inseminación artificial
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IPC	Intervalo Parto-Concepción
IPP	Intervalo Parto-Parto
M	Molar
MEC	Matriz extracelular endometrial
Min	Minuto

ml	Mililitro
MLG	Modelo Lineal Generalizado
MMP	Metaloproteasas de la matriz
MT-MMP	Metaloproteasa de la matriz de tipo membrana
PBS	Buffer fosfato salino
PGF	Prostaglandina
pp	Período pospartal
t	Tiempo
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
TIMP	Inhibidores tisulares de las metaloproteasas
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
VEGF	Factor de crecimiento Vascular
W	Vatio

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS e HIPÓTESIS	3
1.1.1. Objetivo General.....	3
1.1.2. Objetivos Específicos	3
1.1.3. Hipótesis	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Aspectos generales en relación al establecimiento de la preñez.	5
2.2. Anatomía del útero bovino	6
2.3. Histología del endometrio	9
2.4. Período pospartal	13
2.5. Matriz extracelular, metaloproteasas de la matriz y sus inhibidores.....	14
2.5.1. Composición de la Matriz Extracelular.	14
2.5.2. Metaloproteasas de la matriz. Generalidades.	16
2.5.3. Participación de las metaloproteasas y sus inhibidores en reproducción.	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Lugares de desarrollo del trabajo	23
3.2. Aspectos éticos	23
3.3. Grupos de animales	23
3.4. Toma y Procesamiento de las Muestras	26
3.4.1. Biopsias Uterinas.....	26
3.4.2. Sangre	29
3.4.2.1. Determinación de las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol y progesterona	29
3.4.3. Expresión proteica y localización endometrial de Metaloproteasas y sus Inhibidores.....	29
3.4.3.1. Inmunohistoquímica indirecta en muestras de útero	30
3.4.3.2. Análisis de imágenes	33
3.5. Análisis Estadístico de los resultados obtenidos.	33
4. RESULTADOS	35

4.1. Niveles de expresión proteica de MMP2, MMP14 y MMP9 en endometrio de vacas lecheras durante el período pospartal.	36
4.1.1. Niveles de expresión proteica de MMP2 en endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular.....	36
4.1.2. Niveles de expresión proteica de MMP2 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea	38
4.1.3. Niveles de expresión proteica de MMP14 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular.....	42
4.1.4. Niveles de expresión proteica de MMP14 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea	44
4.1.5. Niveles de expresión proteica de MMP9 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular.....	48
4.1.6. Niveles de expresión proteica de MMP9 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea.	50
4.2. Niveles de expresión proteica de TIMP1 y TIMP2 en el endometrio de vacas lecheras durante el período pospartal.	54
4.2.1. Niveles de expresión proteica de TIMP1 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular.....	54
4.2.2. Niveles de expresión proteica de TIMP1 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea.	56
4.2.3. Niveles de expresión proteica de TIMP2 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular.....	60
4.2.4. Niveles de expresión proteica de TIMP2 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea.	62
4.3. Relaciones entre la expresión proteica de metaloproteasas de la matriz y la expresión proteica de Inhibidores tisulares de metaloproteasas en el endometrio pospartal de vacas lecheras.	66
4.3.1. Relación entre la expresión proteica de MMP2 y la expresión proteica de cada uno de los TIMP.....	66
4.3.2. Relación entre la expresión proteica de MMP14 y la expresión proteica de cada uno de los TIMP.....	67
4.3.3. Relación entre la expresión proteica de MMP9 y la expresión proteica de cada uno de los TIMP.....	68

4.4. Asociación de los niveles de expresión proteica de Metaloproteasas y sus Inhibidores con el retraso en la concepción.	68
4.4.1. Asociación entre la expresión proteica de MMP2 y el retraso en la concepción.	69
4.4.2. Asociación entre la expresión proteica de MMP14 y el retraso de la concepción.	71
4.4.3. Asociación entre la expresión proteica de MMP9 y el retraso en la concepción.	73
4.4.4. Asociación entre la expresión proteica de TIMP1 y el retraso en la concepción.	75
4.4.5. Asociación entre la expresión proteica de TIMP2 y el retraso en la concepción.	77
5. DISCUSIÓN	80
5.1. Expresión proteica de Metaloproteasas y sus Inhibidores en el endometrio pospartal de vacas lecheras en Fases Folicular y Lútea.	80
5.1.1. Expresión de las Metaloproteasas y sus Inhibidores en el endometrio pospartal de vacas lecheras, durante la Fase Folicular.....	82
5.1.2. Expresión de las Metaloproteasas y sus Inhibidores en el endometrio pospartal de vacas lecheras, durante la Fase Lútea.....	84
5.2. Relaciones halladas entre la Expresión de las Metaloproteasas y sus Inhibidores en el Endometrio pospartal de vacas lecheras.....	91
5.3. Asociaciones halladas entre los niveles de expresión proteica de Metaloproteasas y sus Inhibidores con el retraso en la concepción.	93
6. CONCLUSIONES	95
7. BIBLIOGRAFÍA	97

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. MMP y sustratos sobre los que actúa. Adaptado de Curry y Osteen, 2003.	20
Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados, y las condiciones de uso en la técnica de IHQ indirecta.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vista Lateral (A) y Dorsal (B) del aparato reproductor de la Vaca. Extraído de Senger, 2003.....	8
Figura 2: A) Epitelio luminal (EL) y Estroma (Es) en corte de tejido endometrial.....	10
Útero, bovino; H-E; 40X. (B) Epitelio glandular (EG) y estroma (Es) en corte de tejido endometrial. Útero, bovino; H-E; Magnificación 400X. Barra = 25 μ m.....	10
Figura 3: Ilustración esquemática del Estrato o Zona basal y Estrato o Zona funcional del endometrio uterino. Extraído de Ross y Pawlina, 2015.....	11
Figura 4: Ilustración esquemática del tejido uterino. Extraído de Senger 2003.	12
Figura 5. La estructura de la matriz extracelular, adaptado de Kusindarta y Wihadmadyatami, 2018.....	15
Figura 6. Distribución de la toma de muestras sanguíneas, aplicaciones de D-Cloprostenol y biopsias uterinas según los días postparto.....	25
Figura 7: (A) Pasos para realizar el examen de flujo vaginal utilizando Metricheck. (B) Escala de flujo vaginal obtenido mediante Metricheck. Score 1 = moco claro. Score 2 = moco en su mayoría claro con pequeñas manchas de pus. Score 3 = moco que contiene <50% de pus. Score 4 = moco que contiene \geq 50 % de pus. Score 5 = moco que contiene \geq 50% de pus y olor. Extraído de Doyle y col., 2019.	27
Figura 8: (A) Toma de biopsia uterina guiada por técnica recto-vaginal de enhebrado cérvico-uterino. (B) Retiro de la biopsia desde la pinza y colocación en placa de Petri conteniendo formol bufferado al 10%	28
Figura 9: Intervalos Parto – Primer Servicio en las vacas de ALTO y BAJO IPC. Resultados de Prueba de Mann-Whitney.....	35
Figura 10: Imágenes representativas de los controles negativos de inmunomarcación para cada uno de los Anticuerpos utilizados. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	36
Figura 11: Expresión proteica de MMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada en Es, EL y EG del endometrio pospartal, de vacas en FF (n=18), con ALTO y BAJO IPC, a	

los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.....	37
Figura 12: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	37
Figura 13: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	38
Figura 14: Expresión proteica de MMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	39
Figura 15: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FL, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	39
Figura 16: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FL, con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	40
Figura 17: Expresión proteica de MMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO IPC (n=10), a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	41
Figura 18: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	41
Figura 19: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, E y EG. Magnificación 400X.....	42
Figura 20: Expresión proteica de MMP14 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FF (n=18) con BAJO y ALTO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	43
Figura 21: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	43

Figura 22: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	44
Figura 23: Expresión proteica de MMP14 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24) con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	45
Figura 24: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FL, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	45
Figura 25: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	46
Figura 26: Expresión proteica de MMP14 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO IPC (n=10), a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	47
Figura 27: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	47
Figura 28: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	48
Figura 29: Expresión proteica de MMP9 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FF (n=18) con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	49
Figura 30: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	49
Figura 31: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	50
Figura 32: Expresión proteica de MMP9 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con ALTO y BAJO IPC, a	

los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.	51
Figura 33: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	51
Figura 34: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	52
Figura 35: Expresión proteica de MMP9 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO IPC (n=10), a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.	53
Figura 36: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	53
Figura 37: Imágenes representativas de área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	54
Figura 38: Expresión proteica de TIMP1 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, ELy EG del endometrio pospartal de vacas en FF (n=18), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.	55
Figura 39: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FF con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	55
Figura 40: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FF con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	56
Figura 41: Expresión proteica de TIMP1 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24) , con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	57
Figura 42: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	57

Figura 43: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	58
Figura 44: Expresión proteica de TIMP1 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO IPC (n=10), a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	59
Figura 45: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y epitelio EG. Magnificación 400X.	59
Figura 46: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	60
Figura 47: Expresión proteica de TIMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FF (n=18), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < ,05$).	61
Figura 48: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FF con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	61
Figura 49: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FF con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	62
Figura 50: Expresión proteica de TIMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < ,05$).	63
Figura 51: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	63
Figura 52: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	64
Figura 53: Expresión proteica de TIMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO	

(n=10) IPC, a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)	65
Figura 54: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	65
Figura 55: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.	66
Figura 56: (A) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP2/TIMP1, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. (B) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP2/TIMP2, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.	67
Figura 57: (A) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP14/TIMP1, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. (B) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP14/TIMP2, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.	67
Figura 58: (A) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP9/TIMP1, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. (B) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP9/TIMP2, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)	68
Figura 59: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP2 en EL ($p > 0 05$).....	70
Figura 60: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP2 en Es ($p > 0 05$).	70
Figura 61: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP2 en EG ($p > 0 05$).	71
Figura 62: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP14 en EL ($p > 0 05$).....	72
Figura 63: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP14 en Es ($p > 0 05$).	72
Figura 64: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP14 en EG ($p > 0 05$).	73
Figura 65: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP9 en EL ($p > 0 05$).....	74

Figura 66: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP9 en Es ($p > 0.05$).	74
Figura 67: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP9 en EG ($p > 0.05$).	75
Figura 68: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP1 en EL ($p < 0.05$).	76
Figura 69: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP1 en Es ($p > 0.05$).	76
Figura 70: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP1 en EG ($p > 0.05$).	77
Figura 71: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP2 en EL ($p > 0.05$).	78
Figura 72: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP2 en Es ($p > 0.05$).	78
Figura 73: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP2 en EG ($p > 0.05$).	79

RESUMEN

La evaluación del Intervalo Parto-Concepción (IPC), permite conocer el comportamiento reproductivo de las vacas durante el período pospartal (pp), sabiendo que juega un importante papel en el éxito reproductivo del rodeo y, por tanto, influye en la producción y beneficio económico de la empresa agropecuaria. Si bien se esperaría que las vacas se encuentren ciclando y el tejido endometrial se regenere antes de la cuarta semana pp, actualmente los sistemas lecheros presentan un bajo rendimiento reproductivo. En este sentido, la reestructuración de la matriz endometrial constituye uno de los procesos de remodelación uterina pp más relevantes, y en este punto, el sistema de metaloproteasas de la matriz (MMP) y sus inhibidores (TIMP), estarían directamente involucrados en la degradación proteolítica de la misma, en coordinación con la esteroidogénesis ovárica. En este trabajo, se investigó la expresión proteica de MMP2, MMP14 y MMP9, y de sus inhibidores, TIMP1 y TIMP2, en epitelio luminal, epitelio glandular y estroma del endometrio de vacas lecheras a los 45 y 60 días posparto (DPP), que se encontraban tanto en fase lútea como folicular. Se observó que la expresión aumentada de MMP2 y de MMP14, no estaría asociada con una demora en la concepción de los animales, aun expresándose a los 60 DPP, y que la función de TIMP2 como inhibidor o activador dependería de la expresión de dichas metaloproteasas. Asimismo, la relación entre MMP9 y TIMP1, así como la expresión aumentada de este último, podrían vincularse a la ocurrencia de la futura preñez posparto.

Palabras Clave: Intervalo Parto-Concepción – Metaloproteasas – Inhibidores de Metaloproteasas - Vacas – Endometrio posparto

SUMMARY

The Calving-Conception Interval (IPC), allows to evaluate the reproductive behavior of cows during the postpartum period (pp), knowledge that it plays an important role in the reproductive success of the dairy cattle and, therefore, influences production and the economic benefit of the cattle farmers. Although cows would be expected to be cycling and endometrial tissue to regenerate before the fourth week pp, dairy systems currently have low reproductive performance. The restructuring of the Endometrial Matrix, has a relevant participation in the processes of uterine remodeling pp, and at this point, the matrix metalloprotease system (MMP) and its inhibitors (TIMP) would be directly involved in the proteolytic degradation of the matrix itself, in coordination with ovarian production of steroid hormones. In this work, the protein expression of MMP2, MMP14 and MMP9, and their inhibitors, TIMP1 and TIMP2, in the luminal epithelium, glandular epithelium and stroma of the endometrium of dairy cows in both the luteal and follicular phases, at 45 and 60 days postpartum (DPP), was investigated. It was observed that the increased expression of MMP2 and MMP14 would not seem to be associated with a delay in conception in the animals, even when expressed at 60 DPP, and furthermore, the activity of TIMP2 as an inhibitor or activator would depend on the expression of these. Likewise, the relationship between MMP9 and TIMP1, as well as the increased expression of the latter, could be linked to the occurrence of a future postpartum pregnancy.

Keywords: Calving-Conception Interval – Metalloproteases – Metalloprotease inhibitors- Cows – Postpartum endometrium

1. INTRODUCCIÓN

Alcanzar buenos índices reproductivos es uno de los requisitos fundamentales para lograr una rentabilidad aceptable en los rodeos (De Vries, 2006). El comportamiento reproductivo de las vacas en el posparto, juega un importante papel en el éxito reproductivo y, por tanto, influye en la producción y el beneficio económico de la empresa agropecuaria. El mismo, ha sido evaluado a través de parámetros específicos como el Intervalo Parto-Parto (IPP) y el Intervalo Parto-Concepción (IPC), entre otros. En los últimos tiempos, se ha determinado que, para alcanzar una óptima eficiencia reproductiva, es primordial enfocar los esfuerzos en el logro de la preñez, reducir el tiempo del IPC y el número de inseminaciones o servicios necesarios para que esto ocurra (Ferguson y Galligan, 2000). Las vacas deben parir a intervalos que permitan maximizar su producción individual, así como la producción lechera de todo el rodeo (Forero, 2004; Recce, 2013), por esto, se debe procurar que la mayoría de las vacas queden preñadas entre los 85 y 120 días en lactancia (DEL) o días posparto (DPP) (LeBlanc y col., 2002).

Una buena salud reproductiva posparto en el ganado lechero, se evidencia al observar un útero completamente involucionado y libre de infecciones y cuando, además, las vacas hayan reanudado su ciclicidad al momento de ingresar a servicio, entre los 50 a 60 DPP (LeBlanc y col., 2002). En condiciones normales, entre la segunda y cuarta semana posparto, el tejido endometrial dañado se regenera, se desarrolla una onda folicular y el animal ovula su primer folículo dominante y forma un cuerpo lúteo, reiniciando así su ciclicidad (Sheldon y col., 2009a).

Los sistemas lecheros actuales se encuentran caracterizados por el bajo rendimiento reproductivo, frecuentemente asociado a la intensificación y al aumento de la producción individual de leche. En efecto, el conjunto de medidas destinadas a aumentar la productividad no tiene un efecto positivo sobre la capacidad reproductiva de las vacas. En condiciones de cría intensiva en vacas lecheras de alta producción, se ha encontrado una correlación negativa entre la alta productividad y la capacidad reproductiva (Dobson y col., 2007; Baimishev y col., 2018). Se describe que la tasa de concepción en vacas de alta producción está en permanente descenso a medida que pasan los años, quizás por la elevada exigencia

productiva que se impone al ganado (Sheldon y col., 2009a). Dentro de las alteraciones reproductivas podemos nombrar el retraso en la reanudación ovárica posparto, fallas en la ovulación, pérdidas embrionarias tempranas, entre otras (Wathes, 2012). Las pérdidas embrionarias conforman uno de los principales problemas reproductivos. Estas pérdidas ocurren principalmente entre la primera y tercera semana de preñez (Córdova y col., 2002; Diskin y Morris, 2008; Geovanny, 2018) y es mayor en las vacas lecheras de alta producción (De Vries, 2006; Moore y Thatcher, 2006; Diskin y Morris, 2008; Minten y col., 2013). Una característica única de los tejidos reproductivos es su capacidad de modificarse según los ciclos fisiológicos. Todos los tejidos experimentan diferenciación y desarrollo durante la embriología, pero los órganos reproductivos tienen ciclos de actividad como una característica integral de su estado maduro y funcional (Luck y Zhao, 1995). El éxito de la implantación del embrión depende de sucesos claves como la preparación del endometrio durante el ciclo estral y especialmente, de características y eventos puntuales como, por ejemplo, la capacidad del trofoblasto para fusionarse con el epitelio endometrial en la región caruncular. En este sentido, la remodelación del endometrio durante el ciclo estral y la gestación temprana, sigue siendo crucial para el establecimiento de la preñez y para que el proceso de implantación ocurra de manera normal (Mishra y col., 2010). La matriz extracelular endometrial (MEC), componente no celular que brinda soporte físico a las células uterinas, tiene una relevancia fundamental en este proceso. La abundancia de proteínas de la misma, está finamente controlada por la síntesis y la degradación proteolítica, y cualquier alteración de dicho equilibrio puede provocar anomalías en la implantación y consecuente infertilidad (Skinner y col., 1999). La degradación proteolítica de las proteínas de la MEC, se encuentra modulada en parte por la expresión del sistema de metaloproteasas (MMP, del inglés: *matrix metalloproteinases*) y sus inhibidores (TIMP, del inglés: *tissue inhibitors of metalloproteinases*) (Salamonsen, 1999; Fata y col., 2000; Kizaki y col., 2008) y todo ello está en coordinación con la producción ovárica de hormonas esteroideas (Henriet y col., 2002; Spencer y col., 2004). Estudios previos han demostrado que durante la implantación y la placentogénesis en bovinos, las MMP se expresan en el endometrio de una manera espacio-temporal dependiente y juegan un rol destacado en la fusión del embrión al epitelio luminal y también en la activación de producción de citoquinas y factores de

crecimiento por parte del estroma endometrial (Mishra y col., 2010). Sin embargo, no se han estudiado en profundidad las modificaciones de dicho sistema y sus inhibidores en el momento de la remodelación pospartal de vacas lecheras, previo a ser liberadas a servicio.

1.1. OBJETIVOS e HIPÓTESIS

1.1.1. Objetivo General

Evaluar la participación de las metaloproteasas y sus inhibidores en la restauración y remodelación endometrial de vacas lecheras, teniendo en cuenta su potencial efecto sobre la receptividad endometrial pospartal.

1.1.2. Objetivos Específicos

1) Evaluar la expresión proteica de metaloproteasas de la matriz (MMP2, MMP9, MMP14) en el endometrio pospartal de vacas lecheras, durante las fases lútea y folicular, previo a su liberación a servicio.

2) Evaluar la expresión proteica de inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP1 y TIMP2) en el endometrio pospartal de vacas lecheras, durante las fases lútea y folicular, previo a su liberación a servicio.

3) Establecer las relaciones entre la expresión proteica de metaloproteasas de la matriz (MMP2, MMP14, MMP9) y la expresión proteica de Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP1 y TIMP2) en el endometrio pospartal de vacas lecheras en fase lútea.

4) Determinar si los niveles de expresión de las metaloproteasas de la matriz y sus inhibidores en el útero pospartal de vacas lecheras en fase lútea, están asociados a la demora en la concepción inmediata al parto.

1.1.3. Hipótesis

Considerando la importancia de las MMP y sus inhibidores en el proceso de remodelación endometrial pospartal, se propone que: alteraciones en los procesos pre-implantatorios de reparación/degradación de la Matriz Extracelular (MEC) en los que interviene el sistema MMP/TIMP, podrían estar asociados a un retraso en la concepción en vacas lecheras y, consecuentemente, al aumento del intervalo parto-concepción.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos generales en relación al establecimiento de la preñez.

Durante las últimas décadas, se ha observado que los índices de eficiencia reproductiva han disminuido en relación a la intensificación e incremento de la exigencia productiva. El ganado, y mayormente, las vacas lecheras de alta producción, se someten a numerosos factores estresantes relacionados con el ambiente, el manejo y la nutrición, que pueden inhibir o perjudicar su potencial productividad y bienestar general (Thatcher y col., 2002; Carroll y Forsberg, 2007). En particular, se ha visto que el mérito genético para la producción lechera puede afectar significativamente el patrón de cambio en las concentraciones plasmáticas de metabolitos y hormonas. Éstas tienen efectos sobre el sistema inmune, la actividad ovárica pospartal, la funcionalidad del útero e hipófisis-hipotálamo, afectando en muchos casos la fertilidad del ganado (Glauber, 2013; Cainelli, 2019).

Entre los principales problemas reproductivos en todos los sistemas de producción ganaderos, la pérdida embrionaria es uno, cuyos efectos directos se relacionan con subfertilidad, lo que a su vez se refleja en la reducción de las tasas de concepción en cada servicio (Diskin y col., 2006; Diskin y Morris, 2008). Tal es así, que la supervivencia de los embriones se convierte en un factor con importante impacto sobre la producción y la eficiencia económica en todos los sistemas pecuarios (Santos y col., 2004; Hansen y Block, 2004). Diversos estudios concuerdan en que la mayoría de las pérdidas embrionarias ocurren principalmente entre la primera y tercera semana de preñez (Córdova y col., 2002) particularmente entre el día 7 y 16 de gestación (Sreenan y Diskin, 1987; Diskin y Morris, 2008; Berg y col., 2010; Minten y col., 2013). Asimismo, se ha observado que la pérdida embrionaria temprana es aún mayor en las vacas de alta producción láctea (De Vries, 2006; Moore y Thatcher, 2006; Minten y col., 2013). En estimaciones realizadas en Estados Unidos y Gran Bretaña, el porcentaje de inseminaciones artificiales exitosas en el ganado destinado a la producción de carne es del 90%, del cual la tasa de pérdida embrionaria/fetal es de aproximadamente el 35-50 % (Diskin y col., 2006; Minten y col., 2013). Estudios realizados en Argentina, determinaron mayores pérdidas de gestación en tambos con rodeos puramente

de raza Holando argentino (Miguel Catalino y col., 2017). Por otro lado, otros autores pudieron constatar que las vacas multíparas presentaron mayores porcentajes de pérdidas de gestación que las primíparas, entre los días 29 y 45 posparto (Perez Wallace, 2013)

Para el éxito de la preñez, el estado fisiológico del útero debe permitir la implantación y el crecimiento del embrión (Ulbrich y col., 2013; Minten y col., 2013). Estudios previos sugieren que las secreciones endometriales actúan como reguladores primarios de la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo del embrión a lo largo de la gestación (Bazer y col., 1979; Gray y col., 2001; Spencer y col., 2008), lo que indica que, durante el periodo previo a la implantación, el embrión se expone a un entorno marcadamente cambiante (Leese, 1988; Wolf y col., 2003). Este periodo pre-implantatorio resulta crítico ya que se ha reportado que entre los días 8 y 17, previo al reconocimiento materno, las pérdidas embrionarias fluctúan entre el 30-40% (Thatcher y col., 1994). La implantación propiamente dicha es producto de la interacción entre las membranas asociadas propias del embrión y el endometrio de la hembra gestante, donde se produce el reconocimiento materno de la preñez. Este proceso es indispensable para el subsecuente mantenimiento de la gestación (Duica y col., 2007). En este sentido, estudios previos han sugerido que muchos de los problemas relacionados al establecimiento de la preñez, podrían atribuirse a una comunicación defectuosa entre el embrión y el entorno materno, lo que provocaría una receptividad endometrial inadecuada o deficiente (Thatcher y col., 2001). Sin embargo, en rumiantes, el conocimiento de los complejos mecanismos biológicos y genéticos que gobiernan la receptividad endometrial y la implantación del embrión es aún limitado (Minten y col., 2013; Ulbrich y col., 2013).

2.2. Anatomía del útero bovino

El tracto reproductivo de la hembra consta de los ovarios, el oviducto, el útero, la vagina, y los genitales externos (Figura 1). Los ovarios son los encargados de producir las gametas sexuales femeninas y las hormonas que ejercerán influencia sobre los demás órganos involucrados en la reproducción. Los oviductos o trompas de Falopio, proveen un ambiente óptimo para la fertilización y para el desarrollo embrionario preimplantatorio. El útero, por

su parte, experimenta una definida sucesión de cambios durante el estro y los ciclos reproductivos, proveyendo así, el ambiente para el transporte espermático, el desarrollo embrionario temprano y el sitio de implantación del embrión eclosionado (Dellmann, 1994). La unión entre el oviducto y el cuerno uterino ipsilateral se denomina unión útero-tubárica, y en las vacas, regularía el movimiento del embrión hacia el interior de la luz uterina respondiendo a estímulos de tipo hormonal. El cérvix (o cuello uterino) es una barrera que protege al útero del ambiente exterior, lubricándose durante el período de celo y sellándose durante la gestación. Tiene unos 10 cm de largo, siendo su pared gruesa, muscular y rica en fibras elásticas. La mucosa-submucosa, forma altos pliegues primarios, con pliegues secundarios y terciarios, que le dan a la luz del órgano, una apariencia espiralada. Ésta se cierra por una serie de proyecciones irregulares de su superficie que engranan entre sí, protegiendo eficazmente el ambiente uterino interno. No existen glándulas en el cérvix, sin embargo, las células globosas pueden secretar un moco denso, sobre todo durante el estro; este moco también es el origen del tapón mucoso que sella el canal cervical del animal gestante (Sisson y Grossman, 1982; Dyce y col., 1999; Hopper, 2014). El cérvix conecta con la vagina, que es, por un lado, el órgano copulatorio, y por otro, el canal dilatado a través del cual el feto es expulsado desde el útero. Su epitelio varía en altura y estructura según las etapas del ciclo estral. El segmento terminal del tracto genital en el que se abre la uretra se denomina vestíbulo vaginal y la vulva representa el límite caudal conteniendo el clítoris, órgano homólogo al pene (Dellmann, 1994; Senger, 2003; Sisson y Grossman., 1982).

El útero consta de un cuello (cérvix), un cuerpo y dos cuernos. El cuerpo tiene sólo unos 3 a 4 cm de largo, sin embargo, los cuernos pueden llegar a medir entre 35 a 40 cm. Estos últimos se ramifican desde el cuerpo, pero están unidos por peritoneo (tejido conjuntivo). El cérvix por su parte, tiene una longitud de 10 cm (Sisson y Grossman, 1982). La pared uterina consta de tres capas, denominándose desde la más externa hacia la más interna: serosa o perimetrio, muscular o miometrio y mucosa-submucosa o endometrio (Dellmann, 1994; Budras y col., 2003). El perimetrio o túnica serosa, es la continuación del peritoneo abdominal en el útero. El miometrio está constituido por dos capas de músculo liso, una capa interna más gruesa y una externa más fina, separadas mutuamente por una capa vascular. El endometrio (mucosa), consiste en un epitelio de revestimiento, glándulas tubulares y un

tejido conjuntivo especial con muchas células y pocas fibras (estroma) (Mullins y Saacke, 2003; Welsch, 2014). En el endometrio se encuentran las carúnculas uterinas, prominencias estromales densas, aglandulares, poco elevadas, cubiertas por epitelio luminal, de disposición longitudinal y circular, cuya distribución puede ser irregular o en filas (Sisson y Grossman, 1982; Dyce y col., 1999, Gray y col., 2001). Estas estructuras son ricas en fibroblastos, están altamente vascularizadas, están formadas por estroma subepitelial engrosado y se unen con las membranas fetales (cotiledones) durante la formación de la placenta, conformando de esta forma los denominados placentomas (Dellmann, 1994; Hopper, 2014). El endometrio “intercaruncular” se ubica entre las carúnculas y contiene glándulas uterinas enrolladas y ramificadas, que secretan o transportan una variedad de enzimas, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, hormonas, proteínas transportadoras y otras sustancias (Guillomot, 1995; Gray y col., 2001). El endometrio bovino, presenta cambios histológicos que responden a las hormonas presentes durante el ciclo estral, así como también al estado gestacional, incluyendo variaciones en la altura del epitelio superficial y epitelio glandular, en el tamaño del lumen, desarrollo y secreción glandular y en el edema estromal (Dellmann y Brown, 1987; Ohtani y col., 1993; Dellman y Carithers, 1996).

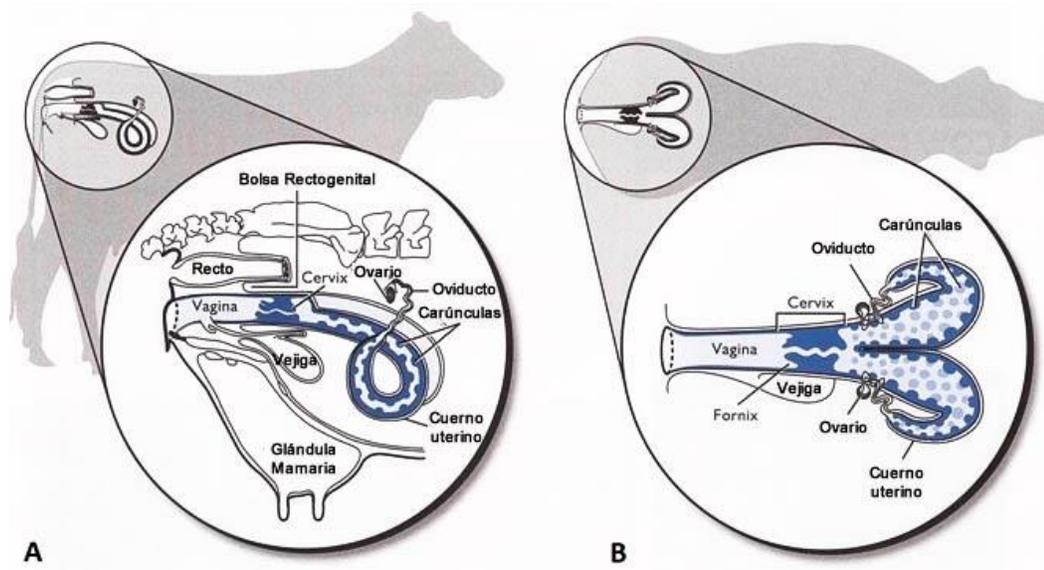


Figura 1: Vista Lateral (A) y Dorsal (B) del aparato reproductivo de la Vaca. Extraído de Senger, 2003.

2.3. Histología del endometrio

El endometrio bovino se encuentra constituido por un compartimento epitelial, uno estromal y otro vascular con la existencia, además, de una población de células inmunes residentes. Todo ello se encuentra situado en dos regiones que difieren tanto en estructura como función, denominadas zona superficial o funcional y zona profunda o basal (Figura 3). La primera se transforma y regenera en cada ciclo estral, mientras que la segunda permanece y constituye la base para regenerar cíclicamente el endometrio (Dellmann, 1994; Horst-Dieter, 1994; Simón y col., 2009).

El epitelio endometrial, está constituido por un componente luminal (EL -epitelio luminal) y otro glandular (EG – epitelio glandular-) (Figura 2 y 4). Como el resto de las mucosas, actúa como barrera para proporcionar protección contra los patógenos que logran acceder hasta la cavidad endometrial, pero también debe permitir regular la implantación del embrión que es, en esencia, la función primordial del endometrio. Dicho epitelio endometrial está regulado por las hormonas esteroideas ováricas que inducen cambios morfológicos y bioquímicos cíclicos que ayudan a mantener un microambiente adecuado para la implantación del embrión (Simón y col., 2009). El EL es cilíndrico pseudoestratificado y/o cilíndrico simple en rumiantes. La altura y la estructura de las células epiteliales están relacionadas con la secreción de hormonas ováricas a lo largo del ciclo (Horst-Dieter, 1994). Las células del EL producen una secreción proteica que forma una cubierta superficial, y también pueden transportar iones y líquido. En las porciones glandulares de la capa basal, existen células precursoras y células madre que pueden regenerar el EG (Welsch, 2014). Éste, se compone de un epitelio cilíndrico simple que forma glándulas endometriales tubulares, simples, espiraladas y ramificadas (Sisson y Grossman, 1982). Las glándulas uterinas aumentan en número y tamaño a medida que la fase secretora o lútea avanza. Su función es la producción y secreción de moléculas necesarias para la nutrición e implantación del ovocito fecundado (Simón y col., 2009). Altos niveles de estrógenos estimulan el crecimiento y las ramificaciones de las glándulas, pero el arrollamiento y el aumento de su secreción sólo ocurren cuando es estimulado por la progesterona (Dellmann, 1994).

El compartimiento estromal (Es) se compone de tejido conjuntivo formado por células y matriz extracelular, siendo el fibroblasto el tipo celular de mayor relevancia (Horst-Dieter, 1994; Simón y col., 2009).

La red de vasos que compone el compartimiento vascular intrauterino, comienza en el miometrio y finaliza en el endometrio, entregando oxígeno y nutrientes a todas las células que conforman tanto la región basal como la región funcional del mismo (Gartner y Hiatt, 2005; Simón y col., 2009).

Existen también en el endometrio, células del sistema inmunológico como neutrófilos, macrófagos y linfocitos, que ingresan desde el torrente sanguíneo, y son relevantes para la fisiología endometrial, especialmente en la regulación de la respuesta inmune local para la protección del tracto genital frente a infecciones y para evitar el rechazo inmunológico durante la implantación embrionaria (Horst-Dieter, 1994; Simón y col., 2009).

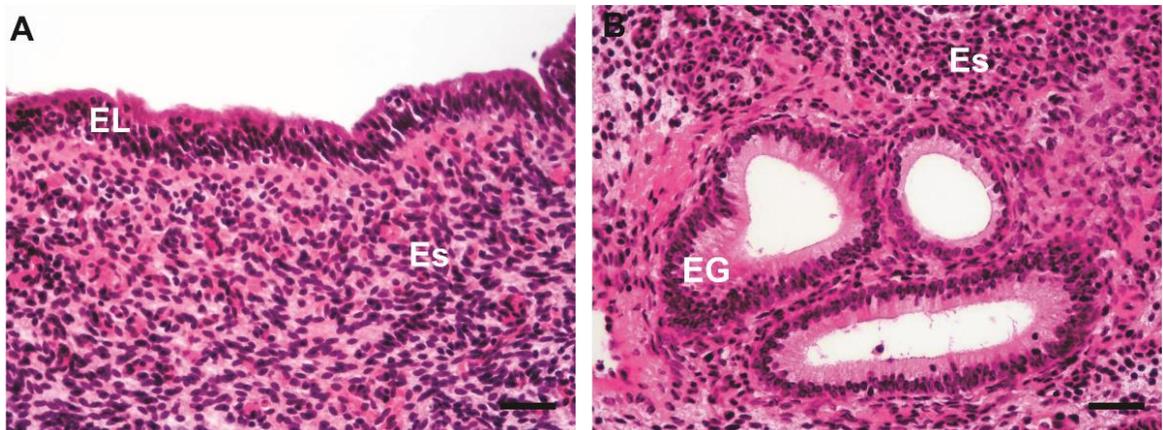


Figura 2: A) Epitelio luminal (EL) y Estroma (Es) en corte de tejido endometrial. Útero, bovino; H-E; 40X. (B) Epitelio glandular (EG) y estroma (Es) en corte de tejido endometrial. Útero, bovino; H-E; Magnificación 400X. Barra = 25 µm.

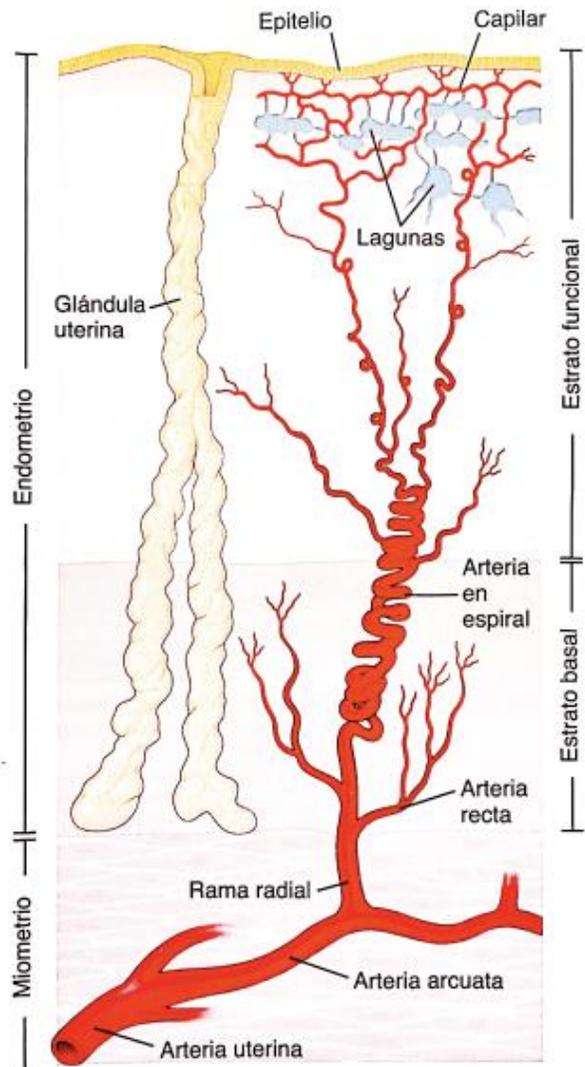


Figura 3: Ilustración esquemática del Estrato o Zona basal y Estrato o Zona funcional del endometrio uterino. Extraído de Ross y Pawlina, 2015.

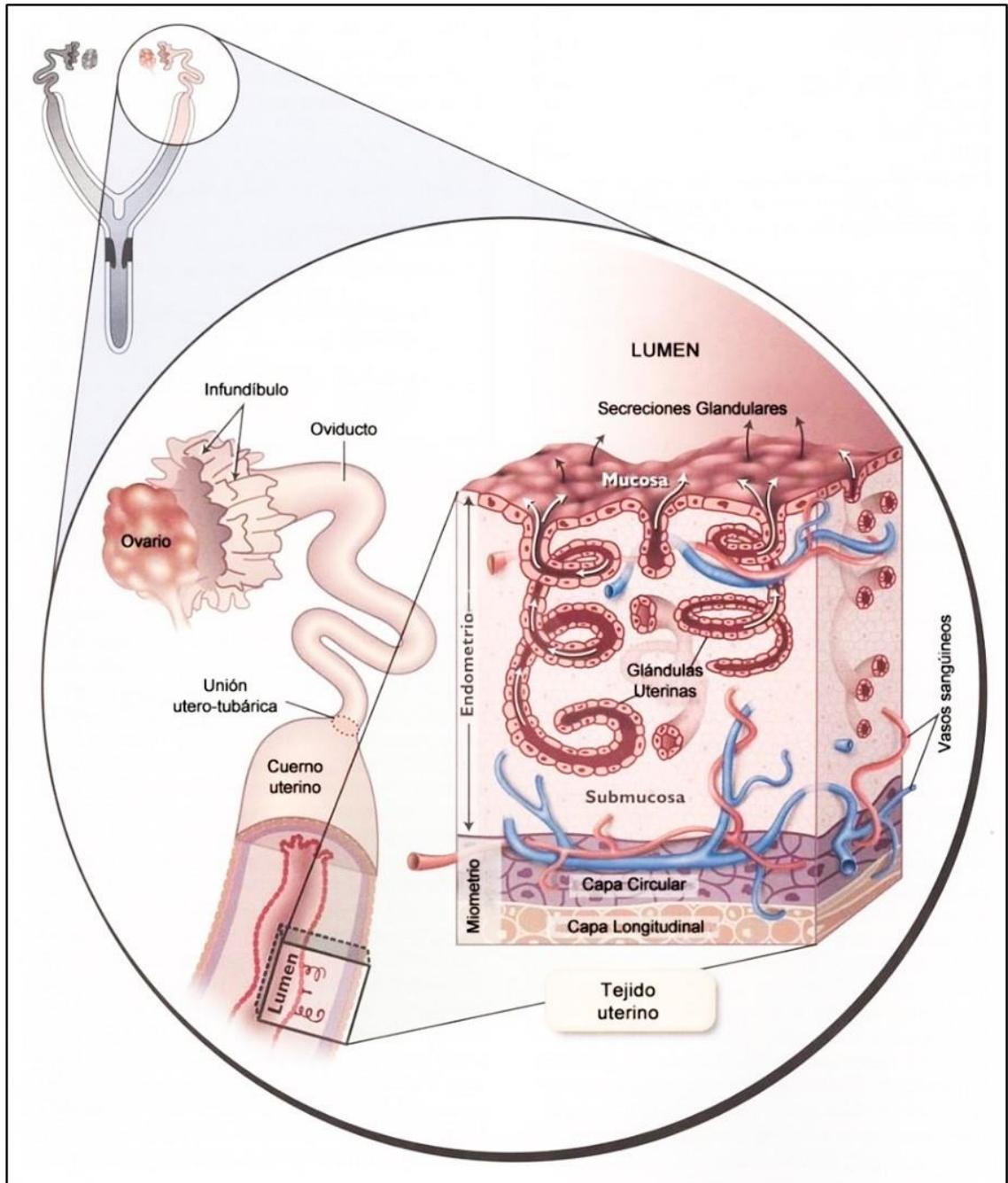


Figura 4: Ilustración esquemática del tejido uterino. Extraído de Senger 2003.

2.4. Período pospartal

La involución uterina en vacas lecheras implica una reducción considerable del tamaño del útero, necrosis de la superficie del endometrio y una reestructuración extensa de la matriz extracelular (Leslie, 1983). Los tejidos placentarios que quedan en el útero después del parto se acumulan como restos de tejido en la luz uterina, lo que contribuye a la secreción loquial. Después de esta degradación inicial, se inicia la reparación, remodelación y regeneración del tejido (Whates y col., 2011). Durante este proceso existen múltiples mecanismos inmunológicos locales que facilitan el retorno de las funciones fisiológicas a un estado homeostático (Velázquez y col., 2019), entre los que podemos mencionar la síntesis y producción de citoquinas, como $TNF\alpha$, $IL1\beta$ e $IL6$, y también de quimiocinas, como la $IL8$ (Hammon y col., 2006; Singh y col., 2008; Peter y col., 2015). En vacas sanas, la inflamación uterina disminuye entre la cuarta y la quinta semana posparto. Sin embargo, se ha descrito que la reparación del tracto genital (principalmente el útero) no se completa hasta la sexta-octava semana posparto (Sheldon y col., 2009b). Eventualmente, los últimos vestigios de contaminación bacteriana se eliminan en la mayoría de las vacas al final de la cuarta semana del posparto (Hussain y col., 1990).

Como ya se ha mencionado anteriormente, las vacas deben parir a intervalos que maximicen sus rendimientos. IPP o IPC muy largos, incrementan el número de días abiertos, encareciendo el mantenimiento de los animales en períodos de baja productividad, sumado a los gastos en dosis de semen por inseminaciones sin la obtención de buenos resultados, y los servicios profesionales adicionales.

Normalmente, en vacas saludables, los días abiertos, se componen del puerperio fisiológico y propiamente dicho, más el período de espera voluntario. El primero, son los días necesarios para que el útero involucione clínica y anatómicamente, y aparezca un primer celo después del parto, abarcando un período aproximado de 45 días, mientras que el segundo, si bien está determinado por cada sistema productivo, no debería superar en su totalidad, incluyendo al puerperio fisiológico, los 60-70 días, para poder cumplir con los objetivos reproductivos del rodeo. Es por esto, que los animales son liberados a servicio alrededor de los 60 días posteriores al parto. La remodelación requiere una angiogénesis significativa, que

implica la degradación de la membrana basal, la migración y proliferación de células endoteliales y la formación de lúmenes. Los factores que regulan la remodelación incluyen a las hormonas esteroides, numerosos factores de crecimiento mitógenos y quimiotácticos y otros inductores de la diferenciación celular, como interleucinas, interferones, prostaglandinas y componentes de la MEC (Luck MR y Zhao Y, 1995). El periodo de espera voluntario no puede ser modificado sustancialmente, ya que responde a variables fisiológicas, y el respeto y desarrollo del mismo en condiciones óptimas, resulta imperativo para el rápido control de factores que puedan impactar a nivel reproductivo y, consecuentemente, a nivel productivo (Recce, 2013).

2.5. Matriz extracelular, metaloproteasas de la matriz y sus inhibidores.

2.5.1. Composición de la Matriz Extracelular.

La MEC es una red estructural altamente dinámica, que experimenta una remodelación continua mediada por varias enzimas. La desregulación de la composición y estructura de la MEC tiene una asociación con el desarrollo y progresión de condiciones fisiológicas y patológicas. Comúnmente, se compone de tres clases principales de biomoléculas: glicosaminoglicanos (GAG), ligados a proteoglicanos, y también proteínas fibrosas, que incluyen colágeno, elastina, fibronectina, vitronectina y laminina (Figura 5) (Kusindarta y Wihadmadyatami, 2018). Estos componentes pueden clasificarse en moléculas formadoras de fibras (colágeno y elastina) y moléculas de la MEC interfibrilares o no formadoras de fibras, como los proteoglicanos y las glucoproteínas (Järveläinen y col., 2009). En general, la MEC proporciona soporte y anclaje para la formación de las células, regulando y determinando la dinámica y el comportamiento de las mismas, incluida su supervivencia, proliferación, diferenciación, adhesión y migración. Además, brinda un soporte mecánico a los tejidos, estando involucrada en el mecanismo de crecimiento, los procesos regenerativos y de curación (Kusindarta y Wihadmadyatami, 2018).

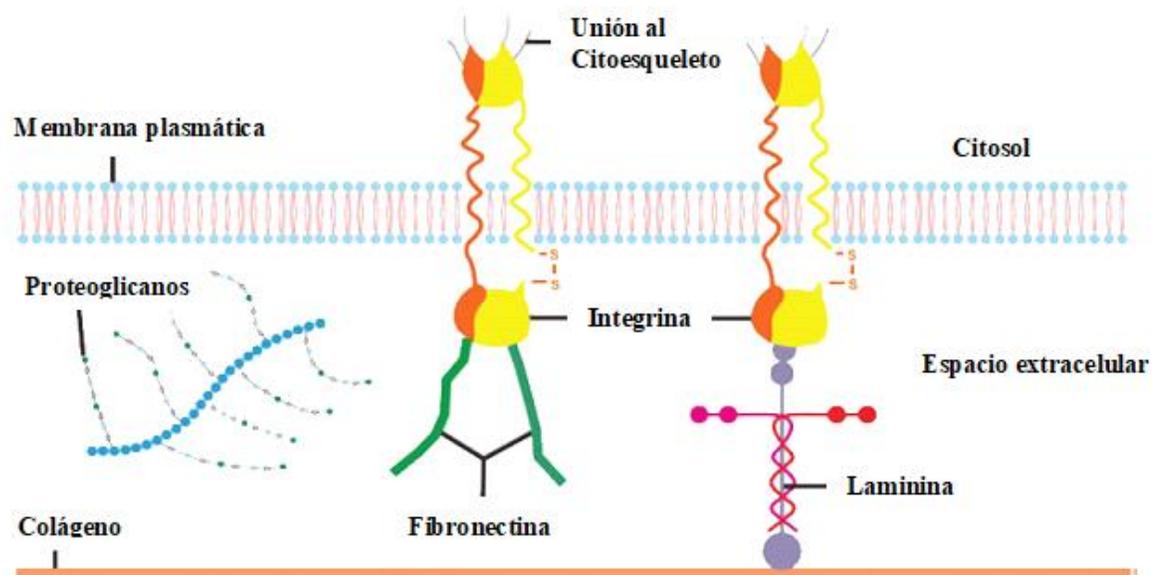


Figura 5. La estructura de la matriz extracelular, adaptado de Kusindarta y Wihadmadyatami, 2018.

La placenta bovina se clasifica como epitelio corial o sindesmocorial, cotiledonaria y adecidua (Dellmann y Brown, 1987; Senger, 2003), considerándose que, a pesar de la no ocurrencia de sangrado en el alumbramiento, la regresión endometrial y la remodelación de la MEC son factores indispensables para una futura implantación exitosa (Marvaix y col., 1996). Los colágenos son los principales componentes de la MEC (Yamada y col., 2002). A nivel uterino, el colágeno Tipo I se observa como una malla fina de fibras directamente debajo del epitelio de la superficie luminal y directamente debajo del epitelio que recubre la abertura de las glándulas hacia la luz uterina. Sin embargo, estaría ausente en el estroma superficial y profundo. En cuanto al colágeno Tipo III, dentro del estroma superficial, las fibras parecen estar dispuestas laxamente, mientras que, en el estroma intermedio y profundo, el grosor y la densidad de las fibras son mayores. El colágeno tipo IV se halla presente en las membranas basales que subyacen al epitelio de la superficie endometrial, las glándulas uterinas y el endotelio vascular, y el colágeno tipo VI se observa formando una fina malla de fibras en todas las partes de la pared uterina, aunque el diámetro de los haces de las fibras es mayor en el estroma intermedio y profundo en comparación con el estroma superficial (Boos, 2000).

2.5.2. Metaloproteasas de la matriz. Generalidades.

La degradación oportuna de la MEC es una característica importante del desarrollo, la morfogénesis, la reparación y la remodelación de tejidos. Varios tipos de proteinasas están implicadas en la degradación de la MEC, pero se considera que las principales enzimas son las MMP, también llamadas matrixinas. A medida que las MMP degradan los componentes de la MEC y las moléculas de la superficie celular, participan en la liberación y activación de citocinas y factores de crecimiento que dirigen la migración, diferenciación y vascularización celular (Nagase y col., 2006).

Las MMP, son proteínas pertenecientes a la familia de las metaloproteasas de zinc. Actualmente, las MMP abarcan al menos 25 enzimas proteolíticas relacionadas (Birkedal-Hansen y col., 1993; Kleiner y Stetler-Stevenson, 1993; Nagase y Woessner, 1999; Curry y Osteen, 2003). Las mismas se subdividen en 5 grupos de acuerdo a sus propiedades funcionales y estructurales: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, tipo de membrana (MT-MMP- del inglés “*Membrane-type matrix metalloproteinases*”) y un último grupo conformado por componentes proteicos heterogéneos. Estos 5 grupos comparten dominios funcionales y mecanismos de activación que son comunes a todas ellas, además de ser enzimas involucradas en la degradación de la matriz extracelular (Curry y Osteen, 2003; Nagase y col., 2006). Las MMP se sintetizan como proenzimas y se procesan en proenzimas que eventualmente se secretan al espacio extracelular (Ulbrich y col., 2011). A excepción de las MT-MMP, todas son sintetizadas y secretadas como zimógenos, estructuras precursoras (latentes) que precisan ser activadas para alcanzar su actividad proteolítica. Sus sitios activos contienen Zn^{2+} , y todas requieren de la presencia de Ca^{2+} para ser estables. La síntesis de MMP está regulada principalmente a nivel transcripcional, y su expresión responde a numerosos factores estimulantes y supresores, dirigidos por múltiples vías de señalización. Factores hormonales de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés *Transforming growth factor- β*), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*); así como las citoquinas, entre ellas el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés *Tumor Necrosis Factor - α*), pueden modular la estabilidad de los transcriptos (Bode y col., 1999; Sternlicht

y Werb, 2001). Si bien existen similitudes entre dichas enzimas, también hay diferencias claras en el reconocimiento y la especificidad para los componentes de la MEC (Birkedal-Hansen y col., 1993; Nagase y Woessner, 1999; Curry y Osteen, 2003). Entre la familia de MMP, dos miembros, MMP2 y MMP9 están bien caracterizados en rumiantes (Dilly y col., 2011). Las mismas, fueron identificadas por zimografía de gelatina como dos proteínas distintas de 72 y 92 kDa respectivamente (Imai y col., 2003), capaces de unir y escindir la gelatina y, por tanto, degradar muchos constituyentes de las membranas basales, incluyendo el colágeno de tipo IV, laminina y fibronectina (McIntush y Smith, 1998; Curry y col., 2001). En particular, MMP2 es capaz de degradar y desnaturalizar colágenos de la membrana basal (Woessner, 1991). MMP14, también denominada MT1-MMP, es una proteinasa transmembrana con un dominio extracelular proteolítico. Un papel importante de MMP14 es la activación de MMP2, ya que es capaz de escindir la pro-MMP2 unida a TIMP2. La concentración de las tres moléculas es importante debido a que pro-MMP2 sólo puede escindirse en presencia de una molécula de MMP14 no unida a TIMP2, por lo tanto, en caso de que TIMP2 esté presente en exceso o ausente, la pro-MMP2 no se escinde. Pro-MMP2 forma un complejo con TIMP2, que se localiza en la superficie celular y se une a la MMP14 (Sato y col., 1996; Butler y col., 1998; Zucker y col., 1998), y el complejo pro-MMP2 / TIMP2 / MMP14 ternario resultante, luego facilita la escisión y activación de su pro-MMP2 unido, por acción de otra MMP14 "libre" (Kolkenbrock y col., 1991; Fridman y col., 1993; Morgunova y col., 2002). Por su parte, las colagenasas (MMP1, MMP8 y MMP13) son capaces de escindir colágeno fibrilar, tales como los tipos de colágeno I, II, III, V y XI, como así también, los colágenos no fibrilares, tales como los tipos de colágeno IX, XII, y XIV. La clase estromelinas (MMP3, MMP7, MMP10 y MMP11) y del tipo MT-MMP, actúan sobre una amplia y diversa gama de sustratos de la MEC (Curry y Osteen, 2003). Una lista de los miembros de las familias de MMP y sus sustratos se detalla en la Tabla 1.

Si bien las MMP son las principales proteasas que participan en la remodelación de la matriz, estarían además implicadas en diversos procesos biológicos normales como, por ejemplo: el desarrollo y la implantación embrionaria, la morfogénesis de órganos, la ovulación, la dilatación del cérvix uterino, la involución uterina después del parto, el ciclo endometrial, la remodelación ósea, la cicatrización de heridas, la angiogénesis, la apoptosis,

entre otros (Nagase y col., 2006; Nagase y Woessner, 1999). Esto pone en evidencia la amplia gama de tejidos y diversas funciones en las que se encuentran implicadas dichas enzimas.

La actividad de las MMP, está regulada por la activación de los zimógenos precursores y su inhibición, por inhibidores endógenos llamados TIMP. Por lo tanto, el equilibrio entre MMP y TIMP es fundamental para la eventual remodelación de la MEC en el tejido (Nagase y col., 2006). Las MMP están reguladas en múltiples niveles, incluida la transcripción génica, la inducción, la secreción, la activación del zimógeno, la dimerización y la internalización por endocitosis. Las proMMP inactivas dan lugar a sus formas proteolíticas activas por acción de otras MMP u otras proteasas (Visse y Nagase, 2003; Raffetto y Khalil, 2008). Además, los TIMP endógenos se unen e inhiben las MMP (Bode y col., 1999; Nagase y col., 2006). Las gelatinasas MMP2 y MMP9 son secretadas por las células como monómeros que podrían formar diversos complejos y formas diméricas (Sato y col., 1996; Butler y col., 1998; Olson y col., 2000; Koo y col., 2012). Cabe destacar que la activación de gelatinasas puede requerir la formación de complejos no inhibitorios con otras MMP o TIMP (Itoh y col., 2001; Morgunova y col., 2002). MMP9 también existe como un homodímero, así como formando complejos con otras proteínas (Olson y col., 2000; Malla y col., 2008), y se predice que las diferentes especies moleculares y formas diméricas de MMP9 tienen diferentes propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y enzimáticas. Se han identificado formas monoméricas y diméricas de proMMP9 en varias células (Triebel y col., 1992; Kjeldsen y col., 1993; Toth y col., 1997), tejidos (Upadhyay y col., 1997) y fluidos biológicos (Vartio y Baumann, 1989; Mautino y col., 1997), lo que indica que son formas fisiológicas de MMP9.

Los TIMP presentan diversas funciones biológicas y bioquímicas, tales como las mencionadas anteriormente en relación a su capacidad para inhibir las MMP activas y controlar la activación de las proMMP, así como también están implicados en promover el crecimiento celular, inhibir la angiogénesis e inducir la apoptosis (Nagase y Woessner, 1999). Además, esta clase de inhibidores, es muy abundante en los tejidos reproductivos, y su síntesis estaría regulada hormonalmente (Curry y Osteen, 2003). Se han descrito cuatro tipos de TIMP en mamíferos (TIMP1 – 4), los cuales comparten entre ellos de 30 a 40% de homología respecto a su secuencia de aminoácidos, y se diferencian en la masa molecular y el grado de glicosilación, así como en la solubilidad en el medio extracelular (Brew y col.,

2000). Mientras TIMP1, TIMP2 y TIMP4 son solubles en el medio extracelular, TIMP3 se puede unir a la MEC (Leco y col., 1994). Particularmente, TIMP1 puede unirse a las formas activas de todas las MMP conocidas (Woessner, 1991), mientras que TIMP2 puede unirse a MMP activas e inhibir su actividad proteasa (Zhang y col., 2003). En lo que refiere a su participación en la fisiología de la reproducción, los TIMP son abundantes en los tejidos reproductivos regulados hormonalmente, y participan en numerosos eventos en relación a la remodelación endometrial en torno a la implantación (Ulbrich y col., 2011; Peralta y col., 2017).

MMP n°	Nombre Común	Colágeno	Sustratos adicionales
1	Colagenasa-1, colagenasa intersticial, colagenasa de fibroblastos	I, II, III, VII, VIII, X, XI	Agrecano/gelatina/fibrina/MMP-2, MMP-9/Pro-TNF α /IGFBPs/IL-1 β
2	Gelatinasa de 72 kDa, gelatinasa A, colagenasa tipo IV de 72 kDa	I, III, IV, V, VII, X, XI	Agrecano/elastina/fibronectina/gelatina/laminina/IGFBPs/IL-1 β /MMPs 9, 13/ProTGF β /ProTNF α /sustancia P
3	Estromelisin-1, transina-1, procologenasa, proteína PTR1	II, III, IV, V, VII, IX-XI	Agrecano/elastina/fibronectina/gelatina/laminina/IL-1 β /MMP 7, 8, 13/ProTNF α /sustancia P
4-6	(Obsoleta)		
7	Matrilisina, matrinsa, PUMP-1, metaloproteinasa uterina	I, IV, X	Agrecano/elastina/fibronectina/gelatina/laminina/MMP 1, 2, 9/ProTNF α
8	Colagenasa-2, colagenasa de neutrófilos, colagenasa PMNL	I, II, III, V, VIII, X	Agrecano/fibronectina/gelatina/laminina/sustancia P
9	Gelatinasa de 92 kDa, gelatinasa B, colagenasa tipo IV de 92 kDa	IV, V, VII, XIV	Agrecano/elastina/fibronectina/gelatina/ProTGF β /ProTNF α /sustancia P
10	Estromelisin-2, transina-2	III, IV, V	Agrecano/elastina/fibronectina/ gelatina/laminina/MMP 1, 8
11	Estromelisin-3		Agrecano/fibronectina/laminina/IGFBP
12	Metaloblastasa de macrófagos	I, IV	Elastina/fibronectina/laminina/ProTNF α
13	Colagenasa-3	I, II, III, IV	Agrecano/fibronectina/gelatina
14	Metaloproteinasa tipo 1 de membrana, MT1	I, II, III, IV	Agrecano/elastina/fibronectina/gelatina/laminina/MMP 2, 13/ProTNF α
15	Metaloproteinasa tipo 2 de membrana, MT2		Fibronectina/gelatina/laminina/MMP-2
16	Metaloproteinasa tipo 3 de membrana, MT3	III	Fibronectina/MMP-2
17	Metaloproteinasa tipo 4 de membrana, MT4		
18	Colagenasa-4 de Xenopus, xCol4	I	
19	RASI-1	I, IV	Fibronectina/gelatina
20	Enamelisina		
21	Xenopus MMP, XMMP		
22	Pollo MMP, CMMP		
23	Matriz de cisteína MMP, CA-MMP		
24	Metaloproteinasa tipo 5 de membrana, MT5		
25	Metaloproteinasa tipo 6 de membrana, MT6		
26	Matrilisina-2, endometasa	IV	Fibronectina/gelatina
27	Parálogo humano de MMP-22		
28	Epilisina		

Tabla 1. MMP y sustratos sobre los que actúa. Adaptado de Curry y Osteen, 2003.

2.5.3. Participación de las metaloproteasas y sus inhibidores en reproducción.

El proceso de remodelación de la matriz extracelular es un proceso dinámico que requiere la degradación de sus componentes. En este contexto, las MMP se consideran mediadores clave que desencadenan la degradación de los principales componentes de la MEC (Nagase y col., 2006). Tal como se ha mencionado, las gelatinasas MMP2 y MMP9, desempeñan un papel de relevancia en la remodelación del tejido endometrial durante los ciclos estral y menstrual y durante la preñez (Mishra y col., 2010; Ulbrich y col., 2011). Se ha demostrado que MMP2 y MMP9 están reguladas positivamente en el útero y la aorta de las ratas preñadas, y en función de ello se ha sugerido un papel importante de las gelatinasas en la remodelación uterina y vascular relacionada con la preñez en ratas (Yin y col., 2012; Dang y col., 2013). Tanto MMP2 como MMP9 escinden elastina, colágeno tipo IV y varias otras moléculas de MEC. Por su parte, MMP2 digiere colágeno intersticial tipo I, II y III (Nagase y col., 2006). Ambas, son secretadas por el trofoblasto para facilitar su penetración a las membranas basales. El trofoblasto es el tejido no patológico más invasivo, sin embargo, su invasión se distingue por ser progresiva, controlada y limitada (Luck y Zhao, 1995).

En base a lo expuesto, y en lo que refiere a rumiantes, se sabe que el éxito de la implantación en ellos depende de sucesos claves como, por ejemplo, la preparación del endometrio durante el ciclo estral y, especialmente, de los sucesos alrededor del momento de la implantación incluyendo la capacidad del trofoblasto para fusionarse con el epitelio endometrial en la región caruncular. En relación a estos sucesos, durante el ciclo estral y el establecimiento de la preñez, las células endometriales experimentan un rápido crecimiento y diferenciación, al mismo tiempo que se descompone y se remodela la matriz extracelular (Curry y Osteen, 2001; Yamada y col., 2002). Estos cambios y la remodelación en el endometrio están modulados en parte, por la expresión del sistema MMP que hemos mencionado (Salamonsen, 1999; Fata y col., 2000; Kizaki y col., 2008) y todo ello está en coordinación con la esteroidogénesis ovárica (Henriet y col., 2002; Spencer y col., 2004). Se ha encontrado que existen alteraciones en la expresión génica de MMP14, TIMP2 y MMP2 en el útero de vacas posparto con retención de membranas fetales tras la inducción del parto

o cesárea prematura, lo que denota que el sistema MMP/TIMP podría estar involucrado en el proceso de retención placentaria (Dilly y col., 2011).

Estudios previos en bovinos, han demostrado que TIMP2 estaba presente en la luz uterina durante la preñez temprana, lo que podría proporcionar un entorno protegido contra las enzimas que degradan la MEC, permitiendo la elongación del trofoblasto (Ulbrich y col., 2011). Su patrón de expresión y la localización celular están en concordancia con las funciones de las MMP en la liberación y activación de citoquinas y factores de crecimiento que dirigen la migración celular, la diferenciación y la vascularización requerida durante este período crucial de desarrollo del embrión. Específicamente, la presencia de la forma activa de MMP2 en el endometrio puede determinar un efecto positivo en el desarrollo del embrión a través de su influencia sobre los factores de crecimiento (Curry y Osteen, 2003). Estas evidencias sugieren que las metaloproteasas de la matriz y sus inhibidores, poseen un rol primordial en los procesos cruciales de remodelación, preparando un endometrio receptivo para una regulación adecuada y precisa del desarrollo embrionario posterior.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugares de desarrollo del trabajo

- Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA). ICIVET Litoral (UNL-CONICET).
- Laboratorio de Histología y Anatomía Patológica. ICIVET Litoral (UNL-CONICET).
- Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV). Esperanza. Santa Fe.
- Hospital de Salud Animal. FCV, UNL. Esperanza. Santa Fe.
- Campos de la zona de influencia de la FCV, UNL.

3.2. Aspectos éticos

Todos los procedimientos efectuados con animales se realizaron de acuerdo a las normas correspondientes sobre experimentación animal (*Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching. 4th edition. 2020*) y han sido evaluados y aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL (protocolo n° 616/20).

3.3. Grupos de animales

El estudio se realizó sobre 22 vacas Holando Argentino multíparas (entre 2 y 4 lactancias), pertenecientes a un establecimiento productor de leche comercial, ubicado en la zona rural de Hipatia, departamento Las Colonias, Provincia de Santa Fe, zona de influencia de la FCV (UNL). En el mismo se realiza parición estacionada (para evitar partos de verano), lo que permitió extender los muestreos de útero hasta los 60 DPP.

De todas las vacas se obtuvieron muestras de tejido uterino a los 45 (t1) y 60 (t2) DPP, Para la obtención de las biopsias endometriales, se sincronizaron los ciclos estrales, por aplicación de dos dosis de D-cloprostenol (Enzaprost, Biogénesis-Bagó S.A) separadas 11 días (Mac Kenna, 2018), corroborando posteriormente las fases del ciclo estral (lútea y

folicular) mediante la medición de hormonas (estrógeno y progesterona) en sangre. La toma de biopsias uterinas, se realizó en simultáneo con la toma de muestras de sangre (Figura 6). La primera dosis de D-Cloprostenol, fue colocada el día 42 posparto, es decir, 72 hs previas a la toma de las biopsias en el t1. La segunda dosis de prostaglandina, se colocó 11 días después de la primera, es decir, a los 53 DPP. La toma de la segunda biopsia fue llevada a cabo el día 60 posparto. Debido a que luego de la segunda dosis de prostaglandina, el intervalo hasta la ocurrencia del celo es muy variable entre cada vaca, por diversos factores entre los que podemos mencionar el tamaño y grado de madurez del folículo dominante al momento de aplicar la segunda dosis de PGF 2α , o los niveles de progesterona que pudiesen existir al momento de aplicar el tratamiento (Quintans y col., 2000; Lucy y col., 2004), para poder dividir con mayor precisión las muestras según la fase folicular (FF) o fase lútea (FL), se utilizaron los valores hormonales obtenidos en los días 45 y 60 de muestreo. De esta manera, y debido a que la progesterona es una hormona clave frecuentemente utilizada para estudiar la actividad reproductiva y sus niveles suelen evaluarse para monitorear la función ovárica (Barui y col., 2015), fueron considerados animales en FF, aquellos que hayan registrado concentraciones menores a 1 ng/ml de progesterona en sangre, y en FL, aquellos donde se hayan obtenido concentraciones iguales o mayores a 1 ng/ml de progesterona sanguínea (Stabenfeldt y col., 1969; Carrera, 2017). Asimismo, y bajo la premisa de que el aumento en el diámetro del folículo ovulatorio se acompaña de aumento significativo en la concentración de estradiol concomitantemente a una disminución en la concentración de progesterona, nos basamos en datos de estudios previos y corroboramos que las mediciones de 17 β -estradiol sérico obtenidos se encuentren por encima de los valores previamente reportados para vacas en anestro (Spicer y col. 1986; Nosier, 2003).

Una vez obtenidas las biopsias correspondientes a los 60 DPP, las vacas recibieron una tercera dosis de D-cloprostenol, separada 14 días de la segunda, para luego realizar el servicio de las mismas por inseminación artificial (IA). El celo fue detectado mediante observación visual a partir de las 48 hs posteriores a la última aplicación. A medida que los animales manifestaron el celo, fueron inseminados mediante la técnica AM/PM, utilizando siempre semen congelado del mismo toro y de la misma partida, previamente chequeada su calidad mediante análisis subjetivos de motilidad, concentración y morfología, en el Instituto de

Reproducción Animal (IRA) de la FCV. Las inseminaciones se realizaron siempre por el mismo operario, siendo éste, personal permanente del establecimiento donde se encontraban las vacas. Se repitió la dosis de D-cloprostenol cada 14 días en aquellas vacas que no manifestaron celo. El diagnóstico de preñez se realizó mediante ultrasonografía, para poder considerar este dato en el análisis estadístico empleado, a partir de los 35 días posteriores a la aplicación de la tercera dosis de prostaglandina, y repitiéndose la misma cada 30 días. Este manejo reproductivo permitió llevar un registro de preñez de los animales en estudio, teniendo en cuenta la confirmación de la misma por ultrasonografía y la fecha de servicio del animal.

Los animales fueron divididos en 2 grupos, retrospectivamente según el IPC que registraron, y teniendo en cuenta, además, estudios previos realizados con animales del mismo rodeo comercial (Angeli y col., 2019). El Grupo de bajo IPC: $IPC < 100$ días, $n = 11$; y el Grupo de alto IPC: $IPC > 130$ días, $n = 11$.

En cada punto de muestreo se examinó la condición corporal (CC) de todos los animales, utilizando la escala de 1 a 5 puntos (Edmonson y col., 1989), donde el valor “1” se refiere a las vacas más flacas y el valor “5” hace referencia a las vacas más gordas.

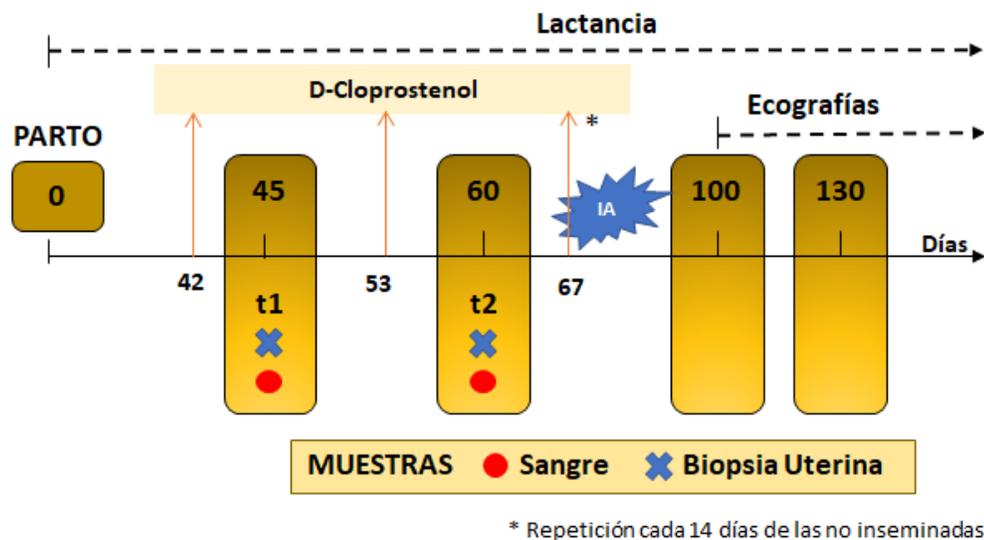


Figura 6. Distribución de la toma de muestras sanguíneas, aplicaciones de D-Cloprostenol y biopsias uterinas según los días postparto.

La salud de los animales fue evaluada antes y durante el estudio por el veterinario del establecimiento. Los signos externos evaluados fueron la temperatura rectal, el puntaje de CC, el color y la consistencia de las descargas vaginales, el aspecto general, la marcha y el estado de alerta. Además, se realizaron auscultación y percusión simultánea del abdomen. Por otro lado, se recabaron datos individuales de todos los animales seleccionados para muestrear, en relación a su producción láctea e índices reproductivos. Las muestras de animales en los que haya existido una marcada reducción en la producción de leche o el desarrollo de alguna patología durante el parto o complicación del mismo, como ser mellizos, distocia, retención de membranas fetales, mastitis, enfermedades podales, metritis, endometritis, fueron excluidas del análisis.

3.4. Toma y Procesamiento de las Muestras

Los animales de interés para el estudio se separaron luego de realizado el ordeño de la tarde para la obtención de muestras de sangre y biopsias uterinas según los métodos detallados más adelante. Previo a la toma de muestras se realizó la palpación rectal y ultrasonografía para corroborar la ausencia de anomalías en el tracto reproductivo que pudieran afectar el estudio. En los casos en que se detectó alguna alteración de índole reproductiva, los animales fueron excluidos del muestreo.

3.4.1. Biopsias Uterinas

Previo a la obtención de biopsias uterinas en los t1 y t2, el exudado vaginal fue evaluado empleando el dispositivo ‘MetricheckTM’, el cual permite asignar a la descarga recogida una puntuación basada en un Score según las características del moco obtenido (Figura 7). El uso de Metricheck, permitió seleccionar e incluir en los grupos aquellas vacas con flujo normal translúcido (grado = 1) y descartar aquellas con signos de endometritis (grado 2 – 5) donde el flujo se observó conteniendo pus (Williams y col., 2005; Pleticha y col., 2009; Westermann y col., 2010).



Figura 7: (A) Pasos para realizar el examen de flujo vaginal utilizando Metricheck. (B) Escala de flujo vaginal obtenido mediante Metricheck. Score 1 = moco claro. Score 2 = moco en su mayoría claro con pequeñas manchas de pus. Score 3 = moco que contiene <50% de pus. Score 4 = moco que contiene $\geq 50\%$ de pus. Score 5 = moco que contiene $\geq 50\%$ de pus y olor. Extraído de Doyle y col., 2019.

Para la toma de biopsias uterinas, se empleó la técnica descrita por Chapwanya y col., (2010). Las muestras se obtuvieron con una pinza para biopsias uterinas bovinas (Figura 8), previa aplicación de anestesia epidural baja con lidocaína al 2% (5 ml) (OVER S.R.L, Santa Fe, Argentina), en el espacio epidural sacrococcígeo o 1er espacio intercoccígeo. Inicialmente se limpió el perineo y los genitales externos, para luego, mediante la técnica recto-vaginal de enhebrado cérvico-uterino (Hafez y Hafez, 2000), proceder a atravesar el cérvix y deslizar la pinza hacia el cuerno uterino, aproximadamente 3 cm más allá de la bifurcación. Una vez en el sitio deseado, se abrieron las mordazas de la pinza y, con la ayuda de la mano en el recto, se presionó suavemente la pared uterina en las mordazas del instrumento. El tejido endometrial se cortó cerrando las mordazas y tirando del instrumento. Con este procedimiento se extrajo la muestra del cuerno contralateral al último gestante, según los registros del establecimiento. Esta se destinó al procesamiento histológico,

fijándose inmediatamente en formol bufferado al 10% durante 6-8 hs a 4°C, seguidamente fue lavada en buffer fosfato salino (PBS) 0,01M, pH 7,2, deshidratada en concentraciones crecientes de etanol (de 70° a 100°), aclarada en xilol y embebida en parafina siguiendo protocolos histológicos de rutina (Ortega y col., 2008). Se efectuaron cortes seriados de 4 µm de espesor con un micrótopo rotativo (Leica, Suiza). Los mismos se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropiltriectoxisilano (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), se secaron en estufa a 37°C y se almacenaron a 4°C hasta su utilización para técnicas de inmunohistoquímica.

Se realizó un estudio microscópico de las estructuras histológicas endometriales mediante coloración de hematoxilina-eosina, a fin de realizar una caracterización inicial de los estratos presentes en el tejido y evidenciar la morfología y orientación general del mismo. Luego, mediante inmunohistoquímica (IHQ) indirecta, se evaluaron las metaloproteasas MMP2, MMP9 y MMP14, y sus inhibidores TIMP1 y TIMP2, empleando anticuerpos específicos para la detección de cada uno de ellos.



Figura 8: (A) Toma de biopsia uterina guiada por técnica recto-vaginal de enhebrado cérvico-uterino. (B) Retiro de la biopsia desde la pinza y colocación en placa de Petri conteniendo formol bufferado al 10%

3.4.2. Sangre

Se tomaron muestras de sangre de cada uno de los animales en los puntos de muestreo planteados (véase Figura 6).

Las muestras se tomaron por punción venosa yugular y fueron procesadas luego para la obtención de plasma. Para ello, una alícuota de cada muestra fue recolectada en tubos con anticoagulante (EDTA), y conservada en hielo hasta su llegada al laboratorio, donde fueron centrifugadas a 1000 g durante 10 min. El plasma obtenido fue almacenado a -80°C para posteriores determinaciones hormonales.

3.4.2.1. Determinación de las concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol y progesterona

Las concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol y progesterona se midieron mediante electroquimioluminiscencia (Roche Diagnostics GmbH, Germany) en un sistema COBAS e411 (Roche Diagnostics), de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes, y previamente validados en estudios bovinos (Díaz y col., 2015). La sensibilidad del ensayo utilizado fue de 5,00 pg/ml para el 17β-estradiol y 0,05 ng/ml para la progesterona. Dichas determinaciones fueron realizadas en Alkemy Diagnóstico, Santa Fe, Argentina.

3.4.3. Expresión proteica y localización endometrial de Metaloproteasas y sus Inhibidores.

Sobre los cortes histológicos realizados previamente y por medio de la técnica de IHQ indirecta (Woods y Ellis, 1994), se analizó la expresión proteica y localización celular de metaloproteasas (MMP2, MMP14 y MMP9) y sus inhibidores (TIMP1 y TIMP2) en los diferentes estratos celulares del endometrio: EL, EG y Es. Los anticuerpos utilizados han sido validados por Western Blot, en muestras de ovario bovino (Peralta y col., 2017; Belotti y col., 2020) constando la especificidad declarada por el fabricante para dicha especie.

3.4.3.1. Inmunohistoquímica indirecta en muestras de útero

Los patrones de expresión y localización endometrial de las metaloproteasas y sus inhibidores fueron evaluados a partir de las muestras de útero tomadas en los t1 y t2 (45 y 60 DPP) cuando las vacas se encontraban en el periodo de espera voluntaria, antes de ser liberadas a servicio. Se empleó la técnica de IHQ indirecta, utilizando anticuerpos primarios específicos (Abcam, Santa Cruz) para cada marcador mencionado.

Se siguió el siguiente protocolo (Ortega y col., 2004; Salvetti y col., 2004; Baravalle y col., 2011):

- Los cortes se colocaron 10 minutos en la estufa de 60°C.
- Las secciones de tejido incluidas en parafina fueron desparafinadas en 2 cambios de xilol de 15 y 10 min, y luego hidratados en una serie de alcoholes con graduación decreciente (etanol 100°, etanol 96°, etanol 70°), finalizando con un lavado de PBS durante 5 min.
- Para la determinación de MMP9, TIMP1 y TIMP2, se realizó la recuperación antigénica convencional en horno microondas de uso doméstico (potencia máxima 1200 W). Los cortes se colocaron en buffer citrato 0,01 M pH 6,0 durante 3 min a 100% de potencia, 6 min a 40% (dos veces) y enfriamiento durante 20 min dentro del microondas apagado. En este procedimiento de recuperación, entre cada paso y si es necesario, se completa el coplin que contiene los cortes con agua destilada caliente. Para la detección de MMP2 y MMP14, no se realizó el paso de recuperación antigénica.
- El bloqueo de la actividad endógena de peroxidasa se realizó sumergiendo los cortes durante 10 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto. Transcurrido ese tiempo se agregó nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno y se mantuvieron sumergidos durante 10 minutos adicionales. Luego se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min.
- Para MMP9, se bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal de burro al 10%, en cámara húmeda por 15 min a 25°C.
- Los anticuerpos primarios (Abcam, Santa Cruz) y las concentraciones utilizadas para cada uno de ellos se encuentran detallados en la tabla 2. Las incubaciones se realizaron en

cámara húmeda durante toda la noche (mínimo 16 h) a 4°C. Luego se realizaron 2 lavados de 5 min con PBS.

- La incubación con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente, según el anticuerpo primario utilizado (Tabla 2), se realizó en cámara húmeda durante 30 min a 25°C. Luego se realizaron 2 lavados con PBS durante 5 min.

- La incubación con complejo streptavidina - peroxidasa (Cytoscan HRP Detection System Cell marque) se realizó en cámara húmeda durante 30 min a 25°C, para luego realizarse 5 lavados con PBS durante 5 min.

- Para el revelado, se adicionó cromógeno 3,3'-diaminobencidina (Kit DAB Plus, Invitrogen), controlando la reacción positiva en microscopio óptico para estandarizar el tiempo óptimo en cada prueba. La reacción se detuvo sumergiendo los portaobjetos en agua destilada (Velázquez y col., 2010, Salvetti y col., 2012).

- Se efectuó contra coloración con hematoxilina activada (Biopur, Bubendorf, Suiza), deshidratación en una serie de alcoholes con graduación creciente (etanol 70°, etanol 96°, etanol 100°), aclarado en xilol y montaje con bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

En todos los ensayos se realizaron controles negativos, reemplazando los anticuerpos primarios por PBS-BSA, con el fin de descartar reacciones inespecíficas de los anticuerpos secundarios.

ANTICUERPO	CONDICIONES	RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA	BLOQUEO	ANTICUERPO SECUNDARIO
Anti MMP2 Rabbit polyclonal (sc-8835, Santa Cruz Biotechnology)	1:200 4 °C toda la noche	Sin recuperación	Sin bloqueo	Secundario Universal (CytoScan HRP detection system-Cell Marque)
Anti MMP14 Rabbit polyclonal (sc-12367, Santa Cruz Biotechnology)	1:100 4 °C toda la noche	Sin recuperación	Sin bloqueo	Secundario Universal (CytoScan HRP detection system-Cell Marque)
Anti MMP9 Goat polyclonal (sc-6840 Santa Cruz Biotechnology)	1:50 4 °C toda la noche	Convencional en microondas	Suero normal de burro al 10%	Donkey anti-goat IgG (sc-2042 Santa Cruz)
Anti TIMP1 Rabbit polyclonal (sc-6832R Santa Cruz Biotechnology)	1:100 4 °C toda la noche	Convencional en microondas	Sin bloqueo	Secundario Universal (CytoScan HRP detection system-Cell Marque)
Anti TIMP2 Mouse monoclonal (ab1828 Abcam)	1:200 4 °C toda la noche	Convencional en microondas	Sin bloqueo	Secundario Universal (CytoScan HRP detection system-Cell Marque)

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados, y las condiciones de uso en la técnica de IHQ indirecta.

3.4.3.2. Análisis de imágenes

Las imágenes de los preparados histológicos fueron tomadas mediante una cámara digital (Nikon DS-Fi2, Tokio, Japón), montada sobre un microscopio óptico (Nikon Eclipse Ci-L Ni) y conectada a una PC de escritorio. La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 píxeles. La evaluación de las mismas fue realizada con el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, EE.UU.), siguiendo métodos ya descritos (Velázquez y col., 2010; Salvetti y col., 2012).

El porcentaje de área inmunomarcada se calculó a través del análisis de segmentación de colores, seleccionando los objetos con reacción marrón moderado/intenso (dado por la reactividad del cromógeno utilizado) como rango positivo. Dicha coloración fue elegida con una sensibilidad de 4 (máximo 5). Posteriormente fue aplicada una máscara para la separación permanente de los colores y se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada sobre el área total evaluada, tal como fue descrito en trabajos previos (Salvetti y col., 2004; Ortega y col., 2007). Los valores fueron normalizados con los controles realizados paralelamente, utilizando la misma región (verificado por comparación de imágenes) para calibración. El porcentaje de área inmunopositiva o inmunomarcada fue calculada separadamente para cada estrato del endometrio (EL, EG y Es). Este procedimiento se realizó, siempre que fue posible, para al menos 10 imágenes de cada uno de los estratos, en cada corte histológico.

3.5. Análisis Estadístico de los resultados obtenidos.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistic 22 para Windows. Luego de verificar la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas con los tests de Shapiro-Wilk y Estadístico de Levene, respectivamente, se realizaron los análisis estadísticos detallados a continuación.

Para realizar comparaciones entre animales con BAJO y ALTO IPC, y entre los resultados de ambos muestreos, 45 DPP y 60 DPP, los animales fueron divididos en dos grupos, según se encontraban en FF o FL al momento de toma de las biopsias. Para evaluar los niveles de

expresión proteica de las metaloproteasas y sus inhibidores (variables respuestas), a los 45 y 60 DPP, se utilizó un Modelo Lineal Generalizado (MLG), considerando como predictores, los grupos categorizados: Vacas con BAJO IPC (< 100 días de IPC) y Vacas con ALTO IPC (>130 días de IPC).

Para evaluar los niveles de expresión proteica de las metaloproteasas y sus inhibidores (variables respuestas) en cada tiempo (45 y 60 DPP), dentro de cada grupo de estudio (Vacas con BAJO IPC y Vacas con ALTO IPC), se tomaron los animales que al momento del muestreo se encontraban en la FL del ciclo, y se utilizó un MLG.

En todos los casos, se utilizó una función de enlace lineal para aquellas variables con distribución normal, mientras que, para las variables no normales, se utilizó una función de enlace gamma. Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

Se calcularon los cocientes (MMP/TIMP) para las vacas en FL, a los 60 DPP. Esto se llevó a cabo para todos los estratos evaluados, promediando las áreas inmunomarcadas, a los fines de comparar entre los grupos de ALTO y BAJO IPC los cocientes calculados, aplicando un MLG, con el IPC categorizado como factor.

Finalmente, para evaluar la posible asociación de la expresión endometrial de MMP y TIMP con la ocurrencia y celeridad para la concepción de los animales, se utilizó un modelo de supervivencia de Kaplan-Meier, considerando los valores de expresión endometrial de manera categorizada según la mediana de los datos ('altos/bajos niveles de expresión'), determinados en FL a los 60 DPP. En dicho análisis, la variable tiempo representada por el IPC (valores continuos) de los animales que lograron la preñez, fue la variable respuesta. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Se analizaron los valores correspondientes de las primo inseminaciones realizadas a cada grupo (BAJO y ALTO IPC), a fin de descartar que haya existido entre ambos una disparidad de manejo que pudiese haber influido en los resultados obtenidos. Se observó que la media de las primo inseminaciones para las vacas de BAJO IPC fue de 86 días, con un desvío estándar de 7 días, y para las vacas de ALTO IPC fue de 97 días, con un desvío estándar de 23 días, observándose que no existieron diferencias significativas entre los grupos observados ($p < 0,562$). En efecto, podemos aseverar que el tiempo a la primera inseminación posparto, no sería un factor de confusión para el análisis de las asociaciones propuestas con el IPC de los animales, dado que no hubo demoras involuntarias en tales inseminaciones que pudieran estar provocando variaciones en los IPC (Ver Figura 9). En cuanto a la cantidad de servicios que fueron necesarios para lograr la concepción, la totalidad de las vacas del grupo de BAJO IPC recibió un solo servicio, mientras que las vacas del grupo de ALTO IPC, recibió más de 2 servicios, siendo 6, el máximo de servicios otorgados para alcanzar la preñez.

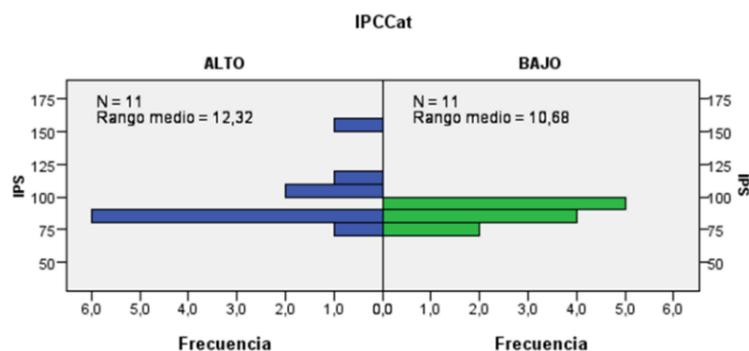


Figura 9: Intervalos Parto – Primer Servicio en las vacas de ALTO y BAJO IPC. Resultados de Prueba de Mann-Whitney.

La expresión proteica de las metaloproteasas MMP2, MMP9, MMP14 y de los Inhibidores de Metaloproteasas, TIMP1 y TIMP2, fue detectada y localizada por

inmunohistoquímica indirecta en EL, Es y EG del endometrio de las vacas de todos los grupos analizados y en ambas fases del ciclo estral. En todos los ensayos se evaluaron controles negativos, corroborando la ausencia de inmunomarcación en los mismos, lo cual indica la especificidad del anticuerpo primario empleado en cada caso (Ver Figura 10).

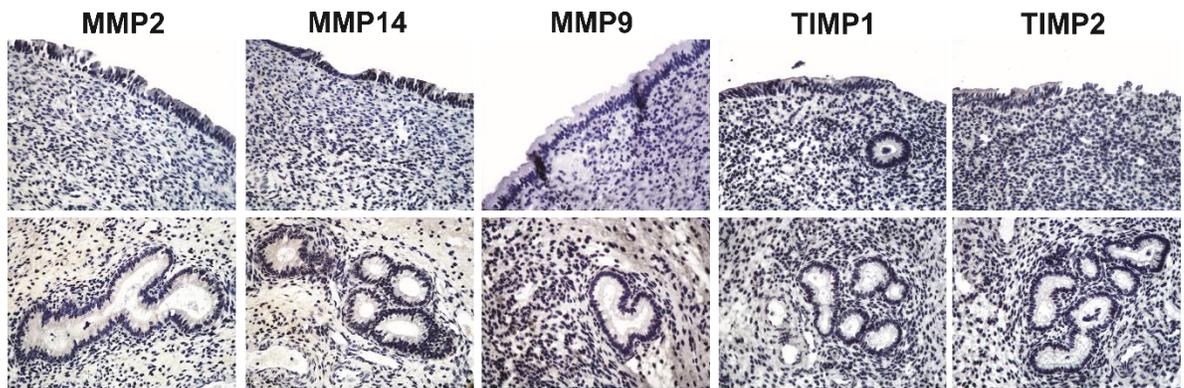


Figura 10: Imágenes representativas de los controles negativos de inmunomarcación para cada uno de los Anticuerpos utilizados. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

4.1. Niveles de expresión proteica de MMP2, MMP14 y MMP9 en endometrio de vacas lecheras durante el período pospartal.

4.1.1. Niveles de expresión proteica de MMP2 en endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular

A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de MMP2 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados (BAJO IPC vs ALTO IPC) ($p = 0,341$, $p = 0,308$, $p = 0,169$, respectivamente) (Figura 11).

A los 60 DPP, los niveles de expresión proteica de MMP2 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,370$, $p = 0,341$ y $p = 0,699$, respectivamente) (Figura 11).

En las figuras 12 y 13, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP2, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FF, en ambos tiempos de muestreo.

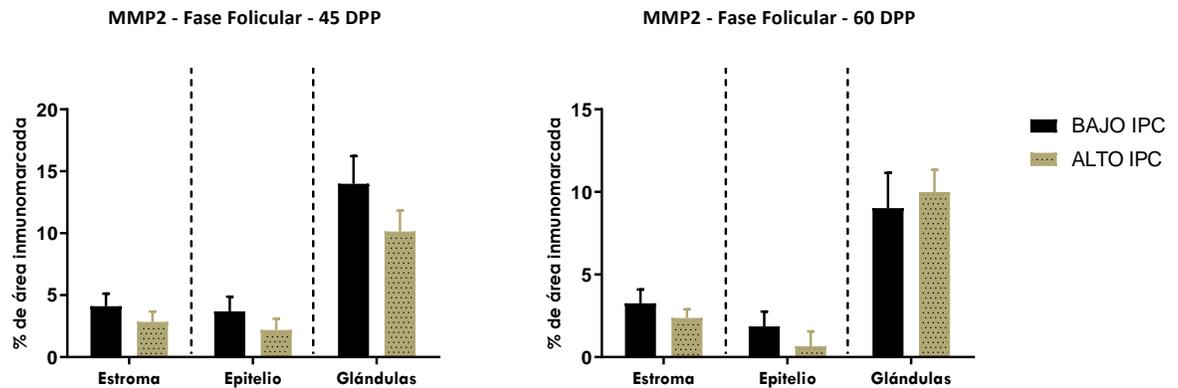


Figura 11: Expresión proteica de MMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada en Es, EL y EG del endometrio pospartal, de vacas en FF (n=18), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.

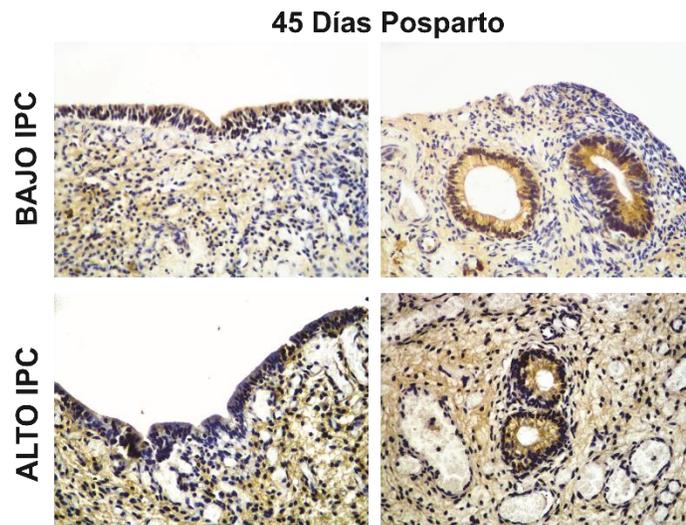


Figura 12: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

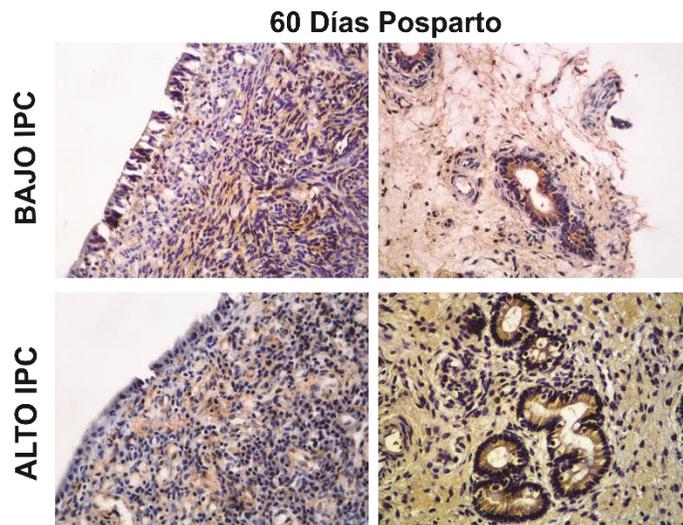


Figura 13: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

4.1.2. Niveles de expresión proteica de MMP2 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea.

A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de MMP2 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,211$, $p = 0,106$, $p = 0,873$, respectivamente) (Figura 14).

A los 60 DPP los niveles de expresión proteica de MMP2 en Es y EL mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,001$ y $p = 0,012$ respectivamente) siendo en ambos casos mayor la expresión en biopsias de animales con BAJO IPC. En cambio, los niveles de expresión proteica de MMP2 en EG, no mostraron diferencias significativas entre las vacas con BAJO y ALTO IPC ($p = 0,269$) (Figura 14).

En las figuras 15 y 16, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP2, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FL, en ambos tiempos de muestreo.

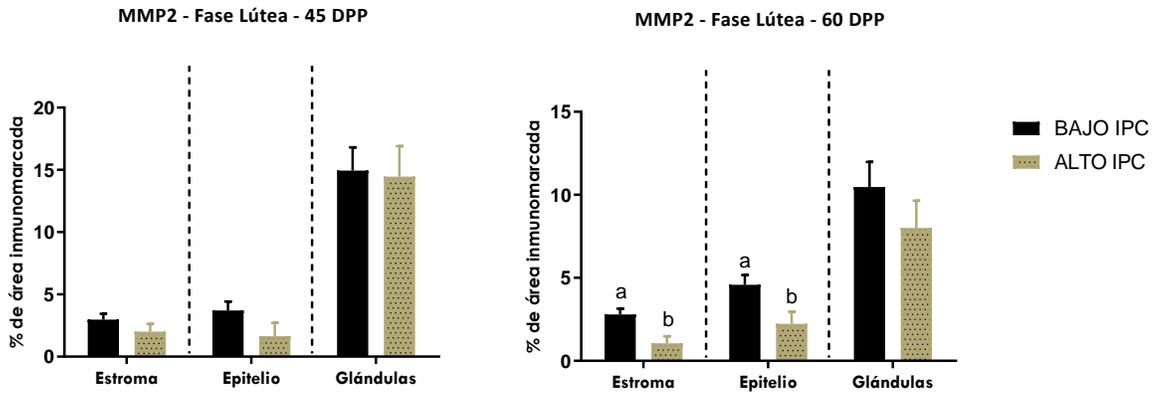


Figura 14: Expresión proteica de MMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio posparto de vacas en FL (n=24), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

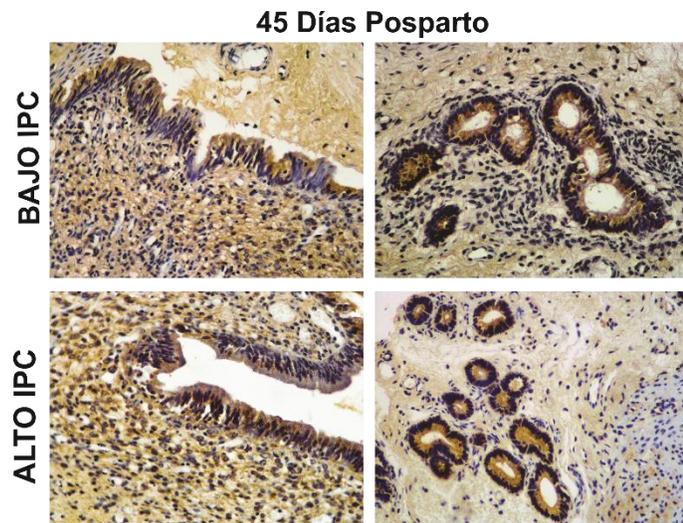


Figura 15: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FL, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

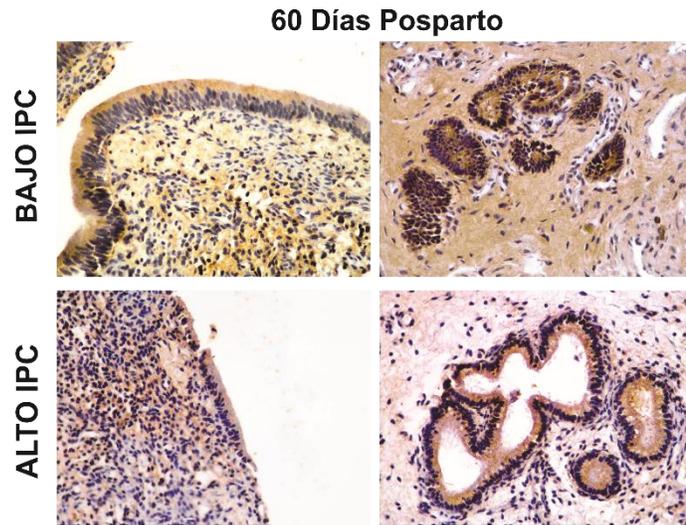


Figura 16: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FL, con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

Posteriormente y a los fines de estudiar las posibles variaciones entre los tiempos de muestreo para animales en FL, se obtuvo que: en las vacas con BAJO IPC, los niveles de expresión proteica de MMP2 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre ambos tiempos de muestreo ($p = 0,775$, $p = 0,473$, $p = 0,110$, respectivamente) (Figura 17).

En las vacas con ALTO IPC, los niveles de expresión proteica de MMP2 en Es y EL no mostraron diferencias significativas entre ambos tiempos de muestreo ($p = 0,101$ y $p = 0,637$ respectivamente). En cambio, los niveles de expresión proteica de MMP2 en EG, fueron significativamente mayores a los 45 DPP en comparación con los resultados obtenidos a los 60 DPP ($p = 0,001$) (Figura 17).

En las figuras 18 y 19 se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP2, en EL, Es y EG, para cada tiempo de muestreo, en vacas con BAJO y ALTO IPC.

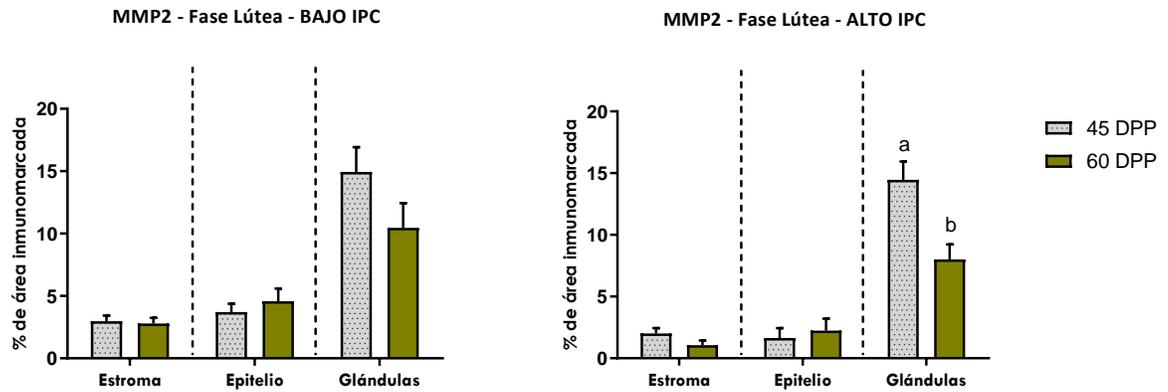


Figura 17: Expresión proteica de MMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO IPC (n=10), a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

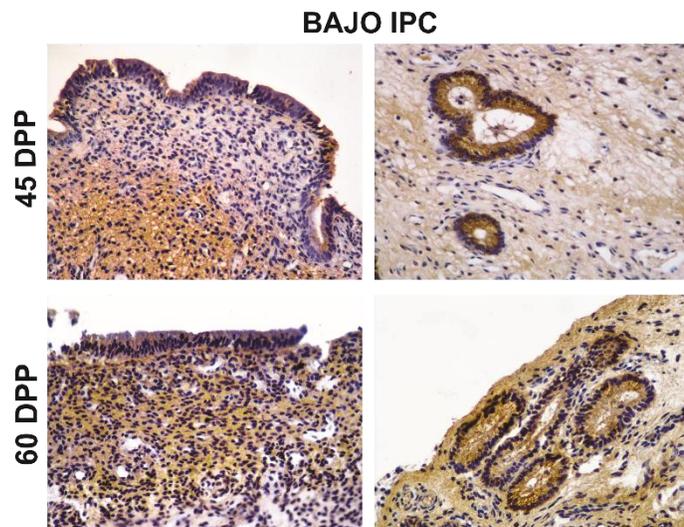


Figura 18: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

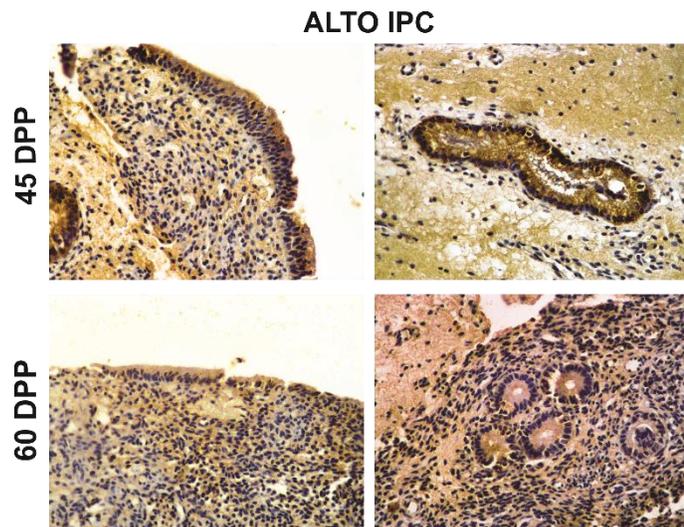


Figura 19: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP2 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, E y EG. Magnificación 400X.

4.1.3. Niveles de expresión proteica de MMP14 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular.

A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de MMP14 en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,296$ y $p = 0,354$ respectivamente). En cambio, los niveles de expresión proteica de MMP14 en EL, fueron significativamente mayores para el grupo de vacas de BAJO IPC en comparación con el grupo de vacas de ALTO IPC ($p = 0,001$) (Figura 20).

A los 60 DPP los niveles de expresión proteica de MMP14 en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,392$ y $p = 0,471$ respectivamente). En cambio, los niveles de expresión proteica de MMP14 en EL, fueron significativamente mayores para el grupo de vacas de BAJO IPC en comparación con el grupo de vacas de ALTO IPC ($p = 0,004$) (Figura 20).

En las figuras 21 y 22, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP14, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FF, en ambos tiempos de muestreo.

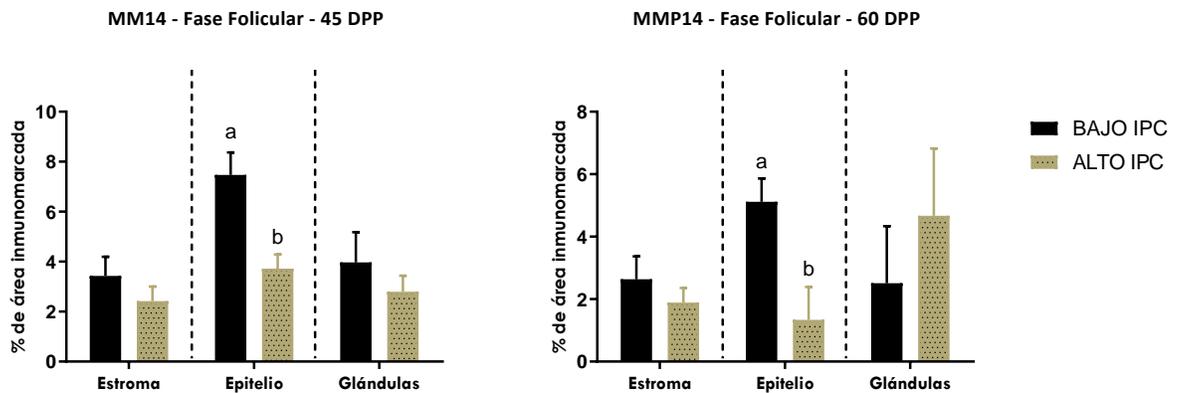


Figura 20: Expresión proteica de MMP14 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FF (n=18) con BAJO y ALTO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

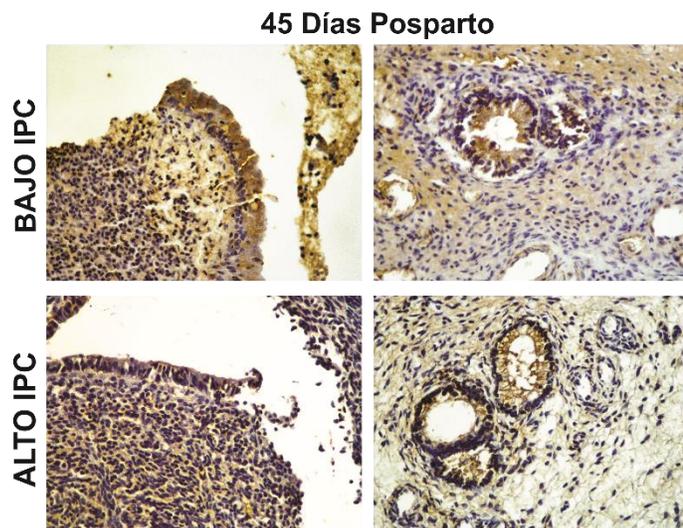


Figura 21: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

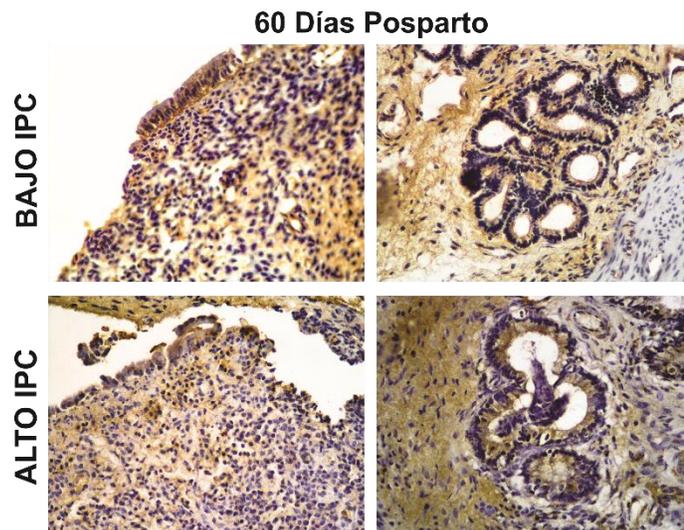


Figura 22: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

4.1.4. Niveles de expresión proteica de MMP14 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea.

A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de MMP14 en EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,441$ y $p = 0,203$ respectivamente). En cambio, los niveles de expresión proteica de MMP14 en Es, fueron significativamente mayores para el grupo de vacas de BAJO IPC en comparación con el grupo de vacas de ALTO IPC ($p = 0,017$) (Figura 23).

A los 60 DPP los niveles de expresión proteica de MMP14 en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,442$ y $p = 0,144$ respectivamente) En cambio, los niveles de expresión proteica de MMP14 en EL, fueron significativamente mayores para el grupo de vacas de BAJO IPC en comparación con el grupo de vacas de ALTO IPC ($p = 0,001$) (Figura 23).

En las figuras 24 y 25, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP14, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FL, en ambos tiempos de muestreo.

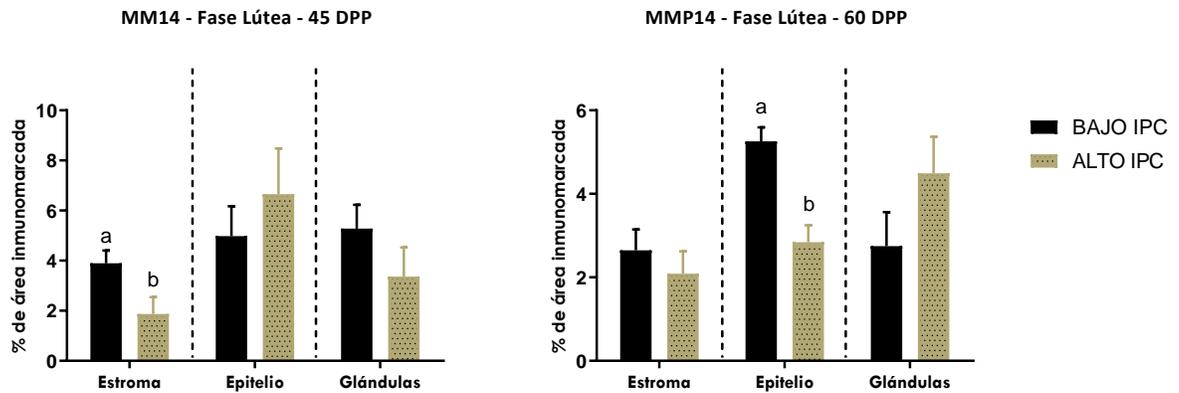


Figura 23: Expresión proteica de MMP14 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24) con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

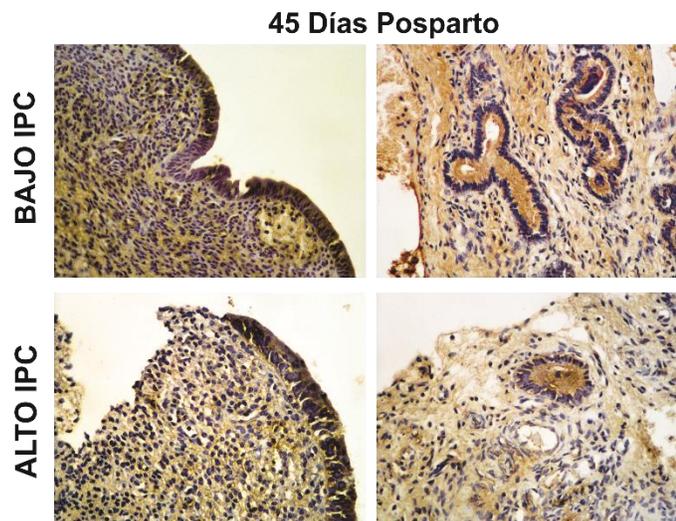


Figura 24: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FL, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

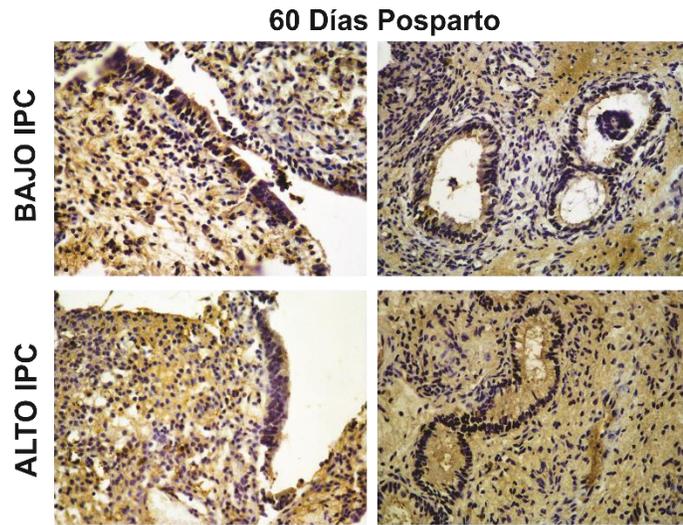


Figura 25: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X

Asimismo, a los fines de estudiar las posibles variaciones entre los tiempos de muestreo para animales en fase lútea, se obtuvo que: en las vacas con BAJO IPC, los niveles de expresión proteica de MMP14 en Es y EL no mostraron diferencias significativas entre ambos tiempos de muestreo ($p = 0,130$ y $p = 0,899$ respectivamente). En cambio, los niveles de expresión proteica de MMP14 en EG, fueron significativamente mayores a los 45 DPP en comparación con los resultados obtenidos a los 60 DPP ($p = 0,017$) (Figura 26).

En las vacas con ALTO IPC, los niveles de expresión proteica de MMP14 en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre ambos tiempos de muestreo ($p = 0,729$ y $p = 0,501$ respectivamente). En cambio, los niveles de expresión proteica de MMP14 en EL, fueron significativamente mayores a los 45 DPP en comparación con los resultados obtenidos a los 60 DPP ($p = 0,001$) (Figura 26).

En las figuras 27 y 28, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP14, en EL, Es y EG, para cada tiempo de muestreo, en vacas con BAJO y ALTO IPC.

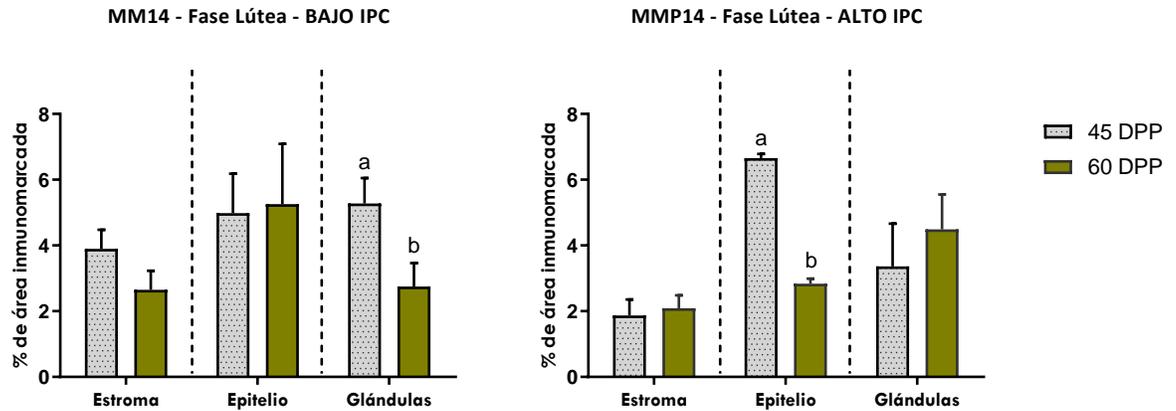


Figura 26: Expresión proteica de MMP14 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO IPC (n=10), a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

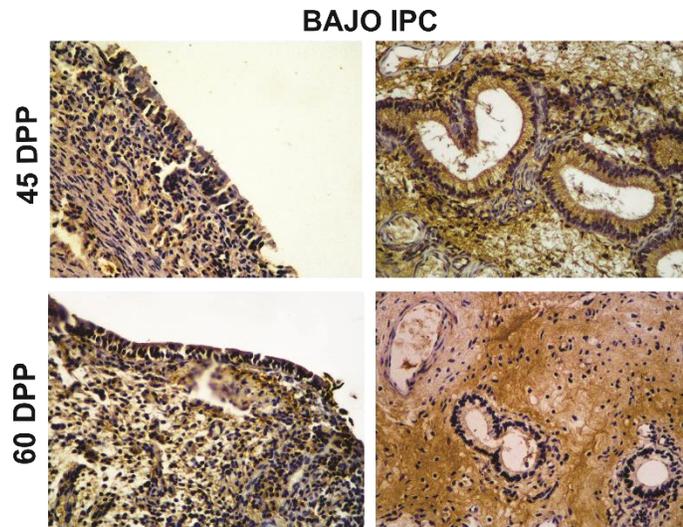


Figura 27: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

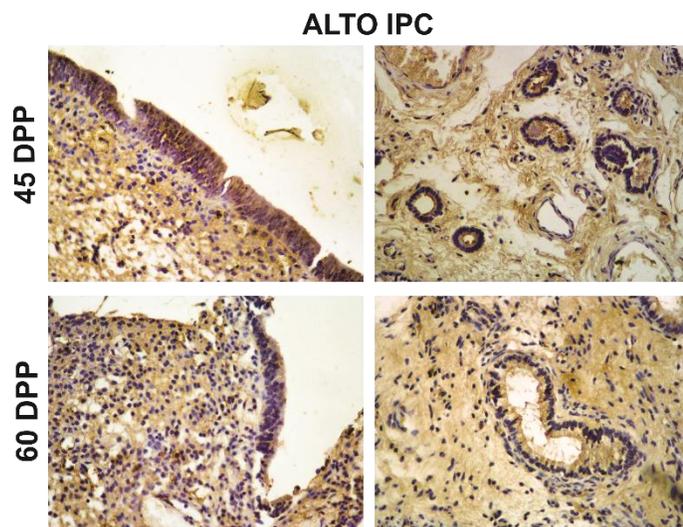


Figura 28: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP14 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

4.1.5. Niveles de expresión proteica de MMP9 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular.

A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de MMP9 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,949$, $p = 0,552$ y $p = 0,757$ respectivamente) (Figura 29).

A los 60 DPP los niveles de expresión proteica de MMP9 en Es y EL no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,354$ y $p = 0,105$ respectivamente). En cambio, los niveles de expresión proteica de MMP9 en EG, fueron significativamente mayores para el grupo de vacas de ALTO IPC en comparación con el grupo de vacas de BAJO IPC ($p = 0,023$) (Figura 29).

En las figuras 30 y 31, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP9, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FF, en ambos tiempos de muestreo.

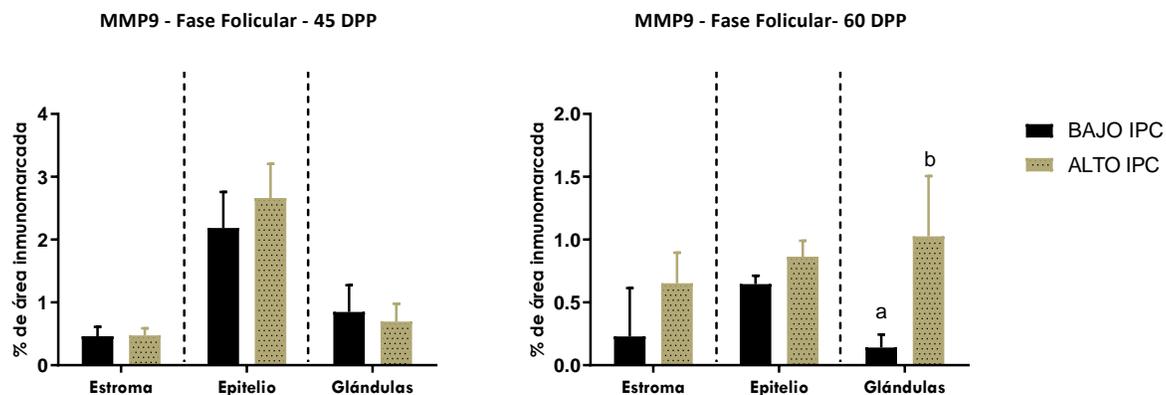


Figura 29: Expresión proteica de MMP9 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FF (n=18) con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

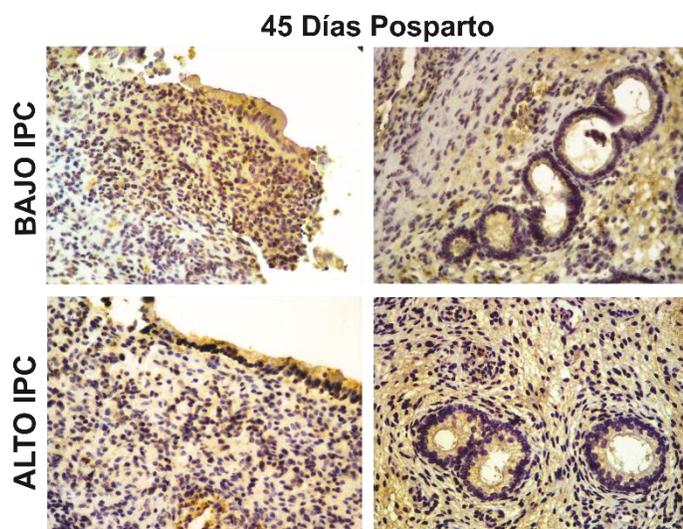


Figura 30: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

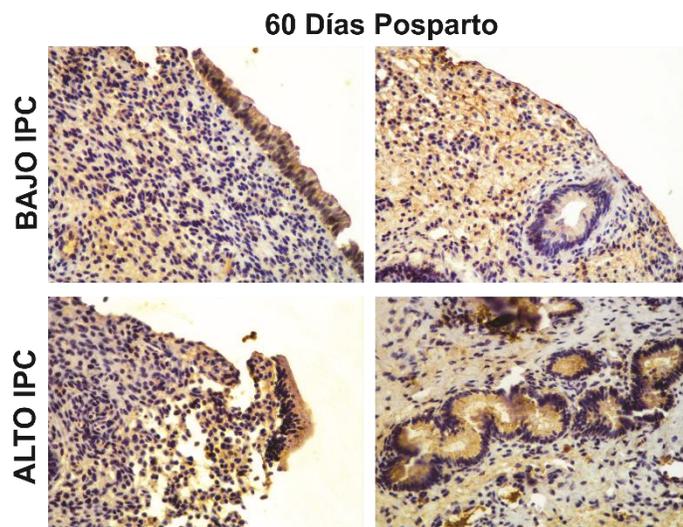


Figura 31: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FF, con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X

4.1.6. Niveles de expresión proteica de MMP9 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea.

A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de MMP9 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,917$, $p = 0,384$ y $p = 0,756$ respectivamente) (Figura 32).

A los 60 DPP los niveles de expresión proteica de MMP9 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,793$, $P = 0,946$ y $p = 0,860$ respectivamente) (Figura 32).

En las figuras 33 y 34, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP9, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FL, en ambos tiempos de muestreo.

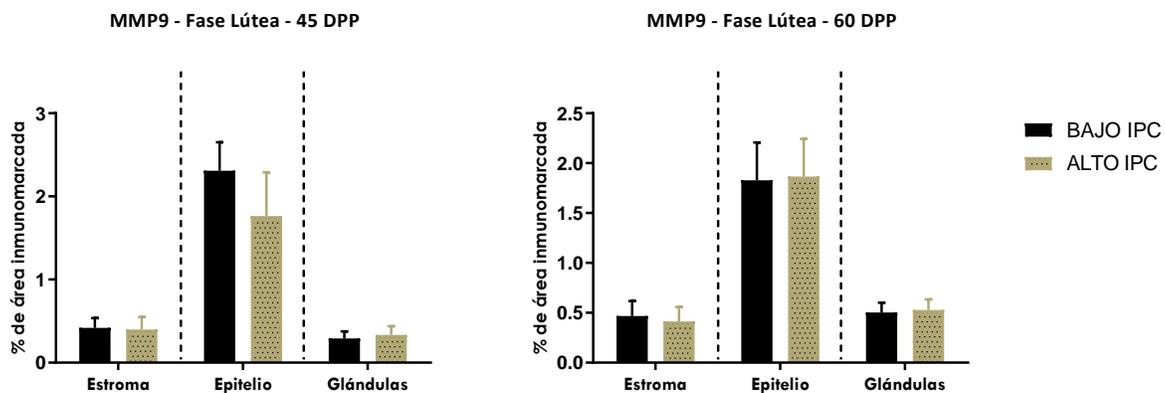


Figura 32: Expresión proteica de MMP9 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio posparto de vacas en FL (n=24), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.

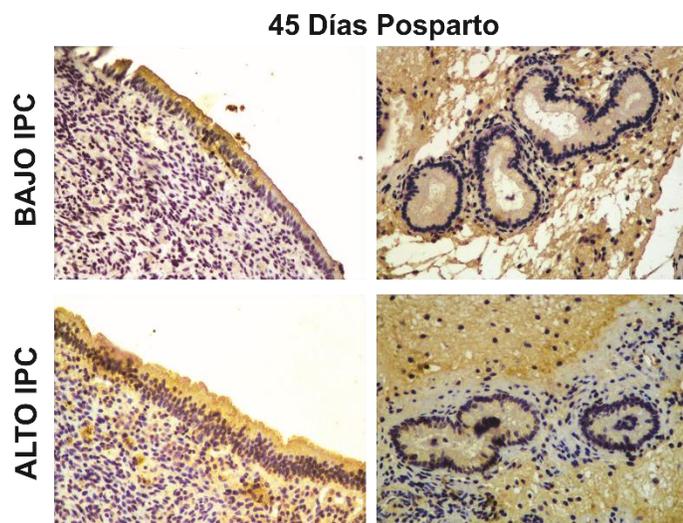


Figura 33: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

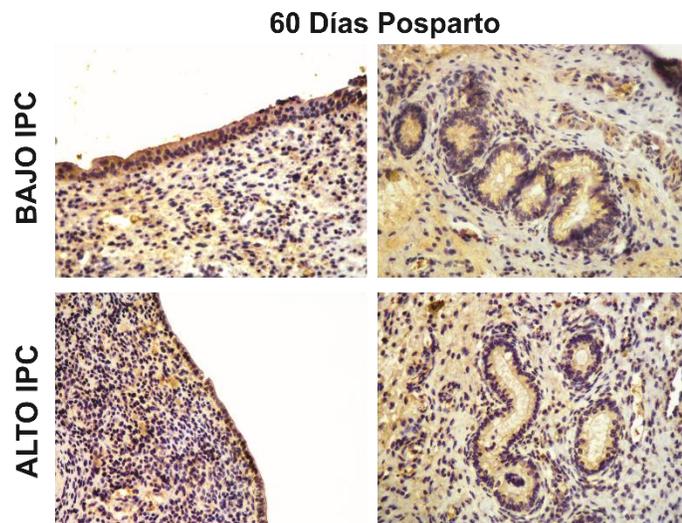


Figura 34: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

Asimismo, a los fines de estudiar las posibles variaciones entre los tiempos de muestreo para animales en fase lútea, se obtuvo que: en las vacas con BAJO IPC, los niveles de expresión proteica de MMP9 en Es y EL no mostraron diferencias significativas entre ambos momentos de muestreo ($p = 0,829$ y $p = 0,457$ respectivamente). Sin embargo, a nivel de EG, si bien no se observaron diferencias significativas, se reconoce cierta tendencia hacia un mayor nivel de expresión proteica en las muestras obtenidas al día 60 posparto, en relación a las obtenidas a los 45 DPP ($p = 0,062$) (Figura 35).

En las vacas con ALTO IPC, los niveles de expresión proteica de MMP9 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre ambos momentos de muestreo ($p = 0,896$, $p = 0,833$ y $p = 0,281$ respectivamente) (Figura 35).

En las figuras 36 y 37 se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP9, en EL, Es y EG, para cada tiempo de muestreo, en vacas con BAJO y ALTO IPC.

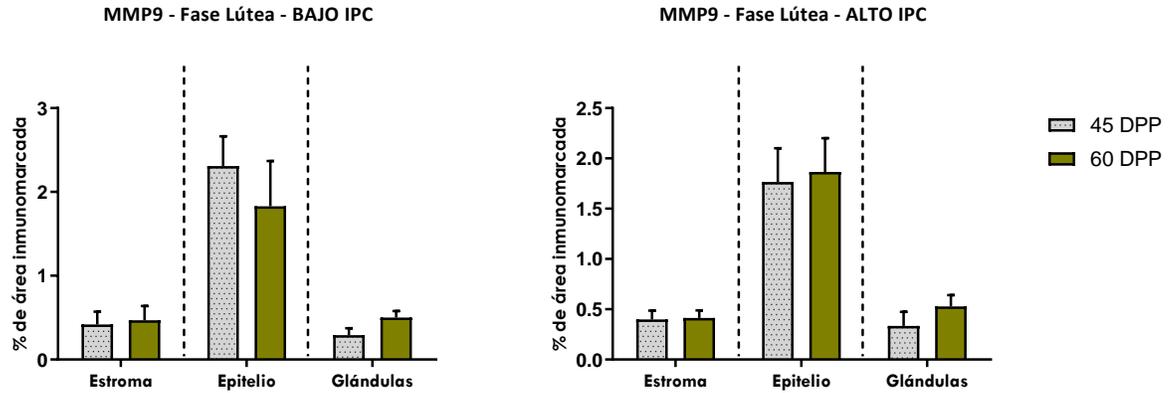


Figura 35: Expresión proteica de MMP9 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO IPC (n=10), a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.

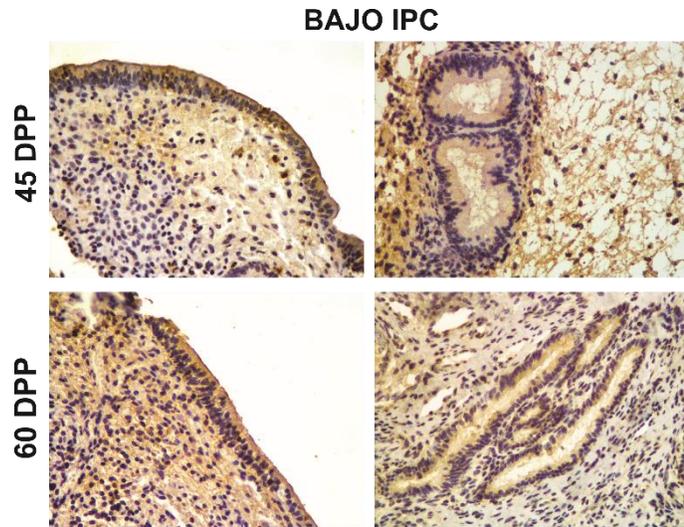


Figura 36: Imágenes representativas del área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

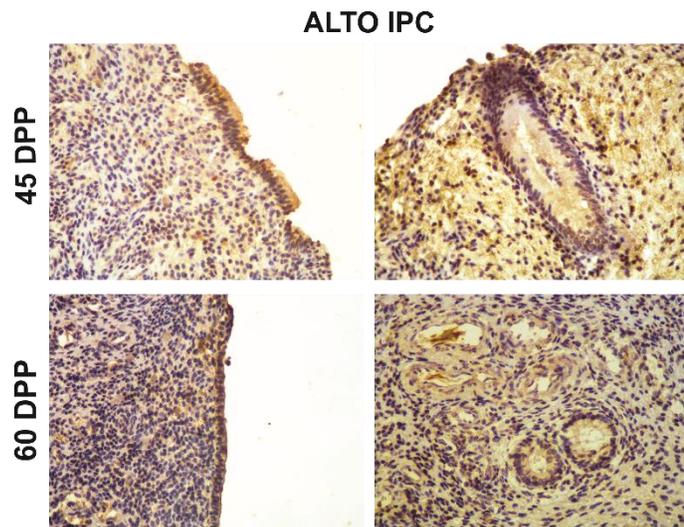


Figura 37: Imágenes representativas de área inmunomarcada de MMP9 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

4.2. Niveles de expresión proteica de TIMP1 y TIMP2 en el endometrio de vacas lecheras durante el período pospartal.

4.2.1. Niveles de expresión proteica de TIMP1 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular.

A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de TIMP1 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,952$, $p = 0,609$ y $p = 0,613$ respectivamente) (Figura 38).

A los 60 DPP los niveles de expresión proteica de TIMP1 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,700$, $p = 0,138$ y $p = 0,116$ respectivamente) (Figura 38).

En las figuras 39 y 40, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de TIMP1, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FF, en ambos tiempos de muestreo.

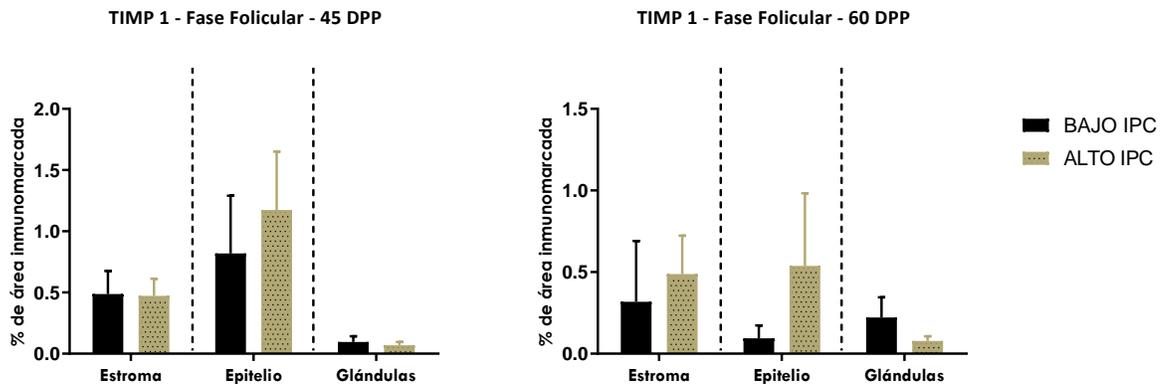


Figura 38: Expresión proteica de TIMP1 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, ELy EG del endometrio pospartal de vacas en FF (n=18), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.

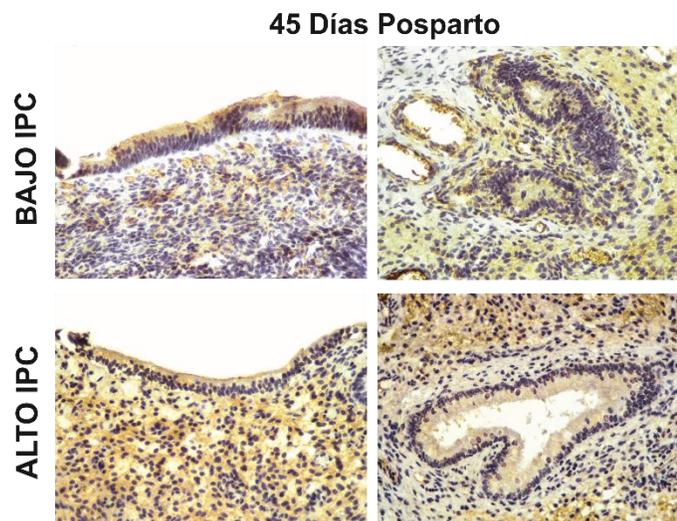


Figura 39: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FF con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

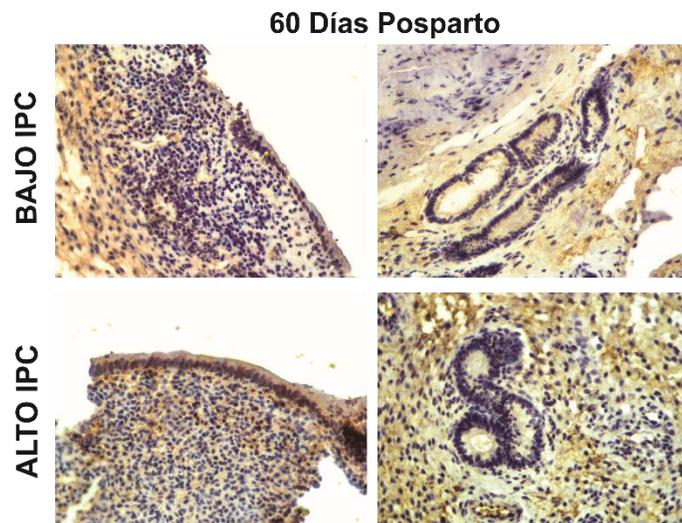


Figura 40: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FF con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

4.2.2. Niveles de expresión proteica de TIMP1 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea.

A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de TIMP1 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,519$, $p = 0,844$ y $p = 0,345$ respectivamente) (Figura 41).

A los 60 DPP los niveles de expresión proteica de TIMP1 en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,164$ y $p = 0,191$ respectivamente). En cambio, los niveles de expresión proteica de TIMP1 en EL, mostraron resultados significativamente mayores para los animales con BAJO IPC en relación a aquellos con ALTO IPC ($p = 0,013$) (Figura 41).

En las figuras 42 y 43, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de TIMP1, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FL, en ambos tiempos de muestreo.

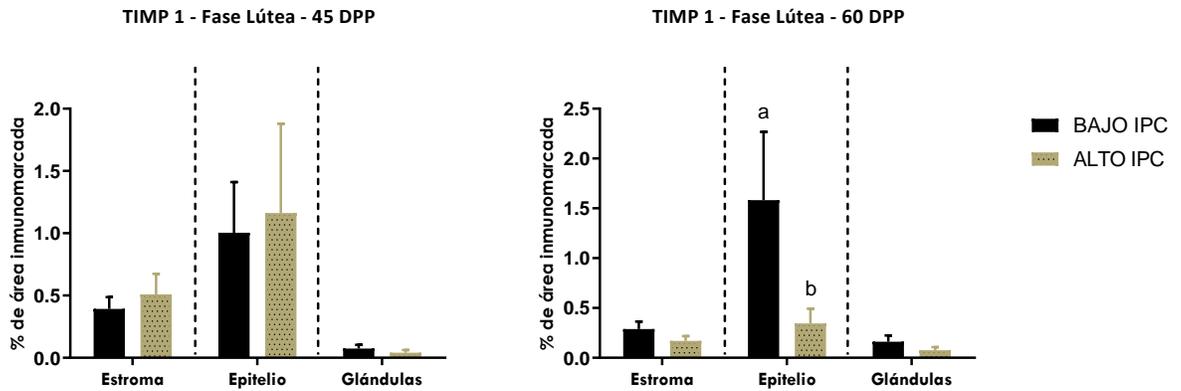


Figura 41: Expresión proteica de TIMP1 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

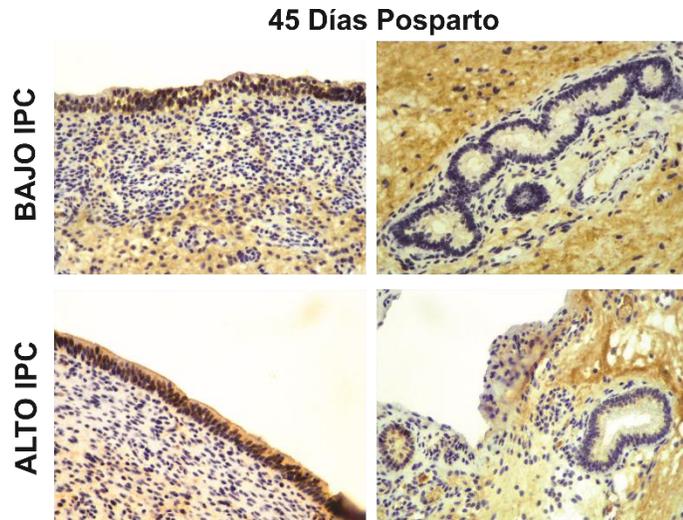


Figura 42: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

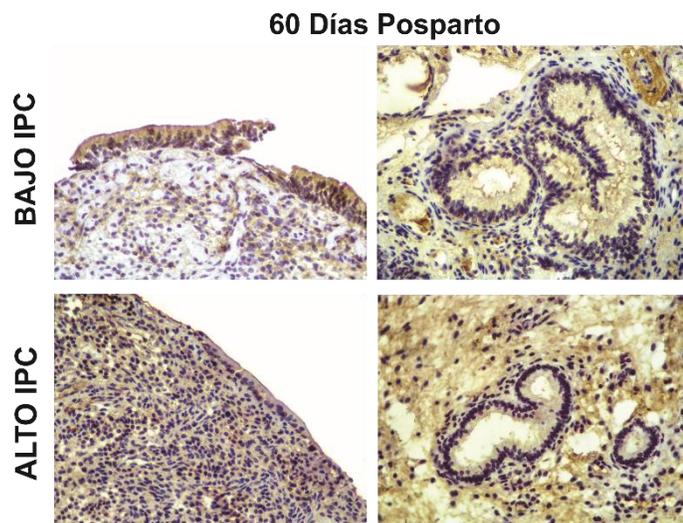


Figura 43: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

Por otro lado, a los fines de estudiar las posibles variaciones entre los tiempos de muestreo para animales en fase lútea, se obtuvo que: en las vacas con BAJO IPC, los niveles de expresión proteica de TIMP1 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre ambos momentos de muestreo ($p = 0,429$, $p = 0,437$ y $p = 0,194$ respectivamente) (Figura 44).

En las vacas con ALTO IPC, los niveles de expresión proteica de TIMP1 en EL y EG no mostraron diferencias significativas entre ambos tiempos de muestreo ($p = 0,187$ y $p = 0,284$ respectivamente). Sin embargo, en la expresión proteica de TIMP1 a nivel de Es, se observaron niveles de expresión significativamente mayores en las muestras correspondientes al día 45 posparto en comparación con las muestras correspondiente al día 60 posparto ($p = 0,004$) (Figura 44).

En las figuras 45 y 46 se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de TIMP1, en EL, Es y EG, para cada tiempo de muestreo, en vacas con BAJO y ALTO IPC.

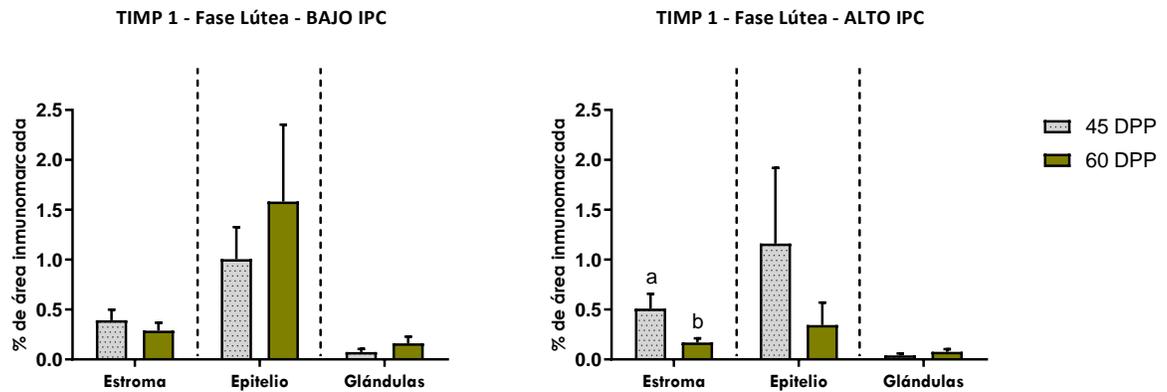


Figura 44: Expresión proteica de TIMP1 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO IPC (n=10), a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

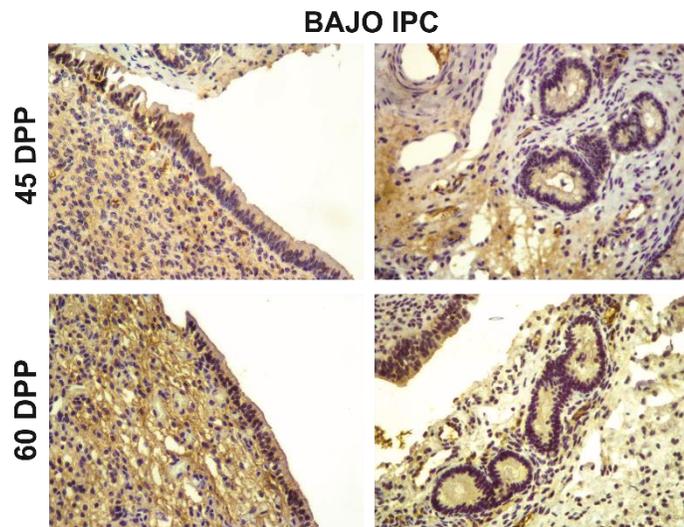


Figura 45: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y epitelio EG. Magnificación 400X.

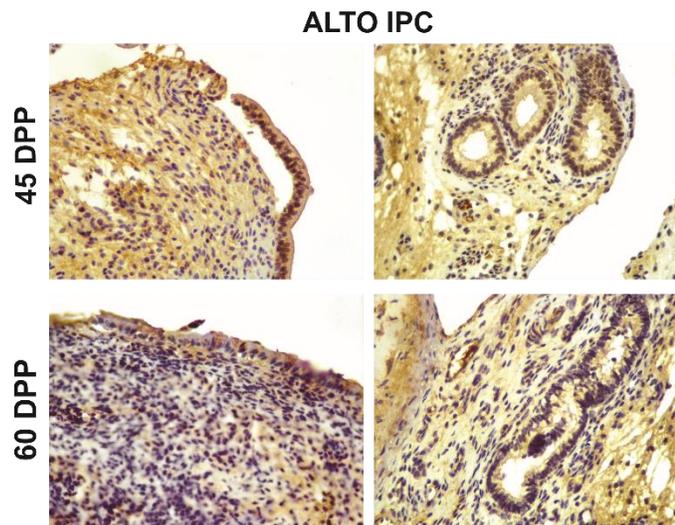


Figura 46: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP1 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

4.2.3. Niveles de expresión proteica de TIMP2 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Folicular.

A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de TIMP2 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,501$, $p = 0,750$ y $p = 0,085$ respectivamente) (Figura 47).

A los 60 DPP los niveles de expresión proteica de TIMP2 en Es y EL no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,282$ y $p = 0,259$ respectivamente). En cambio, se encontraron niveles de expresión proteica significativamente mayores a nivel de EG, en las vacas con ALTO IPC, en relación a las vacas con BAJO IPC ($p = 0,001$) (Figura 47).

En las figuras 48 y 49 se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de TIMP2, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FF, en ambos tiempos de muestreo.

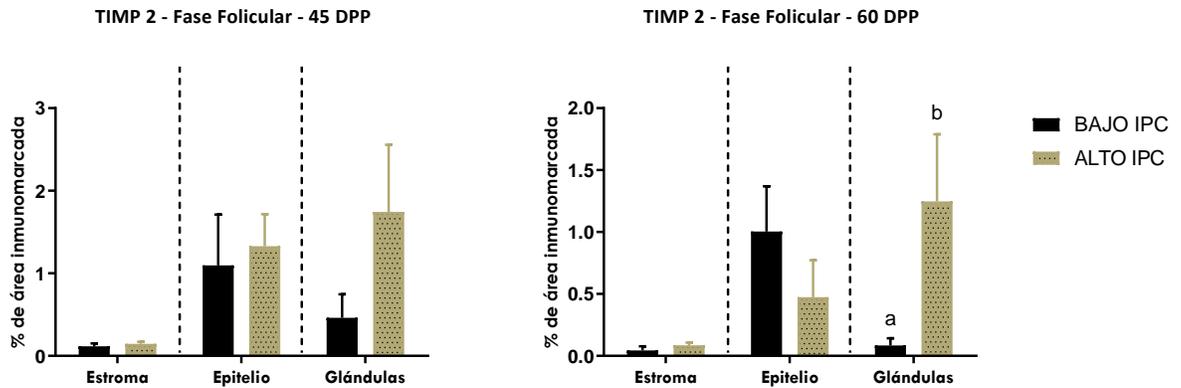


Figura 47: Expresión proteica de TIMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio posparto de vacas en FF (n=18), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=7) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < .05$).

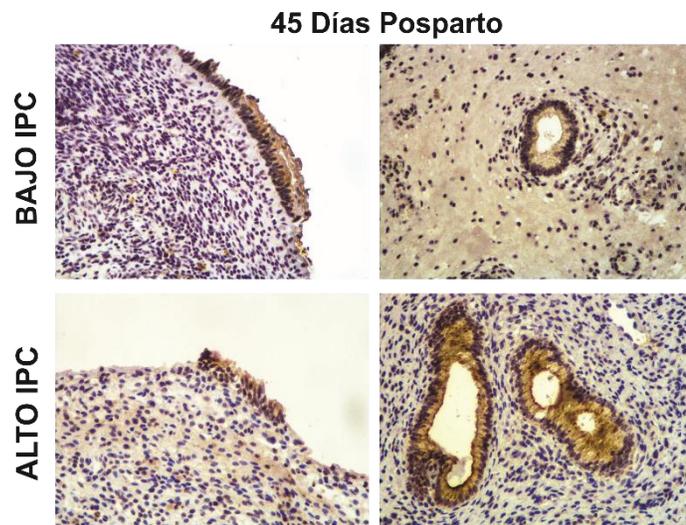


Figura 48: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FF con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X

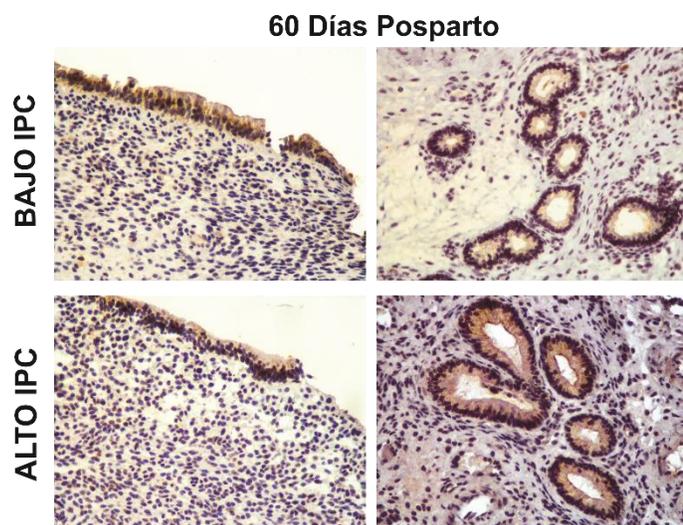


Figura 49: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FF con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

4.2.4. Niveles de expresión proteica de TIMP2 en el endometrio de vacas lecheras en Fase Lútea.

A los 45 DPP, se encontraron niveles de expresión proteica de TIMP2 en Es, significativamente mayores para el grupo de vacas con ALTO IPC, en relación a las vacas de BAJO ICP ($p = 0,007$). Por otro lado, si bien no se observaron diferencias significativas, existió cierta tendencia a una mayor expresión proteica de TIMP2 a nivel de EL para las vacas con BAJO IPC comparado con las de ALTO IPC ($p = 0,064$). En cuanto al EG, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,682$) (Figura 50).

A los 60 DPP los niveles de expresión proteica de TIMP2 en Es, EL y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,475$, $p = 0,550$ y $p = 0,081$ respectivamente) (Figura 50).

En las figuras 51 y 52, se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de TIMP2, en EL, Es y EG, para cada uno de los grupos en estudio en FL, en ambos tiempos de muestreo.

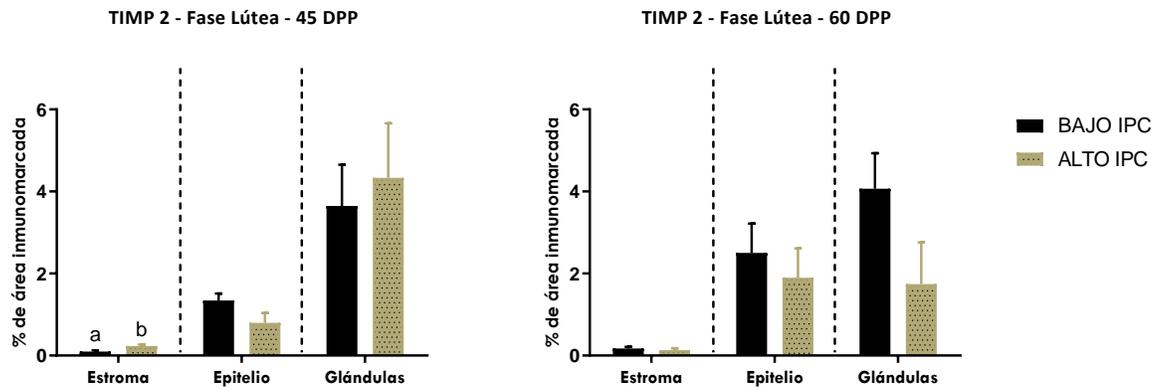


Figura 50: Expresión proteica de TIMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con ALTO y BAJO IPC, a los 45 (n=11) y 60 (n=13) DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < .05$).

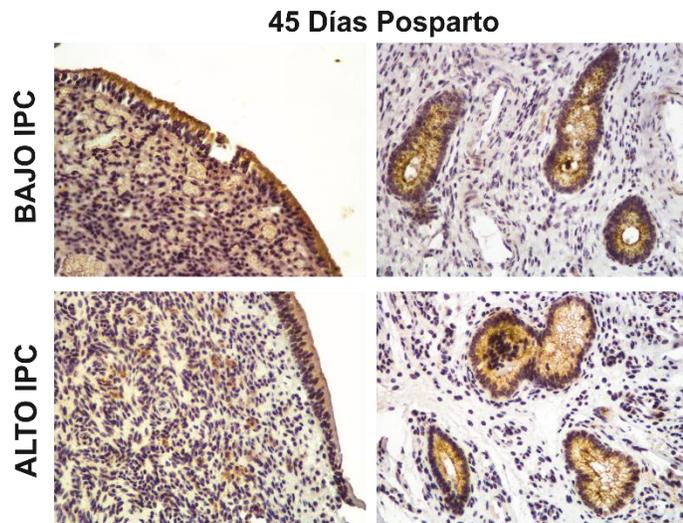


Figura 51: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 45 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X

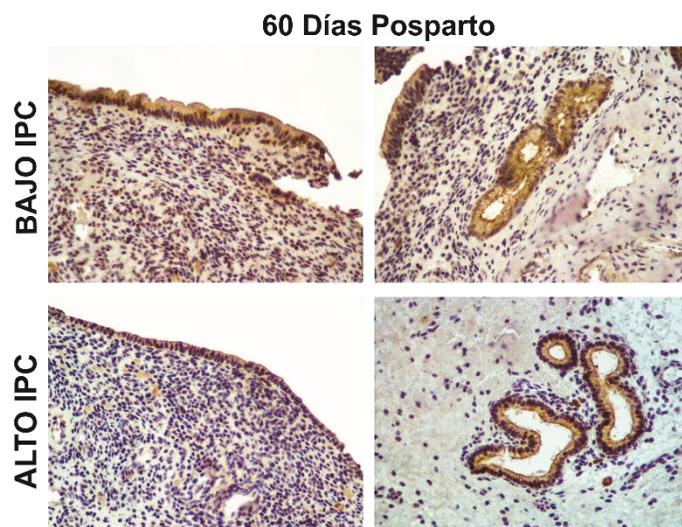


Figura 52: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FL con ALTO y BAJO IPC, a los 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

Por otro lado, a los fines de estudiar las posibles variaciones entre los tiempos de muestreo para animales en fase lútea, se obtuvo que: las vacas con BAJO IPC, presentaron niveles de expresión proteica de TIMP2 en Es, significativamente mayores a los 60 DPP en relación a lo observado a los 45 DPP ($p = 0,048$). En cuanto a EL y EG, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p = 0,076$ y $p = 0,756$ respectivamente) (Figura 53).

En las vacas con ALTO IPC, los niveles de expresión proteica de TIMP2 en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre ambos momentos de muestreo ($p = 0,192$ y $p = 0,098$ respectivamente). Sin embargo, en EL, se observó una tendencia a mostrar mayores niveles de expresión proteica de TIMP2 en las muestras obtenidas a los 60 DPP en comparación con las obtenidos a los 45 DPP ($p = 0,059$) (Figura 53).

En las figuras 54 y 55 se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación de TIMP2, en EL, Es y EG, para cada tiempo de muestreo, en vacas con BAJO y ALTO IPC.

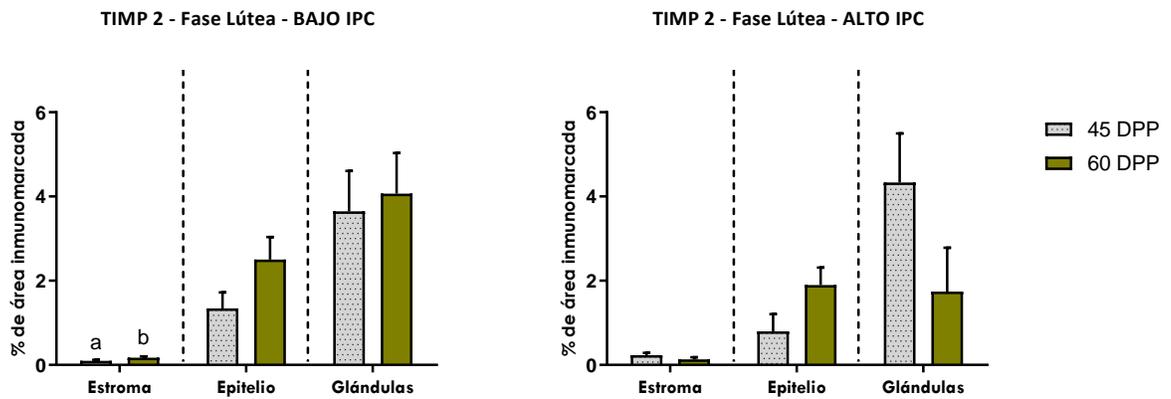


Figura 53: Expresión proteica de TIMP2 medida como porcentaje de área inmunomarcada de Es, EL y EG del endometrio pospartal de vacas en FL (n=24), con BAJO (n=14) y ALTO (n=10) IPC, a los 45 y 60 DPP. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

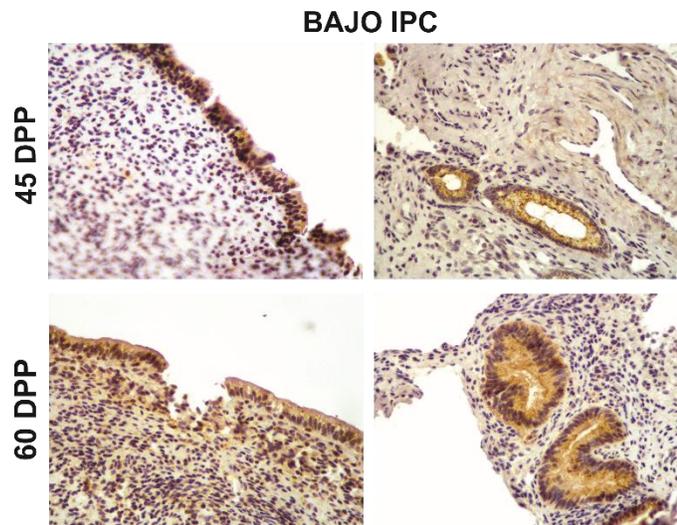


Figura 54: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FL y BAJO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

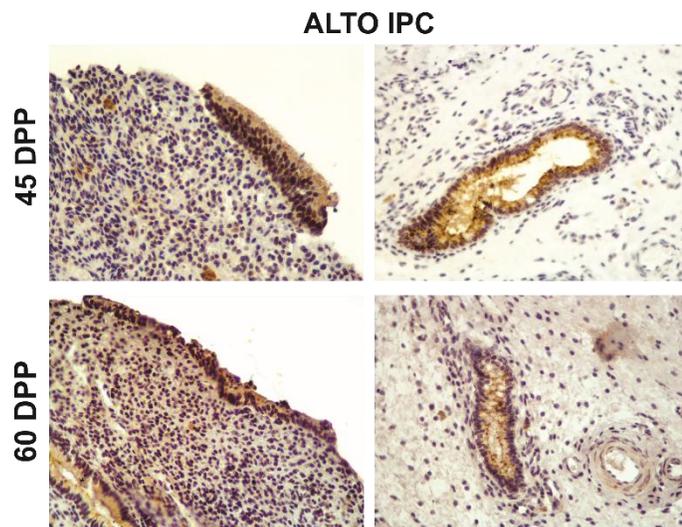


Figura 55: Imágenes representativas del área inmunomarcada de TIMP2 en endometrio de vacas en FL y ALTO IPC, a los 45 y 60 DPP. Para cada caso se muestran imágenes del EL, Es y EG. Magnificación 400X.

4.3. Relaciones entre la expresión proteica de metaloproteasas de la matriz y la expresión proteica de Inhibidores tisulares de metaloproteasas en el endometrio pospartal de vacas lecheras.

Las relaciones de MMP/TIMP se calcularon a partir de los promedios de los valores de área inmunomarcada de MMP y TIMP, en cada uno de los estratos evaluados del endometrio uterino pospartal (EL, Es y EG), a los 60 DPP, en animales en FL.

4.3.1. Relación entre la expresión proteica de MMP2 y la expresión proteica de cada uno de los TIMP.

Tanto la relación MMP2/TIMP1 como la relación MMP2/TIMP2, no mostraron diferencias significativas entre los animales agrupados según su IPC, en las vacas en FL, a los 60 DPP ($p = 0,9$ y $p = 0,756$ respectivamente) (Figura 56 A y B).

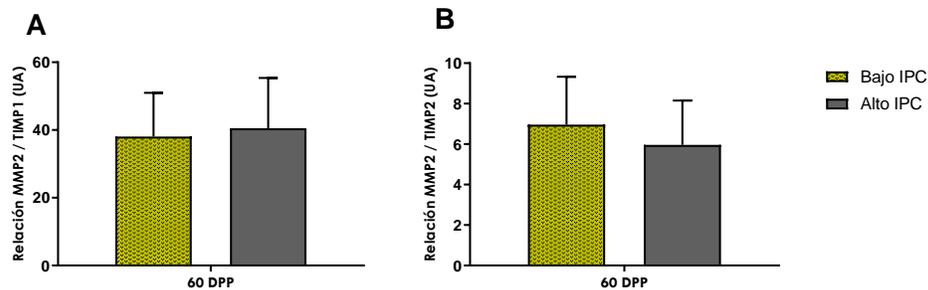


Figura 56: (A) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP2/TIMP1, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. (B) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP2/TIMP2, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.

4.3.2. Relación entre la expresión proteica de MMP14 y la expresión proteica de cada uno de los TIMP.

Tanto la relación MMP14/TIMP1, como la relación MMP14/TIMP2, no mostraron diferencias significativas entre los animales agrupados según su IPC, en las vacas en Fase Lútea, a los 60 DPP ($p = 0,721$ y $p = 0,973$) (Figura 57 A y B).

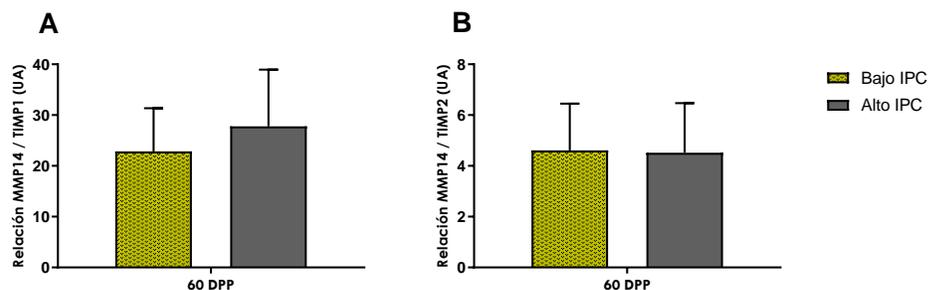


Figura 57: (A) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP14/TIMP1, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. (B) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP14/TIMP2, a los 60 DPP, en vacas en FL (n=24), de Alto y Bajo IPC. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media.

4.3.3. Relación entre la expresión proteica de MMP9 y la expresión proteica de cada uno de los TIMP.

La relación MMP9/TIMP1 mostró diferencias significativas entre animales de distintos grupos ($p = 0,045$) siendo mayor la relación en aquellas vacas con alto IPC (Figura 58A).

La relación MMP9/TIMP2 no mostró diferencias entre los grupos de animales evaluados ($p = 0,371$) (Figura 58B)

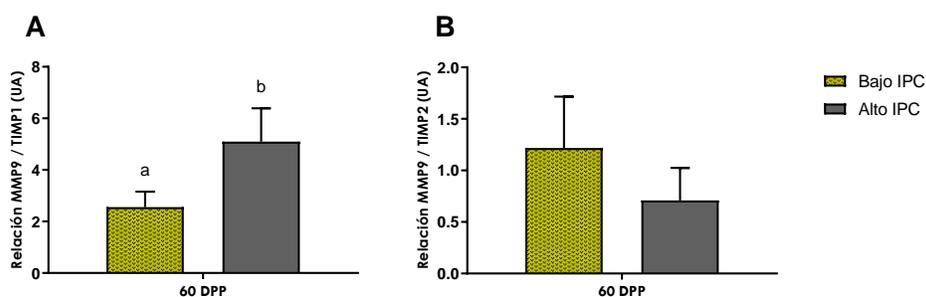


Figura 58: (A) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP9/TIMP1, a los 60 DPP, en vacas en FL ($n=24$), de Alto y Bajo IPC. (B) Relación de los porcentajes de área inmunomarcada MMP9/TIMP2, a los 60 DPP, en vacas en FL ($n=24$), de Alto y Bajo IPC. Los valores representan la media \pm desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

4.4. Asociación de los niveles de expresión proteica de Metaloproteasas y sus Inhibidores con el retraso en la concepción.

En la sección 4.1. se evaluaron los niveles de expresión proteica de MMP y TIMP para los diferentes grupos en estudio, tanto a los 45 como a los 60 DPP. Sin embargo, no es posible concluir a partir de dicho análisis si el retraso en la concepción está asociado a los niveles de expresión local de algún componente del sistema MMP-TIMP en particular. Por este motivo, se realizó un análisis estadístico complementario, teniendo en cuenta los niveles de expresión de cada componente a los 60 DPP (de manera categorizada), es decir, en el momento previo

a que los animales se liberaron a servicio. De esta manera, se logró determinar si el retraso en la concepción inmediata al parto, pudo estar asociado a dichos niveles temporales de expresión proteica a nivel endometrial, de acuerdo al IPC de los animales, considerado como variable de respuesta continua.

4.4.1. Asociación entre la expresión proteica de MMP2 y el retraso en la concepción.

En relación con los niveles de expresión proteica de MMP2, si bien no se observaron diferencias significativas, existió cierta tendencia en EL ($p = 0,063$), donde se encontró que los animales con menores niveles de expresión proteica tardaron más en preñarse (247 ± 41 DPP y 92 ± 3 DPP respectivamente) (Figura 59).

En cuanto a la expresión de MMP2 en Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ($p = 0,221$ y $p = 0,571$ respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en Es (151 ± 30 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (107 ± 20 DPP) (Figura 60). Del mismo modo, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EG (143 ± 32 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (124 ± 18 DPP) (Figura 61).

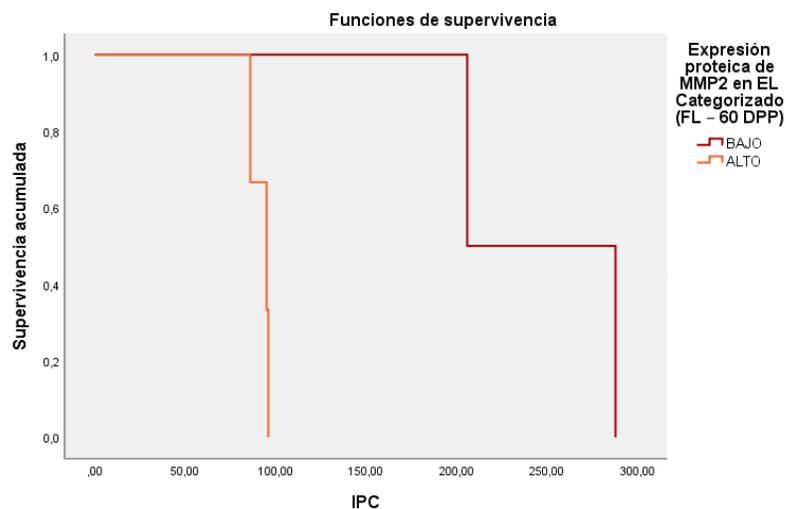


Figura 59: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP2 en EL ($p > 0.05$).

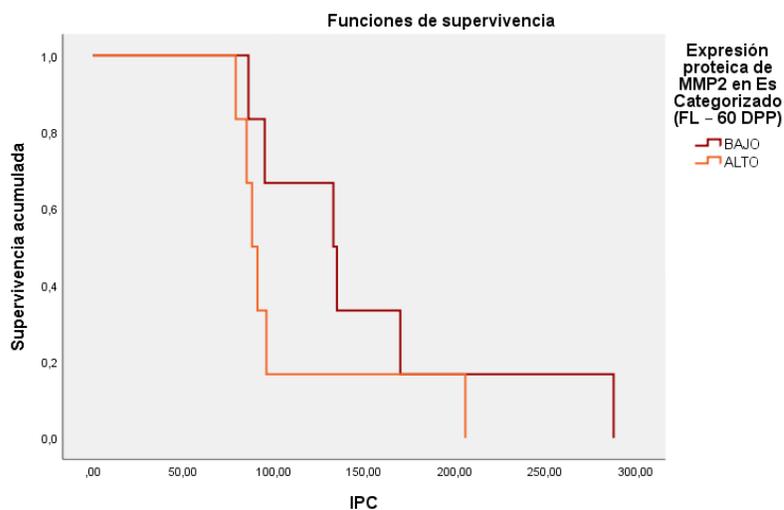


Figura 60: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP2 en Es ($p > 0.05$).

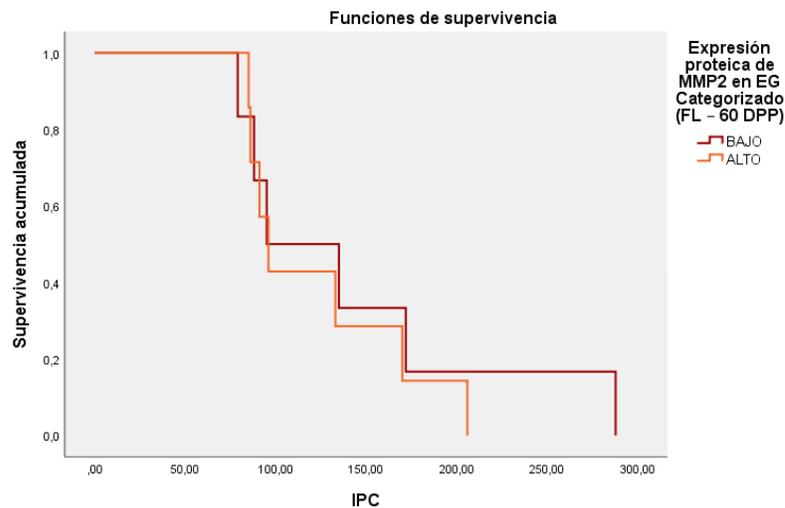


Figura 61: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP2 en EG ($p > 0.05$).

4.4.2. Asociación entre la expresión proteica de MMP14 y el retraso de la concepción.

En relación con los niveles de expresión proteica de MMP14 en EL, si bien no se observaron diferencias significativas ($p = 0,063$), se observó una tendencia hacia mayores niveles de expresión proteica, en animales que alcanzaron la preñez en menor cantidad de tiempo (92 ± 3 DPP y 247 ± 41 DPP respectivamente) (Figura 62)

En cuanto a la expresión de MMP14 en Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ($p = 0,896$ y $p = 0,713$ respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en Es (130 ± 20 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (134 ± 28 DPP) (Figura 63).

Finalmente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EG (141 ± 35 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (126 ± 14 DPP) (Figura 64).

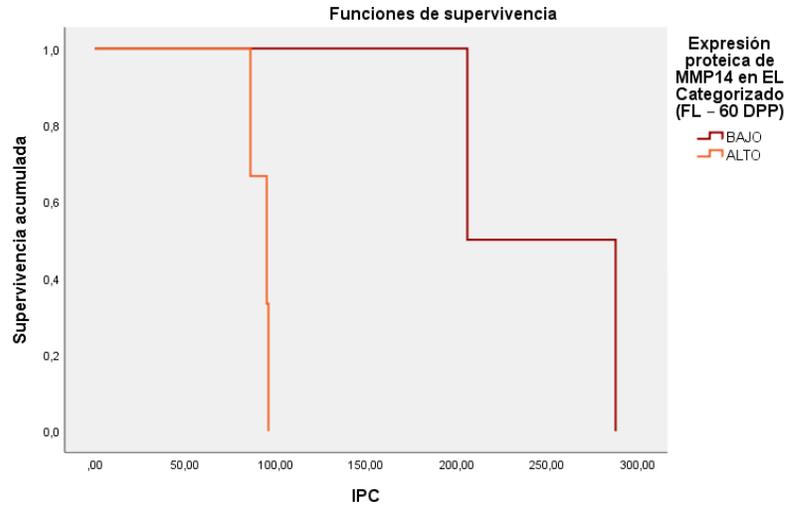


Figura 62: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP14 en EL ($p > 0.05$).

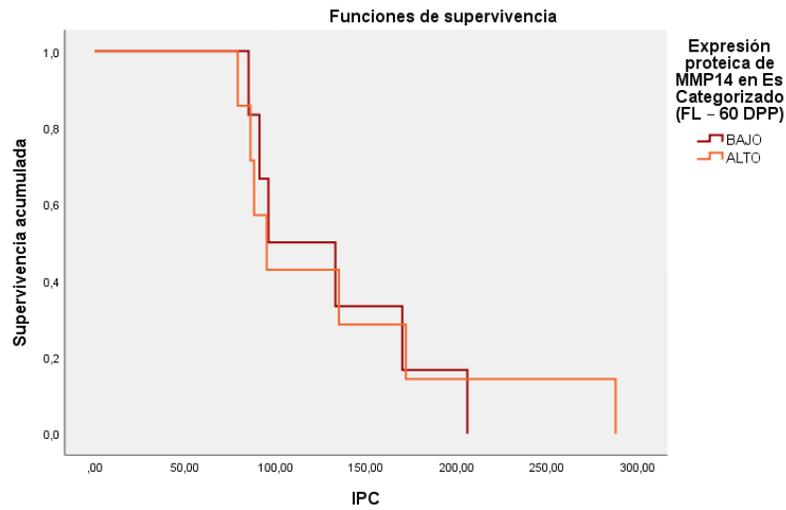


Figura 63: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP14 en Es ($p > 0.05$).

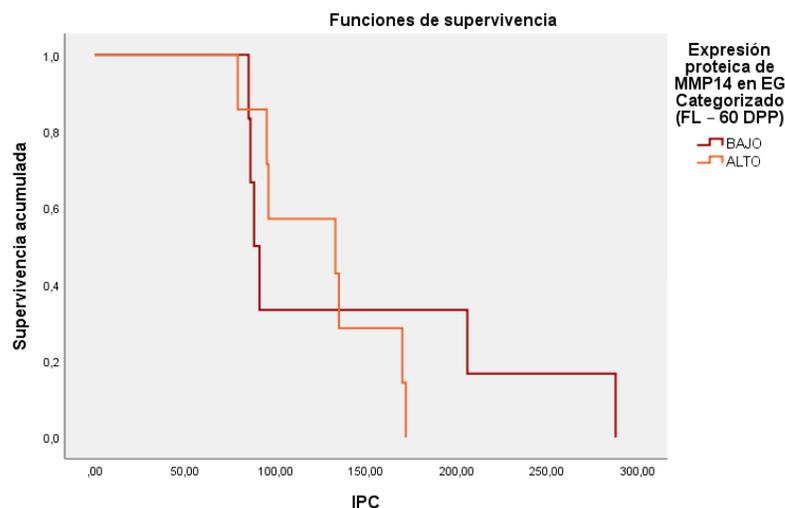


Figura 64: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP14 en EG ($p > 0.05$).

4.4.3. Asociación entre la expresión proteica de MMP9 y el retraso en la concepción

En relación con los niveles de expresión proteica de MMP9 en EL, Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ($p = 0,343$, $p = 0,210$ y $p = 0,648$ respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EL (129 ± 38 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (173 ± 58 DPP) (Figura 65). Del mismo modo, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en Es (111 ± 14 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (151 ± 29 DPP) (Figura 66). Finalmente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EG (124 ± 17 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (140 ± 30 DPP) (Figura 67).

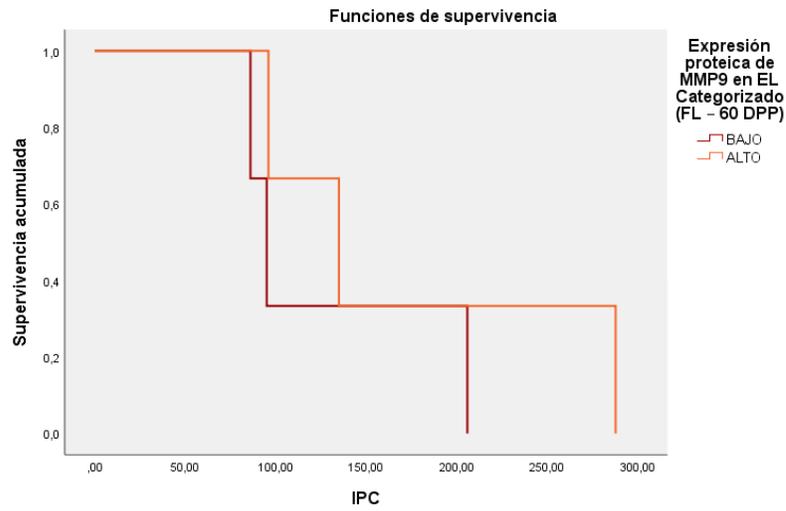


Figura 65: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP9 en EL ($p > 0.05$).

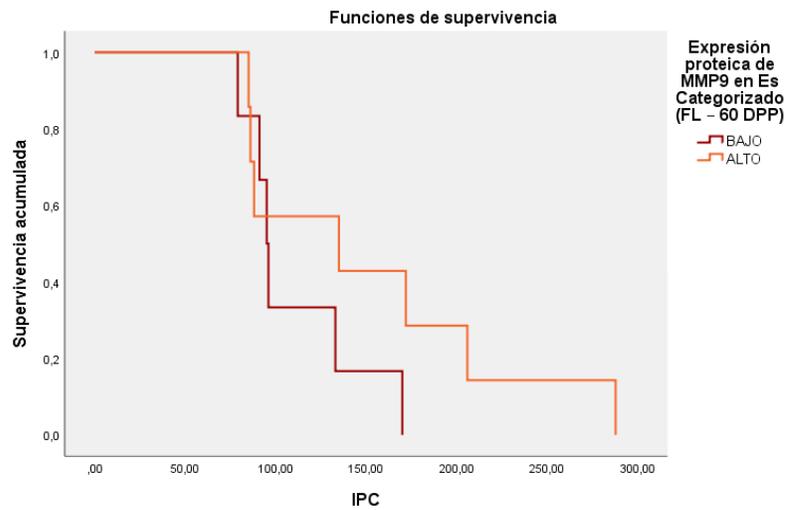


Figura 66: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP9 en Es ($p > 0.05$).

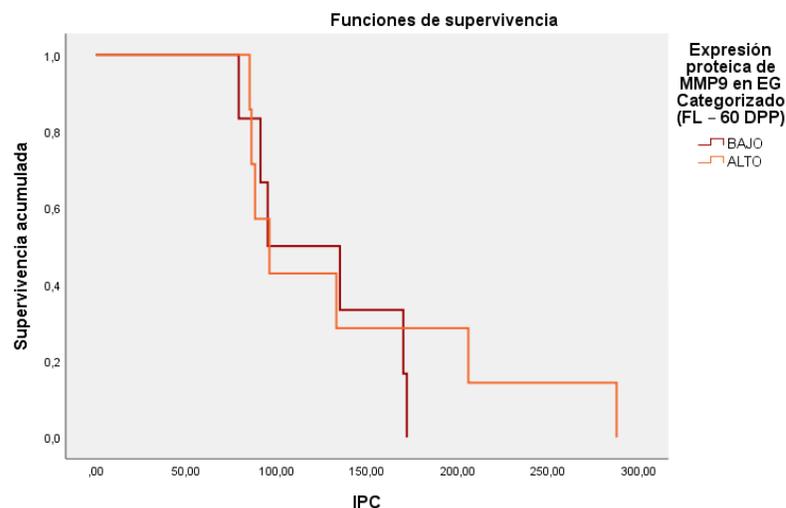


Figura 67: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de MMP9 en EG ($p > 0.05$).

4.4.4. Asociación entre la expresión proteica de TIMP1 y el retraso en la concepción.

En relación con los niveles de expresión proteica de TIMP1 en EL, se observaron diferencias significativas ($p = 0,025$), encontrándose una mayor expresión en aquellos animales que alcanzaron la preñez en menor tiempo, en relación a aquellos que tardaron más en preñarse (92 ± 3 DPP y 221 ± 35 DPP respectivamente) (Figura 68).

En relación con los niveles de expresión proteica de TIMP1 en Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ($p = 0,091$ y $p = 0,349$ respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en Es (98 ± 12 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (148 ± 23 DPP) (Figura 69). Asimismo, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EG (158 ± 47 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (121 ± 14 DPP) (Figura 70).

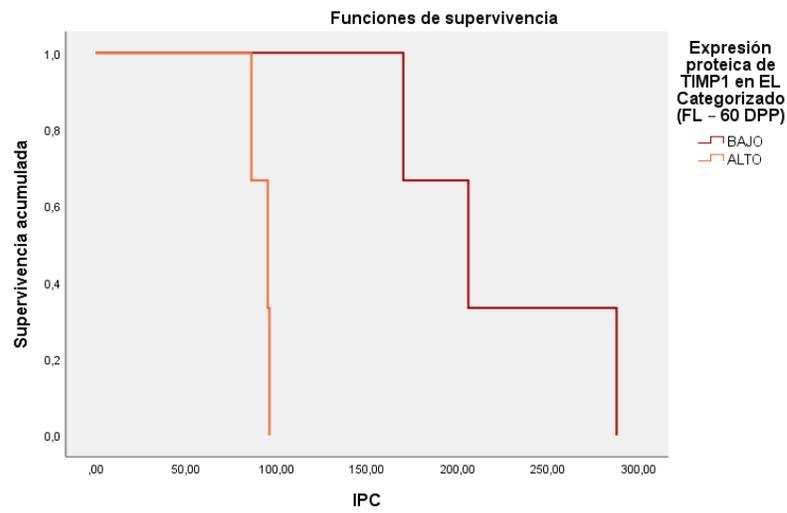


Figura 68: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP1 en EL ($p < 0.05$).

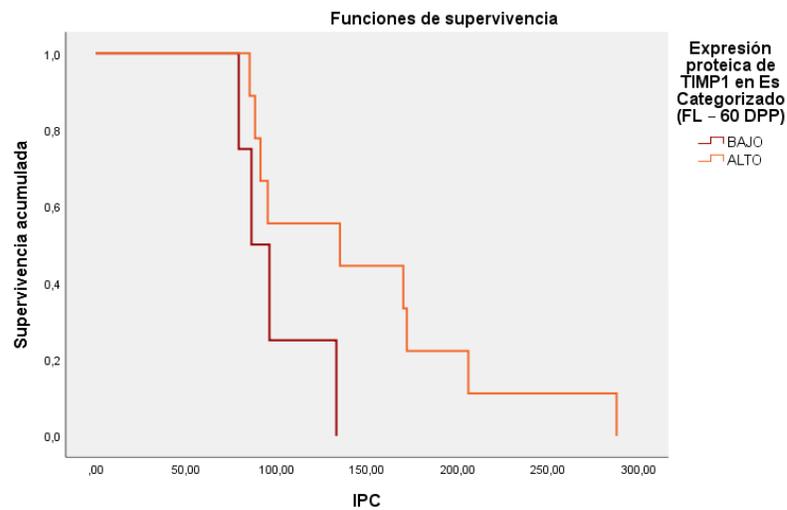


Figura 69: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP1 en Es ($p > 0.05$).

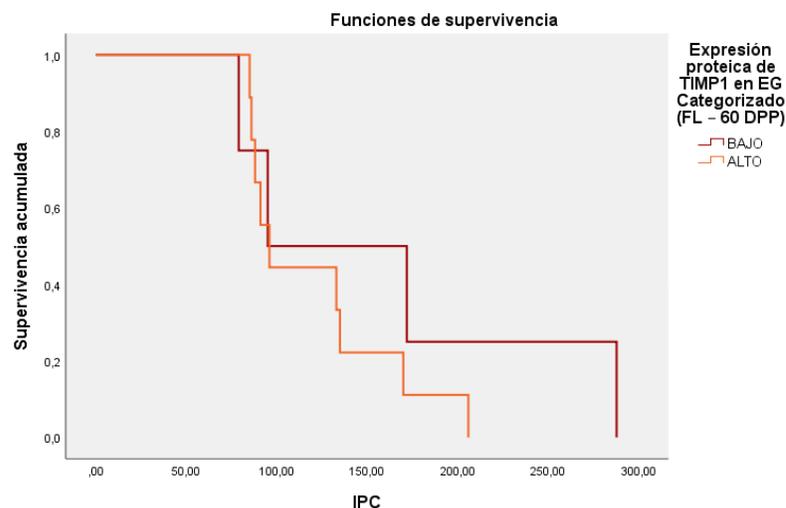


Figura 70: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP1 en EG ($p > 0.05$).

4.4.5. Asociación entre la expresión proteica de TIMP2 y el retraso en la concepción.

En relación con los niveles de expresión proteica de TIMP2 en EL, Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ($p = 0,277$, $p = 0,341$ y $p = 0,193$ respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EL (109 ± 13 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (181 ± 58 DPP) (Figura 71). Del mismo modo, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en Es (153 ± 37 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (112 ± 17 DPP) (Figura 72). Finalmente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EG (152 ± 30 DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica (107 ± 20 DPP) (Figura 73).

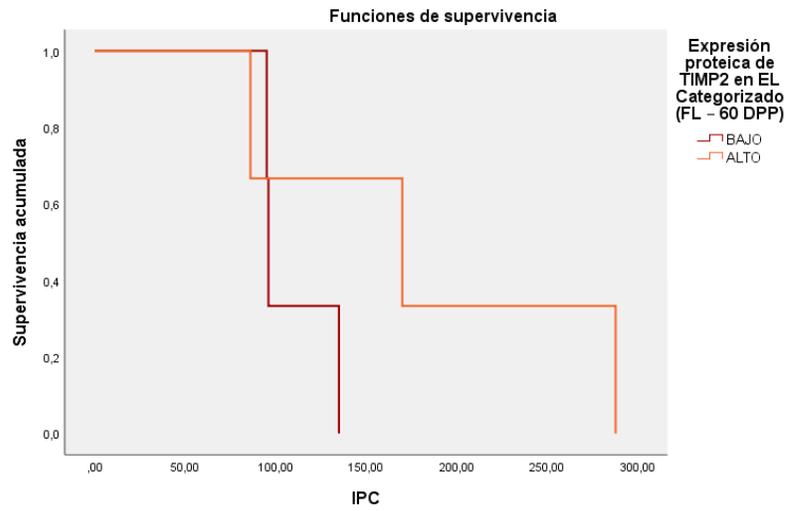


Figura 71: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP2 en EL ($p > 0.05$).

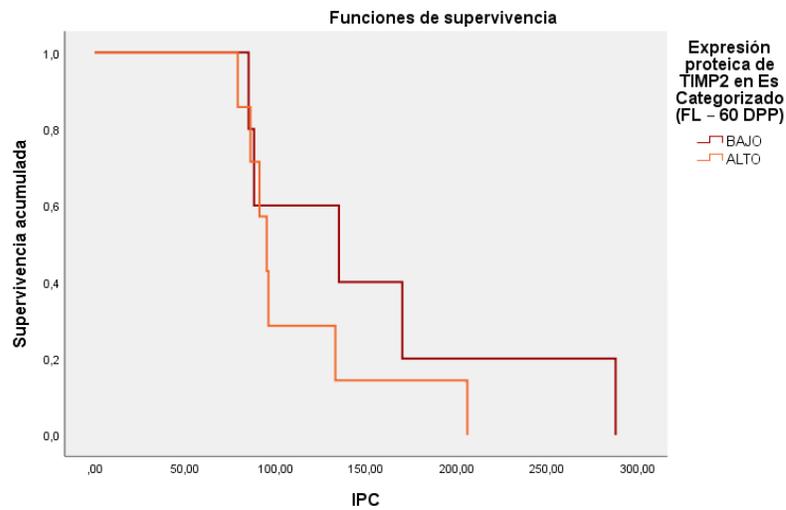


Figura 72: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP2 en Es ($p > 0.05$).

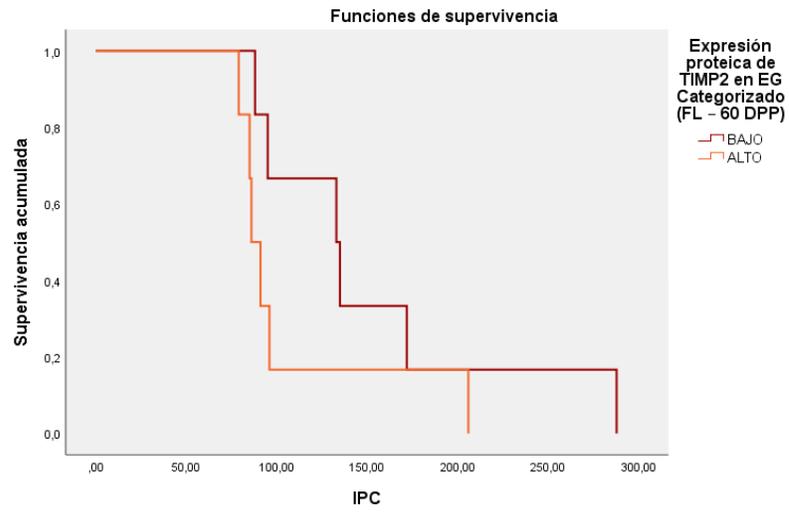


Figura 73: Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TIMP2 en EG ($p > 0.05$).

5. DISCUSIÓN

5.1. Expresión proteica de Metaloproteasas y sus Inhibidores en el endometrio pospartal de vacas lecheras en Fases Folicular y Lútea.

El establecimiento y mantenimiento de la preñez son eventos complejos. El desarrollo de un endometrio histológica y funcionalmente normal es fundamental para la implantación y las interacciones embrionarias-maternas iniciales. En este contexto, la remodelación del tejido endometrial podría ser un requisito previo para conseguir un ambiente uterino óptimo para la ocurrencia de una gestación (Scolari y col., 2017). Se estima que un endometrio receptivo a la implantación, debería mostrar características de un tejido que superó el estado proliferativo, con el fin de proporcionar un microambiente maduro y diferenciado capaz de recibir al embrión (Binelli y col., 2015).

En rumiantes, la implantación no invasiva da lugar a una placenta sindesmocorial y la remodelación del tejido endometrial se considera un requisito previo para la implantación y desarrollo de la angiogénesis cerca del tejido trofoblástico. Se ha estudiado en ratas y humanos que durante la involución se produce una pérdida de colágeno a medida que el útero vuelve a su estado anterior a la preñez (Harkness y Moralee, 1956; Curry y Osteen, 2003). Concomitantemente con modificaciones del estroma endometrial, ocurre una transformación del epitelio uterino luminal, siendo en ambos procesos, fundamental la degradación de la matriz extracelular (MEC), y en este contexto, las MMP se consideran como principales mediadores (Salamonsen y col., 1995; Guillomot, 1999; Nagase y col., 2006). Asimismo, estudios más recientes han postulado que la remodelación de la MEC es un factor clave para la receptividad materna y el éxito de la preñez (Binelli y col., 2015; Mesquita y col., 2015), y que, en el endometrio bovino, la función de las MMP estaría mayormente relacionada a sostener un equilibrio entre proliferación y diferenciación (Nagase y col., 2006).

Sin el apoyo de las hormonas esteroideas, el endometrio uterino exhibe pocos cambios morfológicos y no logra la diferenciación bioquímica necesaria para el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Más aún, durante los ciclos menstrual y estral, y durante la gestación se requiere la acción de una serie compleja, precisa y altamente interactiva de

eventos biológicos, que pueden afectar el patrón de expresión, así como la actividad de las MMP y TIMP (Curry y Osteen, 2003). En humanos, se ha observado que existe una variación cíclica de la expresión de la mayoría de las MMP, que es reprimida durante la fase secretora (lútea) e inducida en la menstruación, cuando caen las concentraciones de progesterona, sugiriendo que los esteroides ováricos regulan la expresión de estos genes (Marbaix y col., 1996; Gaide Chevronnay y col., 2012). Mediante cultivos *in vitro* de endometrio bovino otros autores pudieron confirmar la influencia hormonal mencionada sobre la expresión de las MMP (Hashizume y col., 2003; Rahman y col., 2020). Sumado a esto, se ha observado que los TIMP, se encuentran hormonalmente regulados (Curry y Osteen, 2003). Es por eso, que para evaluar los posibles cambios que pudiesen existir en la expresión de MMP y TIMP a nivel endometrial en ambos tiempos de muestreo, entre las vacas que obtuvieron resultados de ALTO y BAJO IPC, se han analizado de manera separada los animales según la fase del ciclo en la que se encontraban al momento de la biopsia, a fin de bloquear el posible efecto hormonal sobre las diferencias de expresión.

Sin embargo, y dado que existen evidencias acerca de la influencia que ejercen sobre la expresión génica endometrial pequeñas fluctuaciones de los niveles de progesterona durante el ciclo, e incluso, durante la misma fase lútea (Spencer y col., 2015), sería enriquecedor ampliar el estudio considerando como objeto del mismo la evaluación de la expresión proteica de MMP y TIMP dentro de una misma fase contemplando las concentraciones hormonales como co-variables en el análisis.

A su vez, la comparación entre los resultados de expresión proteica de las MMP y sus inhibidores observados a los 45 y 60 DPP dentro de los grupos de vacas de ALTO y BAJO IPC, se llevó a cabo sólo en las vacas que se encontraban en FL al momento de los muestreos, debido a que, por estar bajo la influencia de progesterona y ante la presencia de un cuerpo lúteo cíclico, se estima sería homólogo al ambiente uterino en el cual se produciría la preñez e implantación del embrión, siendo los resultados de alguna manera indicativos de los eventos que podrían ocurrir al momento de la concepción.

Por el mismo motivo, al momento de evaluar las potenciales relaciones entre las distintas MMP y sus inhibidores, así como el efecto individual que pueda tener cada uno en el tiempo necesario para que ocurra la primera concepción posparto, se decidió trabajar sólo con los

animales que se encontraban en FL y con los muestreos realizados a los 60 DPP, a fin de evaluar el estado de reestructuración endometrial dependiente de MMP y TIMP previo a la liberación a servicio de los animales.

5.1.1. Expresión de las Metaloproteasas y sus Inhibidores en el endometrio pospartal de vacas lecheras, durante la Fase Folicular.

Los resultados obtenidos en las vacas que al momento de los muestreos se hallaban en FF, mostraron que, si bien hay expresión de MMP2 en endometrio, no se observaron diferencias significativas entre las vacas de ALTO y BAJO IPC, en ninguno de los tiempos de muestreo. Respecto a MMP14, se encontraron mayores niveles de expresión en EL tanto a los 45 como a los 60 DPP en las vacas que tuvieron BAJO IPC. MMP14 es una metaloproteasa de membrana, y por lo tanto actúa en la superficie celular, donde puede facilitar localmente la degradación de la MEC, la migración celular, la invasión y la angiogénesis. En humanos, se ha postulado que se produce en las células epiteliales del endometrio (Zhang y col., 2000) y que su expresión disminuye con el advenimiento de la menopausia, lo que sugiere su posible rol en la remodelación de un endometrio cíclico. Asimismo, se estima que MMP14 podría estar asociada con el proceso de desprendimiento endometrial y que, por lo tanto, desempeñaría un rol en los procesos de remodelación del endometrio en la preparación para la implantación. En humanos se ha reportado, que la mayoría de las MMP de membrana redujeron su expresión durante la ventana receptiva, posiblemente bajo la influencia de hormonas esteroides (Plaisier y col., 2006). En el presente estudio, encontramos una mayor expresión proteica de MMP14 a nivel de EL durante la FF, en ambos tiempos de muestreo en las vacas con bajo IPC, por lo que aparentemente, su expresión no parecería tener un efecto negativo sobre la ocurrencia de la preñez futura. Esto a su vez, podría relacionarse con su actividad proteolítica *per se* (d'Ortho y col., 1997), ya que como metaloproteasa de tipo membrana, afecta el entorno cercano de manera paracrina en procesos de migración e invasión celular, ejecutando precisamente una de sus funciones más importantes en cuanto a

la degradación de colágeno, el cual es un componente principal de la MEC (Itoh y Seiki, 2006).

Los niveles de expresión de MMP9 durante la FF, mostraron ser significativamente mayores en el EG de las vacas con ALTO IPC, a los 60 DPP, en relación a lo expresado en las vacas con BAJO IPC. En humanos, se ha observado que MMP9 proveniente de neutrófilos, tiene un papel importante en la degradación del tejido en la etapa menstrual del ciclo (Salamonsen y Lathbury, 2000; Goffin y col., 2003), y su actividad, podría considerarse, como parte de los mecanismos de defensa y reestructuración del endometrio (Rigot y col., 2001; Gaide Chevronnay y col., 2012). Vincent y col. (1999), han reportado su expresión en células epiteliales, estromales, inmunitarias y vasculares del endometrio humano. Asimismo, MMP9 se ha identificado en las células epiteliales glandulares endometriales con niveles más altos durante la fase proliferativa tardía del ciclo menstrual y se ha reportado que este aumento de su expresión estaría asociado con la afluencia de leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y eosinófilos (Zhang y Nothnick, 2005). La mayor expresión de MMP9 observada en el presente estudio, en las glándulas endometriales de las vacas a los 60 DPP con bajos niveles de progesterona característicos de la FF, en el grupo con alto IPC, podría sugerir que la presencia de esta enzima se relaciona a una reestructuración endometrial activa que, en este caso, podría haber afectado la futura concepción. En relación con estos hallazgos, un estudio realizado en perras demostró que una mayor actividad de MMP9 a nivel uterino en la segunda y tercera semanas posparto, llevó a una marcada degeneración de las células epiteliales luminales, y elevado número de neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas en el estroma. Esto permitió a los autores sugerir que dicha actividad de MMP9 podría estar asociada con una respuesta inflamatoria del endometrio, y concomitantemente, con procesos de remodelación del útero (Chu Py PY y col., 2002).

Durante la FF del ciclo estral, encontramos que, si bien TIMP1 no mostró diferencias significativas entre las vacas de ALTO y BAJO IPC, en ninguno de los tiempos de muestreo, TIMP2 mostró mayor porcentaje de área inmunomarcada en el EG de las vacas con ALTO IPC, a los 60 DPP. En bovinos, Ledgard y col. (2009), encontraron que TIMP2 se expresó abundantemente en el borde apical del epitelio de las glándulas endometriales, secretándose directamente al líquido luminal uterino. En la misma especie, Ulbrich y col. (2011),

mencionan que al final de la FL, la detección de TIMP2 en endometrio disminuye. Por su parte, Scolari y col. (2017), encontraron que la expresión de TIMP2 en el endometrio bovino no estaría influenciada por los niveles de hormonas esteroides. En este contexto, podemos decir que la expresión aumentada de TIMP2 a los 60 DPP en vacas de ALTO IPC durante la FF, podría ser parte de mecanismos que obstaculicen la preparación del endometrio para la futura concepción

Es sabido, que la regulación de MMP y TIMP es una interacción compleja. Se ha determinado que el patrón de expresión temporal de TIMP2 parecería estar inversamente relacionado con la expresión de MMP2 y MMP14 (Ulbrich y col., 2011). En efecto, los niveles de expresión de MMP2 y MMP14 hallados en las vacas de ALTO IPC fueron menores en relación a lo observado en las de BAJO IPC, hallándose un comportamiento inverso para TIMP2. Esto evidencia que, concomitantemente a la existencia de bajos niveles de progesterona, los altos niveles de TIMP2 pueden estar inhibiendo la expresión de las mencionadas metaloproteasas a los 45 y 60 DPP en las vacas de ALTO IPC y de esta manera, verse afectados los procesos de reestructuración endometrial, retrasando una futura concepción.

5.1.2. Expresión de las Metaloproteasas y sus Inhibidores en el endometrio pospartal de vacas lecheras, durante la Fase Lútea.

En nuestro trabajo, y durante la FL, encontramos que la expresión de MMP2, mostró ser significativamente mayor a los 60 DPP, en Es y EL del endometrio de las vacas con BAJO IPC en comparación con las vacas de ALTO IPC.

La presencia de MMP2 en las células estromales, podría ser indicativa de la participación de la misma en procesos de migración y remodelación celular y vascular (Zhang y col., 2000; Walter y Boos, 2001; Nagase y col., 2006). Ulbrich y col. (2011), por su parte, observaron la expresión proteica de MMP2 en Es endometrial de bovinos, sin encontrar expresión en EL y EG. Si bien existen opiniones encontradas en cuanto a la síntesis de MMP2 por parte de las células epiteliales endometriales, se acepta que factores ováricos, en particular las hormonas esteroides, podrían estar involucradas en estimular dicha expresión (Hashizume y col.,

2003). Kizaki y col. (2008), han podido demostrar actividad gelatinasa en epitelio endometrial y estroma, así como también la participación crucial de MMP2 en la remodelación endometrial durante el período de implantación en las vacas. Se estima que la localización de MMP2 en Es y EL, guarda relación con la abundancia de colágeno tipo IV en tales tipos celulares, principalmente en las carúnculas endometriales, y se ha registrado un aumento de expresión del mismo en Es bajo la influencia de progesterona (Boos, 2000). Hay reportes que indican que mayores concentraciones de MMP2 activa se acompaña de una intensa inmunomarcación de la membrana plasmática de las células del Es, en aquellas áreas de remodelación del tejido (Hashizume y col., 2003; Gaide Chevronnay y col., 2012). La mayor expresión de MMP2 en Es y EL en el endometrio pospartal de vacas con BAJO IPC, podría relacionarse con hallazgos previos donde se ha reportado la presencia de la forma activa de MMP2 en los placentomas bovinos, indicando que esta metaloproteasa podría desempeñar un rol relevante en la remodelación tisular de los mismos (Dilly y col., 2011), y, a la luz de nuestros resultados, podríamos suponer a su vez que su expresión en Es y EL a los 60 DPP favorecería la concepción temprana.

Al comparar entre los 45 y 60 DPP dentro del grupo de vacas de BAJO IPC, en FL, no hubo diferencias significativas en la expresión de MMP2, en ninguno de los estratos evaluados. Contrariamente, en el grupo de vacas de ALTO IPC, se observó que la expresión de MMP2 en EG, fue significativamente mayor a los 45 DPP en relación a los 60 DPP.

Como detallamos anteriormente, no se observaron marcadas diferencias a nivel de EG, comparando las vacas de ALTO y BAJO IPC durante la FL, por lo tanto, esta mayor expresión a los 45 DPP que luego decae hacia el día 60 posparto en las vacas de ALTO IPC, podría no estar directamente relacionada con el tiempo para que ocurra la primera concepción posparto. Sin embargo, se ha observado en yeguas, que las alteraciones endometriales que afectaron la morfología glandular, redujeron significativamente su fertilidad (Schoon y col., 1997). Bajo la premisa de la ocurrencia de una extensa hiperplasia e hipertrofia glandular en el endometrio durante cada preñez, en respuesta a las crecientes demandas por parte de la unidad fetoplacentaria en crecimiento (Gray y col., 2001), es posible que haya ocurrido en estas vacas, un proceso de remodelación glandular mediado por MMP2 a los 45 DPP que fue paulatinamente disminuyendo hacia los 60 DPP. Sin embargo, serán necesarios estudios más

específicos a nivel glandular en el endometrio pospartal de vacas lecheras, para esclarecer la posible participación de MMP2 sobre la fertilidad posterior de los animales.

Para el caso de MMP14, en FL, se observó la mayor inmunomarcación en las vacas de BAJO IPC en comparación con las de ALTO IPC, particularmente en Es a los 45 DPP, y en EL a los 60 DPP. Ulbrich y col. (2011) observaron la expresión de MMP14 en las células del EL del endometrio bovino, y notaron que su intensidad aumentaba durante la FL. Por su parte, al analizar la expresión de varias enzimas en el endometrio bovino durante el ciclo estral, Mishra y col. (2010) hallaron niveles de expresión del ARNm de MMP14 significativamente mayores después de la ovulación, mayormente en Es, disminuyendo hacia la mitad del ciclo y al día 35 de gestación. La expresión coordinada de MMP2 y MMP14, sugiere que estas proteasas se producirían conjuntamente en forma activa contribuyendo a la remodelación de la matriz y ejerciendo actividades “de limpieza” (Goffin y col., 2003). Tal como hemos mencionado previamente, MMP2 se expresa y secreta en varios tipos celulares y tejidos, y no se regula predominantemente a nivel de transcripción, sino en su activación, debido en gran medida a la acción de MMP14 (Zhang y col., 2000). Bajo la luz de estas afirmaciones, podemos sugerir, que el aumento en la expresión de MMP14 en la misma localización y en concordancia con la expresión de MMP2, podría estar sustentado en su participación en el complejo ternario Pro-MMP2-MMP14-TIMP2. Por otro lado, estos hallazgos se relacionan con su actividad *per sé* como enzima proteolítica y su participación en la migración celular, específicamente a nivel de Es y EL, donde se localizan las fibras de colágeno I, que son sustrato de MMP14 (Boos, 2000; Nagase y col., 2006; Dilly y col., 2011). En efecto, en un estudio realizado en ratas, se halló que, durante la involución uterina pospartal, MMP14 y MMP2 actuaban juntas para degradar el colágeno tipo I (Manase y col., 2006). Concomitantemente, existen evidencias que sugieren que MMP14 provoca la degradación de los tipos de colágeno I, IV y V y de elastina (Birkedal-Hansen y col., 1993) y, aunque se cree que la función principal de la MMP2 activada es la degradación del colágeno tipo IV, también escinde el colágeno tipo I (Aimes y Quigley, 1995).

A su vez, dentro del grupo de vacas con BAJO IPC, se observó que la expresión de MMP14 a nivel de EG, fue mayor a los 45 DPP, para luego disminuir significativamente en el día 60 posparto. Similar a lo ocurrido con MMP2, al comparar los resultados obtenidos

para la expresión de MMP14 entre las vacas de ALTO y BAJO IPC durante la FL, encontramos que no existieron diferencias significativas a nivel de EG, y que, por lo tanto, esta mayor expresión a los 45 DPP que luego disminuye hacia el día 60 posparto en las vacas de BAJO IPC, tampoco estaría directamente relacionada a la celeridad para lograr la concepción. Sin embargo, en estas vacas se podría sugerir una participación de MMP14 en los procesos de reestructuración del EG, con mayor expresión a los 45 respecto a los 60 DPP, que parecerían no comprometer la receptividad del ambiente uterino y que, asimismo, podría ser objeto de estudios futuros.

Dentro del grupo de vacas de ALTO IPC, encontramos que la expresión de MMP14 en EL fue significativamente mayor a los 45 DPP que a los 60 DPP. Cuando se comparó la expresión de MMP14 entre las vacas de ALTO y BAJO IPC durante la FL, observamos que hubo una mayor expresión en EL a los 60 DPP a favor de las vacas de BAJO IPC. Observando que, en las vacas de ALTO IPC esta metaloproteasa disminuyó su expresión hacia el día 60 posparto, podría sugerirse que el detrimento en su expresión en tiempos previos a la concepción estaría impidiendo el logro de una preñez temprana, confirmando a su vez lo hallado en cuanto a su expresión, en animales con BAJO IPC.

Varios estudios han reportado que los niveles de expresión de MMP9 en el endometrio bovino, son relativamente bajos, hallándose en algunos casos por debajo de los límites de detección (Kizaki y col., 2008; Mishra y col., 2010). En nuestro trabajo, y durante la FL, al igual que lo hallado en FF, no se hallaron diferencias significativas en los niveles de expresión de MMP9 en EL y Es, entre las vacas de ALTO y BAJO IPC, en ninguno de los tiempos de muestreo. Otros autores han observado que, en células cultivadas *in vitro* o explantos de tejido, la progesterona (sola o combinada con estradiol) inhibió moderadamente la expresión de MMP9, indicándose que dicha regulación ocurriría a través de citocinas o factores de crecimiento producidos, liberados o activados localmente (Gaide Chevronnay y col., 2012; Rahman y col., 2020). Específicamente, en endometrio decidualizado de ratón, se observó que MMP9 aumentó dramáticamente después de la retirada de progesterona (Kaitu'u y col., 2005). Estos reportes de alguna manera concuerdan con los hallados en el presente trabajo para vacas en FL, donde los niveles de P4 estarían regulando negativamente la

expresión de MMP9, lo que explicaría la baja e invariable expresión encontrada en los animales de ambos grupos.

En las vacas de BAJO IPC, se observó una tendencia hacia un aumento de la expresión de MMP9 en EG, en el día 60 posparto, comparado con el día 45. La proteína MMP9 se ha identificado en las células epiteliales glandulares del endometrio humano, con niveles más altos durante la fase proliferativa tardía y justo después de la ovulación, así como en la secreción glandular y el líquido uterino durante la fase periimplantacional. En el endometrio de ratones, se observó que, a medida que el tejido se reparaba, las células positivas a MMP9 se reducían en número, manteniéndose sólo donde aún no se había completado la reepitelización (Kaitu'u y col., 2005). Bajo la premisa de que el éxito de los eventos de desarrollo que regulan la morfogénesis de la glándula endometrial, determinan la capacidad funcional y el potencial embriotrófico del útero adulto (Gray y col., 2001), se podría inferir que a los 60 DPP, aumentó la degradación de colágeno con participación de MMP9 a nivel del EG en las vacas con BAJO IPC, lo que podría estar determinando un ambiente adecuado para la concepción temprana, si bien no existieron diferencias significativas en la expresión de esta MMP entre las vacas de ALTO y BAJO IPC.

Durante la FL, una mayor expresión en EL de vacas con BAJO IPC a los 60 DPP se observó para TIMP1. El ARNm y la proteína de TIMP1 se han detectado tanto en EL como en Es del endometrio intacto de ovejas (Hampton y col., 1995). Se ha reportado que TIMP1 tiene afinidad por MMP9 (Zhang y Nothnick, 2005) y que, además, puede unirse a casi todos los sitios activos de la misma, lo que inhibe irreversiblemente su actividad (Willenbrock y Murphy, 1994). En ovinos, se observó que, en las carúnculas, la regeneración del EL comenzó después del día 8 y no se completó hasta los días 28-31 después del parto, y que el mismo, parecía emanar del epitelio que recubre las áreas intercarunculares (van Wyk y col., 1972). Se ha estudiado que MMP9 puede actuar sobre células epiteliales, induciendo cambios estructurales y funcionales asociados con la remodelación (Vermeer y col., 2009). Asimismo, en bovinos, se observó una aumentada reactividad de MMP9 en el epitelio endometrial pospartal (Walter y Boos, 2001). Por lo tanto, esta mayor expresión de TIMP1 en EL a los 60 DPP, podría tener un efecto positivo sobre el control de la reepitelización caruncular y la generación de un ambiente endometrial receptivo, ya que ejercería una

actividad inhibitoria sobre la expresión de MMP9, que, si bien no mostró diferencias significativas entre las vacas de ALTO y BAJO IPC, se ha observado su expresión en ambos grupos en EL, tanto a los 45 como a los 60 DPP. Esto guardaría relación con los resultados obtenidos para la expresión de TIMP1 a los 45 y 60 DPP donde no se observaron diferencias a lo largo del tiempo en ninguno de los estratos evaluados, para las vacas con BAJO IPC. Sin embargo, dentro de las vacas de ALTO IPC, se observó una mayor expresión de TIMP1 en EL a los 45 DPP, que luego disminuyó hacia el día 60. En un estudio llevado a cabo en ratones, observaron que la ausencia de TIMP1 es perjudicial para la reproducción, y esto podría relacionarse a una alteración en la actividad de las MMP (Nothnick, 2001). En otros tejidos, se ha visto que la actividad de MMP9 puede desregularse tanto por aumentos de la metaloproteasa como por disminuciones en su inhibidor (Vermeer y col., 2009). A la luz de los resultados obtenidos al comparar las vacas de BAJO y ALTO IPC, donde TIMP1 mostró una mayor expresión en EL de las vacas de BAJO IPC a los 60 DPP, podría suponerse que su mayor expresión a los 45 DPP seguida de un detrimento al día 60 posparto en vacas de ALTO IPC, podría estar denotando un desequilibrio en la actividad de MMP, especialmente de MMP9, lo cual influiría en una variedad de funciones biológicas dentro del útero, pudiendo afectar los procesos de remodelación del endometrio pospartal y la ocurrencia de la futura preñez.

En la expresión de TIMP2 durante la FL, se observó una tendencia a mostrar mayores niveles de expresión en las vacas de BAJO IPC en relación a las de ALTO IPC, en EL a los 45 DPP. Estudios en humanos, informaron que, si bien las proteínas TIMP estaban presentes en todos los compartimentos tisulares del endometrio, la inmunorreactividad era más intensa en el EL (Zhang y Salamonsen, 1997). Se ha visto que se expresa fuertemente en el endometrio durante la gestación tardía, especulándose que esto pueda ser necesario para mantener un equilibrio entre las moléculas de degradación y sus inhibidores (Kizaki y col., 2008). Estas tendencias observadas, que indican una mayor expresión de TIMP2 en las vacas de BAJO IPC, se suman a lo observado para MMP2 y MMP14, donde también fue mayor la expresión proteica en dichas vacas, en relación a las de ALTO IPC. Es por ello que, conjuntamente podría asumirse una participación de TIMP2 como activador dentro del complejo MMP14/TIMP2/pro-MMP2. Esto se respaldaría, además, en el hecho de que

concomitantemente, durante la FL, TIMP2 mostró mayores niveles de expresión para las vacas con ALTO IPC, en Es a los 45 DPP, sin acompañarse de la expresión aumentada de MMP2 y MMP14, por lo que estimamos que, en este caso, TIMP2 ejercería un rol más bien regulador de las metaloproteasas sobre las cuales ejerce su función. En ovejas, se ha observado una expresión inversamente proporcional entre MMP2 y TIMP2, al momento de producirse la migración de células trofoblásticas y posterior implantación, donde se redujo la expresión del inhibidor para permitir la acción de la gelatinasa (Salamonsen y col., 1995). Es decir, que la marcada expresión de TIMP2 en Es a los 45 DPP en las vacas con ALTO IPC, durante la FL, podría estar sugiriendo su necesaria intervención para mitigar la expresión de MMP2, alterando así los procesos de remodelación uterina dependientes de dicha MMP. Como ya hemos mencionado, si bien TIMP2 posee un fuerte efecto inhibidor sobre las MMP, similar a TIMP1, también ejerce un rol como activador, y el hecho de que ejerza una u otra función, dependerá de la cantidad de componentes circundantes del sistema MMP/TIMP. Tal como se ha mencionado previamente, cuando existen altas concentraciones de TIMP2, éste se une en su totalidad a la MMP14 disponible, no quedando monómeros libres de MMP14 capaces de activar MMP2 (Curry y Osteen, 2003; Manase y col., 2006; Dilly y col., 2011). Tal es así, que la regulación de cada TIMP debe ser coordinada para que su expresión en sitios y momentos sea la apropiada para regular las MMP específicas, y sólo el logro de un correcto equilibrio entre TIMP y MMP individuales, permitiría la remodelación apropiada del útero durante el ciclo estral (Hampton y col., 1995).

Asimismo, al analizar las diferencias que pudiesen existir en la expresión de TIMP2, entre ambos tiempos de muestreo, encontramos que, dentro del grupo de vacas con BAJO IPC, la expresión de TIMP2 mostró ser significativamente mayor en Es a los 60 DPP respecto a los 45 DPP. Esto guarda relación con lo anteriormente expuesto, ya que en las vacas de BAJO IPC, se observó que hubo mayores niveles de expresión de MMP2 a nivel de EL y Es a los 60 DPP en comparación a las de ALTO IPC. Estudios previos indicaron que la expresión de MMP2 no estaría regulada por el mismo conjunto de hormonas esteroideas, citocinas y factores de crecimiento que las otras MMP secretadas (Zhang y col., 2000), por lo que podría suponerse, que TIMP2 ejercería en este caso una función como activador del complejo ternario. A su vez, en el grupo de vacas de ALTO IPC, se encontraron tendencias a una mayor

expresión de TIMP2, en EL a los 60 DPP. En estas vacas, se observó que MMP2, estaba mayormente expresado en EG al día 45 posparto y que decrecía hacia el día 60. Ante esto, y basándonos en todo lo anteriormente expuesto, se podría sugerir que TIMP2 estaría participando de la inhibición de la misma. En cuanto a lo observado en EL, al comparar entre ambos tiempos de muestreo dentro de las vacas de ALTO IPC, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de MMP2, aunque si se observó una mayor expresión de MMP14, en dicho estrato, a los 45 DPP que luego disminuyó hacia el día 60 posparto, por lo que esta mayor expresión de TIMP2 en EL a los 60 DPP denotaría su potencial rol inhibitor, a través de su unión a todo el MMP14 disponible, impidiendo consecuentemente la activación de MMP2 (Curry y Osteen, 2003; Manase y col., 2006; Dilly y col., 2011).

5.2. Relaciones halladas entre la Expresión de las Metaloproteasas y sus Inhibidores en el Endometrio pospartal de vacas lecheras

La relación de la expresión de TIMP con la expresión de MMP es clave para el equilibrio de la actividad de MMP durante los períodos de remodelación endometrial (Curry y Osteen, 2003). Los TIMP sirven para regular con precisión el sitio y el alcance de la degradación de la MEC y, por lo tanto, aseguran la homeostasis de la arquitectura extracelular uterina (Zhang y Nothnick, 2005). Se ha estudiado que, ante una proporción de MMP/TIMP baja, se evita la degradación de la MEC y por lo tanto se lentifica la involución; contrariamente, si aumenta esta relación, la MEC se degrada, produciéndose una remodelación epitelial (Talhok y col., 1992; Beccaria y col., 2021). Cada TIMP forma un complejo 1:1 con MMP de forma no selectiva (Bode y col., 1999), a excepción de la interacción de TIMP2 con MMP14 y pro-MMP2, y se desconoce la relevancia biológica de estos complejos. En general, todos los TIMP son inhibidores de amplio espectro de las MMP, pero existen diferencias en su especificidad y aunque las relaciones MMP2/TIMP2 y MMP9/TIMP1 se han utilizado para evaluar el equilibrio de MMP/TIMP en estudios previos (Curry y Osteen, 2003; Löffek y col., 2011), la interacción exacta entre MMP y TIMP sigue siendo en gran parte indeterminado. Es por esto, que evaluamos todas las relaciones posibles MMP/TIMP que

fueron objeto de este estudio, y encontramos que, en las vacas en FL a los 60 DPP, la relación MMP9/TIMP1 fue mayor en las vacas con alto IPC que en las de bajo IPC, lo que estaría indicando que habría en estos animales, una mayor expresión de MMP9 en relación a la expresión de TIMP1.

La actividad de MMP9 y de su inhibidor, son importantes para un normal funcionamiento de los procesos reproductivos. Se ha informado que ratones knockout para MMP9 y TIMP1, resultaron en una fertilidad disminuida. Específicamente, los ratones deficientes en MMP9 tuvieron una menor eficiencia reproductiva, mientras que los ratones deficientes en TIMP1 manifestaron tener un ciclo reproductivo alterado caracterizado por una disminución en la duración del estro y una morfología uterina alterada (Dubois y col., 2000; Nothnick, 2000; Zhang y Nothnick, 2005).

La MMP9 uterina, además de participar en el proceso de parto, y en la involución uterina pospartal, se ha propuesto como uno de los principales factores implicados en la degradación menstrual del endometrio humano, ya que es capaz de degradar los componentes de la membrana basal (Stygar y col., 2002). Asimismo, se ha estudiado que MMP9 aumenta durante y después del parto, mientras que TIMP disminuye, y que este equilibrio entre enzima e inhibidor ocurre en favor de la degradación tisular (Salamonsen, 2003), por lo que esta mayor expresión de MMP9 por sobre la expresión de TIMP1, podría sugerir la presencia de una mayor actividad de remodelación endometrial, con una menor actividad de regulación o control.

En un estudio realizado en bovinos, se ha visto que la intensidad de la expresión endometrial de MMP9 disminuyó de manera significativa desde la primera hasta la quinta semana después del parto, demostrando una disminución en los procesos degenerativos durante ese tiempo (Šematoviča y Jemeljanov, 2008). Además, se ha reportado, que MMP9 se asocia a una inmunorreactividad en células inflamatorias y su expresión puede estar correlacionada con este tipo de función, induciendo la actividad migratoria de linfocitos y monocitos que infiltran el tejido afectado, a los fines de favorecer el *cleareance* del mismo (Porto y col., 2011). Se ha observado que una enzima producida exclusivamente por los neutrófilos, inactiva TIMP1 en el complejo proMMP9/TIMP1, lo que permite la activación de MMP9 (Itoh y Nagase, 1995). Ante esto podría sugerirse, que el desbalance hallado en

favor de MMP9 respecto de TIMP1, podría ser uno de los mecanismos locales necesarios para que ocurran procesos de migración celular para el *cleareance* endometrial, que, en caso de prolongarse en el tiempo, estarían asociados a una demora en la concepción inmediata al parto.

5.3. Asociaciones halladas entre los niveles de expresión proteica de Metaloproteasas y sus Inhibidores con el retraso en la concepción.

La búsqueda de una posible asociación entre los niveles de expresión de las MMP y TIMP a nivel endometrial, con la demora en la concepción inmediata posterior al parto, nos permite postular que existe cierta tendencia de los animales que lograron la preñez con más celeridad a presentar mayores niveles expresión de MMP2 y MMP14 a nivel del EL a los 60 DPP. Estos valores no resultaron ser significativos, posiblemente por la existencia de un “n” bajo, pero el efecto se evidencia notablemente al observar los gráficos.

En este sentido, sabemos que MMP14, además de ser un activador fisiológico de proMMP2, estaría involucrada, entre otros muchos procesos, en la actividad proteolítica afectando al entorno cercano de manera paracrina en procesos de migración e invasión celular mediante la degradación de la MEC, especialmente de los principales colágenos fibrilares (Ohuchi y col., 1997; Itoh, 2015). En un estudio llevado a cabo en ratones, se observó que los “knockout” a MMP14, exhibieron anomalías esqueléticas durante el desarrollo posnatal, lo que se atribuyó a una ausencia de actividad colagenolítica (Holmbeck y col., 1999). En cuanto a MMP2, se estima que podría facilitar y regular la liberación de factores de crecimiento que participarían en los procesos de implantación, ya que se ha observado que su mayor actividad coincide con el momento de la elongación del concepto (Ulbrich y col., 2011).

A la luz de nuestros hallazgos, y los reportes anteriormente citados, podríamos suponer que en ese tiempo previo a la preñez ocurrieron procesos tisulares en los que participaron estas MMP, y que los mismos tuvieron una implicancia positiva para lograr la concepción temprana luego del parto.

Nuestros resultados también muestran una asociación de la expresión de TIMP1 en EL, con la concepción inmediata posterior al parto. Se evidencia que aquellos animales con mayor expresión de TIMP1 en dicho estrato, alcanzaron la primera preñez posparto en menos tiempo que aquellos que mostraron niveles de expresión menores. Esto condice con los hallazgos en los niveles de expresión de dicho inhibidor, al comparar las vacas de ALTO y BAJO IPC en FL, donde se observó una mayor expresión en EL de las vacas con BAJO IPC a los 60 DPP. Asimismo, este hecho refuerza lo postulado respecto a la aumentada relación encontrada entre MMP9/TIMP1 a los 60 DPP, en las vacas con alto IPC. Precisamente, la expresión de TIMP1 a los 60 DPP, podría ejercer un efecto de control de la reepitelización para la generación de un ambiente endometrial receptivo. En un estudio realizado en cabras, se observó que TIMP1 ejerció un papel como promotor de la proliferación de células epiteliales oviductales (Peng y col., 2015). Por otro lado, en humanos, se observó en la mayoría de los tejidos endometriales, que el EL muestra una mayor intensidad de inmunomarcación para TIMP1, y que la función principal de este inhibidor, es la homeostasis de la matriz extracelular y el mantenimiento de la integridad del tejido (Zhang y Salamonsen, 1997). Asimismo, se ha observado que, durante las primeras semanas de embarazo, la relación MMP/TIMP se encuentra a favor de las metaloproteasas, sugiriendo una alta actividad invasiva durante en este período. Sin embargo, existe también una función protectora ejercida por los TIMP resguardando la integridad de los vasos sanguíneos de la acción de las MMP (Seval y col., 2004).

6. CONCLUSIONES

- Durante la FF, observamos una mayor expresión de MMP14 en EL en las vacas que resultaron con BAJOS IPC, por lo que podría suponerse que la expresión aumentada de dicha MMP ante bajos niveles de progesterona, no afectaría negativamente los tiempos de ocurrencia de la primera concepción posparto. En cambio, una elevada expresión de MMP9 y TIMP2 a nivel glandular, se observó en las vacas que resultaron con ALTO IPC, por lo que esto podría representar un estado de desregulación del sistema que podría asociarse a una demora en la ocurrencia de la preñez inmediata posterior al parto.
- Durante la FL, encontramos la expresión concomitante de MMP2 y MMP14 en EL y Es de las vacas con BAJO IPC, lo que parecería demostrar que la expresión de las mismas, sea a los 45 como a los 60 DPP, guardaría una relación positiva con el logro temprano de la preñez en vacas lecheras. Los niveles de expresión hallados para TIMP1, expusieron su relevancia como inhibidor de MMP9 a nivel de Es y EL, indicando que la expresión del mismo, influiría positivamente sobre los tiempos de ocurrencia de preñez posterior al parto. TIMP2 por su parte, pudo ser evaluado en su dualidad, mostrando, por un lado, su participación dentro del complejo ternario, activando MMP2 y por otro, su rol como inhibidor de metaloproteasas, con las consecuentes implicancias de dicha modulación.
- La mayor expresión de MMP14 y MMP2 a los 45 DPP, y la tendencia observada a una mayor expresión de MMP9 a los 60 DPP, en el EG de las vacas en FL, denotan la necesidad de realizar futuros trabajos que profundicen en el estudio de la regulación de MMP en dicho estrato, ya que las glándulas endometriales sufren cambios durante las distintas etapas del ciclo estral y los mecanismos mediante los cuales se logran los patrones espaciotemporales de expresión del sistema MMP involucran, no sólo a las hormonas esteroideas ováricas sino también a numerosos factores autocrinos/paracrinos. Estudios en mayor profundidad, permitirían vislumbrar el

posible efecto que la expresión de estas MMP en las glándulas endometriales, pudiese tener sobre el IPC de los animales.

- La relación hallada entre MMP9/TIMP1, indicaría que la alta expresión de MMP por sobre su inhibidor a los 60 DPP en el endometrio de vacas lecheras en FL, se correspondería con una demora en la concepción.
- Se observó que una mayor expresión de TIMP1, así como la tendencia a mayores expresiones de MMP2 y MMP14, principalmente a nivel de EL, durante la FL y a los 60 DPP, tuvo una relación directa con el advenimiento de la temprana concepción posparto.

El hecho de que la influencia ejercida por las hormonas reproductivas, estrógenos y progesterona, fue tomada en cuenta como “fases” del ciclo estral, y no se consideró de manera específica el efecto que las variaciones en sus niveles pudiesen tener sobre la expresión de las metaloproteasas y los inhibidores evaluados, creemos que futuros análisis que contemplen dicho objetivo, enriquecerían la información brindada en este trabajo.

Asimismo, podemos concluir, que los resultados obtenidos evidencian la presencia y participación de MMP2, MMP14 y MMP9, y de sus inhibidores, TIMP1 y TIMP2, en el útero pospartal de vacas lecheras, y cómo el equilibrio en la expresión de los mismos a nivel endometrial, podría estar asociado positiva o negativamente a los IPC que se logren en los animales, generándose de esta forma, valiosa información para futuras aplicaciones e investigaciones.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aimes RT, Quigley JP. 1995. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*, 270(11): 5872-5876.

Angeli E, Rodríguez FM, Rey F, Santiago G, Matiller V, Ortega HH, Hein GJ. 2019. Liver fatty acid metabolism associations with reproductive performance of dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 208: 106104.

Baimishev BK, Baimishev MH, Grigoryev2 VS, Kokhanov AP, Uskova1 IV, Khakimov IN. 2018. Increase in reproductive ability of high-producing cows, and qualitative parameters of their offspring, under conditions of intensive milk production. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 7(4): 167-171

Baravalle C, Dallard BE, Cadoche MC, Pereyra EAL, Neder VE, Ortega HH, Calvinho LF. 2011. Proinflammatory cytokines and CD14 expression in mammary tissue of cows following intramammary inoculation of *Panax ginseng* at drying off. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144: 52–60.

Barui A, Batabyal S, Ghosh S, Saha D, Chattopadhyay S. 2015. Plasma mineral profiles and hormonal activities of normal cycling and repeat breeding crossbred cows: A comparative study. *Vet World* 8(1):42-5.

Bazer FW, Roberts RM, Thatcher WW. 1979. Actions of hormones on the uterus and effect on conceptus development. *J Anim Sci* 49: 35–45.

Beccaria C, Velázquez NS, Chervaz V, Pirola SI, Baravalle C, Renna MS, Calvinho LF, Dallard BE. 2021. Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in *Staphylococcus aureus* chronically infected bovine mammary glands during active involution. *Res Vet Sci*. 137: 30-39.

Belotti EM, Amweg AN, Matiller V, Varela ML, Stassi AF, Velázquez MML, Ortega HH, Rey F, Salvetti NR. 2020. Effects of adrenocorticotrophic hormone on the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the bovine ovary. *Reprod Fertil Dev*. May;32(8):748-762.

Berg DK, Van Leeuwen J, Beaumont S, Berg M, Pfeffer PL. 2010. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Therio* 73: 250–260.

Binelli M, Scolari SC, Pugliesi G, Van Hoeck V, Gonella-Diaza AM, Andrade SCS, Gasparin GR, Coutinho LL. 2015. The Transcriptome Signature of the Receptive Bovine Uterus Determined at Early Gestation. *PLoS ONE* 10(4): e0122874.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(2): 197-250.

- Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Ruth FX, Nagase H, Tschesche H. 1999. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci* 878: 73-91.
- Boos A. 2000. Immunohistochemical Assessment of Collagen Types I, III, IV and VI in Biopsy Samples of the Bovine Uterine Wall Collected during the Oestrous Cycle Cells Tissues Organs;167: 225–238
- Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267–283.
- Budras KD, Habel RE, Wunsche A, Buda S. 2003. *Bovine Anatomy: An Illustrated Text*. Manson Series. Editor Schlütersche. Hannover, Alemania.
- Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S. 1998. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *The Journal of biological chemistry* 273: 871-80.
- Cainelli S. 2019. Caracterización del perfil inmune endometrial y sistémico en vacas lecheras durante la preñez y la lactancia, y posibles asociaciones con el estado metabólico-hormonal. Tesina de grado. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.
- Carrera DP. 2017. Efectividad de cuatro métodos para la detección de celo en vacuno de carne. Trabajo Fin de Carrera Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza.
- Carroll, JA, Forsberg, NE. 2007. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 23: 105–149.
- Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee JF, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C. 2010. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Therio* 73: 988-994.
- Chu Py PY, Salamonsen LA, Lee CS, Wright PJ. 2002. Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches. *Reproduction.* 123(3): 467-77.
- Córdova A, Sánchez Y, Leal A, Muñoz C, Murillo A. 2002. Causas de infertilidad en ganado bovino. *Med Vet* 19(9): 112–124.
- Curry TE, Osteen KG. 2001. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod* 64: 1285-1296.
- Curry Jr TE, Song L, Wheeler SE. 2001. Cellular localization of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular growth, ovulation and early luteal formation in the rat. *Biol Reprod* 65: 855–865.
- Curry TE Jr, Osteen KG. 2003. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 24: 428–465.

- Dang Y, Li W, Tran V, Khalil RA. 2013. EMMPRIN-mediated induction of uterine and vascular matrix metalloproteinases during pregnancy and in response to estrogen and progesterone. *Biochem Pharmacol* 86: 734-47.
- De Vries A. 2006. Economic Value of Pregnancy in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 89: 3876–3885.
- Dellmann, HD, Brown EM. 1987. Textbook of veterinary histology. 3rd. ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Dellmann HD 1994. Sistema Reproductor Femenino. En: *Histología Veterinaria*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. Pág. 277-286.
- Dellmann HD, Carithers JR. 1996. Cytology and microscopic anatomy. 1st. ed. Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Dyce K, Sack W, Wensing C. 1999. *Anatomía Veterinaria*. 2da Edición. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F.
- Dilly M, Hambrucha N, Shenavaib S, Schulerb G, Froehlich R, Haegera JD, Ozalpc GR, Pfarrera C. 2011. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-14 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-2 during bovine placentation and at term with or without placental retention. *Theriogenology* 75: 1104–1114.
- Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM. 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reprod Sci* 96: 297–311.
- Diskin MG, Morris DG. 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* 43(2): 260–267.
- Dobson H, Smith RF, Royal MD, Knight CH, Sheldon IM. 2007. The high producing dairy cow and its reproductive performance. *Reprod Domest Anim*. 42(Suppl 2): 17–23
- d’Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G. 1997. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 250: 751–757.
- Doyle R, Millar C, Holden S, Butler S. 2019. Uterine health in a pasture based production system. *Irish Dairying, Growing Sustainably*. 3rd July.
- Dubois B, Arnold B, Opdenakker G. 2000. Gelatinase B deficiency impairs reproduction. *J Clin Invest* 106: 627-628.
- Duica AA, Tovío NL, Grajales HL. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria* 14: 107-124.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. 1989. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 72: 68–78.

- Fata JE, Ho AT, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R. 2000. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 57: 77-95.
- Ferguson, JD, Galligan DT. 2000. Assessment of Reproductive Efficiency in Dairy Herds. *Compend. Contin. Educ. Proc. Vet.* 22: S150–S158.
- Forero E (2004) Conceptos sobre Metritis Bovina, un problema poco considerado en la Ganadería Actual. Asistente Dirección Científica Laboratorios PROVET S.A 1–2.
- Fridman R, Bird RE, Hoyhtya M, Oelkuct M, Komarek D, Liang CM. 1993. Expression of human recombinant 72 kDa gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): characterization of complex and free enzyme. *Biochem J* 289 (Pt 2): 411-6.
- Gaide Chevronnay HP, Selvais C, Emonard H, Galant C, Marbaix E, Henriët P. 2012. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta.* Jan;1824(1): 146-56.
- Gartner LP y Hiatt JL. 2005. Texto atlas de histología. 2era edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Geovanny EPC. 2018. Asociación entre la grasa invertida en leche y la pérdida de gestación temprana en vacas lecheras de alta producción. (Tesina de grado). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Glauber CE. 2013. ¿Los altos rendimientos en producción lechera, afectan la fertilidad del rodeo? *Rev Med Vet* 94(1): 10-16.
- Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. 2001. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 65: 1311–1323.
- Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier d’Hauterive S, Béliard A, Fridman V, Nervo P, Colige A, Foidart JM. 2003. Expression Pattern of Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases in Cycling Human Endometrium. *Biology of Reproduction* 69: 976–984.
- Guillomot M. 1995. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fertil Suppl.*49: 39-51.
- Guillomot M. 1999. Changes in Extracellular Matrix Components and Cytokeratins in the Endometrium during Goat Implantation. *Placenta* 20: 339–345.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. Capítulo 2: Anatomía del aparato reproductor de la hembra. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. (Eds. Hafez ESE y Hafez B). 7ma Edición. Mc Graw-Hill Eds. DF-México.
- Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113: 21–29.

- Hampton AL, Butt AR, Riley SC, Salamonsen LA. 1995. Tissue inhibitors of metalloproteinases in endometrium of ovariectomized steroid-treated ewes and during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod.* 53(2): 302-11.
- Hansen PJ, Block J. 2004. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Reprod Fertil Dev* 16: 1–14.
- Harkness RD, Moralee BE. 1956. The time course and route of loss of collagen from the rat's uterus during post-partum involution. *J Physiol* 132: 502–508
- Hashizume K, Takahashi T, Shimizu M, Todoroki J, Shimada A, Hirata M, Sato T, Ito A. 2003. Matrix-Metalloproteinases-2 and -9 Production in Bovine Endometrial Cell Culture. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 49, No. 1.
- Henriet P, Cornet PB, Lemoine P, Galant C, Singer CF, Courtoy PJ, Eeckhout Y, Marbaix E. 2002. Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMP). *Ann NY Acad Sci* 955: 119-138.
- Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. 1999. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, 99(1): 81-92.
- Hopper RM 2014. *Bovine Reproduction*. John Wiley & Sons, Inc. Online ISBN: 9781118833971.
- Horst-Dieter D. 1994. *Histología Veterinaria*. 2da Edición. Editorial ACRIBIA, S.A.
- Hussain AM, Daniel RCW y O'Boyle D. 1990. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology* 34: 291–302.
- Imai K, Khandoker MA, Yonai M, Takahashi T, Sato T. 2003. Matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in bovine follicular fluid of different-sized follicles: relationship to intra-follicular inhibin and steroid concentrations. *Domestic Animal Endocrinology*, 24, 171e183.
- Itoh Y, Nagase H. 1995. Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. *J Biol Chem.* 270: 16518 – 16521.
- Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N. 2001. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 20: 4782-93.
- Itoh Y, Seiki M. 2006. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol.* 206 (1):1-8.
- Itoh Y. 2015. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol*, 44-46: 207-223
- Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight Tn, Penttinen R. 2009. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 61: 198–223.

- Kaitu'u TJ, Shen J, Zhang J, Morison NB, Salamonsen LA. 2005. Matrix metalloproteinases in endometrial breakdown and repair: functional significance in a mouse model. *Biol Reprod.* 73(4): 672-80.
- Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. 1993. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *The Journal of biological chemistry* 268: 10425-32.
- Kleiner Jr DE, Stetler-Stevenson WG. 1993. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol* 5: 891–897.
- Kizaki K, Ushizawa K, Takahashi T, Yamada O, Todoroki J, Sato T, Ito A, Hashizume K. 2008. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* 6:66.
- Kolkenbrock H, Orgel D, Hecker-Kia A, Noack W, Ulbrich N. 1991. The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. *Eur J Biochem* 198: 775-81.
- Koo BH, Kim YH, Han JH, Kim DS. 2012. Dimerization of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2): functional implication in MMP-2 activation. *The Journal of biological chemistry* 287: 22643-53.
- Kusindarta DL, Wihadmadyatami H. 2018. The Role of Extracellular Matrix in Tissue Regeneration. H. A. h. E. Kaoud (ed.), *Tissue Regeneration*, IntechOpen, London. 10.5772/intechopen.75728.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. 2002. Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. *J Dairy Sci* 85(9): 2223-36.
- Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR. 1994. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 269: 9352–9360.
- Ledgard AM, Lee RS, Peterson AJ. 2009. Bovine endometrial legumain and TIMP-2 regulation in response to presence of a conceptus. *Mol. Reprod. Dev.* 76: 65-74.
- Leese HJ. 1988: The formation and function of oviductal fluid. *J Reprod Fertil* 82: 843–856.
- Leslie KE. 1983. The events of normal and abnormal postpartum endocrinology and uterine involution in dairy cows: a review. *Canadian Veterinary Journal* 24: 67–71.
- Löffek S, Schilling O, Franzke CW. 2011. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur. Respir. J.* 38: 191–208.
- Luck MR, Zhao Y. 1995. Structural remodelling of reproductive tissues. *Journal of Endocrinology* 146: 191-195

Lucy MC, McDougall S, Nation DP. 2004. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Animal Reproduction Science* 82–83: 495–512.

Malla N, Sjoli S, Winberg JO, Hadler-Olsen E, Uhlin-Hansen L. 2008. Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes. *Connect Tissue Res* 49:180-4.

Manase K, Endo T, Chida M, Nagasawa K, Honnma H, Yamazaki K, Kitajima Y, Goto T, Kanaya M, Hayashi T, Mitaka T, Saito T. 2006. Coordinated elevation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 expression in rat uterus during postpartum involution. *Reprod Biol Endocrinol* 4: 32.

Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ. 1996. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked *in vitro* and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93: 9120-9125.

Mautino G, Oliver N, Chanez P, Bousquet J, Capony F. 1997. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 583-91.

McIntush EW, Smith MF. 1998. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ovarian function. 3: 23–30. Review.

Mesquita FS, Ramos RS, Pugliesi G, Andrade SCS, Van Hoeck V, Langbeen A, Oliveira ML, Gonella-Diaza AM, Gasparin G, Fukumasu H, Pulz LH, Membrive CM, Coutinho LL, Binelli M. 2015. The Receptive Endometrial Transcriptomic Signature Indicates an Earlier Shift from Proliferation to Metabolism at Early Diestrus in the Cow. *Biology of Reproduction*. 93(2):52, 1–12

Miguel Catalino B, Casaro G. Daglio MC. 2017. Cuantificación de pérdidas de gestación entre los días 35-100 en vacas de tambo de la Cuenca Mar y Sierras. Tesina para optar al grado de Veterinario. Orientación Producción Animal, área Bovinos de Leche, Universidad Nacional del Centro de da Provincia de Buenos Aires.

Minten MA, Bilby TR, Bruno RGS, Allen CC, Madsen CA, Wang Z, Sawyer JE, Tibary A, Neibergs HL, Geary TW, Bauersachs S, Spencer TE. 2013. Effects of Fertility on Gene Expression and Function of the Bovine Endometrium. *PLoS One* 8(8), e69444.

Mishra B, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M. 2010. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. *Reprod Biol Endocrinol* 8: 60.

Moore K, Thatcher WW. 2006. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci* 89: 1254–1266.

- Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K. 2002. Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7414-9.
- Mullins KJ, Saacke R. 2003. *Illustrated Anatomy of the Bovine Male and Female Reproductive Tracts: From Gross to Microscopic*. Columbia, MO: National Association of Animal Breeders, p.79.
- Nagase H, Woessner Jr JF. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491–21494.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562-73.
- Noseir WM. 2003. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reprod Biol Endocrinol*. 21; 1:50.
- Nothnick WB. 2000. Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene results in altered reproductive cyclicity and uterine morphology in reproductive-age female mice. *Biol Reprod* 63: 905-912.
- Nothnick WB. 2001. Reduction in reproductive lifespan of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)-deficient female mice. *Reproduction*. 122(6): 923-7.
- Ohtani, S, Okuda K, Nishimura K, Mohri S. 1993. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology*. 39: 1033-1042.
- Olson MW, Bernardo MM, Pietila M, Gervasi DC, Toth M, Kotra LP. 2000. Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *The Journal of biological chemistry* 275: 2661-8.
- Ortega HH, Lorente JA, Mira GA, Baravalle C, Salvetti NR. 2004. Constant Light Exposure Causes Dissociation in Gonadotrophin Secretion and Inhibits Partially Neuroendocrine Differentiation of Leydig Cells in Adult Rats. *Reproduction in Domestic Animals* 39: 417–423
- Ortega HH, Paredes A, Salvetti NR, Rey F, Lara HE. 2007. Liberación de cortisol *in vitro* en diferentes estructuras foliculares ováricas de bovinos, en respuesta a estímulos gonadotróficos y beta adrenérgicos. *Medicina* 67: 185
- Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2008. Insulin-like growth factor I in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Research in Veterinary Science* 84: 419–427.
- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. 1997. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*, 272(4): 2446-2451.

- Peng J, Gao K, Gao T, Lei Y, Han P, Xin H, An X, Cao B. 2015. Expression and regulation of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP1 and TIMP3) in goat oviduct. *Theriogenology*, 84 (9): 1636-43.
- Peralta MB, Baravalle ME, Belotti EM, Stassi AF, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F, Velázquez MML. 2017. Involvement of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Bovine Cystic Ovarian Disease. *J Comp Pathol* 156(2-3):191-201.
- Perez Wallace SM. 2013. Tratamientos hormonales para reducir pérdidas de gestación en vacas lecheras. Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar por el título de Doctor en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
- Peter S, Michel G, Hahn A, Ibrahim M, Lubke-Becker A, Jung M y Einspanier R GC. 2015. Puerperal Influence of bovine uterine health status on the mRNA expression of pro-inflammatory factors. *J Physiol Pharmacol* 66: 449–462.
- Plaisier M, Koolwijk P, Hanemaaijer R, Verwey RA, van der Weiden RM, Risse EK, Jungerius C, Helmerhorst FM, van Hinsbergh VW. 2006. Membrane-type matrix metalloproteinases and vascularization in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. Jan;12(1): 11-8.
- Pleticha S, Drillich M, Heuwieser W. 2009. Evaluation of the Metrichheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 92(11): 5429–5435.
- Porto CD, Nunes LC, Masseno APB, Sequeira JL, Oliveira DE, Alvarenga MA. 2011. Expressão de MMP-2 e MMP-9 no endométrio de éguas saudáveis e portadoras de endometrite crônica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63(1): 12-19.
- Quintans G, Gari C, Viñoles C. 2000. Sincronización de celos. II. Evaluación de diferentes métodos de sincronización de celos usando prostaglandina. INIA Treinta y Tres. Jornada anual de producción animal: resultados experimentales. Serie Actividades de Difusión 225. Treinta y Tres: INIA. p. 74-78.
- Raffetto JD, Khalil RA. 2008. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 75: 346-59.
- Rahman AMI, Yamashita S, Islam MR, Fujihara T, Yamaguchi H, Kawahara M, Takahashi M, Takahashi H, Gotoh T, Yamauchi N. 2020. Type-I interferon regulates matrix metalloproteinases clearance of the bovine endometrial spheroid. *Anim Sci J*. Jan-Dec;91(1): e13350.
- Recce S. 2013. Utilización del metrichhecktm para el diagnóstico de las endometritis en bovinos lecheros. Tesis de maestría en Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Veterinarias.

- Rigot V, Marbaix E, Lemoine P, Courtoy PJ, Eeckhout Y. 2001. *In vivo* perimenstrual activation of progelatinase B (proMMP-9) in the human endometrium and its dependence on stromelysin 1 (MMP-3) *ex vivo*. *Biochem. J.* 358: 275–280.
- Ross MH y Pawlina W. 2015. *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular*. Editorial Wolters Kluwer.
- Salamonsen LA, Nagase H, Wooley DE. 1995. Matrix metalloproteinases and their inhibitors at the ovine trophoblast-uterine interface. *J Reprod Fertil*, 49 (Suppl.): 29–37.
- Salamonsen LA. 1999. Role of proteases in implantation. *Reproduction* 4:11-22.
- Salamonsen LA, Lathbury LJ. 2000. Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update*. Jan-Feb; 6(1): 16-27.
- Salamonsen LA. 2003. Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction* 125(3): 301-11.
- Salveti NR, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH. 2004. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs*. 178: 117–125.
- Salveti NR, Alfaro NS, Velázquez MML, Amweg AN, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH. 2012. Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction* 144: 723-735.
- Santos JE, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvao KN. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci* (82–83): 513–535.
- Sato H, Takino T, Kinoshita T, Imai K, Okada Y, Stetler Stevenson WG. 1996. Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett* 385: 238-40.
- Schoon HA, Schoon D, Klug E. 1997. The endometrial biopsy in the mare with regards to clinical correlation. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 13: 453-464.
- Scolari SC, Pugliesi G, Strefezzi RF, da Silva Andrade SC, Lehmann Coutinho L, Binelli M. 2017. Dynamic remodeling of endometrial extracellular matrix regulates embryo receptivity in cattle. *Reproduction* 153: 49–61
- Šematoviča I, Jemeljanovs A. 2008. Distribution of Growth Stimulating and Degradation Factors in Cow Endometrium in Postparturition Period. *LLU Raksti* 21 (315): 66-72
- Senger PL. 2003. The organization and function of the female reproductive system. En: *Pathways to pregnancy and parturition*. Cadmus Professional Communications. United States of America. Pág.10-43.
- Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. 2004. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta histochemica* 106: 353 – 362.

Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO and Gadsby JE. 2009a. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim.* 44 (suppl. 3): 1–9.

Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G y Schuberth H-J. 2009b. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction* 81: 1025–1032.

Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley HO. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Human Reproduction* 14: 793–799.

Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J, Pellicer A. 2009. El endometrio humano: desde la investigación a la clínica. Editorial Médica Panamericana.

Singh J, Murray RD, Mshelia G y Woldehiwet Z. 2008. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *Veterinary Journal* 175: 301–309.

Sisson S, Grossman JD. 1982. Sistema Urogenital de los Rumiantes. En: *Anatomía de los Animales Domésticos Tomo I.* Robert Getty. Ed. Masson S.A. Barcelona. Pág. 1049-1056.

Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod* 71: 2-10.

Spencer TE, Sandra O, Wolf E. 2008. Genes involved in conceptus endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* 135: 165–179.

Spencer TE, Forde N, Lonergan P. 2016. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J Dairy Sci.* 99(7):5941-5950.

Spicer LJ, Convey EM, Leung K, Short RE, Tucker HA. 1986. Anovulation in postpartum suckled beef cows. II. Associations among binding of 125I-labeled gonadotropins to granulosa and thecal cells, and concentrations of steroids in serum and various sized ovarian follicles. *J Anim Sci.* 62(3):742-50.

Sreenan JM, Diskin MG. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 27: 99–113.

Stabenfeldt GH, Ewing LL, McDonald LE. 1969. Peripheral plasma progesterone levels during the bovine oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* Aug;19(3): 433-42.

Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516.

Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. 2002. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod* 67: 889–894.

Talhok RS, Bissell MJ, Werb Z. 1992. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J. Cell Biol.* 118: 1271–1282

Thatcher W, Staples C, Danet G, Oldick B, Schmitt P. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J Animal Sci* 72: 16-30.

Thatcher WW, Guzeloglu A, MattosR, Binelli M, Hansen TR, Pru JK. 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56: 1435–1450

Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos JEP. 2002. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 243–254.

Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H. 1992. A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 314: 386-8.

Toth M, Gervasi DC, Fridman R. 1997. Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells. *Cancer Res* 57: 3159-67.

Ulbrich SE, Meyer SU, Zitta K, Hiendleder S, Sinowatz F, Bauersachs S. 2011. Bovine endometrial metalloproteinases MMP14 and MMP2 and the metalloproteinase inhibitor TIMP2 participate in maternal preparation of pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 332: 48-57.

Ulbrich SE, Groebner AE, Bauersachs S. 2013. Transcriptional profiling to address molecular determinants of endometrial receptivity – lessons from studies in livestock species. *Methods* 59: 108–115.

Upadhyaya AG, Harvey RP, Howard TK, Lowell JA, Shenoy S, Strasberg SM. 1997. Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. *Hepatology* 26: 922-8.

van Wyk LC, van Niekerk CH, Belonje PC. 1972. Involution of the post partum uterus of the ewe. *J S Afr Vet Assoc.* 43(1): 19-26.

Vartio T, Baumann M. 1989. Human gelatinase/type IV procollagenase is a regular plasma component. *FEBS Lett* 255: 285-9.

Velázquez MML, Alfaro NS, Dupuy C, Salvetti NR, Rey F. 2010. Heat shock protein patterns in the bovine ovary and their relation with cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci* 118: 201-209.

Velázquez MML, Peralta MB, Angeli E, Stassi AF, Gareis NC, Durante L, Cainelli S, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2019. Immune status during postpartum, peri-implantation and early pregnancy in cattle: An updated view. *Animal Reproduction Science* 206: 1–10.

Vermeer PD, Denker J, Estin M, Moninger TO, Keshavjee S, Karp P, Kline JN, Zabner J. 2009. MMP9 modulates tight junction integrity and cell viability in human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 296(5): L751-62.

Vincent AJ, Malakooti N, Zhang J, Rogers PA, Affandi B, Salamonsen LA. 1999. Endometrial breakdown in women using Norplant is associated with migratory cells expressing matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Hum Reprod.* 14(3): 807-15.

Visse R, Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-39.

Walter I, Boos A. 2001. Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and Tissue Inhibitor-2 of Matrix Metalloproteinases (TIMP-2) in the Placenta and Interplacental Uterine Wall in Normal Cows and in Cattle with Retention of Fetal Membranes. *Placenta* 22: 473–483

Wathes DC, Cheng Z, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Patton J. 2011. Influence of energy balance on the somatotrophic axis and matrix metalloproteinase expression in the endometrium of the postpartum dairy cow. *Reproduction* 141: 269–281.

Wathes DC. 2012. Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow. *Reproduction in domestic animals* 47: 304-12.

Welsch U. 2014. *Sobotta Histología*. Con la colaboración de Thomas Deller. 3era Edición. Editorial Médica Panamericana.

Westermann S, Drillich M, Kaufmann TB, Madoz LV, Heuwieser W. 2010. A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology* 74(7): 1248–1255.

Willenbrock F, Murphy G. 1994. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med*. 150(6 Pt 2): S165-70.

Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffier D, Dobson HC, Shelson IM. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the inflammatory response to endometritis in cattle. *Theriogenology* 63: 102-117.

Woessner JF Jr. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 5: 2145–2154.

Wolf E, Arnold G, Bauersachs S, Beier H, Blum H, Einspanier R, Fröhlich T, Herrler A, Hiendleder S, Kölle S, Prella K, Reichenbach H-D, Stojkovic M, Wenigerkind H, Sinowatz F. 2003. Embryo-Maternal Communication in Bovine - Strategies for Deciphering a Complex Cross-Talk. *Reproduction in Domestic Animals* 38(4): 276–289.

Woods A, Ellis CR. 1994. *Laboratory Histopathology. A Complete Reference*. Longman Group Limited. Londres

Yamada O, Todoroki J, Takahashi T, Hashizume K. 2002. The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation. *J Vet Med Sci* 64: 207-214

Yin Z, Sada AA, Reslan OM, Narula N, Khalil RA. 2012. Increased MMPs expression and decreased contraction in the rat myometrium during pregnancy and in response to prolonged stretch and sex hormones. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E55-70.

Zhang J, Salamonsen LA. 1997. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) -1, -2 and -3 in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 3: 735-741.

Zhang J, Hampton AL, Nie G, Salamonsen LA. 2000. Progesterone Inhibits Activation of Latent Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 by Membrane-Type 1 MMP: Enzymes Coordinately Expressed in Human Endometrium. *Biology of Reproduction* 62: 85–94.

Zhang B, Moses MA, Tsang PC. 2003. Temporal and spatial expression of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1 and -2) in bovine corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 85.

Zhang X, Nothnick WB. 2005. The role and regulation of the uterine matrix metalloproteinase system in menstruating and non-menstruating species. *Front Biosci.* 10: 353-66.

Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE. 1998. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *The Journal of biological chemistry* 273: 1216-22.