



**Universidad Nacional del Litoral**  
*Facultad de Ciencias Veterinarias*

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA).  
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral, UNL-  
CONICET).*

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

***Caracterización sistémica y endometrial del perfil  
inmunológico en bovinos durante el período de  
lactancia: relación con el estado metabólico/hormonal y  
el logro de la preñez inmediata posterior en los mismos.***

**Autor: María Belén Peralta.**

**Director/a: Dra. Melisa M. L. Velázquez.**

**Codirector/a: Dra. Natalia R. Salvetti.**

## **Gracias ...**

*A la Gordi, Pelado, Facu, Dami y Pedrito por apoyarme y confiar en mí en todo momento. Por alegrarse con cada objetivo cumplido, y alentarme en cada momento difícil.*

*A Agu por ser incondicional y acompañarme en este camino siempre con buena onda, e impulsándome para seguir cumpliendo metas.*

*A Melisa Velázquez por confiar en mí siempre. Por alentarme a crecer y a superarme todos los días. Por acompañar mi proceso desde cerca. Estoy feliz de continuar recorriendo este camino de aprendizaje con ella.*

*A Sofi por su ayuda, pero por sobre todo por su amistad. Agradezco haberla cruzado en el camino, el trabajo sin ella no hubiese sido lo mismo.*

*A Pauli por ser la mejor amiga que hubiese podido encontrar en este camino.*

*A Cami Becaria, Lucas Etchevers, Anto Stassi, Caro Engler, Cristi Leiva, Dai Barcarolo, Emma Angelli, Enzo Cabaña, Facu Salinas, Fátima Gasser, Flor Olmos, Gonza Santiago, Juan Chiaraviglio, Lean Durante, Luci Cattaneo, Mati Belotti, Mauri Kern, Nati Gareis, Nati Velázquez, Silvi Addona, Silvi Pirola, Sofi Sacco y Uli Notaro por compartir tantos almuerzos, charlas y hacer que venir a trabajar sea más divertido.*

*Andre Berengeno, Aye Amweg, Belkis Marelli, Fer Rodríguez, Eli Pereyra, Euge Baravalle, Flor Rey, Gustavo Hein, Marce Zayas, Celi Baravalle, Nati Salvetti, Pablito Díaz y Valen Matiller por estar siempre disponibles y bien predispuestos frente a cada consulta, por la confianza y el aliento que siempre me dieron.*

*A Hugo Ortega por permitirme ser parte de este equipo de trabajo excepcional. Siempre estaré agradecida de la oportunidad que me dieron.*

*A Ernesto Quercia y a todo el personal de La Cabañita que muy gentilmente nos permitió realizar el muestreo de esta tesis.*

*A Marcelo Signorini, por la ayuda ante cada consulta estadística.*

*A la Facultad de Ciencias Veterinarias por brindarme la posibilidad de seguirme formando como profesional.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca que me permitió realizar el Doctorado en Ciencias Veterinarias.*

*A la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+I) por otorgar los subsidios necesarios para el desarrollo de este trabajo de tesis.*

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | 8         |
| ÍNDICE DE TABLAS .....   | 16        |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....  | 17        |
| RESUMEN .....  | 20        |
| ABSTRACT.....  | 21        |
| <br>   |           |
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>22</b> |
| 1.1. ÚTERO BOVINO: ANATOMÍA E HISTOLOGÍA.....  | 23        |
| 1.1.1. Anatomía del útero bovino.....  | 23        |
| 1.1.2. Histología del endometrio. ....   | 24        |
| 1.2. SALUD UTERINA Y RESPUESTA INMUNE. ....  | 26        |
| 1.2.1. Mecanismos de defensa uterina.....  | 26        |
| 1.2.1.1. Células epiteliales.....  | 26        |
| 1.2.1.2. Leucocitos. ....  | 32        |
| 1.2.2. Microflora uterina.....   | 34        |
| 1.2.3. Involución uterina en bovinos.....  | 35        |
| 1.3. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS, METABÓLICOS Y HORMONALES. RELACIÓN CON LA INMUNIDAD.<br>..... | 36        |
| 1.3.1. Parámetros hematológicos.....   | 37        |
| 1.3.2. Contexto metabólico y su relación con la inmunidad.....                               | 40        |
| 1.3.3. Contexto hormonal y su relación con la inmunidad. ....                                | 41        |
| 1.4. INMUNIDAD SISTÉMICA Y LOCAL, Y SU RELACIÓN CON LA PREÑEZ. ....                          | 42        |
| 1.4.1. Inmunidad sistémica y preñez. ....  | 42        |
| 1.4.2. Inmunidad uterina y preñez. ....  | 43        |
| <br>   |           |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>   | <b>45</b> |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL. ....  | 46        |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....   | 46        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>  | <b>47</b> |
| 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRAS. ....   | 48        |
| 3.1.1. Grupo de animales.....   | 48        |
| 3.1.2. Procedimiento con los animales. ....   | 50        |
| 3.1.3. Toma, procesamiento y almacenamiento de muestras.....  | 50        |
| 3.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL, PROGESTERONA Y CORTISOL.                                | 51        |
| 3.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS, B-HIDROXIBUTIRATO Y GLUCOSA. ....              | 51        |
| 3.4. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL INMUNE A NIVEL SISTÉMICO.....   | 52        |
| 3.4.1. Recuento de leucocitos totales y diferencial a lo largo de la lactancia.....   | 52        |
| 3.4.2. Actividad y capacidad fagocítica de monocitos/macrófagos a lo largo de la lactancia y la preñez. ....                    | 52        |
| 3.4.2.1. Obtención de la población leucocitaria total. ....   | 52        |
| 3.4.2.2. Obtención de bacterias marcadas con isotiocianato de fluoresceína.....   | 53        |
| 3.4.2.2.1. Preparación del cultivo bacteriano y cuantificación de la suspensión. ....   | 53        |
| 3.4.2.2.2. Tinción con isotiocianato de fluoresceína. ....  | 54        |
| 3.4.2.3. Fagocitosis y citometría de flujo. ....  | 55        |
| 3.4.2.4. Estrategia de selección para la evaluación de la actividad y capacidad fagocítica de monocitos/macrófagos.....         | 56        |
| 3.5. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y ANTIINFLAMATORIAS. ....                     | 58        |
| 3.5.1. Extracción de ARN. ....  | 58        |
| 3.5.2. Obtención de ADN copia mediante retrotranscripción. ....   | 59        |
| 3.5.3. Diseño de cebadores específicos bovinos. ....  | 59        |
| 3.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa de punto final. ....   | 61        |
| 3.5.5. Secuenciación. ....  | 61        |
| 3.5.6. PCR en tiempo real. ....   | 62        |
| 3.6. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN ENDOMETRIAL DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y ANTIINFLAMATORIAS. .... | 63        |
| 3.6.1. Inmunohistoquímica indirecta.....  | 63        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.6.2. Análisis de imágenes.....   | 66        |
| 3.7. EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE MACRÓFAGOS INFILTRANTES A NIVEL ENDOMETRIAL.....   | 67        |
| 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....   | 67        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>   | <b>69</b> |
| 4.1. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE METABOLITOS RELACIONADOS A LA CONDICIÓN NUTRICIONAL Y HORMONAL (B-HIDROXIBUTIRATO, GLUCOSA, ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS, 17B-ESTRADIOL, PROGESTERONA Y CORTISOL) DE VACAS LECHERAS DURANTE LA LACTANCIA Y PREÑEZ. .... | 70        |
| 4.1.1. Concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol, progesterona y cortisol a lo largo de la lactancia y la preñez.....   | 70        |
| 4.1.2. Concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados, β-hidroxitirato y glucosa a lo largo de la lactancia y la preñez. ....   | 73        |
| 4.2. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL INMUNE A NIVEL SISTÉMICO Y POSIBLES ALTERACIONES EN LA ACTIVIDAD Y CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE LEUCOCITOS AISLADOS DE SANGRE PERIFÉRICA, DURANTE LA PREÑEZ Y LACTANCIA EN FUNCIÓN DEL CONTEXTO METABÓLICO/HORMONAL. ....                       | 77        |
| 4.2.1. Recuento de leucocitos totales y diferencial a lo largo de la lactancia y la preñez.....  | 77        |
| 4.2.2. Determinación de la actividad y capacidad fagocítica en asociación al contexto metabólico y hormonal a lo largo de la lactancia y la preñez.....  | 81        |
| 4.2.2.1. Actividad fagocítica en asociación al contexto metabólico y hormonal a lo largo de la lactancia y la preñez. ....   | 81        |
| 4.2.2.2. Capacidad fagocítica en asociación al contexto metabólico y hormonal a lo largo de la lactancia y la preñez. ....   | 84        |
| 4.3. EVALUACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN ENDOMETRIAL DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y ANTIINFLAMATORIAS DURANTE LA LACTANCIA TEMPRANA DE LOS ANIMALES Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA DURACIÓN DEL INTERVALO PARTO-CONCEPCIÓN.....                         | 87        |
| 4.3.1. Niveles de expresión génica y proteica de citoquinas proinflamatorias durante la lactancia temprana.....  | 88        |
| 4.3.1.1. Niveles de expresión del factor de necrosis tumoral alfa. ....  | 88        |
| 4.3.1.2. Niveles de expresión del interferón gamma. ....   | 90        |
| 4.3.1.3. Niveles de expresión de la interleuquina 6. ....  | 92        |
| 4.3.1.4. Niveles de expresión de la interleuquina 8. ....  | 95        |
| 4.3.1.5. Niveles de expresión de la interleuquina 1 alfa. ....   | 98        |
| 4.3.1.6. Niveles de expresión de la interleuquina 1 beta. ....   | 100       |

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.1.7. Niveles de expresión del receptor I de la interleuquina 1.....   | 103 |
| 4.3.2. Niveles de expresión génica y proteica de citoquinas antiinflamatorias durante la lactancia temprana.....  | 105 |
| 4.3.2.1. Niveles de expresión del receptor II de la interleuquina 1.....  | 105 |
| 4.3.2.2. Niveles de expresión del antagonista del receptor I de la interleuquina 1. ....  | 108 |
| 4.3.2.3. Niveles de expresión de la interleuquina 4. ....   | 110 |
| 4.3.2.4. Niveles de expresión del factor de crecimiento transformante beta 3. ....  | 112 |
| 4.4. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MACRÓFAGOS INFILTRANTES EN ENDOMETRIO DE VACAS LECHERAS DURANTE LA LACTANCIA TEMPRANA Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA DURACIÓN DEL INTERVALO PARTO-CONCEPCIÓN. .... | 114 |
| 4.5. EFECTOS DE LAS ALTERACIONES INMUNES ENDOMETRIALES Y SISTÉMICAS HALLADAS EN VACAS DURANTE LA LACTANCIA SOBRE EL ESTABLECIMIENTO DE LA PREÑEZ.....   | 116 |
| 4.5.1. Efecto de la actividad y capacidad fagocítica sobre el establecimiento de la preñez.....   | 116 |
| 4.5.1.1. Efecto de la actividad fagocítica sobre el establecimiento de la preñez. ....  | 116 |
| 4.5.1.2. Efecto de la capacidad fagocítica sobre el establecimiento de la preñez. ....  | 117 |
| 4.5.2. Efecto de los niveles de expresión endometrial génica y proteica de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias sobre el establecimiento de la preñez.....                               | 118 |
| 4.5.2.1. Efecto de los niveles de expresión endometrial génica y proteica de citoquinas proinflamatorias sobre el establecimiento de la preñez. ....  | 118 |
| 4.5.2.1.1. Factor de necrosis tumoral alfa. ....  | 118 |
| 4.5.2.1.2. Interferón gama. ....  | 121 |
| 4.5.2.1.3. Interleuquina 6. ....  | 123 |
| 4.5.2.1.4. Interleuquina 8. ....  | 125 |
| 4.5.2.1.5. Interleuquina 1 alfa. ....   | 128 |
| 4.5.2.1.6. Interleuquina 1 beta. ....   | 130 |
| 4.5.2.1.7. Receptor I de la interleuquina 1. ....   | 133 |
| 4.5.2.2. Efecto de los niveles de expresión endometrial génica y proteica de citoquinas antiinflamatorias sobre el establecimiento de la preñez.....  | 135 |
| 4.5.2.2.1. Receptor II de la interleuquina 1. ....  | 135 |
| 4.5.2.2.2. Antagonista del receptor de la interleuquina1.....   | 138 |

|   |            |
|---|------------|
| 4.5.2.2.3. Interleuquina 4. ....  | 140        |
| 4.5.2.2.4. Factor de crecimiento transformante beta. ....   | 142        |
| <b>5. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>145</b> |
| 5.1. COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO A NIVEL SISTÉMICO Y SU POSIBLE RELACIÓN CON EL LOGRO DE LA PREÑEZ EN VACAS LECHERAS. .... | 146        |
| 5.2. COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO A NIVEL LOCAL Y SU POSIBLE RELACIÓN CON EL LOGRO DE LA PREÑEZ EN VACAS LECHERAS. ....     | 150        |
| <b>6. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>154</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>156</b> |
| <b>8. ANEXO.....</b>  | <b>173</b> |
| 8.1. PUBLICACIONES EN RELACIÓN CON LA TESIS.....  | 174        |
| 8.2. OTRAS PUBLICACIONES.....   | 174        |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Sistema reproductor bovino de la hembra.....   | 23 |
| <b>Figura 2.</b> Zona basal y funcional del endometrio uterino. Vista de epitelio luminal y estroma en corte de tejido endometrial. Vista de epitelio glandular y estroma en corte de tejido endometrial. Útero bovino normal con presencia de carúnculas ..... | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Componentes físicos del mecanismo de defensa inmune postparto en el tracto genital bovino.....   | 28 |
| <b>Figura 4.</b> Mecanismos conocidos (flechas sólidas) y propuestos (flechas de puntos) para la progresión y resolución de la inflamación uterina en la vaca posparto .....  | 30 |
| <b>Figura 5.</b> Imágenes de extendidos sanguíneos bovinos .....  | 40 |
| <b>Figura 6.</b> Planificación de los tiempos de muestreo y el tipo de muestra tomado en cada uno..   | 49 |
| <b>Figura 7.</b> Estrategia de gating para analizar la AF de los monocitos/macrófagos..   | 57 |
| <b>Figura 8.</b> Concentraciones plasmáticas de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol en función de los DPP en el grupo IPC <sub>90</sub> .....  | 70 |
| <b>Figura 9.</b> Concentraciones plasmáticas de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol en función de los DPP en el grupo IPC <sub>120</sub> . .....   | 71 |
| <b>Figura 10.</b> Concentraciones plasmáticas de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol en función de los DPP en el grupo IPC <sub>180</sub> . .....  | 72 |
| <b>Figura 11.</b> Concentraciones plasmáticas de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol en función de los DPP en el grupo IPC <sub>&gt;180</sub> . .....  | 73 |
| <b>Figura 12.</b> Concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB y glucosa en función de los DPP en el grupo IPC <sub>90</sub> .....  | 74 |
| <b>Figura 13.</b> Concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB y glucosa en función de los DPP en el grupo IPC <sub>120</sub> .....   | 75 |
| <b>Figura 14.</b> Concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB y glucosa en función de los DPP en el grupo IPC <sub>180</sub> .....   | 76 |
| <b>Figura 15.</b> Concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB y glucosa en función de los DPP en el grupo IPC <sub>&gt;180</sub> . .....   | 76 |
| <b>Figura 16.</b> Efecto de los DPP sobre el recuento de leucocitos totales y el recuento diferencial de monocitos, neutrófilos y linfocitos en el grupo IPC <sub>90</sub> .....  | 78 |
| <b>Figura 17.</b> Efecto de los DPP sobre el recuento de leucocitos totales y el recuento diferencial de monocitos, neutrófilos y linfocitos en el grupo IPC <sub>120</sub> . .....   | 79 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 18.</b> Efecto de los DPP sobre el recuento de leucocitos totales y el recuento diferencial de monocitos, neutrófilos y linfocitos en el grupo IPC <sub>180</sub> .   | 80  |
| <b>Figura 19.</b> Efecto de los DPP sobre el recuento de leucocitos totales y el recuento diferencial de monocitos, neutrófilos y linfocitos en el grupo IPC <sub>&gt;180</sub> .   | 81  |
| <b>Figura 20.</b> Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la AF a lo largo del tiempo en el grupo IPC <sub>90</sub> .  | 82  |
| <b>Figura 21.</b> Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la AF a lo largo del tiempo en el grupo IPC <sub>120</sub> .   | 83  |
| <b>Figura 22.</b> Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la AF a lo largo del tiempo en el grupo IPC <sub>&gt;180</sub> .   | 84  |
| <b>Figura 23.</b> Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la CF a lo largo del tiempo en el grupo IPC <sub>120</sub> .   | 85  |
| <b>Figura 24.</b> Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la CF a lo largo del tiempo en el grupo IPC <sub>&gt;180</sub> .   | 87  |
| <b>Figura 25.</b> Niveles de expresión génica de TNF $\alpha$ a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> .  | 88  |
| <b>Figura 26.</b> Niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$ en EL a los 45 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de TNF $\alpha$ en EL a los 45 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> .           | 889 |
| <b>Figura 27.</b> Niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$ en Es a los 45 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de TNF $\alpha$ en Es a los 45 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> .           | 89  |
| <b>Figura 28.</b> Niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$ en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de TNF $\alpha$ en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . | 90  |
| <b>Figura 29.</b> Niveles de expresión proteica de INF $\gamma$ en EL a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de INF $\gamma$ en EL a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . | 91  |
| <b>Figura 30.</b> Niveles de expresión proteica de INF $\gamma$ en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de INF $\gamma$ en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . | 91  |
| <b>Figura 31.</b> Niveles de expresión proteica de INF $\gamma$ en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de INF $\gamma$ en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . | 92  |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 32.</b> Niveles de expresión génica de IL6 a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....   | 93  |
| <b>Figura 33.</b> Niveles de expresión proteica de IL6 en EL a los 45 entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL6 en EL a los 45 en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                                     | 94  |
| <b>Figura 34.</b> Niveles de expresión proteica de IL6 en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL6 en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                   | 94  |
| <b>Figura 35.</b> Niveles de expresión proteica de IL6 en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL6 en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....               | 95  |
| <b>Figura 36.</b> Niveles de expresión génica de IL8 a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....   | 96  |
| <b>Figura 37.</b> Niveles de expresión proteica de IL8 en EL a los 45 entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL8 en EL a los 45 en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                                     | 96  |
| <b>Figura 38.</b> Niveles de expresión proteica de IL8 en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL8 en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                   | 97  |
| <b>Figura 39.</b> Niveles de expresión proteica de IL8 en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL8 en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                   | 97  |
| <b>Figura 40.</b> Niveles de expresión génica de IL1 $\alpha$ a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....  | 98  |
| <b>Figura 41.</b> Niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$ en EL a los 45 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\alpha$ en EL a los 45 en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....               | 99  |
| <b>Figura 42.</b> Niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$ en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\alpha$ en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . ..... | 99  |
| <b>Figura 43.</b> Niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$ en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\alpha$ en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . ..... | 100 |
| <b>Figura 44.</b> Niveles de expresión génica de IL1 $\beta$ a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....   | 101 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 45.</b> Niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$ en EL a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\beta$ en EL a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> ..... | 101 |
| <b>Figura 46.</b> Niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$ en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\beta$ en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> ..... | 102 |
| <b>Figura 47.</b> Niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$ en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\beta$ en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> ..... | 102 |
| <b>Figura 48.</b> Niveles de expresión génica de IL1RI a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....   | 103 |
| <b>Figura 49.</b> Niveles de expresión proteica de IL1RI en EL a los 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RI en EL a los 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> .....                       | 104 |
| <b>Figura 50.</b> Niveles de expresión proteica de IL1RI en Es a los 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RI en Es a los 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> .....                       | 104 |
| <b>Figura 51.</b> Niveles de expresión proteica de IL1RI en EG a los 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RI en EG a los 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> .....                       | 105 |
| <b>Figura 52.</b> Niveles de expresión génica de IL1RII a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....  | 106 |
| <b>Figura 53.</b> Niveles de expresión proteica de IL1RII en EL a los 45 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RII en EL a los 45 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> .....                     | 106 |
| <b>Figura 54.</b> Niveles de expresión proteica de IL1RII en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RII en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> .....           | 107 |
| <b>Figura 55.</b> Niveles de expresión proteica de IL1RII en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RII en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> .....           | 107 |
| <b>Figura 56.</b> Niveles de expresión génica de IL1RA a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....   | 108 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 57.</b> Niveles de expresión proteica de IL1RA en Es a los 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RA en Es a los 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                                   | 109 |
| <b>Figura 58.</b> Niveles de expresión proteica de IL1RA en EG a los 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RA en EG a los 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                                   | 109 |
| <b>Figura 59.</b> Niveles de expresión proteica de IL4 en EL a los 45 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL14 en EL a los 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                                      | 110 |
| <b>Figura 60.</b> Niveles de expresión proteica de IL4 en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL4 en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                             | 111 |
| <b>Figura 61.</b> Niveles de expresión proteica de IL4 en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de IL4 en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....                             | 111 |
| <b>Figura 62.</b> Niveles de expresión proteica de TGFβ <sub>3</sub> en EL a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de TGFβ <sub>3</sub> en EL a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . ..... | 113 |
| <b>Figura 63.</b> Niveles de expresión proteica de TGFβ <sub>3</sub> en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de TGFβ <sub>3</sub> en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . ..... | 113 |
| <b>Figura 64.</b> Niveles de expresión proteica de TGFβ <sub>3</sub> en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . Imágenes representativas de la inmunotinción de TGFβ <sub>3</sub> en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . ..... | 114 |
| <b>Figura 65.</b> Número de macrófagos infiltrantes en endometrio a los 45 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....   | 115 |
| <b>Figura 66.</b> Número de macrófagos infiltrantes en endometrio a los 60 DPP entre los grupos IPC <sub>90</sub> , IPC <sub>180</sub> e IPC <sub>&gt;180</sub> . .....   | 115 |
| <b>Figura 67.</b> Imágenes representativas de la inmunotinción de los macrófagos en endometrio. ....  | 116 |
| <b>Figura 68.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de AF previos a la concepción. ....   | 117 |
| <b>Figura 69.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de CF previos a la concepción.. ....  | 117 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 70.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de TNF $\alpha$ . .....        | 119 |
| <b>Figura 71.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$ en EL. ....  | 120 |
| <b>Figura 72.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$ en Es. ....  | 120 |
| <b>Figura 73.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$ en EG.. .... | 121 |
| <b>Figura 74.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de INF $\gamma$ en EL.....   | 122 |
| <b>Figura 75.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de INF $\gamma$ en Es.....   | 122 |
| <b>Figura 76.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de INF $\gamma$ en EG.....   | 123 |
| <b>Figura 77.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL6. ....                   | 123 |
| <b>Figura 78.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL6 en EL. ....           | 124 |
| <b>Figura 79.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL6 en Es. ....           | 125 |
| <b>Figura 80.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL6 en EG.. ....          | 125 |
| <b>Figura 81.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL8. ....                   | 126 |
| <b>Figura 82.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL8 en EL.....            | 127 |
| <b>Figura 83.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL8 en Es.....            | 127 |
| <b>Figura 84.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL8 en EG. ....           | 128 |
| <b>Figura 85.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1 $\alpha$ . ....         | 128 |
| <b>Figura 86.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$ en EL.....   | 129 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 87.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$ en Es..... | 130 |
| <b>Figura 88.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$ en EG..... | 130 |
| <b>Figura 89.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1 $\beta$ .....         | 131 |
| <b>Figura 90.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$ en EL.....  | 132 |
| <b>Figura 91.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$ en Es.....  | 132 |
| <b>Figura 92.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$ en EG.....  | 133 |
| <b>Figura 93.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1RI.....                | 133 |
| <b>Figura 94.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RI en EL.....        | 134 |
| <b>Figura 95.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RI en Es.....        | 135 |
| <b>Figura 96.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RI en EG.....        | 135 |
| <b>Figura 97.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1RII.....               | 136 |
| <b>Figura 98.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RII en EL.....       | 137 |
| <b>Figura 99.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RII en Es.....       | 137 |
| <b>Figura 100.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RII en EG.....      | 138 |
| <b>Figura 101.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1RA.....               | 138 |
| <b>Figura 102.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RA en EL.....       | 139 |
| <b>Figura 103.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RA en Es.....       | 140 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 104.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RA en EG.....         | 140 |
| <b>Figura 105.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL4 en EL.....           | 141 |
| <b>Figura 106.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL4 en Es.....           | 141 |
| <b>Figura 107.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL4 en EG.....           | 142 |
| <b>Figura 108.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TGF $\beta_3$ en EL..... | 143 |
| <b>Figura 109.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TGF $\beta_3$ en Es..... | 143 |
| <b>Figura 110.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TGF $\beta_3$ en EG..... | 144 |

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Valores sanguíneos normales del recuento leucocitario de bovinos adultos.....                                  | 37 |
| <b>Tabla 2.</b> Moléculas CD de superficie y los leucocitos correspondientes que se caracterizan por ellas.....                | 38 |
| <b>Tabla 3.</b> Cebadores específicos para los diferentes genes evaluados.....   | 60 |
| <b>Tabla 4.</b> Anticuerpos primarios, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de IHQ indirecta.....                | 65 |
| <b>Tabla 5.</b> Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de IHQ indirecta..... | 66 |
| <b>Tabla 6.</b> Anticuerpos primarios, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de IHQ indirecta para CD14.....      | 67 |

## Abreviaturas

|        |  |
|--------|--|
| °C     | Grados centígrados                           |
| µg     | microgramo                                   |
| µl     | microlitro                                   |
| µm     | micra  |
| µM     | micromolar                                   |
| ADN    | Ácido desoxirribonucleico                    |
| ADNc   | ADN copia                                    |
| AF     | Actividad fagocítica                         |
| AGNE   | Ácidos grasos no esterificados               |
| AMPs   | Péptidos antimicrobianos                     |
| ARN    | Ácido ribonucleico                           |
| ARNm   | Ácido ribonucleico mensajero                 |
| ATB    | Antibiótico                                  |
| BHB    | β-hidroxibutirato                            |
| BLAST  | Basic Local Alignment Search Tool            |
| BLASTn | Basic Local Alignment Search Tool nucleotide |
| CD     | Cúmulo de diferenciación                     |
| Cel    | Células                                      |
| CF     | Capacidad fagocítica                         |
| cm     | Centímetros                                  |
| c.s.p. | Cantidad suficiente para                     |
| Ct     | <i>threshold cycle</i>                       |
| DAB    | 3,3'-diaminobencidina                        |
| DAMPs  | Patrones moleculares asociados al daño       |
| DC     | Células dendríticas                          |
| DEPC   | Dietilpirocarbonada                          |
| Dil    | Dilución                                     |
| DMSO   | Dimetilsulfóxido                             |
| DNAasa | Desoxirribonucleasa                          |
| dNTPs  | Desoxirribonucleótidos                       |
| DPP    | Días posparto                                |

|                   |   |
|-------------------|---|
| Es                | Estroma   |
| EG                | Epitelio glandular  |
| EL                | Epitelio luminal  |
| FITC              | Isotiocianato de fluoresceína                               |
| FSC               | <i>Foward scatter</i>                                       |
| g                 | gramos  |
| GM-CSF            | Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos |
| h                 | horas   |
| H-E               | Hematoxilina-eosina   |
| IEP               | Intervalo entre partos                                      |
| IFN               | Interferón  |
| Ig                | Inmunoglobulina   |
| IHQ               | Inmunohistoquímica  |
| IL                | Interleuquina   |
| IPC               | Intervalo parto-concepción                                  |
| L                 | Litro   |
| LB                | Linfocitos B  |
| LPS               | Lipopolisacárido  |
| LT                | Linfocitos T  |
| LT reg            | Linfocitos T reguladores                                    |
| M                 | Molar   |
| M1                | Macrófagos proinflamatorios                                 |
| M2                | Macrófagos antiinflamatorios                                |
| Mcal              | Megacaloría   |
| MCP               | proteínas quimioatrayentes de monocitos                     |
| M-CSF             | Factor estimulante de colonias de macrófagos                |
| mg                | miligramos  |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloruro de magnesio   |
| min               | minutos   |
| ml                | mililitros  |
| MLG               | Modelo lineal generalizado                                  |
| mM                | milimolar   |

|                |  |
|----------------|--|
| <b>N°</b>      | Número   |
| <b>NaCl</b>    | Cloruro de sodio                                     |
| <b>NCBI</b>    | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| <b>NK</b>      | Natural Killer                                       |
| <b>nm</b>      | nanómetro  |
| <b>PAMPs</b>   | Patrones moleculares asociados a patógenos           |
| <b>pb</b>      | pares de bases                                       |
| <b>PBS</b>     | Buffer fosfato salino                                |
| <b>PCR</b>     | Reacción en cadena de la polimerasa                  |
| <b>PMN</b>     | Leucocitos polimorfonucleares                        |
| <b>PRRs</b>    | Receptores de reconocimiento de patrones             |
| <b>RPL-19</b>  | Proteína ribosomal L19                               |
| <b>ROS</b>     | Especies reactivas de oxígeno                        |
| <b>RT</b>      | Retrotranscripción                                   |
| <b>RT-qPCR</b> | PCR en tiempo real                                   |
| <b>seg</b>     | segundos   |
| <b>SFB</b>     | Suero fetal bovino                                   |
| <b>SSC</b>     | <i>Side scatter</i>                                  |
| <b>TA</b>      | Temperatura ambiente                                 |
| <b>Ta</b>      | Temperatura de anillado                              |
| <b>TGF</b>     | Factor de crecimiento transformante                  |
| <b>TLR</b>     | Receptores <i>Toll-like</i>                          |
| <b>TNF</b>     | Factor de necrosis tumoral                           |
| <b>T reg</b>   | Linfocitos T reguladores                             |
| <b>UFC</b>     | Unidades formadoras de colonias                      |
| <b>UV</b>      | Ultravioleta   |

## Resumen

Diferentes estudios han asociado los cambios metabólicos y hormonales ocurridos durante el periodo de transición de vacas lecheras con cambios inmunológicos y a nivel reproductivo. Sin embargo, este período de tiempo dista de la concepción inmediata posterior donde los animales transitan cambios y adaptaciones característicos de su condición de gravidez y aumento productivo. Es por ello que, el objetivo general de esta tesis fue caracterizar el perfil inmune endometrial y sistémico en vacas lecheras, más allá del período de transición, y establecer posibles asociaciones con el estado metabólico-hormonal de dichos animales durante la preñez y la lactancia. A nivel sistémico, aquellos animales que mostraron una menor capacidad fagocítica (CF) de monocitos/macrófagos, lograron la preñez con mayor celeridad. Si bien en este grupo la CF no se vio asociada al contexto metabólico y hormonal, los resultados demostraron que tanto la actividad como la capacidad fagocítica de monocitos/macrófagos se encontró asociada con los niveles metabólicos de  $\beta$ -hidroxibutirato, ácidos grasos no esterificados y glucosa; y con los niveles hormonales de  $17\beta$ -estradiol y progesterona, en diferentes puntos de la lactancia y la preñez cuando los animales lograron concebir más tardíamente. A nivel endometrial, el contexto dado por los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  e IL1RA y la presencia de macrófagos infiltrantes, podría estar asociado con condiciones peri-implantatorias claves para el logro de la preñez. De esta manera, el presente trabajo ha permitido conocer aquellos factores inmunológicos sistémicos y endometriales, durante el período cercano a la concepción, que podrían estar implicados en el logro de la preñez con mayor celeridad.

## Abstract

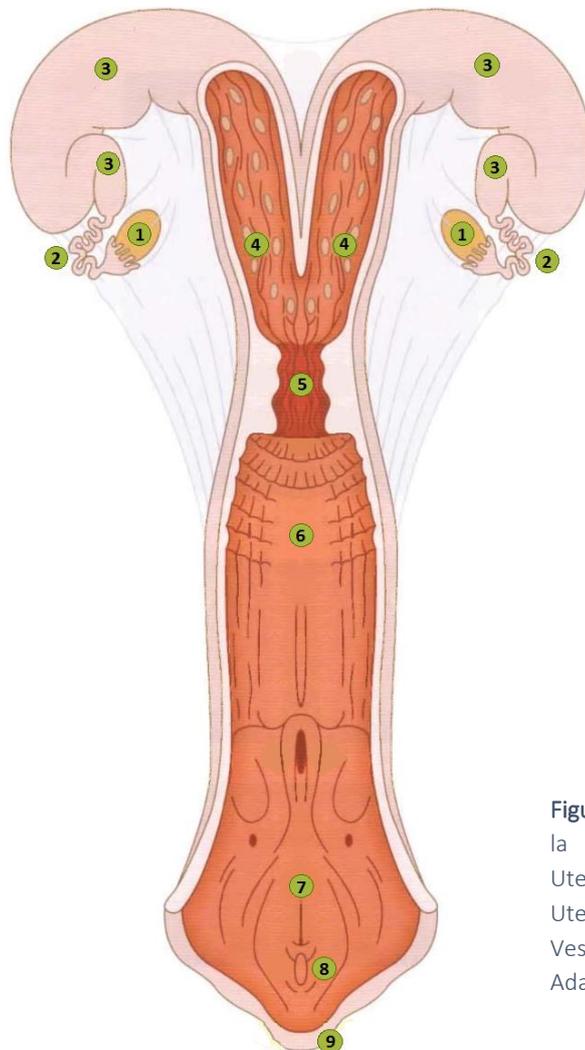
Several studies have associated the metabolic and hormonal changes that occur during the transition period of dairy cows with immunological changes and reproductive performance. However, this period of time is far from the subsequent conception where occur changes and adaptations in relation to pregnancy and increased production. For this reason, the general aim of this thesis was to characterize the endometrial and systemic immune profile in dairy cows, beyond the transition period, and to establish possible associations with the metabolic-hormonal status of these animals during pregnancy and lactation. At systemic level, those animals that showed a lower phagocytic capacity (FC) of monocytes/macrophages are pregnant early. Although in this group FC was not associated with the metabolic and hormonal context, the results showed that both phagocytic activity and phagocytic capacity of monocytes/macrophages were associated with metabolic levels of  $\beta$ -hydroxybutyrate, non-esterified fatty acids, and glucose; and with the hormonal levels of  $17\beta$ -estradiol and progesterone, at different points of lactation and pregnancy in animals that got pregnant later. At the endometrial level, the context given by the protein expression levels of IL1 $\beta$  and IL1RA and the presence of infiltrating macrophages could be associated with an important peri-implantation conditions for achieving pregnancy. In this way, the present study has allowed to know the systemic and endometrial immunological factors, during the period close to conception, that could be involved in achieving pregnancy more quickly.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Útero bovino: anatomía e histología.

### 1.1.1. Anatomía del útero bovino.

La reproducción es un proceso complejo en el que participa todo el organismo. El aparato reproductor de la hembra comprende: dos ovarios, glándulas reproductoras esenciales en las que se produce el óvulo; dos trompas uterinas (trompas de Falopio), que transportan el óvulo al útero y en las que se lleva a cabo la fertilización; el útero, lugar donde el huevo fecundado se convierte en embrión y por lo sucesivo en feto; la vagina, canal dilatado a través del cual el feto es expulsado desde el útero; el vestíbulo vaginal, segmento terminal del tracto genital en el que se abre la uretra; la vulva que representa el límite caudal; y el clítoris, homólogo al pene (Figura 1) (Sisson y Grossman., 1982).



**Figura 1.** Sistema reproductor bovino de la hembra. (1) Ovarios, (2) Trompas Uterinas, (3) Cuernos Uterinos, (4) Cuerpo Uterino, (5) Cérvix, (6) Vagina, (7) Vestíbulo Vaginal, (8) Clítoris, (9) Vulva. Adaptado de Dyce, 1999.

El **útero** consta de un cuello (cérvix), un cuerpo y dos cuernos. En el bovino el cuerpo es corto (3 o 4 cm de largo), comenzando inmediatamente después de que termina el cuello uterino. Los cuernos son más extensos (longitud media de 35 a 40 cm), y se ramifican desde el cuerpo, pero están unidos por peritoneo (tejido conjuntivo). El útero se puede dividir en tres capas: el perimetrio (capa serosa), el miometrio (capa muscular) y el endometrio (capa mucosa-submucosa) (Budras *et al.*, 2011). El **perimetrio** es la continuación del peritoneo abdominal en el útero. Está constituido por tejido conectivo laxo, muy vascularizado, con fibras musculares lisas que aparecen recubiertas por un mesotelio. 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 de tejido conectivo muy vascular. Ambas capas musculares aumentan de grosor durante la gestación. El **endometrio**, está justo a continuación del miometrio y consiste en un epitelio de revestimiento, glándulas tubulares y un tejido conjuntivo especial con muchas células y pocas fibras (estroma) (Mullins *et al.*, 2003; Welsch *et al.*, 2014). El endometrio presenta pliegues poco elevados, de disposición longitudinal y circular denominados carúnculas (Figura 2 D). Las mismas se distribuyen irregularmente sobre la superficie o se disponen en filas (Sisson y Grossman, 1982; Dyce, 1999). Estas estructuras, están altamente vascularizadas y se unen con las membranas fetales (cotiledones) durante la formación de la placenta (Hopper, 2014). La vascularización y grosor del endometrio, varían con las modificaciones de las hormonas sexuales y el estado de gestación. La mucosa del cuerpo uterino es más lisa y conduce hacia el cérvix por medio de una constricción o estrechamiento que corresponde al orificio uterino interno. El cérvix tiene unos 10 cm de largo y su pared es muy gruesa. Su luz, el canal cervical, es espiralado y en general grueso y difícil de dilatar; está claramente separado del cuerpo del útero y de la vagina. La luz del cérvix se cierra por una serie de proyecciones irregulares de su superficie que engranan entre si y sellan eficazmente el entorno externo del entorno uterino interno. No existen glándulas en el cérvix, pero 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, 1999; Hopper, 2014).

### 1.1.2. 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 denominadas zona funcional y zona basal (Figura 2 A). La zona funcional se transforma y regenera en cada ciclo estral, mientras que la zona basal

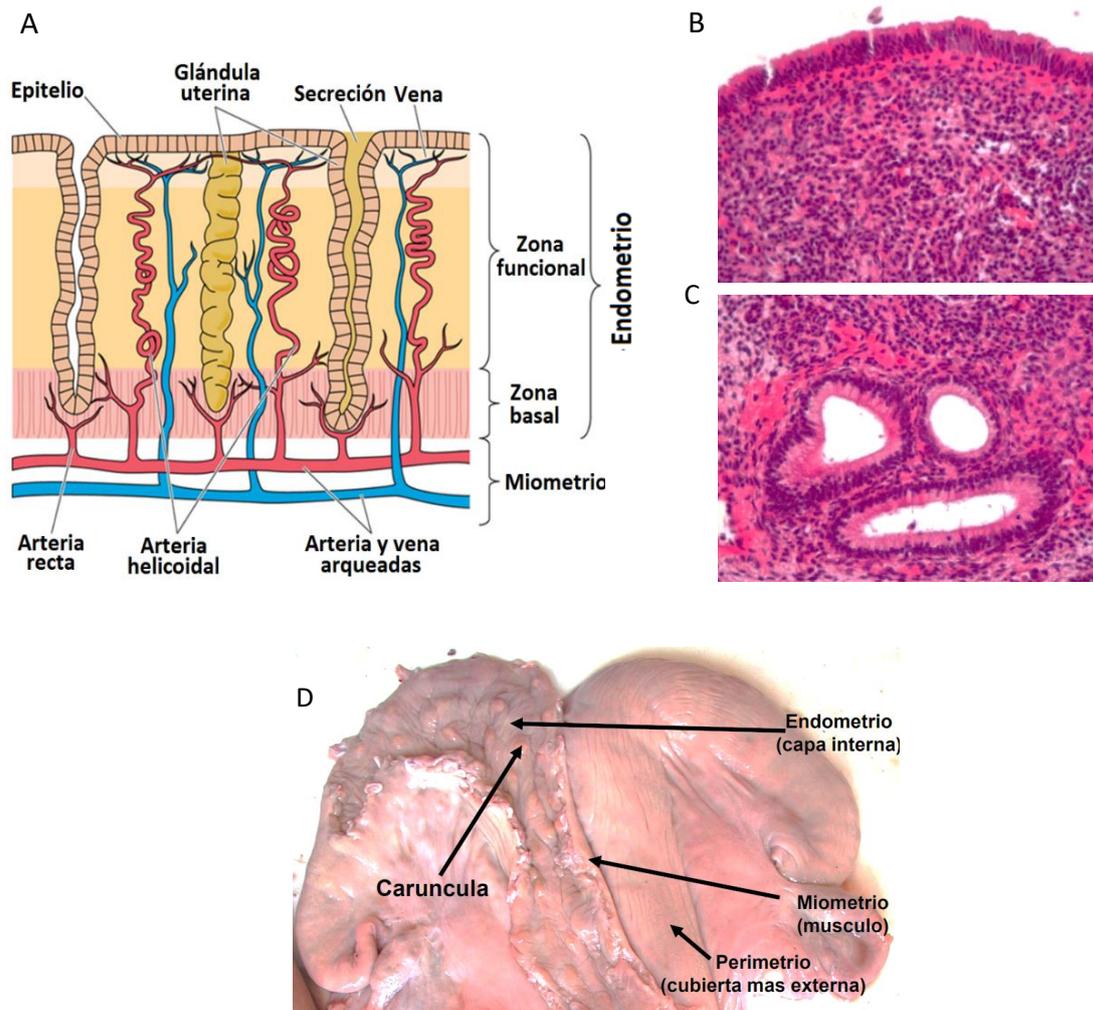
permanece y constituye la base para regenerar cíclicamente el endometrio (Dellmann, 1994; Simón *et al.*, 2009).

El **epitelio endometrial**, está constituido por un epitelio luminal (EL) (Figura 2 B), y otro glandular (EG) (Figura 2 C). 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 *et al.*, 2009). En rumiantes el EL es cilíndrico pseudoestratificado y/o cilíndrico simple. La altura y la estructura de las células epiteliales están relacionadas con la secreción de hormonas ováricas a lo largo del ciclo (Dellmann, 1994). Las células del EL producen una secreción proteica que forma una cubierta superficial, y también pueden transportar iones y líquido (Welsch *et al.*, 2014). En cuanto al EG, es un epitelio cilíndrico simple que forma glándulas tubulares, simples, espiraladas y ramificadas (Sisson y Grossman, 1982). Las glándulas uterinas aumentan en número y tamaño a medida que la fase secretora avanza. Su función es la producción y secreción de moléculas necesarias para la nutrición e implantación del ovocito fecundado (Dellmann, 1994; Simón *et al.*, 2009).

El **estroma endometrial** (Es) (Figura 2, B y C) es un tejido conjuntivo compuesto por células y matriz extracelular. El tipo celular que compone mayoritariamente el estroma es el fibroblasto y está implicado en la remodelación de la matriz extracelular a lo largo del ciclo, principalmente en la fase lútea mediante un proceso dirigido a regular y facilitar la implantación del óvulo fecundado (Dellmann, 1994; Simón *et al.*, 2009).

El **compartimiento vascular** intrauterino está compuesto por una intrincada red que 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 *et al.*, 2009).

El endometrio, además, contiene **células del sistema inmunológico** que 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. Esta población está formada fundamentalmente por neutrófilos, macrófagos y linfocitos que ingresan desde el torrente sanguíneo (Dellmann, 1994; Simón *et al.*, 2009).



**Figura 2.** (A) Zona basal y funcional del endometrio uterino. Adaptado de Gartner y Hiatt, 2005. (B) Vista de epitelio luminal y estroma en corte de tejido endometrial. Útero, bovino; H-E; 400X. (C) Vista de epitelio glandular y estroma en corte de tejido endometrial. Útero, bovino; H-E; 400X. (D) Útero bovino normal con presencia de carúnculas.

## 1.2. Salud uterina y respuesta inmune.

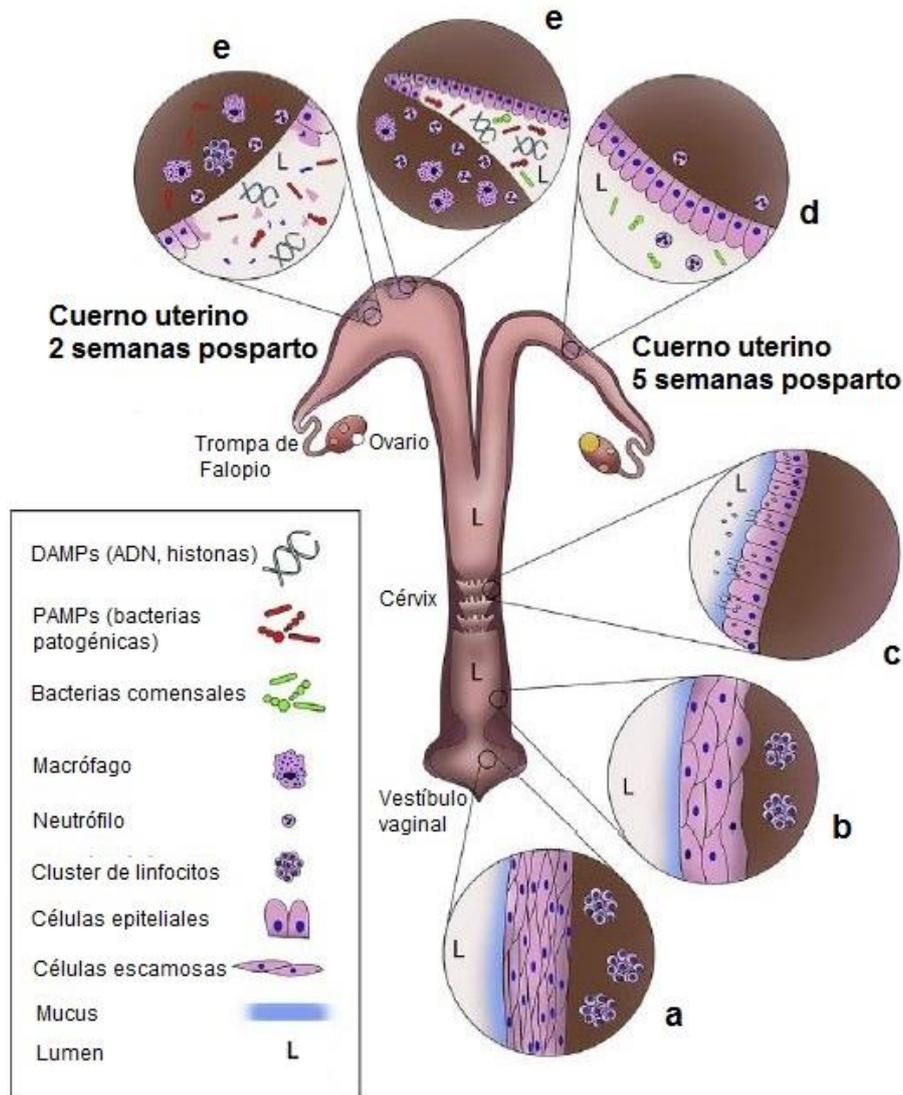
### 1.2.1. Mecanismos de defensa uterina.

#### 1.2.1.1. Células epiteliales.

El recubrimiento epitelial de la mucosa del tracto genital ofrece un mecanismo de defensa físico contra la inserción y la invasión microbiana. El tipo de epitelio de la mucosa y el grosor de esta capa varía con la ubicación anatómica, que responde a las diferentes necesidades fisiológicas (Figura 3). Un epitelio estratificado en el vestíbulo y la vagina es importante ya que estos sitios

son los primeros en ser desafiados por bacterias de origen fecal, uterino y ambiental (Blazquez *et al.*, 1987). El amplio desarrollo de la mucosa cervical agrega otra barrera física a la entrada microbiana en el útero (Figura 3, a, b y c). En contraste con el vestíbulo y la vagina, el epitelio se limita a una sola capa de células en el cuello uterino, el útero y las trompas (Figura 3, d y e) (Kojima y Selander, 1970 a, b; Mokhtar, 2015).

El mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial es un componente clave de la involución uterina durante el período posparto. La falta de un epitelio intacto que proteja las carúnculas durante las primeras dos semanas después del parto puede contribuir a una mayor susceptibilidad a infecciones (como la metritis) durante este período. Como resultado, la regeneración del epitelio uterino aparece primero en la periferia de las regiones carunculares y luego de 30 días posparto, cubre completamente las paredes internas del útero (Wagner *et al.*, 1969).



**Figura 3.** Componentes físicos del mecanismo de defensa inmune postparto en el tracto genital bovino. La abertura vulvar actúa como el portal de entrada y salida de contaminantes microbianos. Múltiples capas epiteliales en el vestíbulo (a) y la vagina (b) impiden la entrada de bacterias en estos sitios anatómicos a menos que se haya producido una herida durante el parto. El cuello uterino (c), aunque todavía está dilatado después del parto, proporciona otra barrera a la entrada de microbios en el útero debido al plegamiento epitelial y la secreción de moco que fluye hacia la vagina. Alrededor de la segunda semana postparto, la barrera epitelial uterina cilíndrica simple se rompe en las carúnculas debido a la muerte de las células epiteliales (e). Durante las siguientes tres semanas, el útero responde a la contaminación microbiana y la colonización mientras se restablece la integridad de la barrera epitelial (d). Adaptado de Dadarwal *et al.*, 2017.

Las células epiteliales del tracto genital bovino, de la misma manera que las células inmunes, tienen la capacidad de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs del inglés, *damage-associated molecular patterns*) a través de una variedad de receptores de reconocimiento de dichos patrones (PRRs del inglés, *pattern-recognition receptors*) (Figura 4 A). La mayoría de los estudios que analizan las respuestas a los PAMPs y DAMPs en el tracto genital

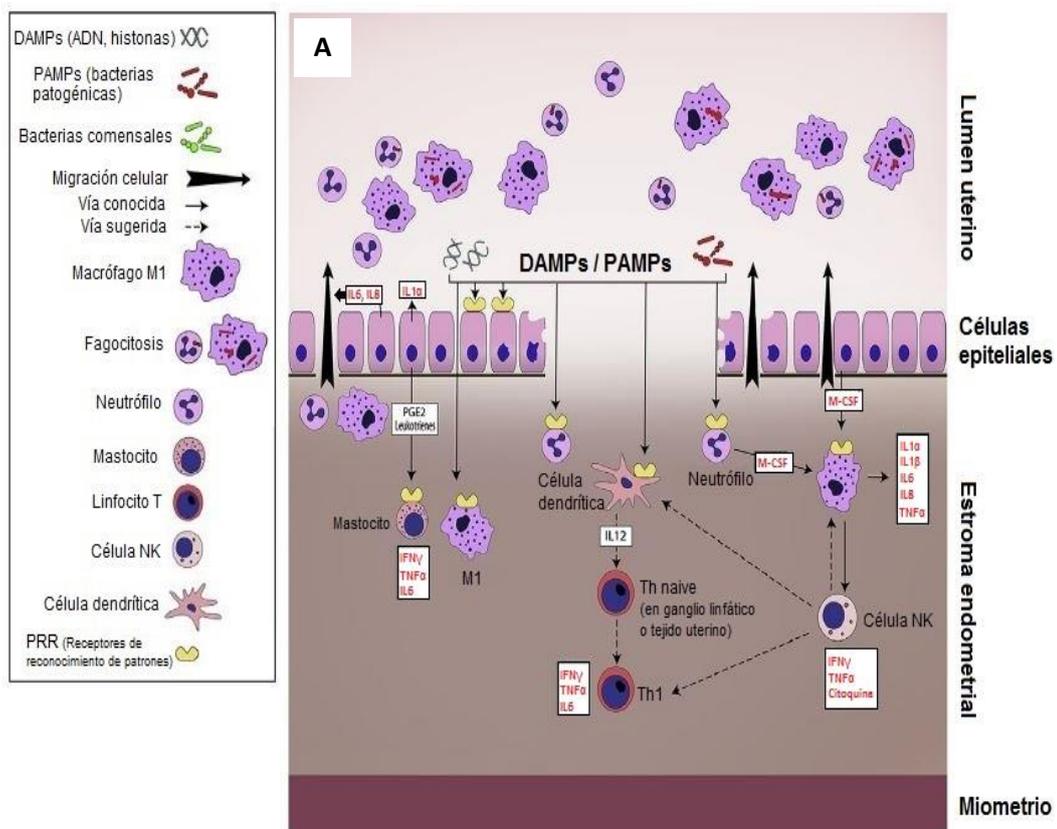
se han centrado principalmente en el útero. Las células epiteliales y estromales del endometrio bovino expresan gran variedad de los receptores *Toll-like* (TLR) (Davies *et al.*, 2008). Si bien los TLR son los PRRs más abundantes y descritos en el útero bovino, existen otros receptores que reconocen PAMPs y DAMPs en el epitelio genital del tracto, pero hasta el momento no se han estudiado en detalle (Pinedo *et al.*, 2013). El reconocimiento de DAMPs o PAMPs en el tracto genital de la hembra bovina es crucial para responder a los contaminantes ambientales, incluidos los patógenos y los desechos celulares durante el período de involución uterina (Figura 4 B).

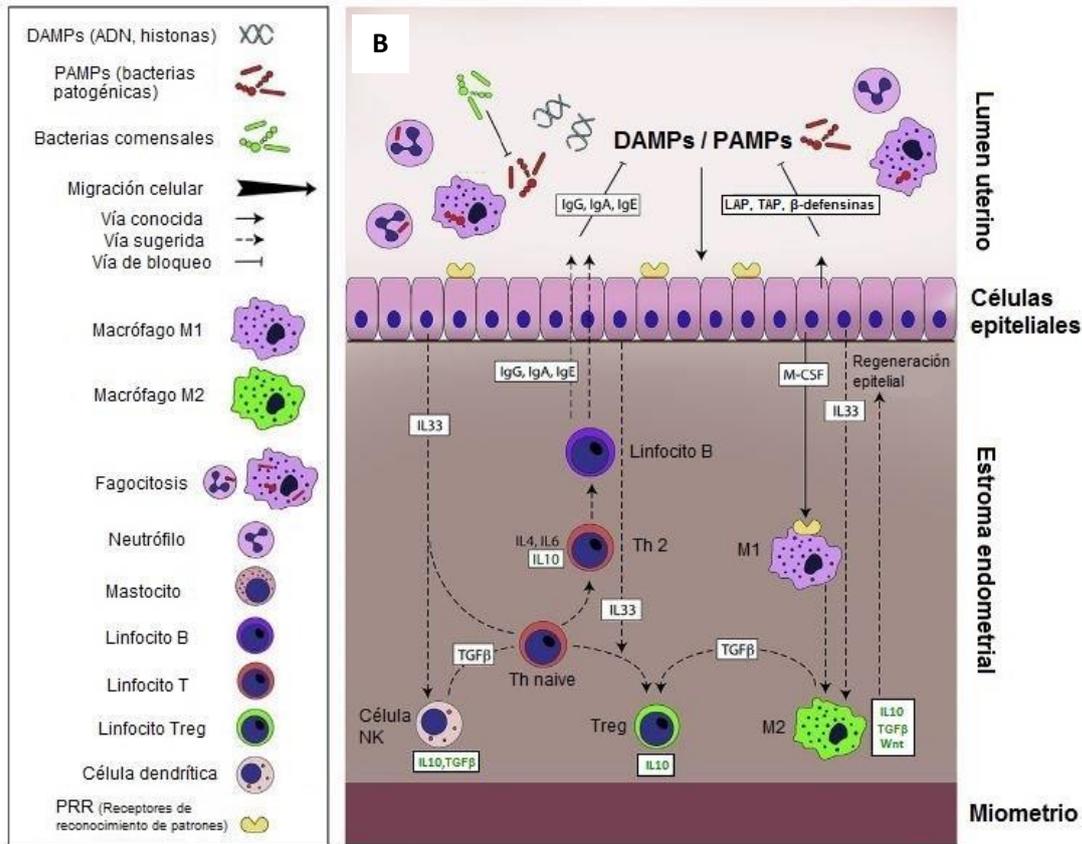
A través de un análisis transcriptómico de tejido endometrial, se observa un cambio temporal de la respuesta proinflamatoria luego de la tercera semana posparto, debido al aumento de la expresión de genes implicados en la regeneración y reparación epitelial (Foley *et al.*, 2012). Sin embargo, la presencia de inflamación uterina diagnosticada clínicamente se asocia con el aumento en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias, también denominadas interleuquinas (IL), que incluyen la IL1 $\beta$ , IL6, IL8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Herath *et al.*, 2009; Gabler *et al.*, 2010; Ghasemi *et al.*, 2012). Para provocar una respuesta inflamatoria, las células endometriales requieren la estimulación bacteriana y, además, el aumento de la secreción de IL1 $\alpha$  para promover el reconocimiento de los DAMPs liberados de las células necróticas (Healy *et al.*, 2015). Sin embargo, este puede ser uno de los múltiples mecanismos mediante los cuales las células epiteliales endometriales responden a los DAMPs.

Las células epiteliales del tracto genital también pueden actuar como células inmunes efectoras cuando son desafiadas por bacterias. Las secreciones de las células epiteliales del tracto genital contienen una variedad de péptidos y proteínas que poseen propiedades antimicrobianas no específicas y actúan como reguladores de la inflamación (Figura 4 B). El mecanismo exacto por el que se controla la secreción de estos péptidos antimicrobianos (AMPs del inglés, *antimicrobial peptides*) no está claro, pero existen reportes que indican que su secreción está modulada por citoquinas como IL1 e IL17 (Kolls *et al.*, 2008). Durante el período posparto, el útero inflamado responde aumentando la secreción de distintos AMPs en diferentes momentos, en comparación con un útero sano (Ibrahim *et al.*, 2016). Esta producción diferencial de péptidos antimicrobianos a lo largo del tiempo podría deberse a diferencias en el tipo de desafío bacteriano, es decir, a las especies bacterianas que invaden el tracto genital bovino (Dadarwal *et al.*, 2017).

Las células epiteliales endometriales no sólo pueden funcionar como sensores y efectores inmunológicos, sino que también pueden actuar como reguladores de la función de las células inmunes a través de la secreción de citoquinas (Figura 4 A). Las citoquinas, como la IL8, son potentes factores quimiotácticos de neutrófilos (MacKintosh *et al.*, 2013), y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) secretado por las células epiteliales es necesario para la maduración de los

macrófagos a nivel local (De Moraes *et al.*, 1999). Además, la IL6 liberada en la superficie apical de las células epiteliales endometriales bovinas también puede desempeñar un papel en el reclutamiento de neutrófilos (Healy *et al.*, 2015) y, en etapas posteriores de la involución uterina, puede influir en la migración de monocitos o macrófagos (Hurst *et al.*, 2001). Las células epiteliales también pueden secretar IL33 (un miembro de la familia IL1), que podría activar a las células *Natural Killer* (NK), linfocitos T (LT) colaboradores y macrófagos de un fenotipo antiinflamatorio para facilitar la regulación de la inflamación uterina (Figura 4 A) (Liew *et al.*, 2016).





**Figura 4.** Mecanismos conocidos (flechas sólidas) y propuestos (flechas de puntos) para la progresión (A) y resolución (B) de la inflamación uterina en la vaca posparto. Las citoquinas en texto rojo y verde indican que participan en mecanismos pro y antiinflamatorios, respectivamente. (a) En el período posparto temprano, los DAMPs que surgen de la separación placentaria y la regeneración tisular y los PAMPs de organismos patógenos y contaminantes ambientales son reconocidos por los PRRs presentes en células epiteliales. La activación de los PRRs resulta en la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas (IL6 e IL8) que reclutan neutrófilos y macrófagos en la luz uterina. La liberación del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF del inglés, Macrophage Colony-Stimulating Factor) a partir de células epiteliales activa a los macrófagos residentes (M1) para liberar citoquinas proinflamatorias (IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL8, TNF $\alpha$ ) y ayudar a los neutrófilos en la fagocitosis. Las células epiteliales pueden desencadenar la degranulación de los mastocitos mediante la secreción de prostaglandinas. La barrera epitelial dañada del útero posparto puede permitir que PAMPs y DAMPs penetren en el tejido conectivo subepitelial y activen directamente las células dendríticas (DC del inglés, dendritic cell), los neutrófilos y los macrófagos residentes. Las DC activadas secretan IL12 que puede activar los linfocitos T que residen en el tejido uterino o en los ganglios linfáticos asociados para secretar citoquinas proinflamatorias (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL6). La resolución de procesos inflamatorios uterinos (b) puede involucrar tanto células epiteliales como una variedad de células inmunes, incluyendo macrófagos antiinflamatorios (M2), linfocitos T reguladores (LTreg), células NK y posiblemente bacterias comensales. Las células epiteliales pueden reducir la inflamación directamente al secretar péptidos antimicrobianos e IL33. La IL33 secretada por las células epiteliales y los macrófagos proinflamatorios M1 en las últimas etapas de la inflamación promueve la diferenciación de los macrófagos hacia un fenotipo M2 y la diferenciación de los LT a los LTreg. Los linfocitos B responden a los antígenos bacterianos secretando inmunoglobulinas que se transportan a la superficie del endometrio para facilitar la opsonización bacteriana y la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos. Las células NK inicialmente comienzan con un perfil proinflamatorio y luego progresan hacia un perfil antiinflamatorio. La resolución de la inflamación también puede estar respaldada por IL-10 y la secreción del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) de macrófagos M2, LTreg y células NK. Adaptado de Dadarwal *et al.*, 2017.

### 1.2.1.2. Leucocitos.

Los neutrófilos participan en la respuesta inmune innata del tracto genital bovino durante el período posparto, y son las células más estudiadas. Durante las primeras tres semanas después del parto, el útero bovino sufre una exposición repetida a noxas biológicas ambientales. No está claro si los DAMPs o los PAMPs son los que inician el proceso proinflamatorio durante la involución uterina (proceso que será abordado en detalle más adelante), pero cualquiera de estas señales puede inducir la liberación de citoquinas de las células epiteliales y otras células inmunes que atraen a los neutrófilos (Figura 4 A) (Dadarwal *et al.*, 2017).

Durante la primera semana posparto hay un marcado reclutamiento de neutrófilos que se relaciona estrechamente con una mayor secreción de citoquinas observada en vacas clínicamente sanas hasta los 24 días de lactancia (Gabler *et al.*, 2010). Con el tiempo, los niveles de neutrófilos disminuyen progresivamente hasta que la involución uterina está completa (Brodzki *et al.*, 2014). Por el contrario, las vacas posparto que no resuelven la infección uterina muestran una infiltración sostenida de neutrófilos en el endometrio y la luz uterina. Algunos estudios han informado que el aumento de neutrófilos en el útero posparto infectado se asocia con una disminución de la capacidad fagocítica de estas células en comparación con los neutrófilos aislados del útero bovino no inflamado (Mateus *et al.*, 2002; Brodzki *et al.*, 2014).

Los monocitos y macrófagos desempeñan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune durante la preñez y la lactancia, en la mayoría de las especies. Están involucrados en todas las etapas de la gestación, incluyendo la implantación, el mantenimiento de la preñez y el parto, y muestran una regulación dinámica en directa relación con el período de gestación (Oliveira *et al.*, 2013; Gomez-Lopez *et al.*, 2014; Leno-Durán *et al.*, 2014; Schumacher *et al.*, 2018). Los macrófagos están involucrados en la fagocitosis, la presentación antigénica y la regulación de la inflamación uterina (Hansen, 2013). Al igual que para los neutrófilos, se ha observado una reducción de la capacidad fagocítica de los macrófagos recuperados de las úlceras uterinas inflamadas postparto en comparación con los macrófagos obtenidos de úteros saludables (Brodzki *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que una subpoblación de macrófagos tiene un fenotipo antiinflamatorio y funciones que promueven la remodelación tisular y la regulación inmunitaria durante la preñez en bovinos (Oliveira *et al.*, 2010). Sin embargo, es posible que macrófagos con fenotipo proinflamatorio, activados por interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y lipopolisacárido (LPS) bacteriano, predominen durante la primera parte de la involución uterina y posean la función de fagocitar

agentes bacterianos (Figura 4 A). Una vez que se han eliminado las bacterias, los macrófagos antiinflamatorios, activados por IL4 e IL33, actuarían durante las últimas etapas de la involución uterina promoviendo la regeneración tisular (Figura 4 B). Estos dos tipos de macrófagos son cruciales para la activación y regulación de las respuestas inmunitarias mediadas por los LT (Hashimoto *et al.*, 2011).

Las células NK, otro componente importante del sistema inmune innato, también se han identificado en el útero bovino (Oliveira *et al.*, 2013). Si bien se sabe que estas células son importantes durante la preñez, su relevancia funcional para la inmunidad uterina durante el período posparto es actualmente desconocida. Teniendo en cuenta su papel observado en la remodelación vascular durante la gestación en humanos y ratones (Zhang *et al.*, 2011), las células NK podrían estar involucradas en el proceso de regeneración epitelial en vacas posparto.

En todo el tracto genital bovino se encuentran nódulos linfoides aislados o agregados linfoides. Se cree que los que están en el estroma subepitelial son posibles sitios de inmuno-inducción y que el tipo predominante de células inmunes que comprenden estos nódulos o agregados dentro del tracto genital son grupos de linfocitos B (LB) y LT (Corbeil *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2013). La importancia de los LB en la inmunidad del tracto genital es evidente a partir de los niveles elevados de inmunoglobulina (Ig) G e IgA en el moco cérvico vaginal (Corbeil *et al.*, 1974; Mulira y Saunders, 1994; Dhaliwal *et al.*, 1996; Agnew *et al.*, 2008), e IgA, IgE e IgG en el útero (Corbeil *et al.*, 1974, 2005; Watson *et al.*, 1990; Butt *et al.*, 1993). Estos anticuerpos pueden actuar en la opsonización bacteriana, facilitando la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos.

Los LT colaboradores que expresan CD4 y los LT citotóxicos que expresan CD8, se localizan principalmente en las áreas perivasculares del tejido estromal uterino (Oliveira *et al.*, 2013). Los LT que expresan el receptor  $\gamma\delta$  son abundantes en los tejidos de la mucosa bovina y también se localizan principalmente en las áreas perivasculares del tejido estromal uterino bovino (Oliveira *et al.*, 2013). Los LT ocasionalmente se sitúan dentro de la capa epitelial de las glándulas uterinas bovinas y dentro de la luz uterina (Oliveira *et al.*, 2013). Los LT  $\gamma\delta$  también pueden estar involucrados en la regulación de la respuesta inmune del útero, ya que expresan tanto citoquinas proinflamatorias (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) como antiinflamatorias (IL10 y el factor de necrosis tumoral beta (TGF $\beta$ )) (Fox *et al.*, 1998).

Los mastocitos, otro tipo de leucocitos residentes, también se identificaron dentro del tracto genital (Eren *et al.*, 2010). Estas células son un componente frecuentemente ignorado pero significativo del sistema inmune presente a nivel local. Un estudio reciente indicó que existe un aumento de la degranulación de los mastocitos desencadenada por IgE en el útero de las vacas

posparto diagnosticadas con metritis (Wang *et al.*, 2016). La activación y la degranulación de los mastocitos durante el período posparto temprano podría iniciarse con la prostaglandina E, los PAMPs y los leucotrienos producidos por las células epiteliales endometriales (Theoharides *et al.*, 2012). Los mastocitos, además de la liberación de histamina durante la degranulación, liberan citoquinas tales como IL6, IL8, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  participando de esta manera en el reclutamiento de otras células inmunes en respuesta a las mismas (Theoharides *et al.*, 2012; Dadarwal *et al.*, 2017).

### 1.2.2. Microflora uterina.

El cuerpo de los mamíferos, provee un hábitat favorable para una gran cantidad y variedad de microorganismos. Esta gran mezcla de microorganismos adaptada al cuerpo del animal recibe el nombre de microflora. La microflora normal comprende principalmente bacterias, además de hongos y protozoos que viven dentro o sobre el animal sin producir enfermedad, incluyendo microorganismos saprófitos, patógenos potenciales y oportunistas. Es esencial tener algún conocimiento de la microflora normal para poder juzgar el significado probable de los gérmenes aislados. La clase y número de microorganismos de la microflora normal uterina varían ampliamente en distintas circunstancias según sean hembras adultas clínicamente sanas, gestantes, en puerperio o con infecciones clínicas. Asimismo, dicha microflora va a depender de la edad del animal y de las condiciones ambientales (Espinoza-Santillán *et al.*, 2016).

Muchos gérmenes que forman parte de la microflora normal del aparato reproductor de vacas clínicamente sanas, pueden transformarse en patógenos cuando la resistencia local y general del animal se debilita y se rompe el equilibrio biológico. Estas especies de bacterias aisladas en el cérvix y el útero poseen el carácter de patógenos facultativos u oportunistas. También en el endometrio de vacas clínicamente sanas se ha podido demostrar que la microflora normal actúa como un factor de defensa primaria del hospedador siendo probable que pueda protegerlo de la invasión de gérmenes patógenos por mecanismos de competición (Fernández y Dimoso, 1984; Espinoza-Santillán *et al.*, 2016).

La contaminación bacteriana del útero a partir de la microflora vaginal, fecal y ambiental se produce en la segunda o tercera semana después del parto debido a la relajación de las barreras físicas. Los eventos de presión negativa creados por la contracción uterina repetida y la relajación durante el parto, aumentan la contaminación bacteriana debido a un efecto de vacío. Independientemente de las circunstancias, las bacterias Gram negativas predominan en todos los úteros bovinos durante la primera semana después del parto y son reemplazadas gradualmente

por bacterias Gram positivas durante la segunda y tercera semana del posparto (Hussain *et al.*, 1990). Existe un proceso dinámico mediante el cual las bacterias ingresan, y luego son eliminadas por mecanismos de defensa uterina. Eventualmente, los últimos vestigios de contaminación bacteriana se eliminan en la mayoría de las vacas al final de la cuarta semana del posparto (Hussain *et al.*, 1990).

Las especies bacterianas que han sido reconocidas como patógenos uterinos no específicos incluyen *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* y *Prevotella melaninogenicus* (Hussain *et al.*, 1990; Bonnett *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 2005; Sens y Heuwieser, 2013; Brodzki *et al.*, 2014; Wagener *et al.*, 2014). Entre estos, *E. coli* es el patógeno uterino no específico predominante asociado con metritis bovina durante la primera semana posparto (Hussain *et al.*, 1990; Bonnett *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 2005; Brodzki *et al.*, 2014). Por el contrario, *T. pyogenes* predomina durante la segunda y tercera semana después del parto convirtiéndose en la principal bacteria asociada con metritis durante este período, y con la endometritis después de la cuarta semana del posparto (Hussain *et al.*, 1990; Bonnett *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 2005; Brodzki *et al.*, 2014; Wagener *et al.*, 2014). El aislamiento de *T. pyogenes* en la segunda semana del postparto también se asoció con un mayor riesgo de desarrollar endometritis en la cuarta semana postparto (Sens y Heuwieser, 2013; Dadarwal *et al.*, 2017).

### 1.2.3. Involución uterina en bovinos.

Durante las primeras semanas posparto, el útero retorna a un estado normal, no preñado. Este proceso denominado involución, se caracteriza por una disminución en el tamaño del útero y la restauración de los tejidos (LeBlanc, 2012; Swangchan-Uthai *et al.*, 2012). Durante este proceso existen múltiples mecanismos inmunológicos locales que facilitan el retorno de las funciones fisiológicas a un estado homeostático (Velázquez *et al.*, 2019). Las células epiteliales que recubren el aparato reproductor, junto con las células inmunitarias especializadas presentes en el endometrio, son las encargadas de activar diferentes mecanismos de respuesta local (Wagner *et al.*, 1969; Turner *et al.*, 2014; Dadarwal *et al.*, 2017). Entre ellos, la síntesis y producción de citoquinas, como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6, y también de quimiocinas, como la IL8 (Hammon *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008; Cronin *et al.*, 2012; Perter *et al.*, 2015). El TNF $\alpha$  es un mediador central de las respuestas inflamatorias de fase aguda y aumenta la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular (Fahey *et al.*, 2005). La IL6 regula la transición de la inflamación temprana dominada por neutrófilos a procesos dominados por macrófagos (Janeway, 2001) y la

IL8 coordina la migración de neutrófilos al sitio de la lesión o infección (Quayle, 2002). 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 *et al.*, 2009). Si bien, es de esperarse que esta inflamación se resuelva, durante este periodo, son frecuentes las enfermedades infecciosas que prolongan el tiempo requerido para la restauración uterina y, por lo tanto, comprometen la fertilidad posterior de los animales (Preisler *et al.*, 2000a; Gilbert, 2019; Velázquez *et al.*, 2019).

Las enfermedades infecciosas recurrentes que aparecen en el posparto, además de impactar en el bienestar animal, impactan económicamente en la industria láctea (Mulligan y Doherty, 2008; Leblanc, 2010; Cattaneo *et al.*, 2013). Es decir, que el comportamiento reproductivo de las vacas en el postparto, juega un importante papel en el éxito reproductivo del rodeo y, por tanto, influye en la producción y el beneficio económico de la empresa agropecuaria. Este comportamiento reproductivo ha sido evaluado a través de parámetros específicos como el Intervalo entre Partos (IEP), el Intervalo parto concepción (IPC), entre otros índices. Las vacas deben parir a intervalos que permitan maximizar la producción lechera del rodeo y la producción individual en toda la vida de la vaca (Forero, 2004; Recce, 2013). IEP o IPC muy largos, incrementan el número de días abiertos, el mantenimiento y alimentación de vacas en periodos de baja productividad, gastos en semen por inseminaciones infructuosas y servicios profesionales adicionales. En relación a los días abiertos en vacas normales, están compuestos por el puerperio fisiológico y el período de espera voluntario. Los primeros son los días necesarios para que el útero involucre y aparezca un primer celo después del parto, mientras que el segundo es un periodo que no es menor a 45 días y que no debería superar los 60 días. Es por esto, que los animales son liberados a servicio alrededor de los 60 días posteriores al parto. El periodo de espera voluntario no puede ser modificado sustancialmente ya que responde a variables fisiológicas (Recce, 2013). Por lo expuesto anteriormente, se debe lograr que los animales tengan un puerperio óptimo, controlando rápidamente los factores que puedan impactar a nivel reproductivo y como consecuencia, a nivel productivo (Recce, 2013).

### 1.3. Parámetros hematológicos, metabólicos y hormonales. Relación con la inmunidad.

### 1.3.1. Parámetros hematológicos.

El análisis de parámetros hematológicos es importante debido al rol que desempeñan los componentes sanguíneos en la definición del estado de salud de todo organismo. La sangre es un tejido conjuntivo especial, compuesto por células y una sustancia intercelular líquida (plasma sanguíneo). Las células de la sangre, que se originan en la médula ósea, consisten en los eritrocitos (hematíes o glóbulos rojos), los leucocitos (glóbulos blancos, a los que ya hemos hecho referencia), y los trombocitos (plaquetas) (Welsch *et al.*, 2014).

Los leucocitos, como se ha mencionado en secciones previas, participan esencialmente en el tejido conjuntivo e infiltrándose en otros tejidos. Las alteraciones en el recuento de los mismos en circulación, en comparación con los valores normales de referencia, es indicativo de la presencia de alguna enfermedad o proceso inflamatorio. Por ello, el hemograma es una de las pruebas diagnósticas más utilizadas para detectar trastornos en la sangre, así como también identificar infecciones. Los valores normales para la especie bovina se presentan en la tabla 1 (Welsch *et al.*, 2014).

La preñez y la lactancia son diferentes etapas fisiológicas en el que se registra una gran variación en los parámetros hematológicos, como por ejemplo en el recuento de los leucocitos (Iriadam, 2007; Chandra *et al.*, 2012). En algunas especies se ha demostrado que los leucocitos aumentan durante las últimas dos semanas de preñez y dicho incremento es significativo sólo el día del parto. Luego, el recuento de leucocitos disminuye gradualmente durante el período posparto (Jain, 1993; Azab y Abdel-Maksoud, 1999).

**Tabla 1.** Valores sanguíneos normales del recuento leucocitario de bovinos adultos. Adaptado de Jones y Allison, 2007.

| LEUCOCITOS                       |              |           |
|----------------------------------|--------------|-----------|
| Células blancas totales/ $\mu$ l | 4000 - 12000 | -         |
| <i>Neutrófilos en banda</i>      | 0 - 120      | 0 - 2 %   |
| <i>Neutrófilos segmentados</i>   | 600 - 4000   | 15 - 45 % |
| <i>Linfocitos</i>                | 2500 - 7500  | 45 - 75 % |
| <i>Monocitos</i>                 | 25 - 840     | 2 - 7 %   |
| <i>Eosinófilos</i>               | 0 - 2400     | 0 - 20 %  |
| <i>Basófilos</i>                 | 0 - 200      | 0 - 2 %   |

En cuanto a su morfología y funciones, los **leucocitos** conservan su núcleo incluso en el estado diferenciado. Se ocupan de la defensa contra los microorganismos patógenos y alérgenos. Se clasifican teniendo en cuenta el tamaño celular, la morfología nuclear, el contenido de gránulos típicos y la cantidad de citoplasma. Incluyen a las células polimorfonucleares (PMN) (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y las mononucleares (linfocitos y monocitos). Una clasificación moderna de los leucocitos tiene su fundamento en diversas moléculas de la superficie de estas células y recibe el nombre de clasificación CD (cúmulo de diferenciación). Dicha clasificación permite la detección de un tipo leucocítico determinado según una molécula superficial CD (Tabla 2) (Núñez Ochoa y Bouda, 2007; Welsch *et al.*, 2014).

**Tabla 2.** Moléculas CD de superficie y los leucocitos correspondientes que se caracterizan por ellas.  
Adaptado de Welsch, 2014.

| Moléculas de la superficie | Tipos celulares                    |
|----------------------------|------------------------------------|
| CD3                        | Linfocitos T                       |
| CD4                        | Linfocitos T colaboradores         |
| CD8                        | Linfocitos T citotóxicos           |
| CD21                       | Linfocitos B y células dendríticas |
| CD56                       | Linfocitos NK                      |
| CD14                       | Macrófagos y monocitos             |
| CD138                      | Neutrófilos                        |

Al igual que todas las células de la sangre, los leucocitos derivan de células madres y células progenitoras de la médula ósea. Como células maduras, los leucocitos actúan principalmente fuera de la sangre, es decir que sólo se transportan en la sangre y deben abandonarla para poder cumplir su función en los tejidos. Los leucocitos en la sangre constituyen sólo el 1% del volumen sanguíneo. El recuento diferencial (Tabla 1) comprende la porción cuantitativa de los tipos de leucocitos individuales en porcentaje, donde la cantidad total de los leucocitos corresponde al 100% (Núñez Ochoa y Bouda, 2007; Welsch *et al.*, 2014).

Los **neutrófilos** maduros (Figura 5 A) son células de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro con un núcleo segmentado y un citoplasma que se tiñe de color rosa o violeta tenue, al usar la coloración hematoxilina-eosina (H-E), debido a la gran cantidad de gránulos citoplasmáticos. Los neutrófilos desempeñan un papel fundamental en la reacción inflamatoria aguda y son el tipo de célula polimorfonuclear más abundante. Su función más importante es la fagocitosis y eliminación de diferentes microorganismos, principalmente bacterias. Esta fagocitosis ocurre en los tejidos, de

modo que los neutrófilos primero deben introducirse en ellos (diapédesis) desde los vasos (vénulas poscapilares) y luego orientar su migración hacia el foco patológico por quimiotaxis (Núñez Ochoa y Bouda, 2007; Welsch *et al.*, 2014).

Los **eosinófilos** (Figura 5 B) son células cuyo tamaño promedio es de 12 a 13  $\mu\text{m}$ . Se identifican fácilmente por sus gránulos relativamente grandes, redondos, refráctiles, con aspecto de rubíes y coloración fuerte (rosados o rojos) por su afinidad a la eosina. El citoplasma es celeste y el núcleo es bilobulado, aunque es más frecuente el núcleo en banda. Esta población de PMN posee un rol importante en la defensa contra los parásitos y participan en la regulación de reacciones alérgicas e inflamatorias (Núñez Ochoa y Bouda, 2007; Welsch *et al.*, 2014).

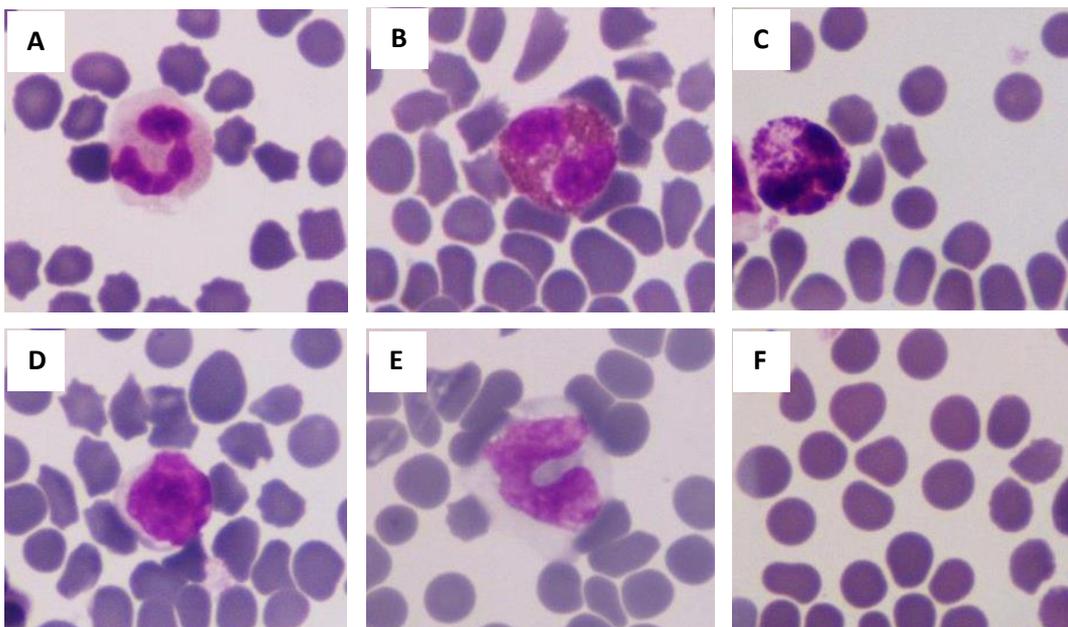
Los **basófilos** (Figura 5 C) tienen un tamaño que varía entre 11 y 14  $\mu\text{m}$ . Poseen un núcleo relativamente grande, con frecuencia redondeado que, en los extendidos, generalmente, se encuentra oculto por la presencia de gránulos azul negruzcos. Los gránulos son de tamaño variable, están limitados por membrana y poseen un contenido granuloso fino. Estas células están involucradas en el inicio de la reacción de hipersensibilidad inmediata (Núñez Ochoa y Bouda, 2007; Welsch *et al.*, 2014).

Los **linfocitos** (Figura 5 D) son los leucocitos más frecuentes en la sangre de los bovinos, constituyendo alrededor del 60% de los leucocitos totales. Su tamaño varía entre 8 y 15  $\mu\text{m}$ . Pueden clasificarse en dos clases principales: LB y LT. Los LB se originan y maduran en la médula ósea, mientras que los LT se originan en la médula ósea, pero migran tempranamente hacia el timo, donde completan su maduración. En la sangre periférica la mayoría de los linfocitos son LT. Existe un grupo minoritario de linfocitos llamados células NK (Núñez Ochoa y Bouda, 2007; Welsch *et al.*, 2014).

- Linfocitos B y T: pueden ser linfocitos pequeños, medianos y grandes. Las causas de las diferencias de tamaño todavía no se conocen, pero al parecer las formas más grandes corresponden a linfocitos activados. En los extendidos sanguíneos teñidos con los colorantes de rutina, los LB no pueden distinguirse de los LT; esto sólo es posible con el uso de métodos inmunohistoquímicos. Poseen un núcleo redondeado bastante oscuro y un reborde muy estrecho de citoplasma color azul pálido. Los gránulos citoplasmáticos son habituales. En cuanto a su función, los LB son responsables de la inmunidad humoral, mientras que los LT son responsables de la inmunidad celular.

- Linfocitos NK: se encuentran en muy baja cantidad en la sangre periférica. Poseen gránulos citotóxicos azurófilos grandes, pero no fagocitan. Los linfocitos NK despliegan citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y actividad NK (destructora natural).

Los **monocitos** (Figura 5 E), se originan en la medula ósea y por lo general permanecen sólo 12-24 horas (h) en la sangre. Luego migran hacia el tejido conjuntivo para transformarse en diferentes tipos de macrófagos de vida larga. Los monocitos son los leucocitos más grandes (diámetro: 13 a 19  $\mu\text{m}$ ) en sangre periférica y frecuentemente muestran un núcleo arriñonado. En general, poseen vacuolas y suelen no tener gránulos azurófilos. Esta población de leucocitos son la segunda línea de defensa del organismo, tienen una importante función fagocítica de partículas y de destrucción de agentes patógenos que no pueden ser controlados por los PMN (Núñez Ochoa y Bouda, 2007; Welsch *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Imágenes de extendidos sanguíneos bovinos: (A) Neutrófilo; (B) Eosinófilo; (C) Basófilo; (D) Linfocito; (E) Monocito; (F) Eritrocitos. Técnica de coloración May Grunwald Giemsa; 1000X.

### 1.3.2. Contexto metabólico y su relación con la inmunidad.

Las vacas lecheras atraviesan una fase crítica denominada período de transición, que abarca desde las últimas 3 semanas antes del parto hasta las 3 semanas posteriores al mismo, y que involucra por lo tanto el parto y el inicio de la lactogénesis (Grummer, 1995; Lamote *et al.*, 2006; Vailati-Riboni *et al.*, 2016). Durante este periodo, el consumo de alimentos no es suficiente para soportar la enorme demanda de energía debido a la presencia del feto en la gestación avanzada, que reduce la capacidad ruminal llevando a un menor consumo de lo requerido al inicio de la lactancia. Por esta razón, existe un aumento de la lipólisis y movilización de reservas principalmente del tejido adiposo (Leblanc, 2010; Angeli *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2019). Esto conduce a su vez, a un aumento de las concentraciones circulantes de ácidos grasos no

esterificados (AGNE) y beta-hidroxibutirato (BHB), que reflejan una oxidación incompleta de los ácidos grasos en el hígado, y una disminución de las concentraciones de glucosa en sangre (Drackley, 1999; Ingvarsen y Moyes, 2015). Estos cambios a nivel metabólico, sumado a la alta incidencia de enfermedades infecciosas luego del parto que indicarían una inmunidad reducida de los animales, dieron lugar a varios estudios que evaluaron los efectos directos de estos metabolitos, altamente modificados en ese período, sobre la función de las células inmunes (Ingvarsen y Moyes, 2015; Mann *et al.*, 2019). Los resultados de estos estudios demostraron los efectos perjudiciales del BHB sobre la quimiotaxis, el estallido oxidativo, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fagocitosis (Ingvarsen y Moyes, 2013; Crookenden *et al.*, 2016; Mann *et al.*, 2019). Mientras que, los NEFA provocaron un aumento en la producción de ROS, de la apoptosis, la estimulación de la señalización a través de receptores de tipo *Toll* y una disminución en el estallido oxidativo, la fagocitosis y la producción de Ig (Ingvarsen y Moyes, 2013; Crookenden *et al.*, 2016; Contreras *et al.*, 2018; Mann *et al.*, 2019). Otros estudios se centraron en la evaluación de la disponibilidad de glucosa, que es un metabolito esencial en varios procesos como son la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación y la fagocitosis (Ingvarsen y Moyes, 2013; Mann *et al.*, 2019). En conjunto, estos antecedentes han demostrado que el desequilibrio nutricional durante el período de transición conduce a una respuesta inmune subóptima, lo que podría conducir a una importante pérdida de producción y eliminación temprana de los animales afectados por enfermedades infecciosas e inflamatorias como la metritis y la mastitis. El vínculo entre la alteración en la disponibilidad de nutrientes, los riesgos de enfermedad y la función reproductiva, se ha analizado epidemiológicamente, y se ha concluido que los primeros factores tienen un rol clave en las tasas de reproducción de vacas lecheras (Ospina *et al.*, 2010; Suthar *et al.*, 2013; Aleri *et al.*, 2016).

### 1.3.3. Contexto hormonal y su relación con la inmunidad.

De la misma manera que el contexto metabólico descrito anteriormente, los cambios hormonales observados a lo largo del período de transición, se han asociado con cambios a nivel del sistema inmunológico. En particular, se ha visto que la progesterona suprime las respuestas proliferativas de los linfocitos de sangre periférica (Segerson y Gunsett, 1993; Singh *et al.*, 2008), y disminuye las funciones de varias moléculas proinflamatorias (Slama *et al.*, 1991; Szekeres-Bartho *et al.*, 2001; Arosh *et al.*, 2002; Seals *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2008). Por otra parte, el  $17\beta$ -estradiol se ha demostrado que puede alterar algunas funciones de los leucocitos PMN, como son la quimiotaxis, la fagocitosis y el estallido respiratorio (Lamote *et al.*, 2004). De la misma

manera, el aumento del cortisol circulante, el día del parto, se ha asociado con una disminución en el número de neutrófilos en circulación, que, al mismo tiempo, pueden resultar en un potencial estado proinflamatorio celular suprimido (Burton *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006; Ingvarlsen y Moyes, 2015).

Estos antecedentes en conjunto refuerzan la idea de que tanto el contexto metabólico como hormonal, ejercerían un efecto directo sobre la inmunidad de los animales durante el período de transición, pudiendo impactar esto a su vez, en procesos que ocurren más allá de dicho periodo.

## 1.4. Inmunidad sistémica y local, y su relación con la preñez.

### 1.4.1. Inmunidad sistémica y preñez.

En rumiantes hay antecedentes que demuestran que durante el periodo peri-implantacional y la gestación, ocurre una modulación de la respuesta inmune, no solo en el útero, sino también a nivel sistémico, e involucra la supresión, activación y modulación de la función inmunitaria (Kamat *et al.*, 2016; Ott, 2020). Se sabe que las hormonas esteroides, en particular la progesterona, importante moduladora de la función inmunitaria en el útero durante la preimplantación y la preñez, tiene efectos que se extenderían a la periferia (Lewis, 2003; Padua y Hansen, 2010; Ott, 2020). Por ejemplo, a lo largo de la preñez en rumiantes se observó un aumento de células T reguladoras (T reg) y  $\gamma\delta$  en sangre periférica (Lewis, 2003; Ott, 2020). Mientras que, cercano al parto hubo un aumento en las células T  $\gamma\delta$  y una disminución de los monocitos en circulación. Esto último sugiere el reclutamiento de monocitos al útero en preparación para el parto (Oliveira y Hansen, 2008; Ott, 2020). Curiosamente, durante la preñez temprana, los monocitos (CD14<sup>+</sup>) constituyen la mayor proporción de células en sangre periférica en rumiantes (Kamat *et al.*, 2016; Ott, 2020). Estos monocitos en sangre, podrían responder al aumento de la expresión de CCL2 y CCL8 en el endometrio durante la preñez temprana, para inducir su migración hacia el útero, conforme se acerca el momento del parto (Ott, 2020). Estos reportes representan uno de los escasos trabajos donde se relacionan el contexto inmune sistémico con la condición de preñez en vacas de alta producción.

Como se ha expuesto anteriormente, la evaluación entre el contexto metabólico y hormonal, y la función de las células inmunes, se limita al período de transición. En particular, la mayoría de los estudios se han centrado en los riesgos posparto de enfermedades inflamatorias y alteraciones del índice de reproducción debido al déficit de nutrientes en este período (Grummer

*et al.*, 2004; Angeli *et al.*, 2019). Sin embargo, si bien estos antecedentes demuestran que el contexto metabólico y hormonal influye de manera directa sobre la respuesta inmune durante este período, no contempla procesos fisiológicos relevantes como son la concepción, el establecimiento de la preñez y el sostenimiento de la misma, procesos en donde la inmunidad juega un rol central. Por lo tanto, el estudio de estos parámetros durante la lactancia media y tardía, es decir, más allá del período de transición, son necesarios ya que esto podría determinar un contexto sistémico adecuado para una implantación exitosa, el mantenimiento de la preñez y la preparación para el próximo parto.

#### 1.4.2. Inmunidad uterina y preñez.

La respuesta inmune local tiene un rol relevante durante la concepción, el sostenimiento de la preñez y el crecimiento fetal (Singh *et al.*, 2008; Velázquez *et al.*, 2019). En relación al establecimiento de la preñez, la señalización sincrónica que se establece entre el endometrio y el embrión durante el período de preimplantación es fundamental para la implantación, la placentación y el desarrollo normal posterior del concepto (Wolf *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2010). El embrión se nutre de secreciones de las glándulas uterinas y durante la implantación forma una estrecha asociación con el endometrio (Atkinson, 1984; Walker *et al.*, 2010). En este sentido, la preñez representa una contradicción inmunológica, dado que el embrión inmunológicamente “extraño” es capaz de formar una estrecha relación física con el endometrio materno durante la gestación, modulando la respuesta inmune materna a nivel local de manera tal que existan mecanismos de tolerancia frente a la misma (Walker *et al.*, 2010; Wonfor *et al.*, 2020).

En rumiantes la preñez depende de señales paracrinas y endocrinas como las hormonas esteroides y el interferón tau (INF $\tau$ ), como así también, de una red de citoquinas y células inmunitarias presentes en el tejido endometrial (Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Velázquez *et al.*, 2019; Fiorenza *et al.*, 2021). El INF $\tau$ , secretado por el embrión, es considerado un mediador clave de las respuestas locales (Ott y Gifford, 2010; Velázquez *et al.*, 2019). Su papel está relacionado con el reclutamiento de células inmunitarias (Imakawa *et al.*, 2005; Fiorenza *et al.*, 2021), la inhibición de la proliferación de linfocitos (Skopets *et al.*, 1992; Fiorenza *et al.*, 2021) y la estimulación de células NK (Tuo y Ott, 1993; Fiorenza *et al.*, 2021). Además, el INF $\tau$  puede modular la expresión génica de células epiteliales endometriales y células inmunes, posiblemente generando el entorno de tolerancia inmunitaria antes mencionado, necesario para el desarrollo del embrión (Fiorenza *et al.*, 2021). Dentro de los genes que modula, se destacan los genes que codifican para las proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCP) 1 y 2, potentes factores

quimiotácticos para dicha población. De la misma manera, estimula la expresión del gen del receptor PTX3 que está relacionada con el reclutamiento y activación de monocitos y células dendríticas (CD) en endometrio (Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Velázquez *et al.*, 2019). En este sentido, hay antecedentes que demuestran que la respuesta inmune materna durante el alargamiento embrionario se caracteriza por la expansión de monocitos y CD en el estroma endometrial a partir del día 13 de gestación (Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Velázquez *et al.*, 2019). En relación a la implantación, en bovinos se ha encontrado que la expresión del gen endometrial de  $TGF\beta_2$  está disminuido, sugiriendo que este factor está involucrado en la invasión del trofoblasto durante la fase de implantación (Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Velázquez *et al.*, 2019). Durante la placentación, sin embargo, la expresión del gen  $TGF\beta_2$  aumenta, un cambio que puede resultar en el reclutamiento de monocitos y la regulación del estado inflamatorio (Wahl *et al.*, 1987; Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Fair, 2015a; Velázquez *et al.*, 2019). A su vez, se ha descrito que los menores niveles de  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  presentes en secreciones uterinas en etapas tempranas de la gestación, favorecerían el desarrollo fetal apropiado, dado que habría una especie de “supresión” de la respuesta inmune innata materna (Correia-Álvarez *et al.*, 2015; Velázquez *et al.*, 2019).

Estos antecedentes demuestran que la inmunidad local juega un rol fundamental durante la implantación y el crecimiento fetal. A su vez, se han logrado identificar factores potencialmente importantes en cada uno de dichos procesos. Sin embargo, aún no se han podido comprender exhaustivamente los mecanismos involucrados que llevan al éxito de la concepción y el sostenimiento de la preñez. Mas aún, han sido escasamente abordados ciertos componentes del entorno endometrial y la posible participación de factores sistémicos inmunes en momentos previos a la concepción. Esto cobra mayor interés, teniendo en cuenta que las vacas lecheras de alta producción sufren pérdidas embrionarias alrededor del día 8 post-fertilización (Wiebold, 1988; Sartori *et al.*, 2002; Diskin *et al.*, 2012; Fiorenza *et al.*, 2021), lo cual pone de relevancia la importancia de conocer el contexto que acompaña a la concepción y los eventos previos a la implantación endometrial teniendo en cuenta las variaciones tanto a nivel local como sistémico.

*En función a los antecedentes mencionados, la HIPÓTESIS GENERAL propuesta en esta tesis es que los cambios inmunológicos que ocurren bajo el contexto hormonal y metabólico del posparto, podrían estar asociados a un retardo en la concepción durante dicho período.*

## 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo general.

Caracterizar el perfil inmune endometrial y sistémico en vacas lecheras y establecer posibles asociaciones con el estado metabólico-hormonal de dichos animales durante la preñez y la lactancia.

## 2.2. Objetivos específicos.

Para alcanzar el objetivo final se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar las concentraciones plasmáticas y/o séricas de metabolitos relacionados a la condición nutricional y hormonal ( $\beta$ -hidroxibutirato, glucosa, ácidos grasos no esterificados,  $17\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol) de vacas lecheras durante la lactancia y preñez.

2. Caracterizar el perfil inmune a nivel sistémico y determinar posibles alteraciones en la actividad y capacidad fagocítica de leucocitos aislados de sangre periférica, durante la preñez y lactancia en función del contexto metabólico/hormonal.

3. Evaluar los patrones de expresión y localización endometrial de citoquinas proinflamatorias (interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina 1 alfa, interleuquina 1 beta, receptor I de la interleuquina 1, interleuquina 6, interleuquina 8) y antiinflamatorias (interleuquina 4, antagonista del receptor de la interleuquina 1, factor de crecimiento transformante beta 3, receptor II de la interleuquina 1) durante la lactancia temprana de los animales y su posible relación con la duración del intervalo parto-concepción.

4. Evaluar la presencia de macrófagos infiltrantes en endometrio de vacas lecheras durante la lactancia temprana y determinar su posible relación con la duración del intervalo parto-concepción.

5. Determinar si las alteraciones inmunes endometriales y sistémicas halladas en vacas durante la lactancia, tienen efectos sobre la concepción inmediata al parto.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Diseño experimental y toma de muestras.

#### 3.1.1. Grupo de animales.

Todos los procedimientos efectuados en los animales se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (Guía para el cuidado y uso de animales agrícolas en Investigación y Docencia, Federación de Sociedades de Ciencia Animal, 2010), y fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad Institucional de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe (Protocolo N° 397/17).

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. La salud de los animales fue evaluada antes y durante el estudio por un veterinario especialista del establecimiento. Entre otros aspectos, los signos externos evaluados fueron la temperatura rectal, el puntaje de condición corporal, 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. A su vez, se determinó la existencia de signos clínicos de enfermedad, especialmente aquellos relacionados con problemas del posparto como son: mastitis, metritis, endometritis y cetosis, entre otras. Cualquier animal que presentó alguna de estas patologías no fue incluido en el estudio como así tampoco aquellos animales que presentaron un aumento notable en el recuento de leucocitos totales. Los animales incluidos en el estudio tampoco presentaron distocia, muerte fetal o aborto en el parto / preñez anterior. Además, se recabaron datos individuales de los animales en relación a su producción láctea e índices reproductivos.

El tambo comercial en el cual fue llevado a cabo el estudio poseía una alimentación de base pastoril con suplementación que resulta común en la cuenca lechera central Argentina. De esta forma, la dieta de la vaca lactante consistió en una dieta mixta compuesta de 17% de ensilado de maíz, 30% de grano de maíz craqueado y 4% de ensilaje de maíz de soja, 5% de harina de soja, 4% de semilla de soja sobre una base de materia seca; con una mezcla mineral y vitamínica formulada para el establecimiento. El resto de la dieta se estimó como el 40% de la materia seca y se basó en el pastoreo de alfalfa *ad libitum*. La composición de la dieta fue: 16% proteína cruda, 32% fibra detergente neutra, 19% fibra detergente ácida, 45% carbohidratos no fibrosos, 1,65 Mcal/kg de energía neta de lactancia, con un consumo de materia seca estimado de 17 kg/día durante el periodo evaluado, desde el parto hasta los 60 días en lactancia.

Se obtuvieron muestras de tejido uterino a los 45 y 60 días posparto (DPP) de todas las vacas incluidas en el estudio, previa sincronización con dos dosis de D-cloprostenol (0,075 mg/ml, Lab MSD, Buenos Aires, Argentina) aplicadas con 11 días de separación, a fin de obtenerlas en fase folicular. Todos los animales habían reanudado su ciclicidad ovárica al inicio del protocolo. En simultáneo con las biopsias uterinas, se tomaron muestras de sangre. Los muestreos de sangre se continuaron hasta los 180 DPP, siendo ejecutados a los 90 (+/-5) DPP, 120 (+/- 5) DPP, 150 (+/- 5) DPP y 180 (+/- 5) DPP inclusive (Figura 6).

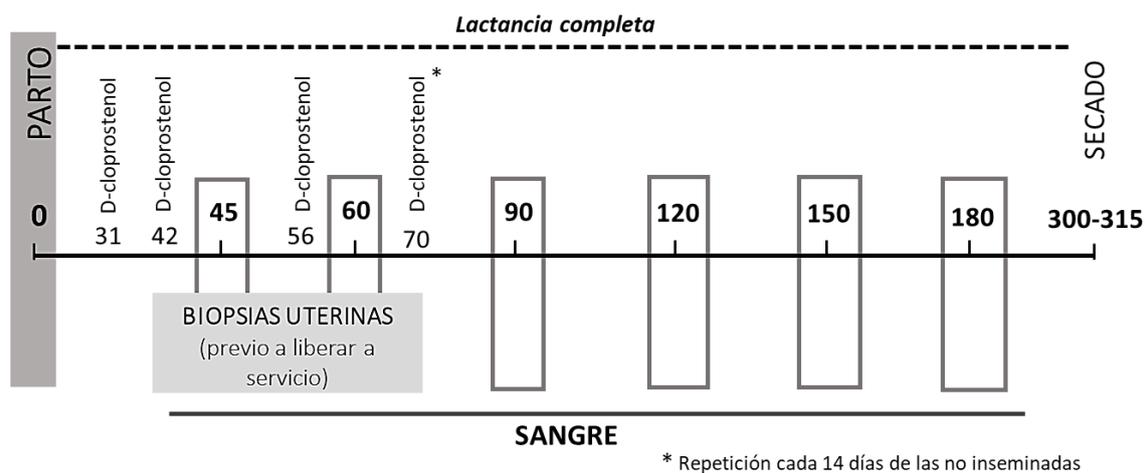


Figura 6. Planificación de los tiempos de muestreo y el tipo de muestra tomado en cada uno.

Luego de la obtención de las biopsias uterinas, los animales se re-sincronizaron con una dosis de D-cloprostenol 14 días posteriores a la última administración y se liberaron a servicio (aproximadamente a los 70 DPP). Se repitió la dosis de D-cloprostenol cada 14 días en aquellas vacas que no manifestaron celo. Mientras que, en aquellos animales en los que se detectó el celo (detección visual), se inseminaron y se realizó ultrasonografía para confirmar la preñez, cada 14 días, en toda vaca sin celo por 28 días. Si alguna de las vacas no se encontraba preñada luego de este tiempo, se le volvía a administrar D-cloprostenol. Por lo tanto, 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. La información recabada permitió agrupar de manera retrospectiva los animales de acuerdo al IPC, al momento de analizar los resultados, como se detalla a continuación.

El total de los animales ( $n=22$ ) se dividió en grupos teniendo en cuenta retrospectivamente su IPC:  $IPC_{90}$  ( $90 \pm 6$  días) ( $n = 7$ ),  $IPC_{120}$  ( $120 \pm 6$  días) ( $n = 4$ ),  $IPC_{180}$  ( $180 \pm 8$  días) ( $n = 3$ ) e  $IPC_{>180}$  ( $220 \pm 37$  días) ( $n = 6$ ). De esta manera, el estado fisiológico de los animales incluidos dentro de cada grupo fue el mismo, en cada punto de muestreo, a lo largo de toda la lactancia. Cabe destacar que el grupo de animales que alcanzaron la preñez a los 150 DPP ( $n = 2$ ) no pudo considerarse

como grupo experimental dado que el número de vacas no fue suficiente para la realización de los análisis estadísticos posteriores.

### 3.1.2. Procedimiento con los animales.

Los animales seleccionados para el estudio, se separaron luego de realizado el ordeño de la tarde para la obtención de biopsias uterinas y muestras de sangre según los métodos detallados a continuación. Asimismo, se evaluó el flujo de descarga vaginal empleando el dispositivo 'Metricheck TM'. Esto nos permitió contemplar en el estudio aquellas vacas con flujo normal de apariencia transparente o translúcida (grado = 0) y de apariencia blanquecina (grado = 1); y descartar aquellas con signos de endometritis (grado > 1), cuyo exudado purulento fue blanco o amarillento. Además, mediante palpación rectal se confirmó la ausencia de anormalidades uterinas.

### 3.1.3. Toma, procesamiento y almacenamiento de muestras.

**Biopsias uterinas:** Se utilizó la técnica descrita por Chapwanya *et al.* (2010). Las muestras fueron tomadas con pinza para biopsias uterinas bovinas, previa anestesia epidural baja con lidocaína al 2% (5 ml) (OVER S.R.L, Santa Fe, Argentina), en el espacio epidural sacrococcigeo y 1° intercoccigeo. Inicialmente se limpió el perineo y los genitales externos, y se introdujo en la vagina la pinza, la cual se guio hacia el cuello uterino mediante manipulación per recto. Luego, se introdujo en el cuerno uterino, aproximadamente 3 cm más allá de la bifurcación, 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 tomaron dos muestras del cuerno contralateral al último gestante, según los registros del establecimiento. Una de las muestras se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para luego ser utilizada en procedimientos de biología molecular (extracción de ARN). La segunda fue inmediatamente fijada en formol bufferado al 10% durante 6-8 h 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 *et al.*, 2008). Se efectuaron cortes seriados de 4 µm de espesor con un micrótopo rotativo (Leica). Los mismos se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropiltriethoxisilano (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.

**Sangre:** Las muestras de sangre se tomaron por punción venosa yugular. Las mismas 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 (Glucosa, AGNE, hormonas, etc). De cada animal se obtuvo también una muestra de sangre entera que se almacenó con EDTA y fueron destinadas a la evaluación de la fórmula diferencial leucocitaria y obtención de leucocitos totales para su análisis por citometría de flujo. Dichas muestras se procesaron dentro de las 24 h de obtenidas.

### 3.2. Determinación de las concentraciones plasmáticas de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol.

Las concentraciones plasmáticas de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol, 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 *et al.*, 2015). La sensibilidad del ensayo utilizado fue de 5,00 pg/ml para el 17 $\beta$ -estradiol, 0,05 ng/ml para la progesterona y 0,2 ng/ml para el cortisol. Dichas determinaciones fueron realizadas en Alkemy Diagnóstico, Santa Fe, Argentina.

### 3.3. Determinación de las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados, $\beta$ -hidroxibutirato y glucosa.

Las concentraciones de BHB se determinaron a campo, a partir de sangre entera inmediatamente después de haberse realizado la extracción, empleando tiras reactivas comerciales (FreeStyle 210 Optium Xceed, Abbott Diabetes Care Ltd., Oxon, UK). Para la evaluación de las concentraciones plasmáticas de glucosa se utilizó el kit para determinación de Glucemia por el método colorimétrico/enzimático GOD/POD (Wiener Lab). Mientras que, para la evaluación de las concentraciones plasmáticas de AGNE se utilizó el kit colorimétrico Randox NEFA (*non-esterified fatty acids*) de Randox Laboratories Ltd., (Ardmore, UK). Las

determinaciones se realizaron empleando un espectrómetro UV/Vis ultrafast (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany), por triplicado.

### 3.4. Caracterización del perfil inmune a nivel sistémico.

#### 3.4.1. Recuento de leucocitos totales y diferencial a lo largo de la lactancia.

A partir de una muestra de sangre fresca anticoagulada y homogeneizada, y empleando el Autoanalizador Mindray 2800Vet, se determinó el número total de leucocitos.

Al mismo tiempo, mediante la técnica de frotis sanguíneo se evaluó la fórmula diferencial leucocitaria para determinar los porcentajes de linfocitos, neutrófilos y monocitos (Núñez Ochoa y Bouda, 2007). Los extendidos sanguíneos se tiñeron con la técnica de coloración May-Grunwald-Giemsa. El recuento diferencial se realizó utilizando un microscopio (Nikon Eclipse Ci -L Ni) con aumento 100 X y aceite de inmersión (Núñez Ochoa y Bouda, 2007).

#### 3.4.2. Actividad y capacidad fagocítica de monocitos/macrófagos a lo largo de la lactancia y la preñez.

##### 3.4.2.1. Obtención de la población leucocitaria total.

Las células blancas totales se obtuvieron a partir de las muestras de sangre periférica anticoaguladas (sección 3.1.3.), empleando buffer de lisis y siguiendo la técnica previamente descrita por otros autores (Heiser *et al.*, 2015) y puesta a punto en el laboratorio para tal fin. Brevemente: se centrifugó la sangre y se separó la capa anteada (capa intermedia de células blancas que se forma entre el plasma y los eritrocitos). Sobre dichas células la eliminación del remanente de glóbulos rojos se realizó mediante el agregado de buffer de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,829 g;  $\text{KHCO}_3$  0,1 g; EDTA disódico 3,72 mg;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, cantidad suficiente para (c.s.p) 100 ml) incubando 15 min en hielo. Transcurrido dicho tiempo, se centrifugó y descartó el sobrenadante, conservando las células blancas del pellet. Seguidamente el mismo se resuspendió en PBS 1X y las células obtenidas se contaron en cámara hemocitométrica de Neubauer. Una vez conocida la cantidad de células recuperadas, se llevaron a una concentración preestablecida ( $1 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^8$  cel/criovial) en 500  $\mu\text{l}$  de medio RPMI + suero fetal bovino (SFB) (5%), más 500  $\mu\text{l}$  de SFB + Dimetil

Sulfóxido (DMSO) (20%) y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización (Guzman *et al.*, 2014).

#### 3.4.2.2. Obtención de bacterias marcadas con isotiocianato de fluoresceína.

##### 3.4.2.2.1. Preparación del cultivo bacteriano y cuantificación de la suspensión.

Para el aislamiento de *E. coli* a utilizar en los ensayos de fagocitosis, se realizaron hisopados en animales con diagnóstico de metritis. Para ello se emplearon hisopos estériles de 45 cm de longitud diseñados comercialmente para la toma de muestras uterinas (Equivet®, Kruuse). Una vez practicado el hisopado, se introdujo el hisopo en un recipiente estéril con medio de transporte Stuart (Britania, Columbia). Para el aislamiento e identificación de microorganismos anaerobios facultativos como *E. coli* las muestras se procesaron en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), siguiendo los métodos estándares de identificación bioquímica de microorganismos. Los aislamientos confirmados fueron almacenados a -80°C en caldo cerebro corazón (Britania, Argentina) con un 20% de glicerol hasta el momento de su utilización. La preparación del cultivo bacteriano a emplear en los ensayos de fagocitosis se llevó a cabo, como se detalla a continuación:

- Día 1: Previamente a descongelar el vial que contenía la suspensión bacteriana, se colocó la placa abierta conteniendo Agar LB, 30 min en estufa a 37°C para que alcance dicha temperatura. Luego se reactivó la cepa bacteriana utilizando la siembra en estrías por agotamiento sobre la placa, quemando el ansa entre cada estría. Se incubó 24 h a 37°C. Todo el procedimiento fue realizado en condiciones de esterilidad.

- Día 2: Se tomaron 4-5 colonias individuales de la última estría con un ansa y se resuspendieron en 10 ml de caldo LB. Se incubó 18 h a 37°C.

- Día 3: En un erlenmeyer de 250 ml de capacidad, se prepararon 49 ml de caldo LB. Se tomó 1 ml del cultivo preparado el día anterior y se adicionó al erlenmeyer. Se incubó a 37°C durante 18 h, en agitación.

- Día 4: El volumen total del cultivo en el erlenmeyer se centrifugó a 10000 *g* durante 20 min a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de PBS 1X estéril. La suspensión bacteriana (madre) obtenida se colocó en un criotubo estéril de 2 ml de capacidad, para luego ser cuantificada, según procedimiento detallado a continuación:

1. Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana homogeneizada y se realizó una dilución 1/10 en PBS 1X estéril (dilución  $10^{-1}$ ).
2. Se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución  $10^{-10}$ , tomando 500  $\mu\text{l}$  de la dilución anterior y colocándolos en 4,5 ml de PBS 1X estéril.
3. Una vez realizadas las diluciones se procedió a la siembra en placa por duplicado de las diluciones  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$ , utilizando en todos los casos placas con agar LB. Para la siembra de cada dilución se utilizó el método de siembra por extensión en superficie. Para ello se utilizó la espátula de Drigalsky que permitió distribuir uniformemente el inóculo sembrado (100  $\mu\text{l}$ ), previamente flameada en alcohol 70% y enfriada en el borde interno de la placa.
4. Se dejaron las placas sobre la mesada de trabajo, durante unos minutos y luego se invirtieron para su incubación en estufa ( $37^{\circ}\text{C}$ , 18 h).
5. Se realizó el recuento del número de colonias desarrolladas sólo en las placas que poseían entre 30 y 300 colonias (en este caso la dilución  $10^{-8}$ ), y se promedió el recuento obtenido por duplicado para cada una de las diluciones sembradas. Se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) según:

$$\text{Concentración de bacterias (UFC/ml)} = \left( \frac{\text{UFC}_{\text{placa 1}} - \text{UFC}_{\text{placa 2}}}{2} \right) \times 10 \text{ ml} \times \frac{1}{10^{-8}}$$

Este ensayo se repitió 4 veces con el fin de corroborar la reproducibilidad del recuento siguiendo dicho procedimiento, y en el último ensayo se procedió a conservar el cultivo completo como se indica a continuación:

6. A la suspensión bacteriana madre obtenida el día 4, se agregaron 9 ml de PBS 1X estéril y se alicuotó en 10 eppendorfs. Cada alícuota se centrifugó a 6000  $g$ , durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y se almacenó el pellet de bacterias a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La concentración en cada alícuota fue  $6,7 \times 10^9$  bacterias.

#### 3.4.2.2.2. Tinción con isotiocianato de fluoresceína.

Para la marcación de las bacterias *E. coli* con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se descongeló una de las alícuotas obtenidas previamente, de concentración conocida, y se resuspendió el pellet en 990  $\mu\text{l}$  de PBS 1X estéril. A la suspensión bacteriana, se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de FITC 10 mg/ml (0,1

mg de FITC en 10 µl de DMSO). Se incubó en estufa a 37°C durante 1 h, bajo agitación suave y al resguardo de la luz. Luego de la incubación, se agregaron 10 ml de PBS 1X estéril, a modo de lavado, y se centrifugó a 24000 g durante 5 min a 4°C. Se repitieron los lavados tantas veces como fue necesario hasta conseguir que el sobrenadante fuera límpido. Finalmente, para evaluar la eficiencia de este procedimiento, se analizaron las bacterias marcadas con FITC y bacterias sin marcar por citometría de flujo. Este chequeo se realizó en todos los casos que se descongelaron bacterias marcadas para su empleo en ensayos de fagocitosis.

Las bacterias marcadas con FITC se centrifugaron 5 min a 13800 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de concentración conocida se almacenó al abrigo de la luz a -20°C hasta su utilización.

#### *3.4.2.3. Fagocitosis y citometría de flujo.*

Se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis preliminares para la puesta a punto de las condiciones a utilizar tales como: relación leucocitos/bacterias (MOI) (MOI: 10, 20 y 100); tratamiento o no con el antibiótico gentamicina para la eliminación de bacterias sin adherir/internalizar, tiempo de exposición a la gentamicina y tiempo de contacto entre las bacterias y los monocitos. A partir de dichos ensayos las condiciones elegidas fueron: MOI 20, sin tratamiento con gentamicina y 30 min de exposición de los leucocitos a las bacterias marcadas. El procedimiento realizado para evaluar la actividad y capacidad fagocítica de monocitos/macrófagos se detalla a continuación:

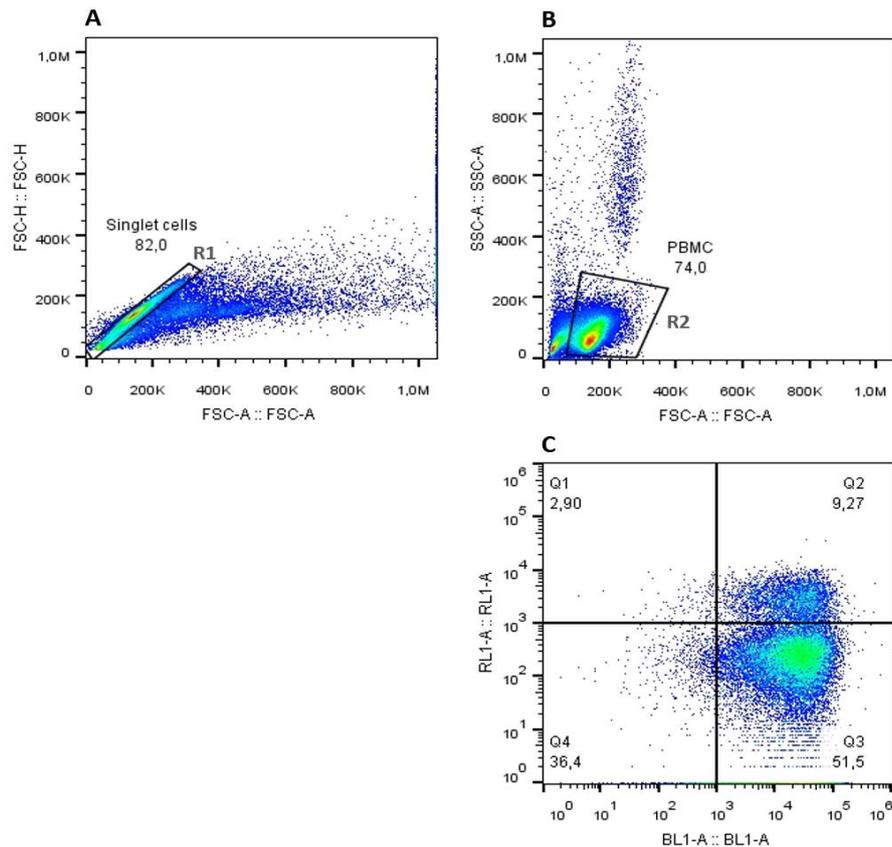
- Los leucocitos almacenados en nitrógeno líquido (sección 3.3.2.1.) fueron descongelados en baño de agua a 37°C.
- Se trasvasó el contenido de cada criotubo (1 ml) a un tubo con 4 ml de PBS 1X estéril para lavar las células por centrifugación, y proceder a su recuento.
- La resuspensión del pellet se hizo en medio RPMI + SFB 5%, y se realizó el recuento de las células en cámara de Neubauer para conocer la concentración de células vivas, utilizando la técnica de tinción con Azul Tripán.
- Se dejaron las células recuperando su isotonicidad y función durante 2 h en medio RPMI + SFB 5%.
- Se separó el volumen adecuado correspondiente a  $1.10^6$  células, se centrifugó a 600 g durante 5 min a 4°C.

- Se descartó cuidadosamente el sobrenadante por inversión y se resuspendió el pellet en 100  $\mu$ l de bacterias marcadas con FITC, concentración  $2 \cdot 10^7$  bacterias/ml. Es decir que las células contactaron con una cantidad de bacterias 20 veces superior (MOI 20 = 1 leucocito: 20 bacterias).
- Se incubó en agitación suave durante 30 min, a 37°C y en oscuridad.
- La reacción de fagocitosis se frenó con 300  $\mu$ l de NaCl (0,85%) / EDTA (0,04%) frío. Se centrifugó nuevamente a 600 g, 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante.
- Se realizó un lavado con PBS 1X estéril a 600 g, 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante.
- El pellet se resuspendió en 0,125  $\mu$ l de anticuerpo primario APC anti-*human* CD14 (BioLegend) diluidos en 25  $\mu$ l finales de buffer FACS (PBS 1X, EDTA 0,5mM, Azida sódica 0,1%, SFB 3%). Se incubó 30 min a 4°C.
- Se agregaron 500  $\mu$ l de FACS para lavar el exceso de anticuerpo primario, y luego se centrifugó a 600 g durante 5 min a 4°C.
- El sobrenadante se descartó por inversión y se resuspendió el pellet en 300  $\mu$ l de *Buffer Focusing* (Attune, NxT *Acoustic Focusing Cytometer* A24860, Life Technology).
- Finalmente, se adquirieron las muestras por citometría de flujo *Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer* A24860 (Life Technology). En todos los casos, se realizaron los controles necesarios para seleccionar los voltajes adecuados de cada canal de fluorescencia para las poblaciones negativas y positivas a analizar, y poder elegir la región de dichas poblaciones.

#### 3.4.2.4. Estrategia de selección para la evaluación de la actividad y capacidad fagocítica de monocitos/macrófagos.

Los archivos generados luego de la adquisición por citometría, fueron analizados empleando el *software FlowJo* (TreeStar Inc., Ashland, USA). La estrategia de selección o *gating* utilizada para el análisis de la actividad y capacidad fagocítica de monocitos/macrófagos se detalla a continuación. A partir de un gráfico *dot plot* para el parámetro de tamaño celular (*forward scatter*, FSC), donde se representó altura (FSC-H) vs. área (FSC-A), se seleccionaron los singletes o eventos individuales (R1) (Figura 7 A). Dentro de R1, teniendo en cuenta los parámetros de FSC vs. complejidad citoplasmática (*side scatter*, SSC), se seleccionó la población de células mononucleares (R2) (Figura 7 B). Finalmente, a partir de R2, los niveles de actividad fagocítica (AF) es decir, de monocitos/macrófagos con bacterias asociadas (adheridas/internalizadas) se

evaluó en un gráfico *dot plot* de APC-CD14 (marcador para monocitos/macrófagos) (RL1) vs. FITC (marcador de bacterias) (BL1) (Figura 7 C). El cálculo se realizó a partir del cuadrante 2 (Q2) que corresponde a las poblaciones CD14<sup>+</sup> - FITC<sup>+</sup>, multiplicado por 100 y dividido por el número total de monocitos (sumatoria de los cuadrantes 1 y 2, Q1 y Q2). La capacidad fagocítica (CF) corresponde al número de bacterias asociadas por monocito, es un valor calculado por el *software* de manera automática, ya que se corresponde con la intensidad de fluorescencia media (Beccaria *et al.*, 2018).



**Figura 7.** Estrategia de *gating* para analizar la AF de los monocitos/macrófagos. (A) Gráfico de *dot plot* en donde se representó FSC-H (altura) vs. FSC-A (área). A partir de este gráfico se seleccionaron los singletes o eventos individuales (R1). (B) Dentro de R1, teniendo en cuenta los parámetros de FSC vs SSC, se seleccionó la población de células mononucleares (R2). (C) A partir de R2, los niveles de AF de monocitos/macrófagos se evaluó en un gráfico *dot plot* de APC-CD14 (marcador para monocitos/macrófagos) (RL1) vs. FITC (marcador de bacterias) (BL1). El cálculo se realizó a partir de Q2 que corresponde a las poblaciones CD14<sup>+</sup> - FITC<sup>+</sup>, multiplicado por 100 y dividido por el número total de monocitos (sumatoria de los cuadrantes 1 y 2, Q1 y Q2).

### 3.5. Evaluación de los niveles de expresión génica de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

La evaluación de la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias se realizó por PCR en tiempo real utilizando como control interno el gen de la proteína ribosomal L19 (RPL-19) de expresión constitutiva en endometrio bovino, reportado en la bibliografía para tal fin (Sosa *et al.*, 2009). Se utilizaron para ello las muestras de tejido uterino congeladas que habían sido almacenadas como se detalló en la sección 3.1.3.

#### 3.5.1. Extracción de ARN.

La extracción de ARN total a partir de las muestras de tejido uterino, se realizó mediante la metodología de extracción con Trizol<sup>®</sup> LS Reagent (Invitrogen<sup>™</sup>, ThermoFisher Scientific), siguiendo la metodología propuesta por el proveedor, con algunas modificaciones del procedimiento incorporadas por nuestro grupo de trabajo (Rodríguez *et al.*, 2011):

- A una porción de tejido (50-100 mg) se le agregó 1ml de Trizol<sup>®</sup> LS y se homogeneizó hasta lograr la disgregación total del mismo. Para ello se utilizó un vástago 8G previamente enjuagado en alcohol 70° y luego en agua libre de ARNasas (DEPC).
- Luego de incubar por 5 min a 25°C se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó por inversión vigorosamente.
- Se incubó 10 min a 4°C y posteriormente se centrifugó a 12000 *g* durante 20 min a 4°C.
- La fase acuosa se transfirió a un eppendorf estéril y se le agregó el mismo volumen de alcohol isopropílico. Se incubó 1 h a -20°C.
- Se centrifugó nuevamente a 12000 *g* durante 20 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante por inversión y se agregó 1ml de etanol 75% frío estéril.
- Se mezcló con vórtex y se centrifugó a 7500 *g* durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se resuspendió el ARN en 30 µl finales de agua DEPC.

Luego de la extracción, se evaluó la integridad, pureza y concentración del ARN mediante espectrofotometría (SPECTROstarNano) y las muestras se conservaron a -80°C hasta la realización de la retrotranscripción (RT).

### 3.5.2. Obtención de ADN copia mediante retrotranscripción.

En primer lugar, el ARN fue tratado con desoxirribonucleasa (DNAasa) a los efectos de eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico y luego se llevó a cabo la RT del ARN extraído a ADN copia (ADNc).

Para el tratamiento con ADNasa, la composición final de la mezcla de reacción fue: ARN (cantidad constante de 2 µl), buffer de la enzima ADNasa I (1X), enzima ADNasa I (0,1 UI/µl) (Productos Bio-Lógicos, PBL) y agua DEPC (0,1%), en c.s.p completar un volumen final de reacción de 20 µl. La reacción se llevó a cabo incubando a 20°C durante 15 min. Luego, se inactivó la enzima con EDTA (25 mM) y se incubó 15 min a 65°C.

Para la RT, las reacciones se llevaron a cabo agregando 2 µg ARN (previamente tratado con ADNasa) en 40 µl finales. La mezcla de reacción contenía: cebadores hexanucleótidos con secuencia al azar (1 µg/µl) (Random Primers Invitrogen), deoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, 25 mM), buffer de reacción para la enzima MMLV (5X First Strand Buffer), ditioneitol (DTT, 100 mM), inhibidor de ribonucleasas (40 U/µl) (*RNase Out*) y la enzima MMLV Reverse Transcriptase (200 UI/µl). Los reactivos empleados fueron provistos por ThermoFisher Scientific. Las reacciones se realizaron en un termociclador de punto final (TECHNE TC-312, Stone, Reino Unido). Las condiciones aplicadas para la RT fueron 10 min a 25°C para la hibridación, 50 min a 37°C para la síntesis del ADNc y 15 min a 70°C para la inactivación de la enzima. Finalmente, los ADNc obtenidos fueron cuantificados por espectrofotometría y luego conservados a -20°C hasta su posterior utilización.

### 3.5.3. Diseño de cebadores específicos bovinos.

Para evaluar los niveles de expresión de ARNm (ARN mensajero) de las citoquinas en estudio se diseñaron cebadores específicos para los genes que codifican dichas proteínas y para amplificar a su vez, el gen normalizador RPL-19. Estos cebadores se diseñaron empleando el *software* libre Primer-Quest disponible en la web (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>), partiendo de las secuencias específicas de los ADNc reportadas para cada gen en la base de datos *Genbank*.

Cada par de cebadores fue obtenido a partir de la secuencia codificante genómica de los genes en estudio publicada en *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para su diseño, se tuvo en cuenta el tamaño del amplicón, la ubicación de cada cebador (sentido y antisentido) en la hebra molde (preferentemente hacia el

extremo 3' del ARNm), el número de nucleótidos de la secuencia, la temperatura de hibridación (o temperatura de *annealing*,  $T_a$ ), el porcentaje de bases C-G y la formación de heterodímeros, homodímeros y estructuras secundarias como los 'hairpins'. Además, en los casos en que fue posible, los pares de cebadores se diseñaron de forma tal que el sentido y el antisentido fueran complementarios a secuencias ubicadas en exones diferentes del gen de interés, a fin de evitar amplificaciones inespecíficas a partir de ADN genómico. Las especificidades de todos los cebadores se cotejaron por comparación directa contra el genoma completo de *Bos taurus* mediante el uso de la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Cebadores específicos para los diferentes genes evaluados.

| CEBADOR                                    | SECUENCIA CEBADOR 5' - 3'                                   | N° ACCESO NCBI | TAMAÑO<br>AMPLICIÓN<br>(PB) | TA<br>(°C) |
|--|---|----------------|-----------------------------|------------|
| <b><i>Citoquinas proinflamatorias</i></b>  |   |                |                             |            |
| <b><i>TNF<math>\alpha</math></i></b>       | S: GCTTTACCTCATCTACTCACAG<br>AS: CTTGATGGCAGACAGGATG        | NM_173966.3    | 133                         | 58         |
| <b><i>IL6</i></b>                          | S: GATGCAGTCTTCAAACGAGTGGGT<br>AS: AGGTTTCTGACCAGAGGAGGGAAT | NM_173923.2    | 110                         | 60         |
| <b><i>IL8</i></b>                          | S: ACACATTCCACACCTTTCC<br>AS: CTTGCTTCTCAGCTCTCTTC          | EU276073.1     | 184                         | 60         |
| <b><i>IL1<math>\alpha</math></i></b>       | S: ACGAACCCGTCTTGCTAAAG<br>AS: GAAGTAGTCCATAGAGCCATGC       | NM_174092.1    | 104                         | 62         |
| <b><i>IL1<math>\beta</math></i></b>        | S: AGTCTGTCCTGTACCCTAAC<br>AS: GAGAGGGTTTCCATTCTGAAG        | NM_174093.1    | 118                         | 59         |
| <b><i>IL1RI</i></b>                        | S: GTGGAATGGGTGCGATGGTTAG<br>AS: CGAGGACTGTACTCCTTCTTCT     | NM_001206735.1 | 98                          | 61         |
| <b><i>Citoquinas antiinflamatorias</i></b> |   |                |                             |            |
| <b><i>IL1RII</i></b>                       | S: AGAGACGAGGAGACTATTCCTG<br>AS: GCTCCAGAAACACCTTACA        | NM_001046210.2 | 101                         | 60         |
| <b><i>IL1RA</i></b>                        | S: GGAGATGAGATCAAGCTCAAGTTA<br>AS: TTGTGAAGCGGATGAAGG       | NM_174357.3    | 98                          | 60         |
| <b><i>Gen normalizador</i></b>             |   |                |                             |            |
| <b><i>RLP-19</i></b>                       | S: CCAGGCCAAGAAAGAGGAAA<br>AS: AATTGCCGAGGCCACTATG          | NM_001040516.2 | 102                         | 62         |

#### 3.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa de punto final.

Para corroborar la obtención de ADNc luego de realizadas las RT, como así también, para verificar la capacidad de hibridación de los pares de cebadores diseñados, se realizó una PCR de punto final.

Brevemente: cada PCR se llevó a cabo utilizando como molde el ADNc en una mezcla de reacción conteniendo buffer Taq 10X (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,4), MgCl<sub>2</sub> (50 mM), dNTPs (25 mM), cebador sentido (20 μM), cebador antisentido (20 μM), Taq polimerasa (5 U/μl) y agua DEPC (0,1%) hasta completar un volumen final de 25 μl. El programa utilizado incluyó una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos sucesivos de desnaturalización, hibridación y extensión bajo el siguiente protocolo: 94°C 45 seg, temperatura variable de anillado (según el cebador, ver Tabla 3.4) durante 30 seg, 72°C 1 min 30 seg. Por último, se realizó la extensión final de los productos a 72°C por 10 min. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de punto final (TECHNE TC-312, Stone, Reino Unido).

En cada reacción de PCR se realizó un control negativo, reemplazando el ADNc por agua DEPC, para descartar la contaminación de los reactivos empleados. Asimismo, se realizaron controles positivos para constatar el funcionamiento de los mismos.

Los productos obtenidos de las PCR fueron sembrados y corridos en gel de agarosa al 2% conteniendo solución tamponada TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 0,5 mM EDTA, pH 8,0) y colorante de ácidos nucleicos Gel Red 1X (Biotium, CA, USA). Paralelamente a las muestras, se sembró 1 μl del marcador de pares de bases (Ladder 100 pb, PBL Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) con el objetivo de determinar la correspondencia del producto amplificado (detallado en la Tabla 3) con el tamaño de fragmento según el marcador. Las bandas obtenidas se visualizaron en el gel bajo luz UV de un transiluminador (Labnet, Edison, Estados Unidos) y se tomaron fotografías usando una cámara digital (Olympus C-5060, Olympus America INC., USA).

#### 3.5.5. Secuenciación.

Los productos obtenidos por PCR de los diferentes genes en estudio se enviaron a secuenciar a un laboratorio privado (Macrogen, Korea) a los fines de confirmar su identidad. Por ello se realizó una PCR convencional para cada uno de los genes evaluados. Las secuencias obtenidas fueron inicialmente analizadas con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor y luego cotejadas con la base de datos del NCBI empleando la herramienta BLAST *nucleotide* (BLASTn), para confirmar la especificidad de los genes y para determinar la ubicación de los nucleótidos, asegurándonos así no amplificar regiones homólogas correspondientes a otros genes.

### 3.5.6. PCR en tiempo real.

Se utilizó un protocolo optimizado de PCR en tiempo real (RT-qPCR) para analizar la expresión de los ARNm correspondientes a todos los genes en estudio y el gen de referencia, utilizando un termociclador en tiempo real StepOne (Applied Biosystems, Life technology, CA, USA) y SYBR Green I como fluoróforo (Invitrogen) (Pfaffl, 2001). Las condiciones correspondientes utilizadas para la evaluación de la expresión de cada gen, se detallan a continuación:

→ Desnaturalización inicial (1 ciclo): 98°C / 3 min.

→ Desnaturalización (1 ciclo): 98°C / 5 seg.

→ Hibridación (40 ciclos):

» TNF $\alpha$ : 58°C / 20 seg.

» IL6: 60°C / 20 seg.

» IL8: 60°C / 20 seg.

» IL1 $\alpha$ : 62°C / 20 seg.

» IL1 $\beta$ : 59°C / 20 seg.

» IL1RI: 61°C / 20 seg.

» IL1RII: 60°C / 20 seg.

» IL1RA: 60°C / 20 seg.

» RLP-19: 62°C / 20 seg.

» Extensión y lectura (40 ciclos): 72°C / 20 seg.

Cada RT-qPCR se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l. Para todas las citoquinas en estudio se utilizó 4  $\mu$ l de ADNc (previamente cuantificado por el espectrofotómetro (CLARIO SPECTROStar Nano, BMG LABTECH)) y 16  $\mu$ l de una mezcla de reacción que contenía: buffer de reacción Phire (5X), cebador sentido y antisentido (20  $\mu$ M), dNTPs (25 mM), SYBR Green I (Life Technologies), Phire Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific Company, Finland) y volúmenes adecuados de agua DEPC. La eficiencia de las PCR y las cantidades relativas de producto se determinaron por la construcción de una curva estándar de, por lo menos, cuatro puntos para cada gen en estudio. Las curvas estándares se construyeron a partir de diluciones seriadas de un pool de ADNc de tejido uterino. Las eficiencias de las PCR se calcularon usando el software Step One v2.3 (Applied Biosystems). Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Además, con el objetivo de constatar la reproducibilidad de la técnica, en cada corrida se incluyó una muestra como control, correspondiente a una de las diluciones utilizadas en la curva estándar. Asimismo, se corrió un

control negativo en cada ensayo para verificar la no contaminación de los reactivos empleados para lo cual se reemplazó el ADNc por agua DEPC. La pureza de los productos amplificados se confirmó mediante curvas de disociación del ADN.

Para llevar a cabo el análisis de expresión relativa de los genes amplificados por RT- qPCR se empleó un gen constitutivo para normalizar los valores de Ct (*threshold cycle* o valor umbral), ciclo en el cual la emisión de fluorescencia supera el ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción) de los genes de interés, teniendo en cuenta que las eficiencias de amplificación de todos ellos en las reacciones de RT-qPCR fueron similares y cercanas al 100%. El análisis comparativo se llevó a cabo entre los valores de 'delta Ct', de todas las muestras, y cuando fue necesario los mismos fueron normalizados aplicando 'log10'.

### 3.6. Evaluación de los niveles de expresión y localización endometrial de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

Sobre los cortes histológicos realizados previamente (sección 3.1.3) y por medio de la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) indirecta (Woods, 1994), se analizó la expresión proteica y localización celular de citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL1RI IL6, IL8) y antiinflamatorias (IL4, IL1RA, IL1RII, TGF $\beta_3$ ) en los diferentes estratos celulares del endometrio: EL, EG y Es.

#### 3.6.1. Inmunohistoquímica indirecta.

Para realizar dicha técnica se siguió el siguiente protocolo (Ortega *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2004; Baravalle *et al.*, 2011):

- Los cortes histológicos se colocaron 10-15 min en la estufa de 60°C.
- Luego se desparafinaron realizando 2 cambios sucesivos de xilol de 15 y 10 min, se hidrataron en una serie de alcoholes con graduación decreciente (etanol 100°, etanol 96° y etanol 70°), y se lavaron en PBS durante 5 min.
- Se procedió a la recuperación antigénica. En la tabla 4 se detalla la recuperación utilizada para cada anticuerpo. Para la recuperación antigénica convencional en horno microondas, 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 20 min dentro del microondas apagado. Mientras que para la recuperación antigénica intensa en horno microondas, los cortes se colocaron en buffer

citrato 0,01 M pH 6,0 durante 5 min a 100% de potencia (dos veces), 6 min a 40% (dos veces) y 20 min dentro del microondas apagado. En ambos procedimientos de recuperación, entre cada paso y si era necesario, se completó el coplin que contiene los cortes con agua destilada caliente.

- Se bloqueó la actividad endógena de la peroxidasa sumergiendo los cortes durante 10 min en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 min.
- Se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min.
- Se bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal de cabra al 10% o burro al 10%, según correspondía teniendo en cuenta la especie de origen del anticuerpo primario (Tabla 4), en cámara húmeda por 15 min a 25°C en estufa.
- Se incubó con el anticuerpo primario. Los anticuerpos y las concentraciones utilizadas para cada uno de ellos se encuentran detallados en la Tabla 4. Las incubaciones se realizaron en cámara húmeda durante toda la noche (mínimo 16 h) a 4°C o 25°C según fuera el caso. Luego se realizaron 2 lavados de 5 min con PBS.
- Se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente, según el anticuerpo primario utilizado (Tabla 5) en cámara húmeda durante 30 min a 25°C, luego se realizaron 2 lavados con PBS durante 5 min.
- Se incubó con extravidina-peroxidasa (Sigma-aldrich), en cámara húmeda durante 30 min a 25°C, luego se realizaron 5 lavados con PBS durante 5 min.
- Se adicionó cromógeno 3,3'-diaminobencidina (Kit DAB Plus, Invitrogen), controlando la reacción positiva en microscopio óptico y se detuvo la reacción en agua destilada (Velazquez *et al.*, 2010; Salvetti *et al.*, 2012).
- Se empleó hematoxilina activada (Biopur, Bubendorf, Suiza) para la contracoloración de los tejidos, luego se deshidrataron en una serie de alcoholes con graduación creciente (etanol 70°, etanol 96° y etanol 100°), se aclararon en xilol y se procedió al 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.

Tabla 4. Anticuerpos primarios, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de IHQ indirecta.

| TIPO Y PROVEEDOR   | CONDICIONES                   | RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA    | BLOQUEO                      |
|--|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| <b><i>Citoquinas proinflamatorias</i></b>                                    |                               |                            |                              |
| <b><i>TNF<math>\alpha</math></i></b><br>Policlonal (AHP852Z, Serotec)        | 1/100<br>Toda la noche a 25°C | -                          | Suero normal de cabra al 10% |
| <b><i>INF<math>\gamma</math></i></b><br>Policlonal (PB0156B-100, Kingfisher) | 1/800<br>Toda la noche a 7°C  | Convencional en microondas | -                            |
| <b><i>IL6</i></b><br>Monoclonal (MAB686, R&D systems)                        | 1/600<br>Toda la noche a 25°C | -                          | Suero normal de cabra al 10% |
| <b><i>IL8</i></b><br>Monoclonal (ab34100, Abcam)                             | 1/25<br>Toda la noche a 25°C  | Intensa en microondas      | Suero normal de cabra al 10% |
| <b><i>IL1<math>\alpha</math></i></b><br>Policlonal (P420A, Endogen)          | 1/150<br>Toda la noche a 4°C  | -                          | Suero normal de cabra al 10% |
| <b><i>IL1<math>\beta</math></i></b><br>Monoclonal (MCA1658, Serotec)         | 1/25<br>Toda la noche a 25°C  | Intensa en microondas      | Suero normal de cabra al 10% |
| <b><i>IL1RI</i></b><br>Monoclonal (NBP1-50304, Novus Biological)             | 1/100<br>Toda la noche a 25°C | Convencional en microondas | Suero normal de cabra al 10% |
| <b><i>Citoquinas antiinflamatorias</i></b>                                   |                               |                            |                              |
| <b><i>IL1RII</i></b><br>Policlonal (sc-292522, Santa Cruz)                   | 1/25<br>Toda la noche a 4°C   | -                          | Suero normal de cabra al 10% |
| <b><i>IL1RA</i></b><br>Policlonal (sc-8481, Santa Cruz)                      | 1/25<br>Toda la noche a 4°C   | -                          | Suero normal de burro al 10% |
| <b><i>IL4</i></b><br>Policlonal (AF2469, R&D systems)                        | 1/25<br>Toda la noche a 4°C   | -                          | Suero normal de burro al 10% |
| <b><i>TGF<math>\beta_3</math></i></b><br>Policlonal (sc-83, Santa Cruz)      | 1/600<br>Toda la noche a 4°C  | Convencional en microondas | Suero normal de cabra al 10% |

**Tabla 5.** Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de IHQ indirecta.

| ANTICUERPO SECUNDARIO                   | PROVEEDOR          | DILUCIÓN |
|---|--------------------|----------|
| <b>Goat anti-mouse IgG Biotinilado</b>  | Santa Cruz sc-2039 | 1/100    |
| <b>Goat anti-rabbit IgG Biotinilado</b> | Santa Cruz sc-2040 | 1/100    |
| <b>Donkey anti-goat IgG Biotinilado</b> | Santa Cruz sc-2042 | 1/2000   |

### 3.6.2. Análisis de imágenes.

Las imágenes de los preparados histológicos fueron tomadas mediante una cámara digital (Nikon DS-Fi2, Tokio, Japón) conectada a una PC de escritorio montada sobre un microscopio óptico (Nikon Eclipse Ci-L Ni). 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 (Velazquez *et al.*, 2010; Salvetti *et al.*, 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 *et al.*, 2004). 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 fue calculada separadamente para cada estrato del endometrio (epitelio luminal, epitelio glandular y estroma). Este procedimiento se realizó, siempre que fue posible, para al menos 10 imágenes de cada uno de los estratos.

### 3.7. Evaluación del número de macrófagos infiltrantes a nivel endometrial.

Sobre los cortes histológicos obtenidos (ver sección 3.1.3) y por medio de la técnica de IHQ indirecta descrita previamente se analizó la expresión proteica del cúmulo de diferenciación de superficie (CD14) para identificar y cuantificar los macrófagos infiltrantes en endometrio. Particularmente para esta determinación se utilizó una recuperación antigénica enzimática con Tripsina, habiéndose inactivado la peroxidasa endógena previamente. Brevemente: los cortes se incubaron con dicha enzima a 37°C durante 10 min. Luego de la incubación se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se continuó con la incubación del anticuerpo primario. En la tabla 6 se resumen las condiciones utilizadas.

**Tabla 6.** Anticuerpos primarios, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de IHQ indirecta para CD14.

| TIPO Y PROVEEDOR   | CONDICIONES                  | RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA | BLOQUEO |
|--|------------------------------|-------------------------|---------|
| <b>Anti- CD14</b><br>Monoclonal (RPA-M1, ZYMED Laboratories) | 1/25<br>Toda la noche a 25°C | Tripsina                | -       |

### 3.8. Análisis estadístico.

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 Kolmogórov-Smirnov y Levene, respectivamente, se realizaron los siguientes análisis estadísticos. Para analizar a lo largo de toda la lactancia (de los 45 a los 180 DPP), la evolución de las concentraciones plasmáticas de 17 $\beta$ -Estradiol, progesterona, cortisol, glucosa, BHB y AGNE, como así también, el recuento de leucocitos totales y el recuento diferencial de neutrófilos, monocitos y linfocitos, se utilizó un Modelo Lineal Generalizado (MLG) considerando tales parámetros como variables respuesta y los DPP como factor. Dicho análisis se realizó sobre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>120</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. También se utilizó un MLG para evaluar a los 45 y 60 DPP, los niveles de expresión génica y proteica de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias y el número de macrófagos infiltrantes (variables respuesta), considerando los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub> como factor.

Para evaluar los niveles de AF y CF de monocitos/macrófagos, en asociación al contexto metabólico/hormonal a lo largo de la lactancia, se utilizó un MLG considerando los valores de AF y CF como variables dependientes, y las concentraciones plasmáticas de 17 $\beta$ -estradiol,

progesterona, cortisol, AGNE, BHB y glucosa, como covariables. El análisis se realizó incluyendo en el modelo sólo las covariables que resultaron significativas en una prueba anterior. A su vez, los valores de  $\beta$  arrojados por el análisis estadístico, se utilizaron para explicar la asociación directa ( $\beta > 0$ ) o inversa ( $\beta < 0$ ) entre la AF o CF y las concentraciones de metabolitos/hormonas en cada momento evaluado.

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 (EEM). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ .

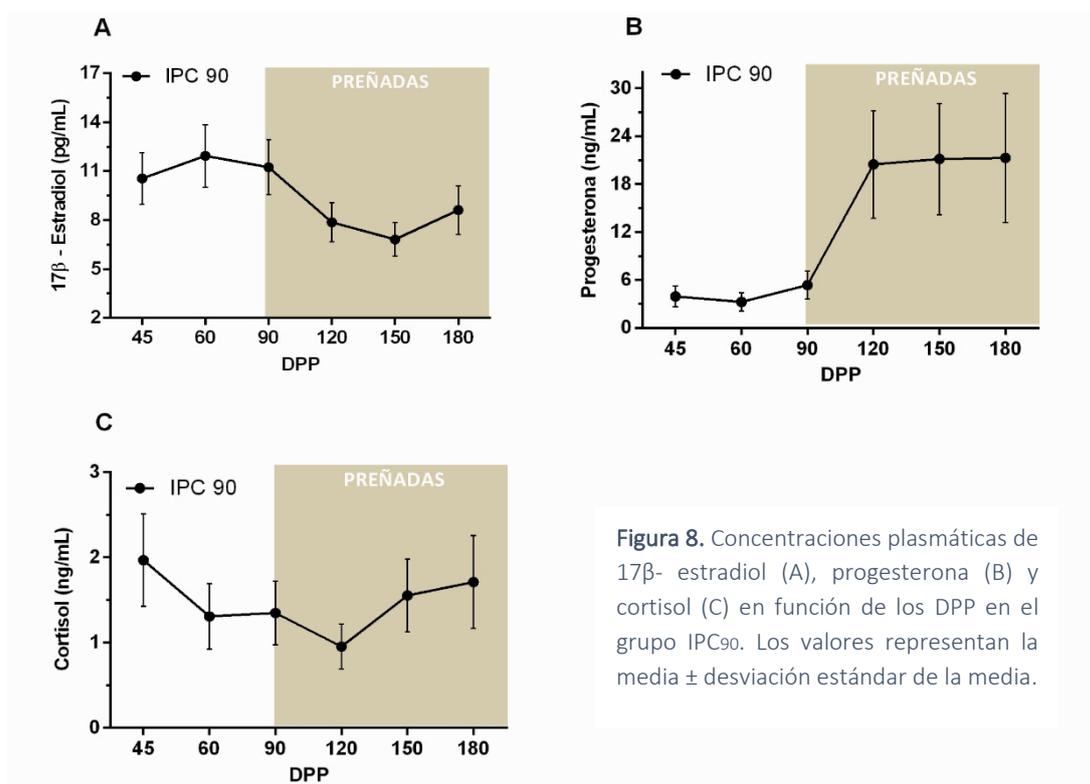
Finalmente, para evaluar el posible efecto de los parámetros inmunológicos medidos a nivel endometrial y sistémico, sobre el retraso en el establecimiento de la preñez de los animales, se utilizó un modelo de supervivencia de Kaplan-Meier. En dicho análisis la variable tiempo representada por el IPC (valores continuos) de los animales que lograron la preñez, corresponde a la variable respuesta. A su vez, se utilizaron como factores las mediciones endometriales de expresión génica y proteica de las citoquinas, a los 60 DPP (es decir, previo a la liberación a servicio de los animales). También se utilizaron como factores los niveles de AF y CF previos a la preñez ( $25 \pm 10$  días previos a la concepción). Dichos valores se categorizaron ('altos/bajos niveles de expresión' o 'altos/bajos niveles de AF o CF') según la media de los datos. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

4.1. Determinación de las concentraciones plasmáticas de metabolitos relacionados a la condición nutricional y hormonal ( $\beta$ -hidroxibutirato, glucosa, ácidos grasos no esterificados,  $17\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol) de vacas lecheras durante la lactancia y preñez.

#### 4.1.1. Concentraciones plasmáticas de $17\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol a lo largo de la lactancia y la preñez.

Para el **grupo IPC<sub>90</sub>** las concentraciones plasmáticas de  $17\beta$ -estradiol y progesterona se encontraron dentro de los parámetros normales para la especie teniendo en cuenta el estado fisiológico antes y después de los 90 DPP, momento aproximado de la concepción para este grupo de vacas (Figura 8 A y 8 B, respectivamente). En relación a las concentraciones plasmáticas de cortisol no hubo diferencias significativas en función de los DPP ( $p = 0,583$ ) (Figura 8 C).



Para el **grupo IPC<sub>120</sub>** las concentraciones plasmáticas de  $17\beta$ -estradiol y progesterona se encontraron dentro de los parámetros normales para la especie teniendo en cuenta el estado fisiológico antes y después de los 120 DPP, momento aproximado de la concepción para este

grupo de vacas (Figura 9 A y 9 B, respectivamente). En relación a las concentraciones plasmáticas de cortisol no hubo diferencias significativas en función de los DPP ( $p = 0,842$ ) (Figura 9 C).

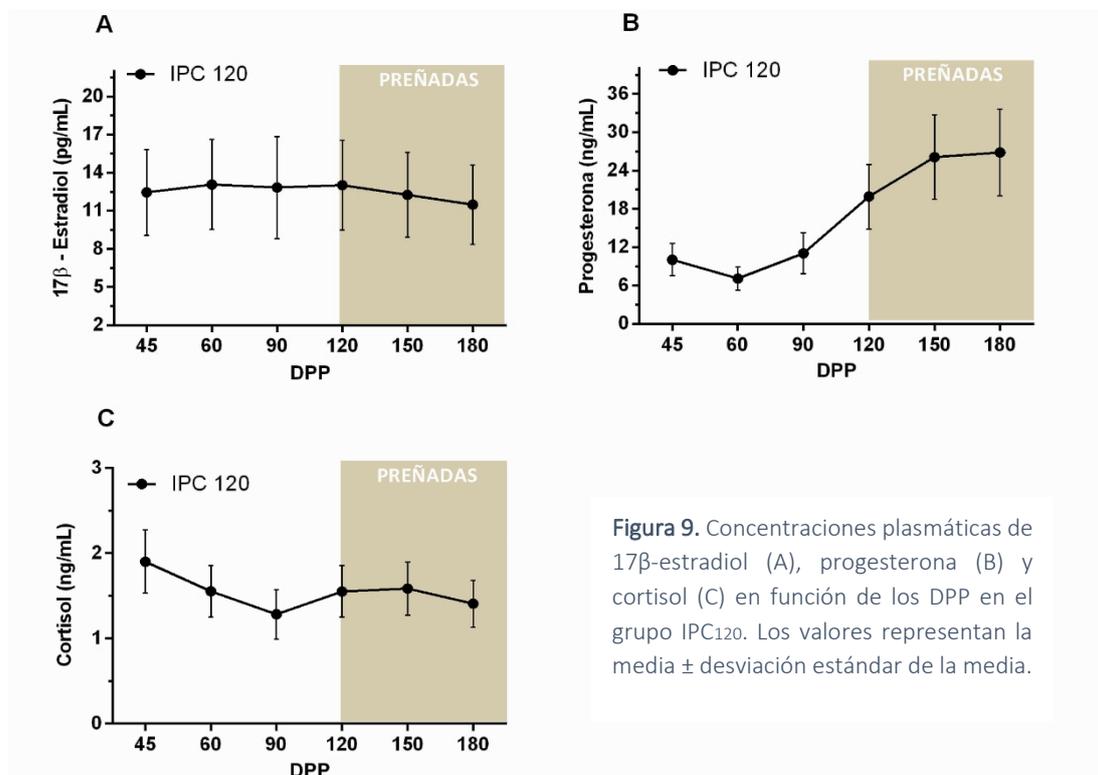


Figura 9. Concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol (A), progesterona (B) y cortisol (C) en función de los DPP en el grupo IPC120. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media.

Para el grupo  $IPC_{180}$  las concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol y progesterona se encontraron dentro de los parámetros normales para la especie siendo los 180 DPP el momento aproximado de la concepción para este grupo de vacas (Figura 10 A y 10 B, respectivamente). En relación a las concentraciones plasmáticas de cortisol no hubo diferencias significativas en función de los DPP ( $p = 0,265$ ) (Figura 10 C).

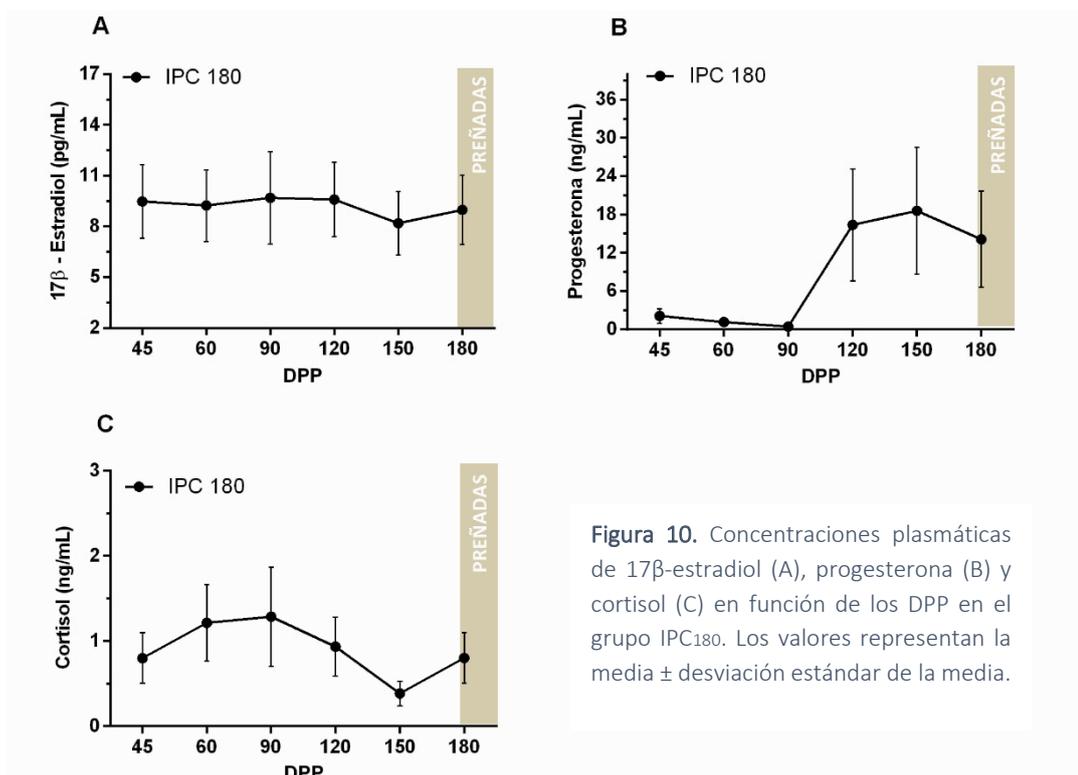
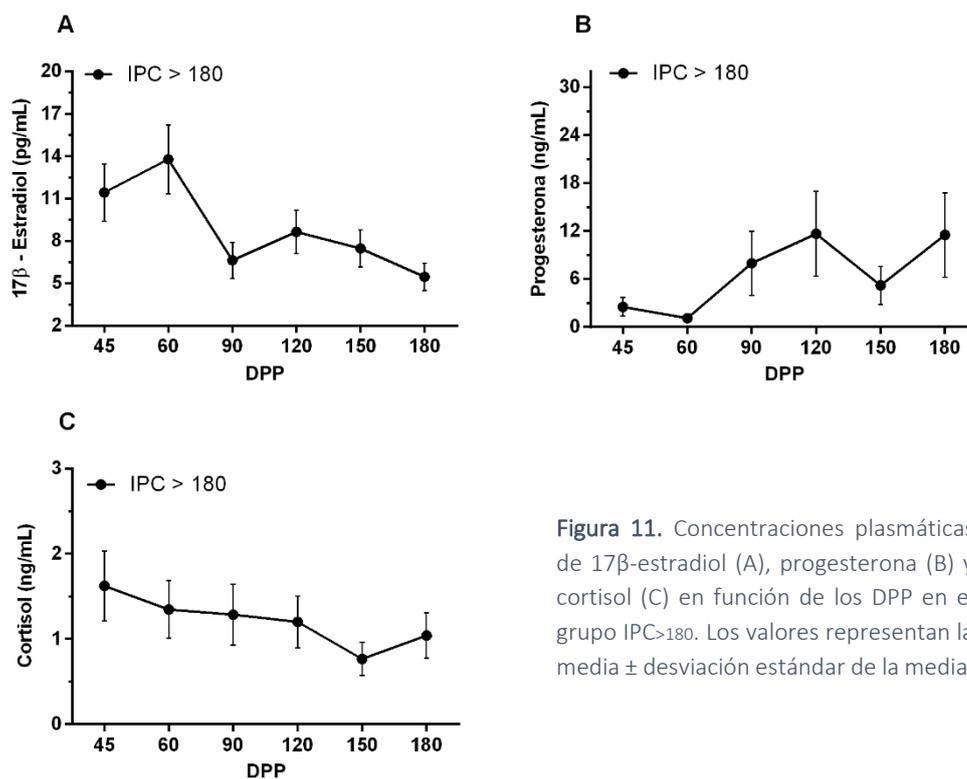


Figura 10. Concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol (A), progesterona (B) y cortisol (C) en función de los DPP en el grupo IPC180. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media.

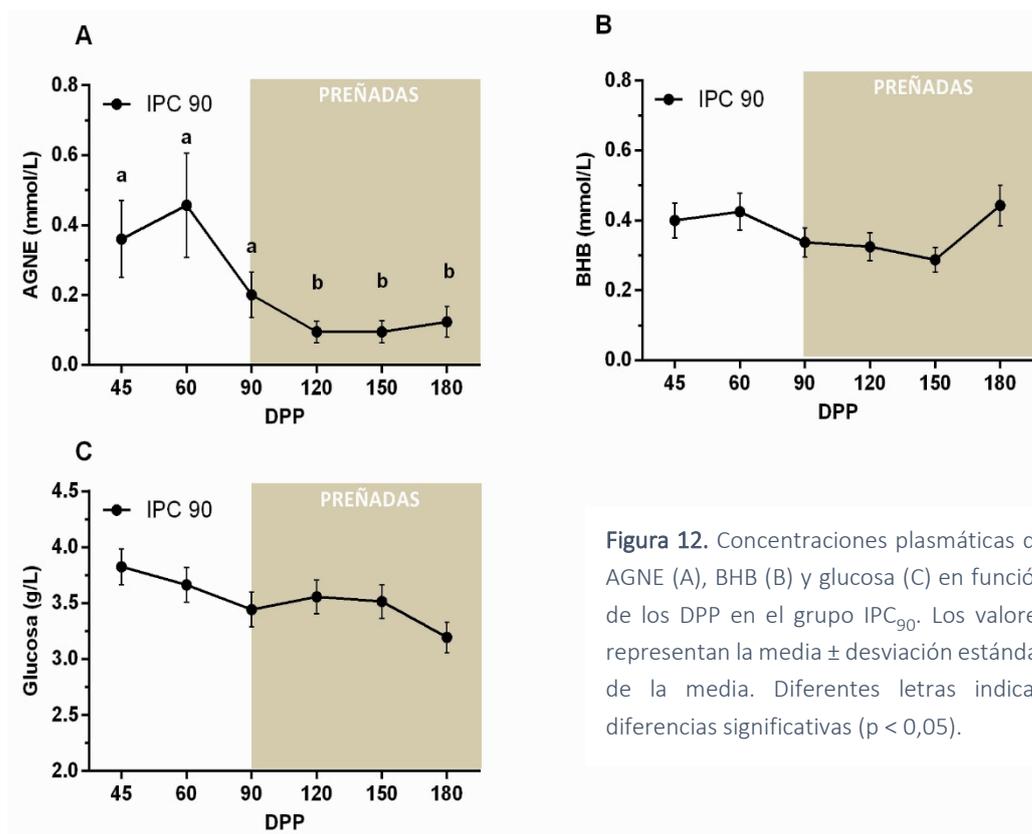
Para el grupo  $IPC_{>180}$  las concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol y progesterona se encontraron dentro de los parámetros normales para la especie si bien los animales a lo largo de todo el muestreo no lograron la preñez (Figura 11 A y 11 B, respectivamente). En relación a las concentraciones plasmáticas de cortisol no hubo diferencias significativas en función de los DPP ( $p = 0,401$ ) (Figura 11 C).



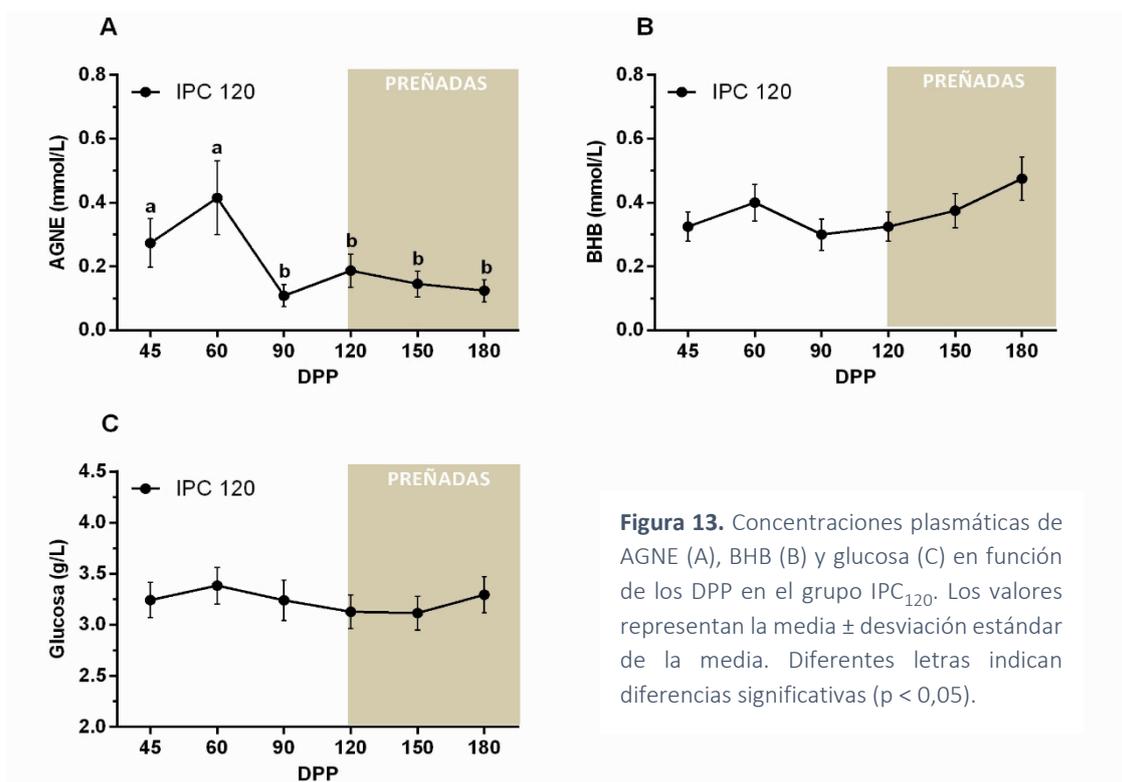
**Figura 11.** Concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol (A), progesterona (B) y cortisol (C) en función de los DPP en el grupo IPC>180. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media.

#### 4.1.2. Concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados, β-hidroxi-butarato y glucosa a lo largo de la lactancia y la preñez.

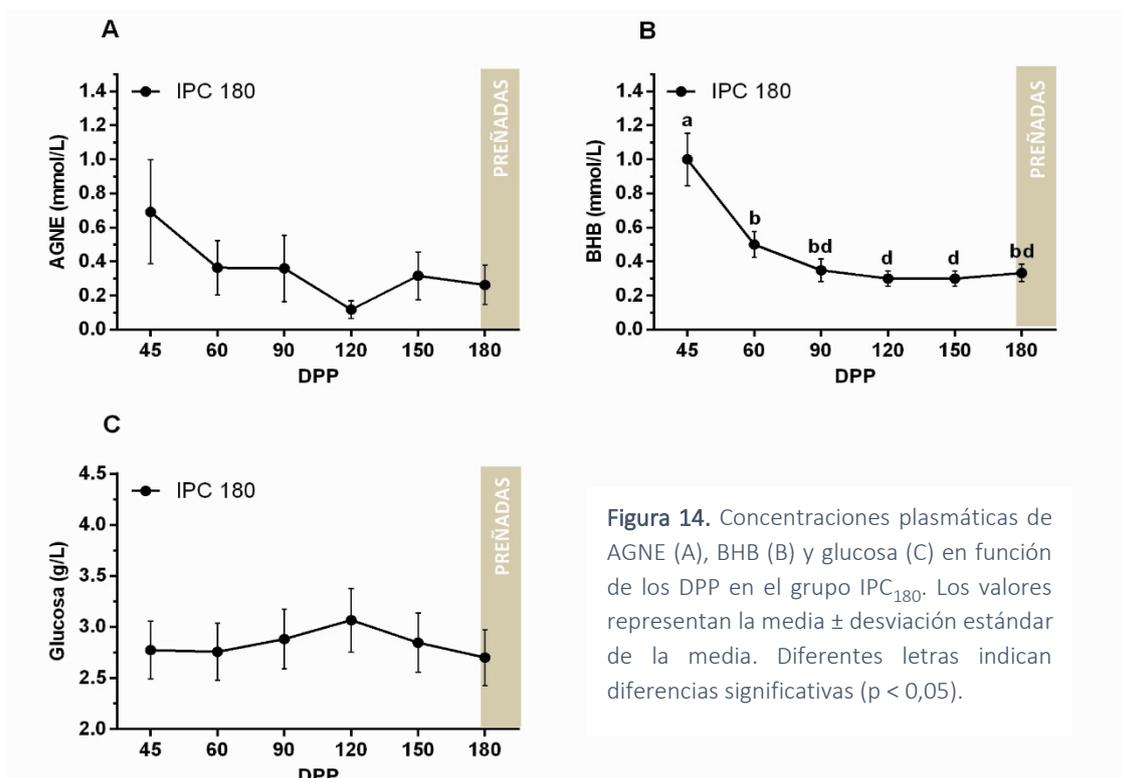
Para el **grupo IPC<sub>90</sub>** las concentraciones plasmáticas de AGNE mostraron diferencias significativas a lo largo del tiempo ( $p < 0,001$ ). Específicamente, los niveles de AGNE a los 120, 150 y 180 DPP fueron significativamente menores en comparación a los observados a los 45, 60 y 90 DPP (Figura 12 A). En relación a las concentraciones plasmáticas de BHB y glucosa no hubo diferencias significativas en función de los DPP ( $p = 0,137$  y  $p = 0,680$ , respectivamente) (Figura 12 B y 12 C, respectivamente).



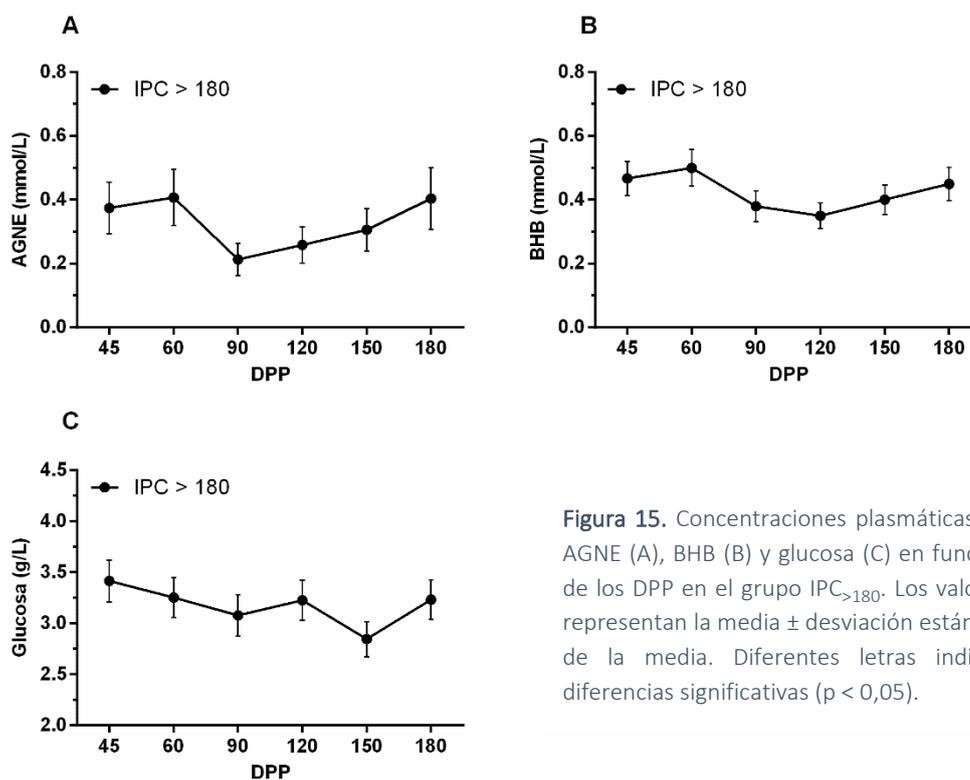
Para el grupo IPC<sub>120</sub> las concentraciones plasmáticas de AGNE mostraron diferencias significativas a lo largo del tiempo ( $p = 0,007$ ). Específicamente, los niveles a los 90, 120, 150 y 180 DPP fueron significativamente menores en comparación a los 45 y 60 DPP (Figura 13 A). En relación a las concentraciones plasmáticas de BHB y glucosa no hubo diferencias significativas en función de los DPP ( $p = 0,247$  y  $p = 0,879$ , respectivamente) (Figura 13 B y 13 C, respectivamente).



Para el grupo IPC<sub>180</sub> las concentraciones plasmáticas de BHB tuvieron un efecto significativo en función de los DPP ( $p < 0,001$ ). Específicamente, los niveles a los 45 DPP fueron significativamente mayores en comparación a los 60, 90, 120, 150 y 180 DPP (Figura 14 B). En relación a las concentraciones plasmáticas de AGNE y glucosa no hubo diferencias significativas en función de los DPP ( $p = 0,135$  y  $p = 0,964$ , respectivamente) (Figura 14 A y 14 C, respectivamente).



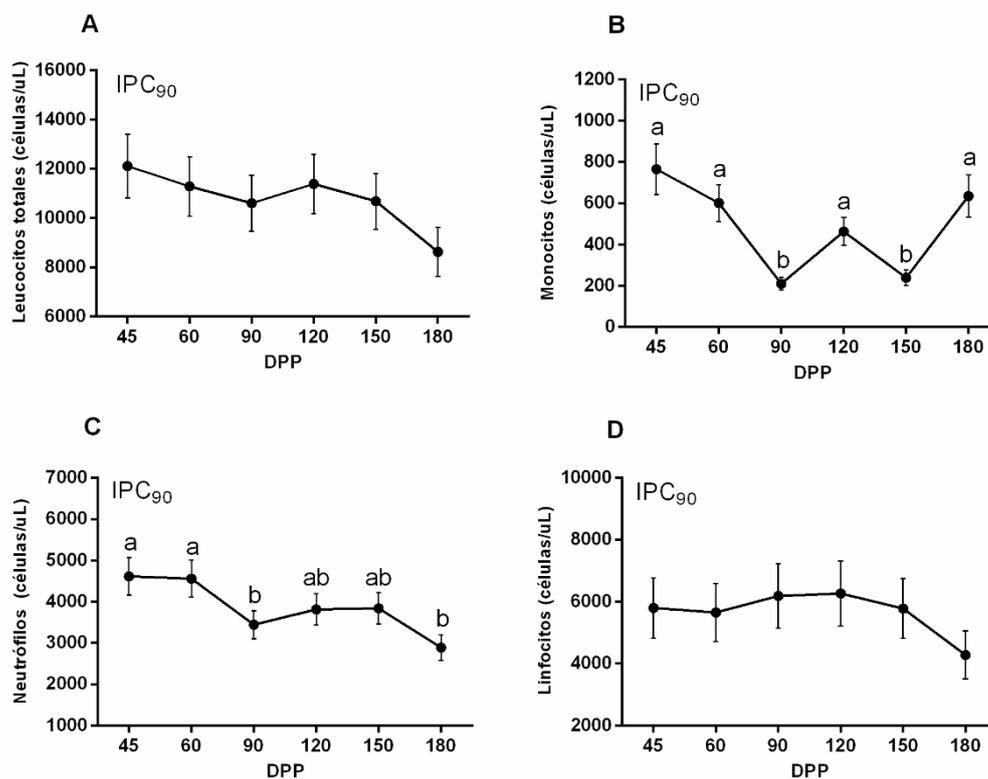
Para el grupo  $IPC_{>180}$  las concentraciones plasmáticas de AGNE, BHB y glucosa no mostraron diferencias significativas en función de los DPP ( $p = 0,250$ ,  $p = 0,239$  y  $p = 0,385$ , respectivamente) (Figura 15 A, 15 B y 15 C, respectivamente).



4.2. Caracterización del perfil inmune a nivel sistémico y posibles alteraciones en la actividad y capacidad fagocítica de leucocitos aislados de sangre periférica, durante la preñez y lactancia en función del contexto metabólico/hormonal.

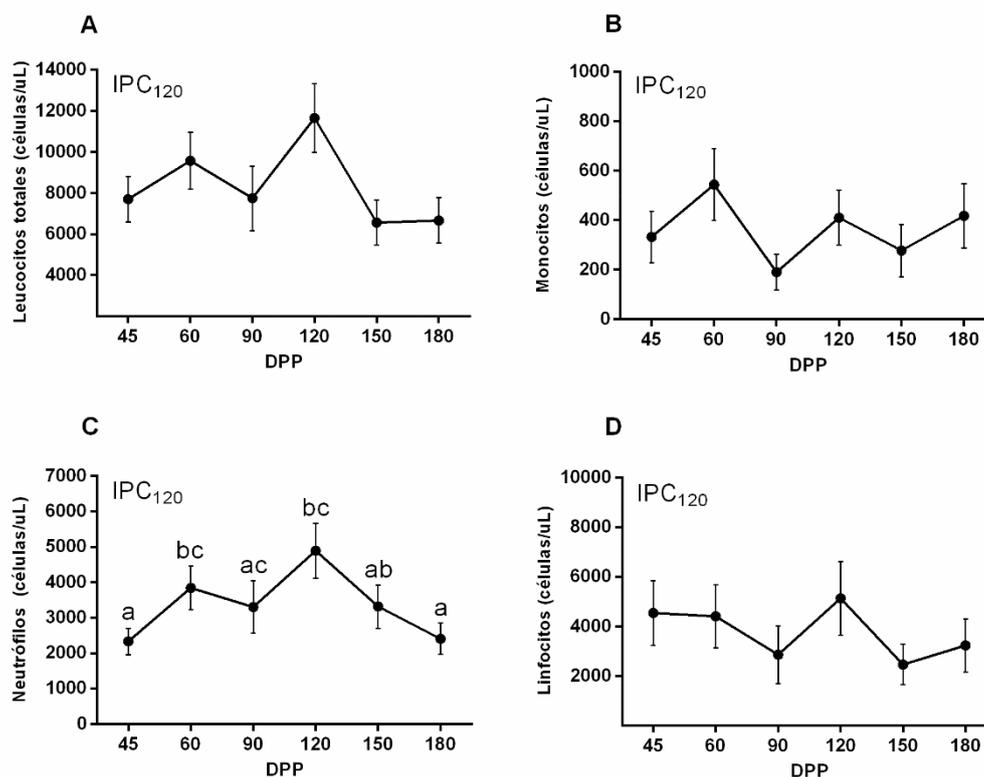
4.2.1. Recuento de leucocitos totales y diferencial a lo largo de la lactancia y la preñez.

En el **grupo IPC<sub>90</sub>** el recuento total de leucocitos no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo ( $p = 0,365$ ) (Figura 16 A). En relación al recuento diferencial, los DPP tuvieron un efecto significativo sobre el recuento de monocitos y neutrófilos ( $p < 0,001$  y  $p = 0,011$ , respectivamente). Específicamente, el número de monocitos a los 90 y 150 DPP fue significativamente menor que a los 45, 60, 120 y 180 DPP (Figura 16 B). Por otro lado, el número de neutrófilos a los 90 y 180 DPP fue significativamente menor que a los 45 y 60 DPP (Figura 16 C). El número de linfocitos no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo ( $p = 0,689$ ) (Figura 16 D).



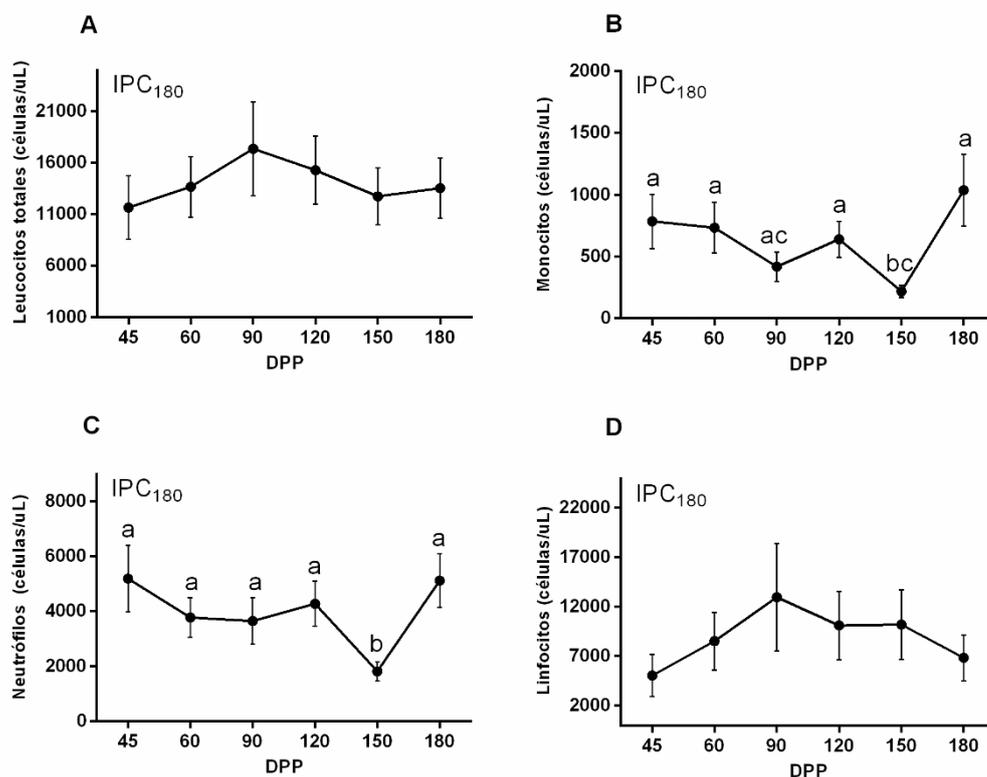
**Figura 16.** Efecto de los DPP sobre el recuento de leucocitos totales (A) y el recuento diferencial de monocitos (B), neutrófilos (C) y linfocitos (D) en el grupo IPC<sub>90</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En el **grupo IPC<sub>120</sub>** el recuento total de leucocitos no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo ( $p = 0,600$ ) (Figura 17 A). En relación al recuento diferencial, los DPP tuvieron un efecto significativo sobre el recuento de neutrófilos ( $p = 0,011$ ). El número de neutrófilos a los 60 y 120 DPP fue significativamente mayor que a los 45 y 180 DPP (Figura 17 C). El número de monocitos y linfocitos no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo ( $p = 0,295$  y  $p = 0,529$ ) (Figura 17 B y 17 D, respectivamente).



**Figura 17.** Efecto de los DPP sobre el recuento de leucocitos totales (A) y el recuento diferencial de monocitos (B), neutrófilos (C) y linfocitos (D) en el grupo IPC<sub>120</sub>. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas (p < 0,05).

En el **grupo IPC<sub>180</sub>** el recuento total de leucocitos no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo (p = 0,910) (Figura 18 A). En relación al recuento diferencial, los DPP tuvieron un efecto significativo sobre el recuento de monocitos y neutrófilos (p < 0,001 y p = 0,039, respectivamente). Específicamente, el número de monocitos a los 150 DPP fue significativamente menor que a los 45, 60, 120 y 180 DPP (Figura 18 B). Por otro lado, el número de neutrófilos a los 150 DPP fue significativamente menor que el encontrado a los demás tiempos (Figura 18 C). El número de linfocitos no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo (p = 0,630) (Figura 18 D).



**Figura 18.** Efecto de los días DPP sobre el recuento de leucocitos totales (A) y el recuento diferencial de monocitos (B), neutrófilos (C) y linfocitos (D) en el grupo IPC<sub>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En el grupo IPC<sub>180</sub> el recuento total de leucocitos no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo ( $p = 0,856$ ) (Figura 19 A). En relación al recuento diferencial, los DPP tuvieron un efecto significativo sobre el recuento de monocitos ( $p = 0,002$ ). El número de monocitos a los 150 DPP fue significativamente menor que el encontrado a los demás tiempos, siendo el recuento a los 180 DPP superior al registrado a los 90, 120 y 150 DPP (Figura 19 B). El número de neutrófilos y linfocitos no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo ( $p = 0,783$  y  $p = 0,937$ ) (Figura 19 C y 19 D, respectivamente).

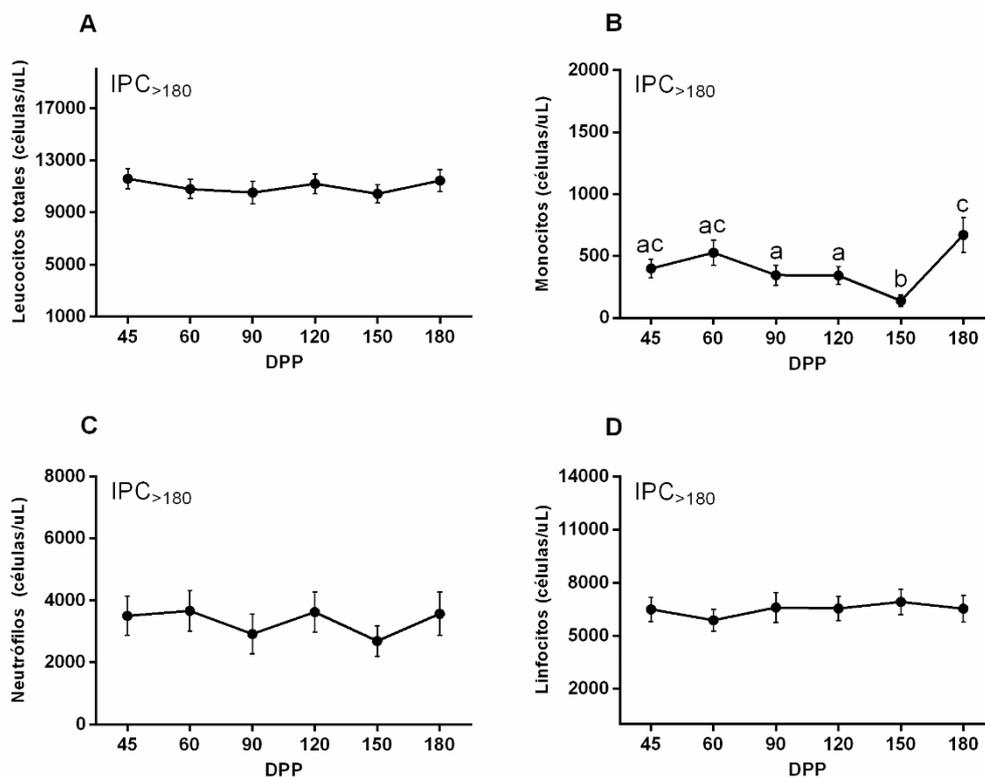


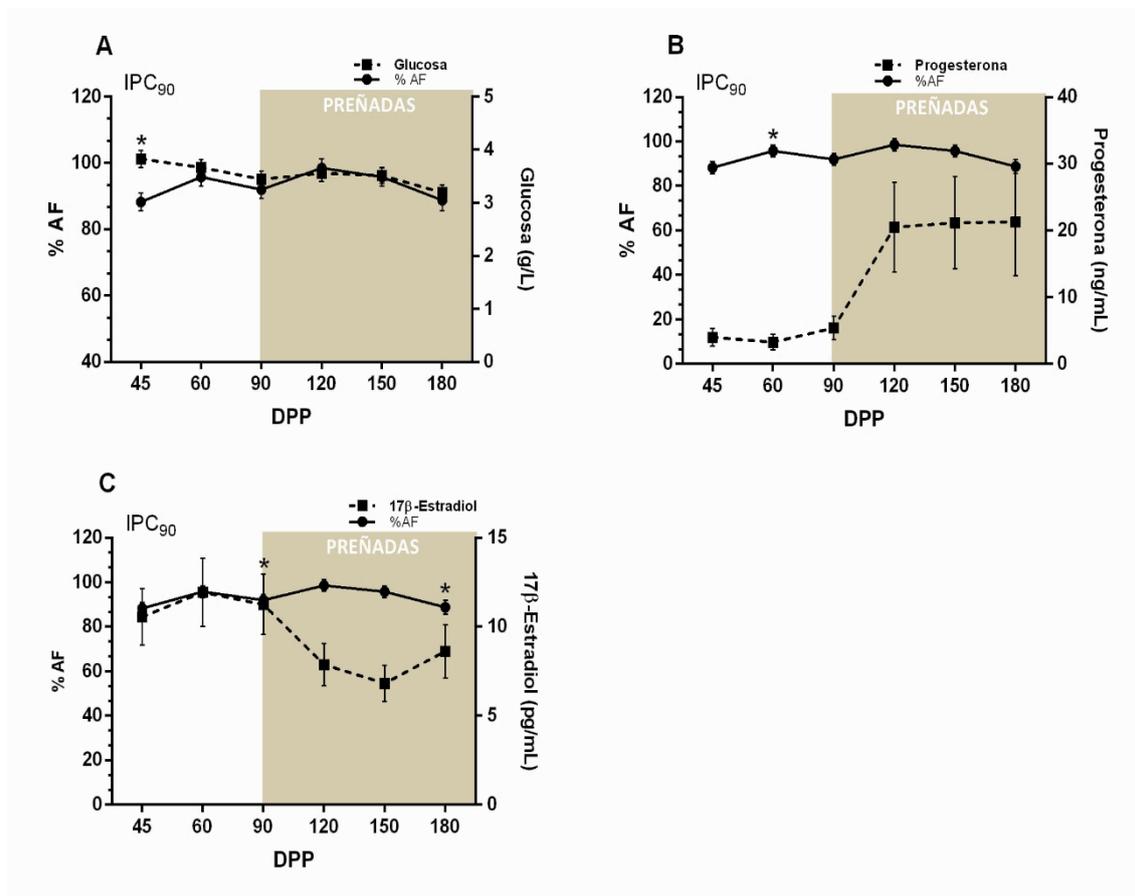
Figura 19. Efecto de los DPP sobre el recuento de leucocitos totales (A) y el recuento diferencial de monocitos (B), neutrófilos (C) y linfocitos (D) en el grupo  $IPC_{>180}$ . Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Determinación de la actividad y capacidad fagocítica en asociación al contexto metabólico y hormonal a lo largo de la lactancia y la preñez.

##### 4.2.2.1. Actividad fagocítica en asociación al contexto metabólico y hormonal a lo largo de la lactancia y la preñez.

En el grupo  $IPC_{90}$  se observó que las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y glucosa se encuentran asociadas significativamente con la AF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo. Específicamente, la asociación de la glucosa con la AF fue significativa a los 45 DPP ( $p = 0,024$ ). A medida que los niveles de glucosa disminuyeron, la AF aumentó ( $\beta = -16,301$ ) (Figura 20 A). La asociación de la progesterona con la AF fue significativa a los 60 DPP ( $p = 0,009$ ). A medida que los niveles de progesterona aumentaron, la AF disminuyó ( $\beta = -1,483$ ) (Figura 20 B). La asociación del  $17\beta$ -estradiol con la AF fue significativa a los 90 DPP y a los 180 DPP ( $p = 0,000$  y  $p = 0,025$ , respectivamente). A los 90 DPP a medida que los niveles de  $17\beta$ -estradiol aumentaron,

la AF disminuyó ( $\beta = -1,275$ ) (Figura 20 C). Mientras que a los 180 DPP, a medida que los niveles de  $17\beta$ -estradiol aumentaron, la AF aumentó (Figura 20 C). En cuanto a las concentraciones de cortisol, AGNE y BHB no tuvieron una asociación significativa con la AF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo en el grupo  $IPC_{90}$  ( $p > 0,05$ ).



**Figura 20.** Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la AF a lo largo del tiempo en el grupo  $IPC_{90}$ . Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (\*,  $p < 0,05$ ).

En el grupo  $IPC_{120}$  se observó que las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol, progesterona, BHB y glucosa se encuentran asociadas significativamente con la AF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo. Específicamente, la asociación del  $17\beta$ -estradiol con la AF fue significativa a los 45 DPP ( $p = 0,009$ ). A medida que los niveles de  $17\beta$ -estradiol aumentaron, la AF disminuyó ( $\beta = -1,114$ ) (Figura 21 A). La asociación de la progesterona con la AF fue significativa a los 90 DPP ( $p < 0,001$ ). A medida que los niveles de progesterona aumentaron, la AF disminuyó ( $\beta = -0,869$ ) (Figura 21 B). La asociación del BHB y la glucosa con la AF fue significativa a los 120 DPP ( $p = 0,028$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). A medida que las concentraciones de BHB aumentaron, la AF disminuyó ( $\beta = -10,826$ ) (Figura 21 D). Mientras que, a medida que los niveles de glucosa aumentaron, la AF aumentó ( $\beta = 4,946$ ) (Figura 21 C). En cuanto a las concentraciones de cortisol

y AGNE no tuvieron una asociación significativa con la AF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo en el grupo IPC<sub>120</sub> ( $p > 0,05$ ).

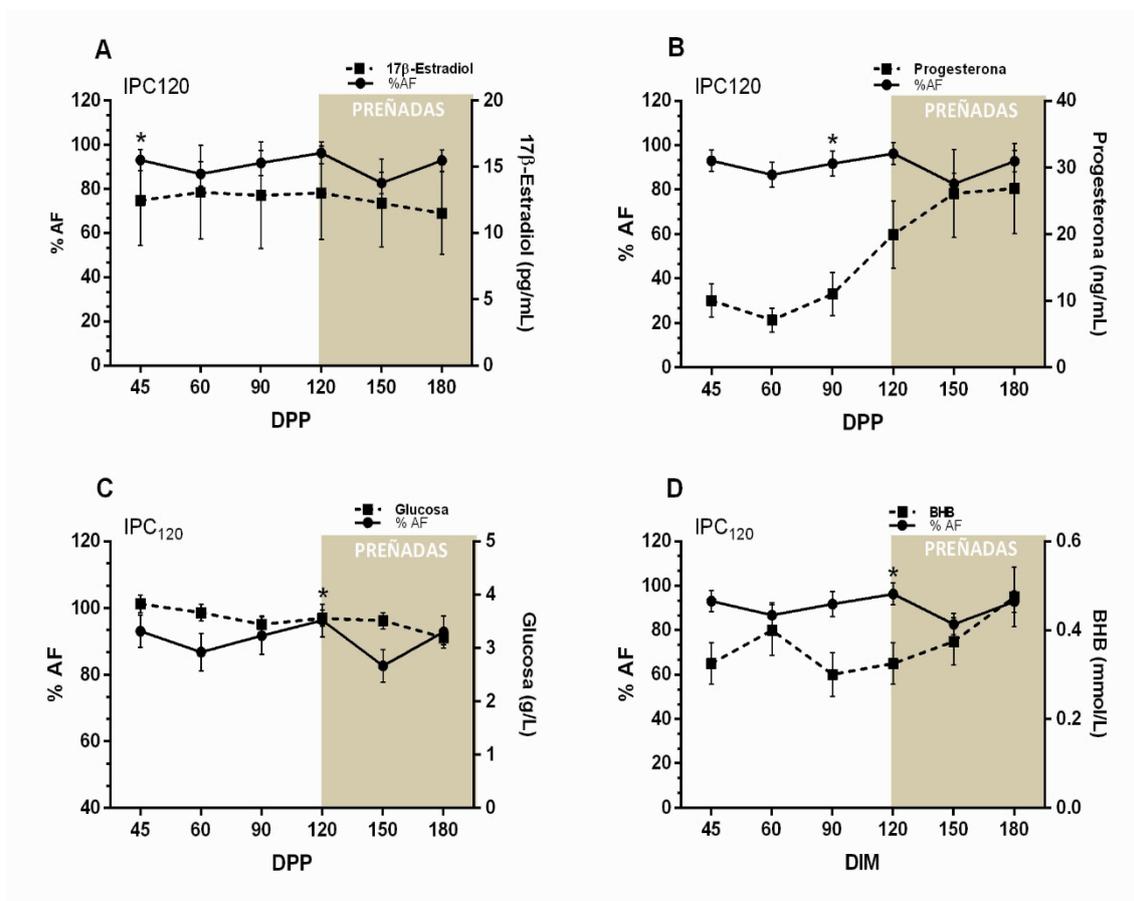


Figura 21. Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la AF a lo largo del tiempo en el grupo IPC<sub>120</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (\*,  $p < 0,05$ ).

En el grupo IPC<sub>180</sub> las concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona, cortisol, AGNE, BHB y glucosa no tuvieron una asociación significativa con la AF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo ( $p > 0,05$ ).

En el grupo IPC<sub>>180</sub> se observó que las concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona, BHB y glucosa se encuentran asociadas significativamente con la AF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo. Específicamente, la asociación del 17 $\beta$ -estradiol con la AF fue significativa a los 45 DPP ( $p = 0,000$ ). A medida que los niveles de 17 $\beta$ -estradiol aumentaron, la AF aumentó ( $\beta = 1,105$ ) (Figura 22 A). La asociación de la glucosa con la AF, fue significativa a los 45 DPP ( $p = 0,000$ ). A medida que los niveles de glucosa aumentaron, la AF disminuyó ( $\beta = -21,502$ ) (Figura 22 B). La asociación del BHB con la AF fue significativa a los 45 DPP y a los 90 DPP ( $p < 0,001$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). En ambos casos a medida que las concentraciones de BHB aumentaron, la AF

disminuyó ( $\beta = -26,245$  y  $\beta = -32,22$ , respectivamente) (Figura 22 C). La asociación de la progesterona con la AF fue significativa a los 90 DPP y a los 150 DPP ( $p < 0,001$  y  $p = 0,028$ , respectivamente). En ambos casos a medida que las concentraciones de progesterona aumentaron, la AF disminuyó ( $\beta = -0,227$  y  $\beta = -0,078$ , respectivamente) (Figura 22 D). En cuanto a las concentraciones de cortisol y AGNE no tuvieron una asociación significativa con la AF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo en el grupo  $IPC_{>180}$  ( $p > 0,05$ ).

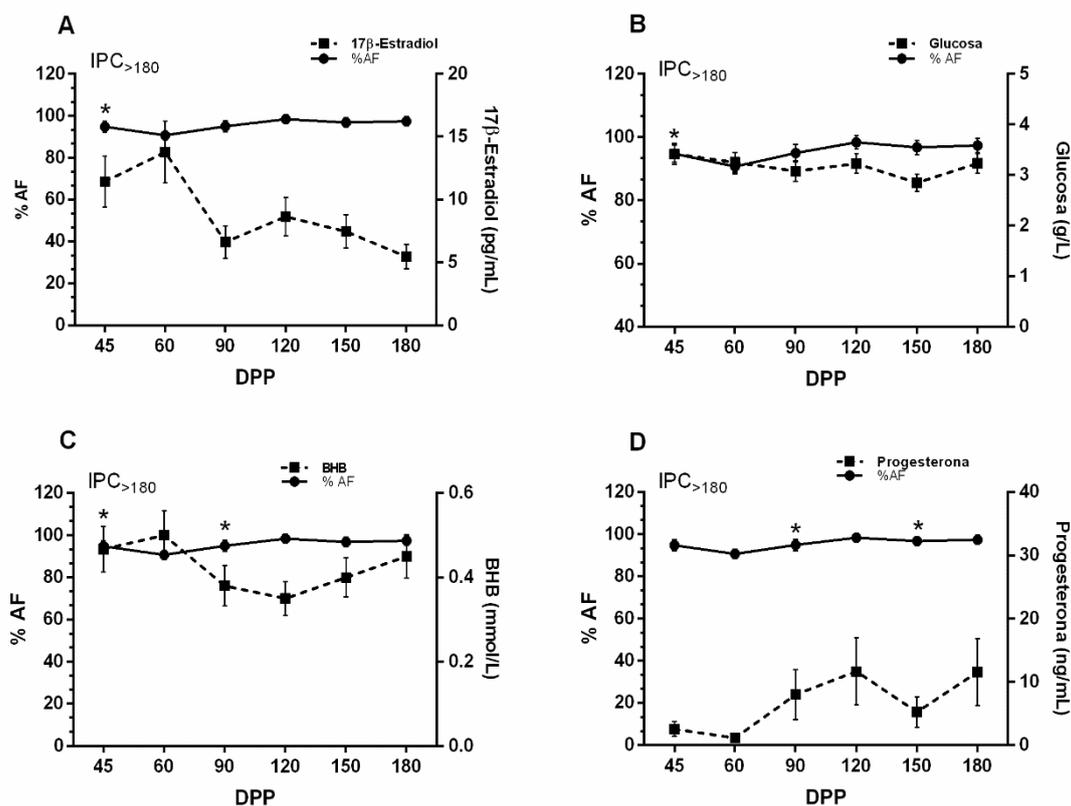


Figura 22. Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la AF a lo largo del tiempo en el grupo  $IPC_{>180}$ . Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (\*,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.2. Capacidad fagocítica en asociación al contexto metabólico y hormonal a lo largo de la lactancia y la preñez.

En el grupo  $IPC_{90}$  las concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona, cortisol, AGNE, BHB y glucosa no tuvieron una asociación significativa con la CF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo ( $p > 0,05$ ).

En el grupo  $IPC_{120}$  se observó que las concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol se encuentran asociadas significativamente con la CF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo. Específicamente, la asociación del cortisol con la CF fue significativa a los 45 DPP ( $p =$

0,015). A medida que los niveles de cortisol aumentaron, la CF disminuyó ( $\beta = -0,460$ ) (Figura 23 A). La asociación de la progesterona con la CF fue significativa a los 90 DPP ( $p = 0,000$ ). A medida que los niveles de progesterona aumentaron, la CF disminuyó ( $\beta = -0,058$ ) (Figura 23 B). La asociación del  $17\beta$ -estradiol con la CF fue significativa a los 180 DPP ( $p = 0,016$ ). A medida que las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol aumentaron, la CF disminuyó ( $\beta = -0,068$ ) (Figura 23 C). En cuanto a las concentraciones de AGNE, BHB y glucosa no tuvieron una asociación significativa con la CF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo en el grupo  $IPC_{120}$  ( $p > 0,05$ ).

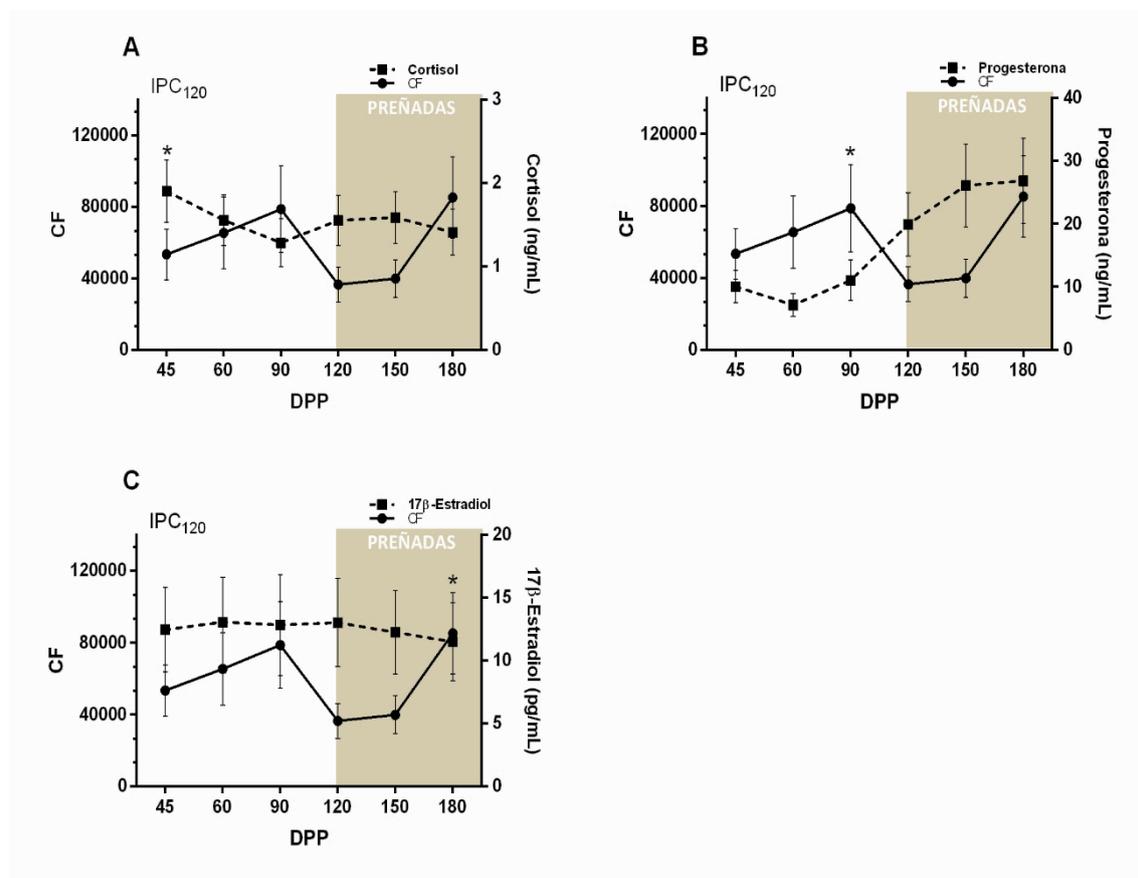


Figura 23. Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la CF a lo largo del tiempo en el grupo  $IPC_{120}$ . Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (\*,  $p < 0,05$ ).

En el grupo  $IPC_{180}$  las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol, progesterona, cortisol, AGNE, BHB y glucosa no tuvieron una asociación significativa con la CF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo ( $p > 0,05$ ).

En el grupo  $IPC_{>180}$  se observó que las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol, progesterona, cortisol, BHB y glucosa se encuentran asociadas significativamente con la CF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo. Específicamente, la asociación de la progesterona y el cortisol con la CF fue significativa a los 45 DPP ( $p < 0,001$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). En

ambos casos a medida que los niveles de progesterona y cortisol aumentaron, la CF disminuyó ( $\beta = -0,024$  y  $\beta = -0,292$ , respectivamente) (Figura 24 A y 24 B, respectivamente). La asociación del BHB con la CF fue significativa a los 90 y a los 180 DPP ( $p < 0,001$  y  $p = 0,034$ ). En ambos casos, a medida que los niveles de BHB aumentaron, la CF disminuyó ( $\beta = -1,611$  y  $\beta = -0,840$ , respectivamente) (Figura 24 C). La asociación de la glucosa con la CF fue significativa a los 120 DPP ( $p = 0,033$ ). A medida que las concentraciones de glucosa aumentaron, la CF aumentó ( $\beta = 0,572$ ) (Figura 24 D). La asociación de  $17\beta$ -estradiol con la CF fue significativa a los 180 DPP ( $p = 0,004$ ). A medida que las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol aumentaron, la CF aumentó ( $\beta = 0,840$ ) (Figura 24 E). En cuanto a las concentraciones de AGNE no tuvieron una asociación significativa con la CF de monocitos/macrófagos a lo largo del tiempo en el grupo  $IPC_{>180}$  ( $p > 0,05$ ).

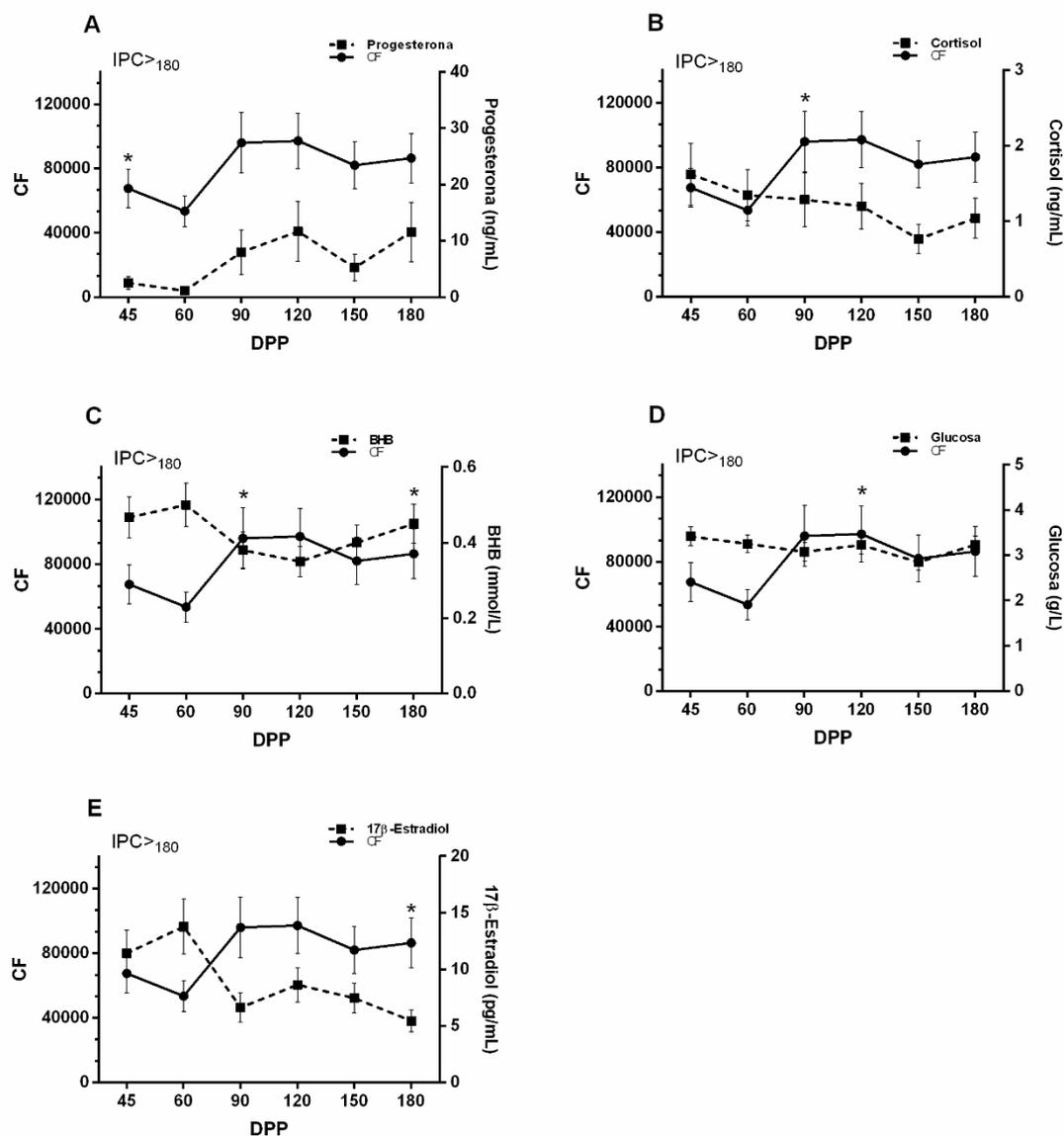


Figura 24. Asociación entre las concentraciones de hormonas y metabolitos con la CF a lo largo del tiempo en el grupo  $IPC_{>180}$ . Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (\*,  $p < 0,05$ ).

4.3. Evaluación de los patrones de expresión y localización endometrial de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias durante la lactancia temprana de los animales y su posible relación con la duración del intervalo parto-concepción.

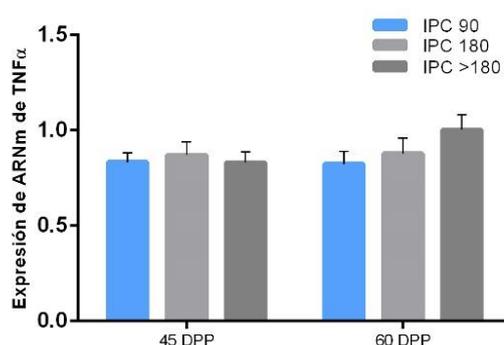
### 4.3.1. Niveles de expresión génica y proteica de citoquinas proinflamatorias durante la lactancia temprana.

#### 4.3.1.1. Niveles de expresión del factor de necrosis tumoral alfa.

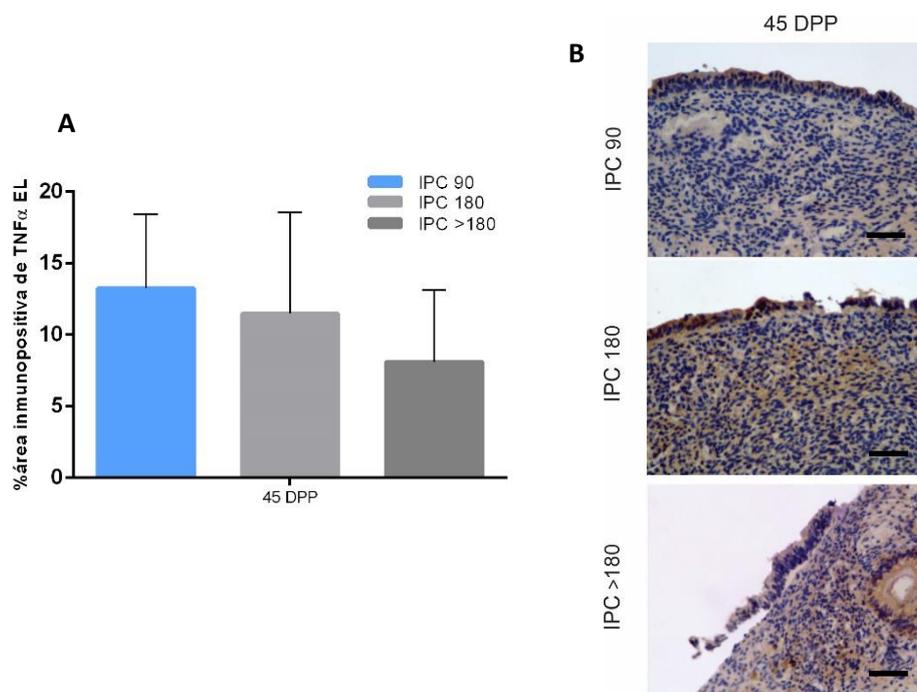
A los 45 DPP, los niveles de expresión génica de TNF $\alpha$  no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,897$ ) (Figura 25). Del mismo modo, los niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$  en EL, Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,799$ ,  $p = 0,660$ ,  $p = 0,399$ , respectivamente) (Figura 26 A, 27 A y 28 A, respectivamente).

A los 60 DPP, los niveles de expresión génica de TNF $\alpha$  no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,207$ ) (Figura 25). Del mismo modo, los niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$  en EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,965$ ) (Figura 28 A). Para los niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$  en EL y Es, no fue posible realizar el análisis estadístico correspondiente dado que las porciones de tejido sobre las que se hicieron las determinaciones por IHQ no presentaron cantidad suficiente y representativa de dicho estrato para la evaluación de la inmunomarcación.

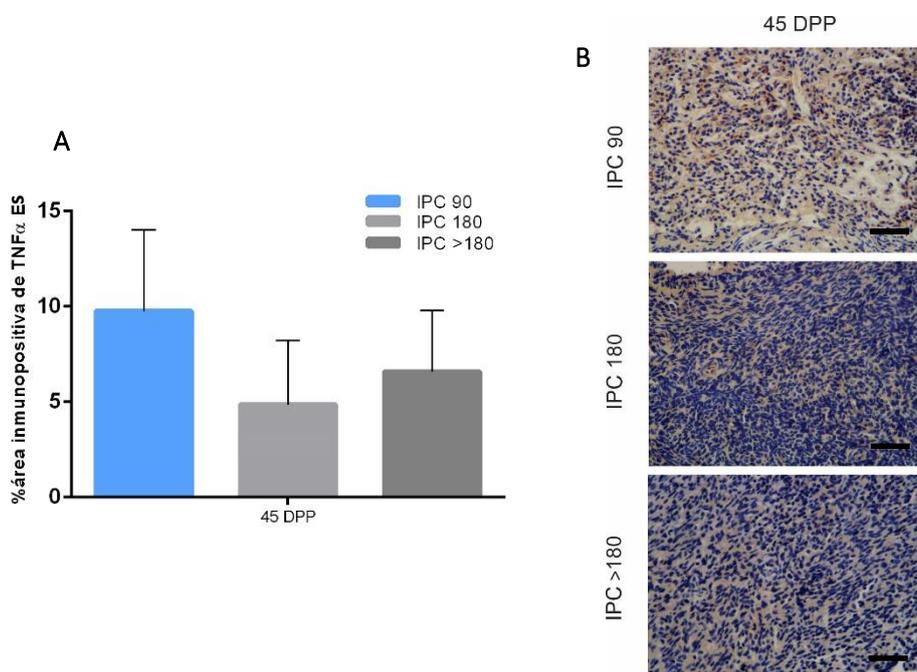
En las figuras 26 B y 27 B se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de TNF $\alpha$  en EL y Es a los 45 DPP, respectivamente, para cada uno de los grupos en estudio. Mientras que en la figura 28 B se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de TNF $\alpha$  en EG a los 45 y 60 DPP, para cada uno de los grupos evaluados.



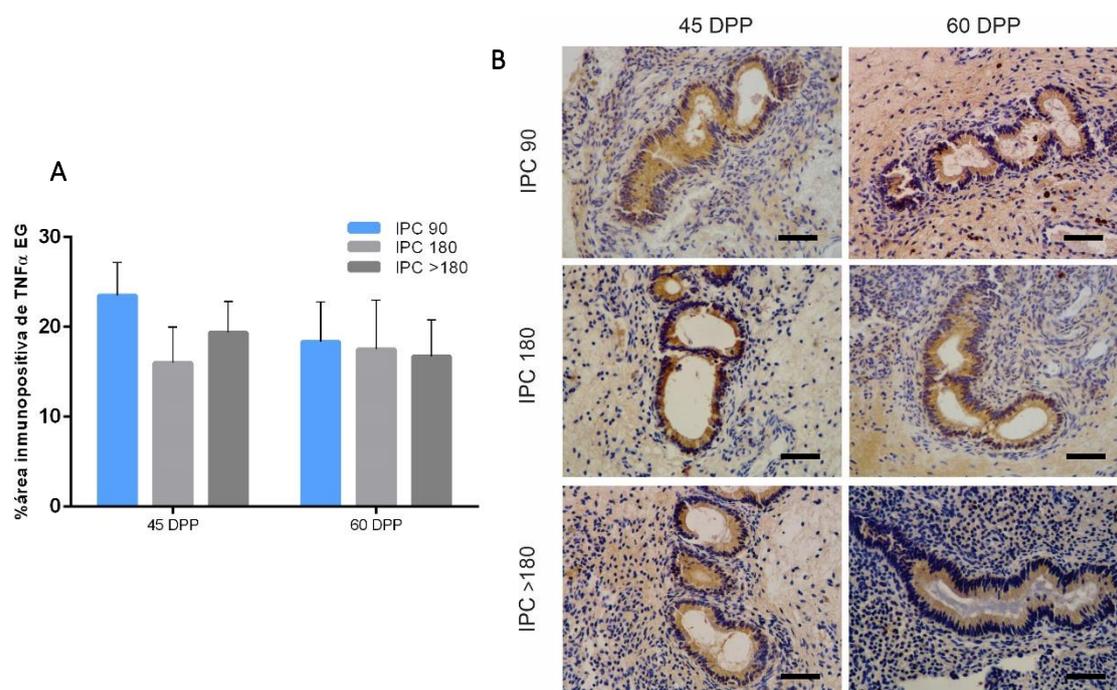
**Figura 25.** Niveles de expresión génica de TNF $\alpha$  a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ).



**Figura 26.** (A) Niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$  en EL a los 45 DPP entre los grupos IPC90, IPC180 e IPC>180. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media.  $p > 0,05$ . (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de TNF $\alpha$  en EL a los 45 DPP en los grupos IPC90, IPC180 e IPC>180. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 27.** (A) Niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$  en Es a los 45 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de TNF $\alpha$  en Es a los 45 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



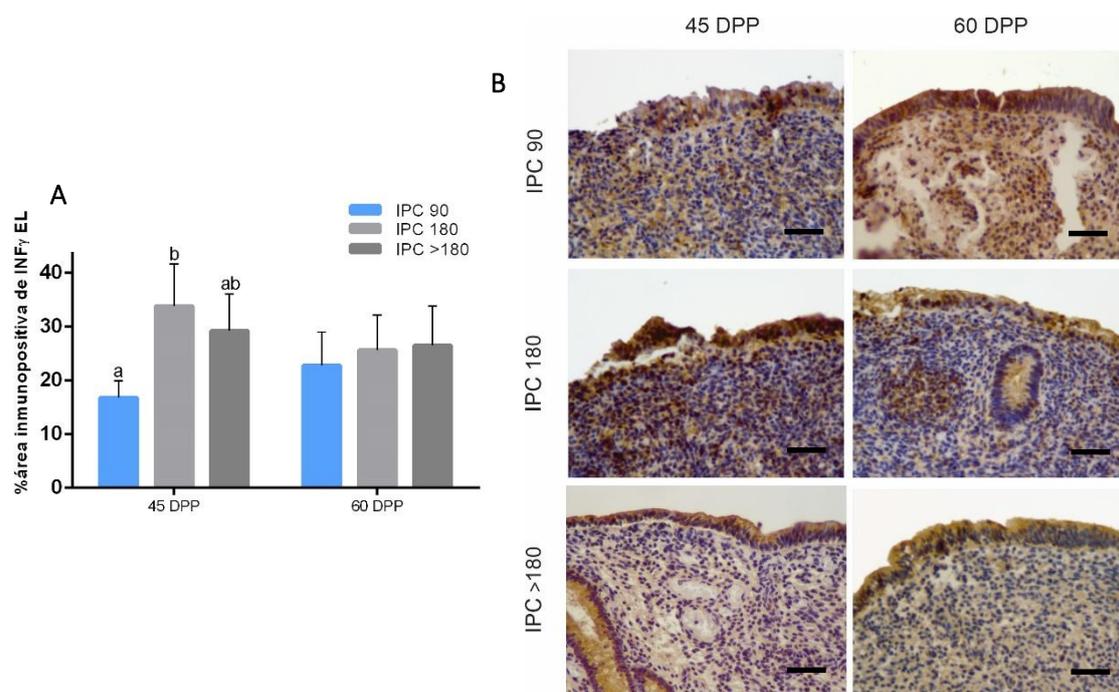
**Figura 28.** (A) Niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$  en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de TNF $\alpha$  en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

#### 4.3.1.2. Niveles de expresión del interferón gamma.

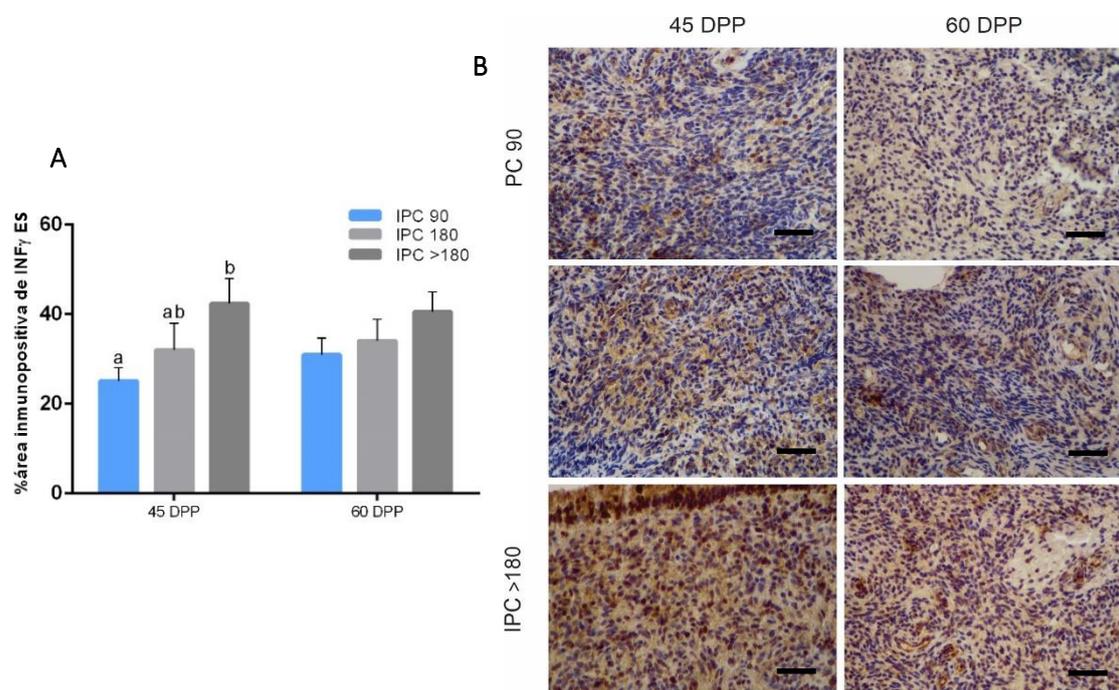
A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de INF $\gamma$  en EL y Es mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,038$  y  $p = 0,013$ , respectivamente). Específicamente, los niveles de expresión proteica de INF $\gamma$  en EL fueron significativamente menores para el grupo IPC<sub>90</sub> en comparación al grupo IPC<sub>180</sub> (Figura 29 A). Mientras que, los niveles de expresión proteica de INF $\gamma$  en Es fueron significativamente menores para el grupo IPC<sub>90</sub> en comparación al grupo IPC<sub>>180</sub> (Figura 30 A). Por el contrario, los niveles de expresión proteica de INF $\gamma$  en EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,335$ ) (Figura 31 A).

A los 60 DPP, los niveles de expresión proteica de INF $\gamma$  en EL, Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,694$ ,  $p = 0,241$  y  $p = 0,741$ , respectivamente) (Figura 29 A, 30 A y 31 A, respectivamente).

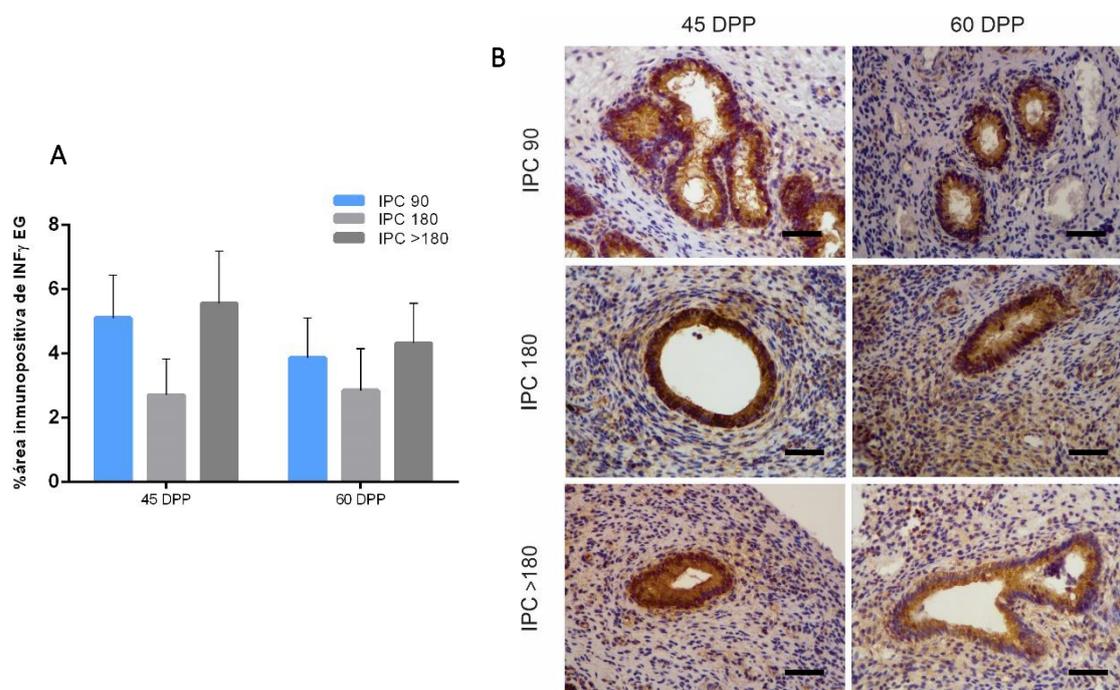
En las figuras 29 B, 30 B y 31 B, se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de INF $\gamma$  en EL, Es y EG, respectivamente, a los 45 y 60 DPP, para cada uno de los grupos en estudio.



**Figura 29.** (A) Niveles de expresión proteica de INF $\gamma$  en EL a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de INF $\gamma$  en EL a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 30.** (A) Niveles de expresión proteica de INF $\gamma$  en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de INF $\gamma$  en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 31.** (A) Niveles de expresión proteica de INF $\gamma$  en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de INF $\gamma$  en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

En relación a los niveles de expresión génica, a pesar de numerosos intentos y diseño de distintos pares de cebadores que permitieran su amplificación, no fue posible cuantificar la expresión del ARNm correspondiente a INF $\gamma$ .

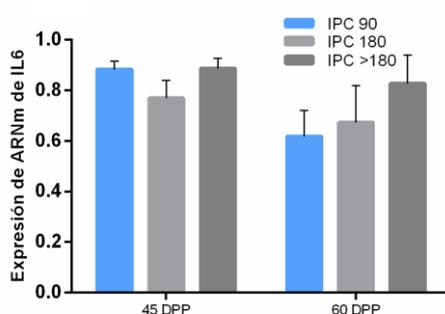
#### 4.3.1.3. Niveles de expresión de la interleuquina 6.

A los 45 DPP, los niveles de expresión génica de IL6 no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,302$ ) (Figura 32). Por el contrario, los niveles de expresión proteica de IL6 en Es y EG mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,007$  y  $p = 0,006$ , respectivamente). Específicamente, los niveles de expresión proteica de IL6 en Es fueron significativamente menores para el grupo IPC<sub>180</sub> en comparación a los grupos IPC<sub>90</sub> e IPC<sub>>180</sub> (Figura 34 A). Mientras que, los niveles de expresión proteica de IL6 en EG fueron significativamente menores para el grupo IPC<sub>180</sub> en comparación al grupo IPC<sub>>180</sub> (Figura 35 A). Los niveles de expresión proteica de IL6 en EL, no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,418$ ) (Figura 33 A).

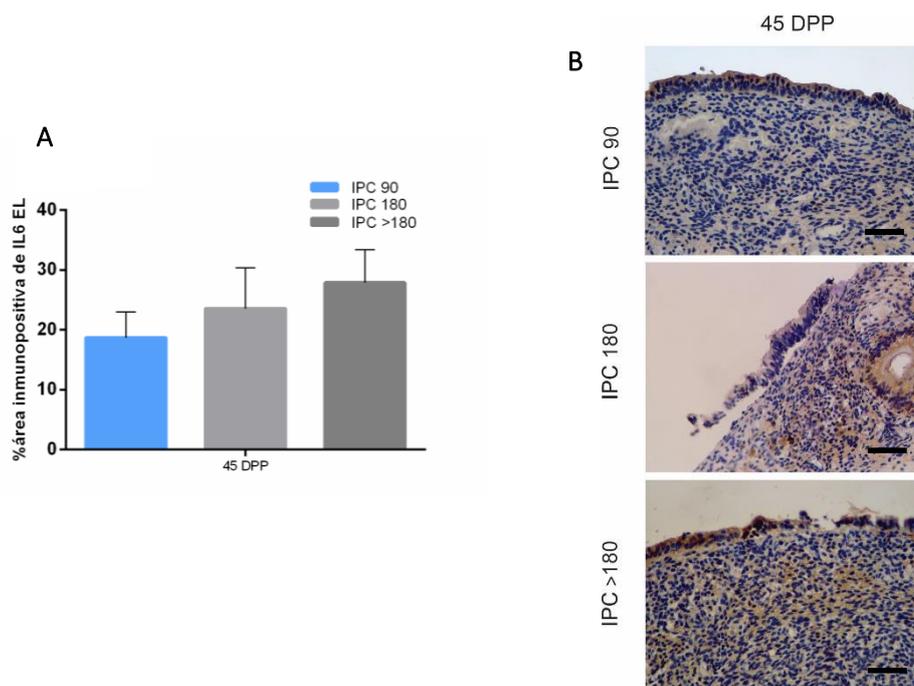
A los 60 DPP, los niveles de expresión génica de IL6 no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,378$ ) (Figura 32). Del mismo modo, los niveles de expresión

proteica en Es y EG a los 60 DPP no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,530$  y  $p = 0,633$ , respectivamente) (Figura 34 A y 35 A, respectivamente). Para los niveles de expresión proteica de IL6 en EL a los 60 DPP no fue posible realizar el análisis estadístico correspondiente dado que las porciones de tejido sobre las que se hicieron las determinaciones por IHQ no presentaron cantidad suficiente y representativa de dicho estrato para la evaluación de la inmunomarcación.

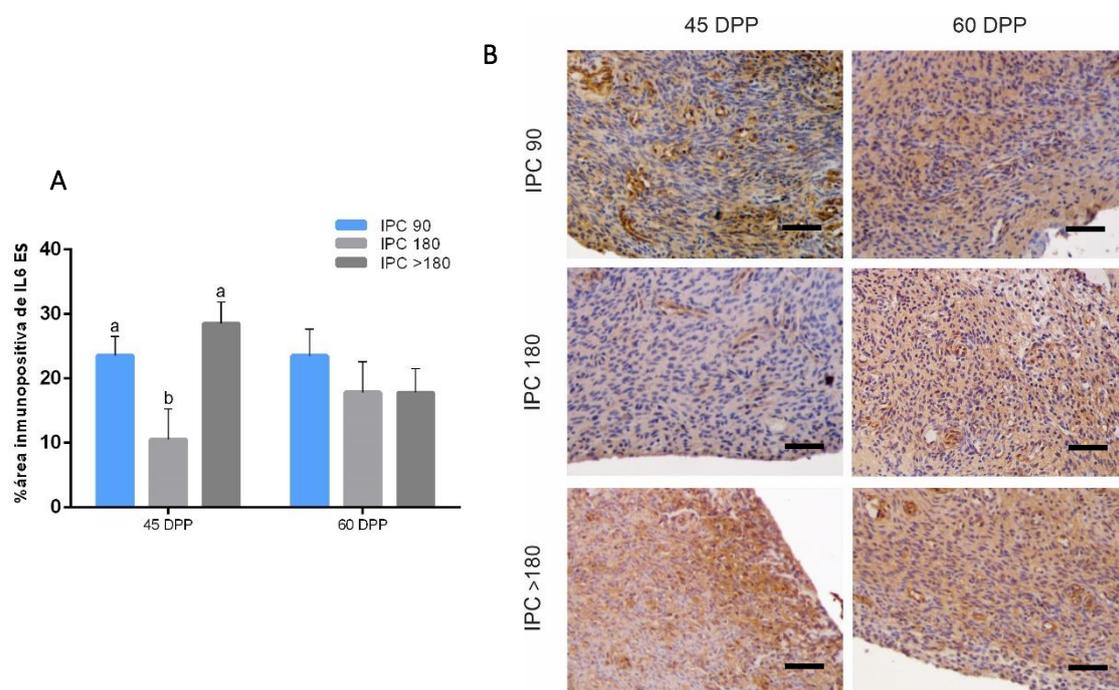
En la figura 33 B se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL6 en EL a los 45 DPP, para cada uno de los grupos en estudio. Mientras que en las figuras 34 B y 35 B, se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL6 en Es y EG, respectivamente, a los 45 y 60 DPP, para cada uno de los grupos evaluados.



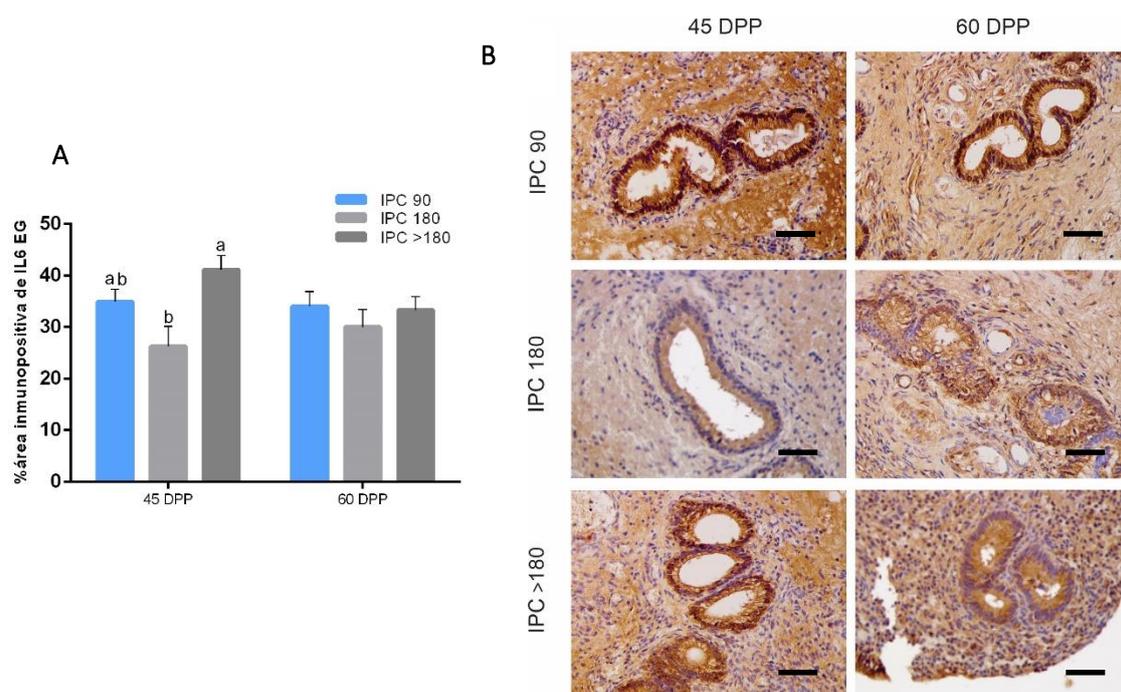
**Figura 32.** Niveles de expresión génica de IL6 a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ).



**Figura 33.** (A) Niveles de expresión proteica de IL6 en EL a los 45 entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL6 en EL a los 45 en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 34.** (A) Niveles de expresión proteica de IL6 en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL6 en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 35.** (A) Niveles de expresión proteica de IL6 en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL6 en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

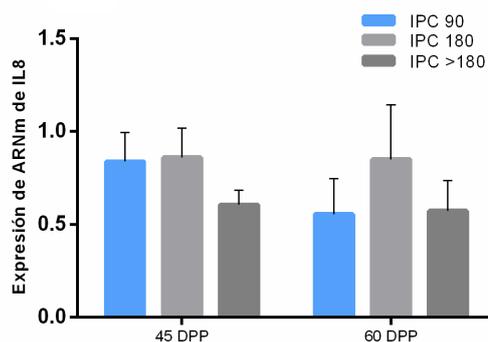
#### 4.3.1.4. Niveles de expresión de la interleuquina 8.

A los 45 DPP, los niveles de expresión génica de IL8 no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,180$ ) (Figura 36). Del mismo modo, los niveles de expresión proteica de IL8 en EL, Es y EG a los 45 DPP no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,156$ ,  $p = 0,290$  y  $p = 0,965$ , respectivamente) (Figura 37 A, 38 A y 39 A, respectivamente).

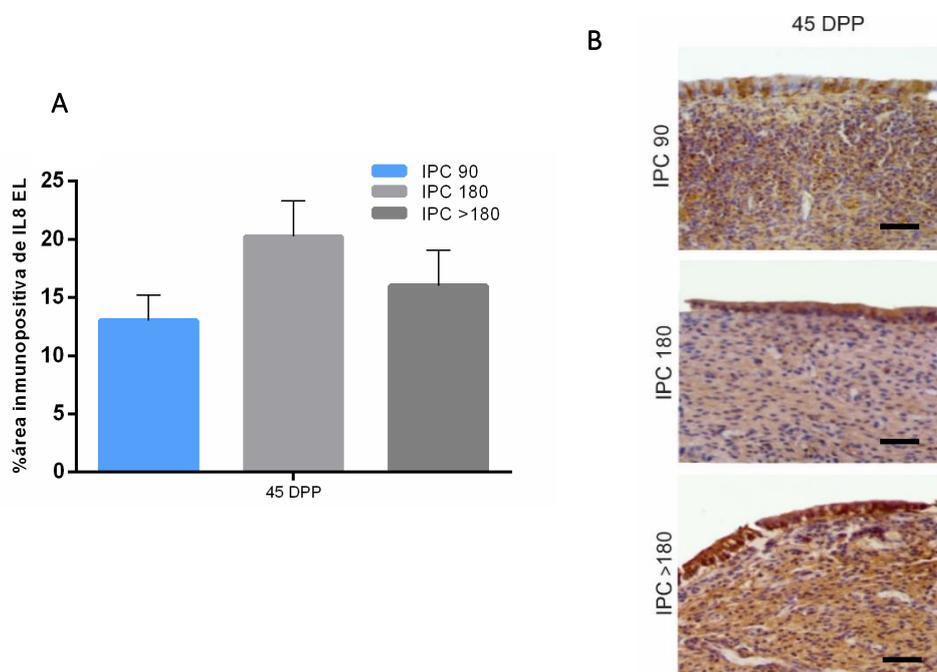
A los 60 DPP, los niveles de expresión génica de IL8 no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,609$ ) (Figura 36). Por el contrario, los niveles de expresión proteica de IL8 en EG mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,014$ ). Específicamente, los niveles de expresión proteica de IL8 en EG fueron significativamente menores para el grupo IPC<sub>90</sub> en comparación al grupo IPC<sub>>180</sub> (Figura 39 A). Los niveles de expresión proteica de IL8 en Es no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,475$ ) (Figura 38 A). Para los niveles de expresión proteica de IL8 en EL, no fue posible realizar el análisis estadístico correspondiente dado que las porciones de tejido sobre las que se hicieron

las determinaciones por IHQ no presentaron cantidad suficiente y representativa de dicho estrato para la evaluación de la inmunomarcación.

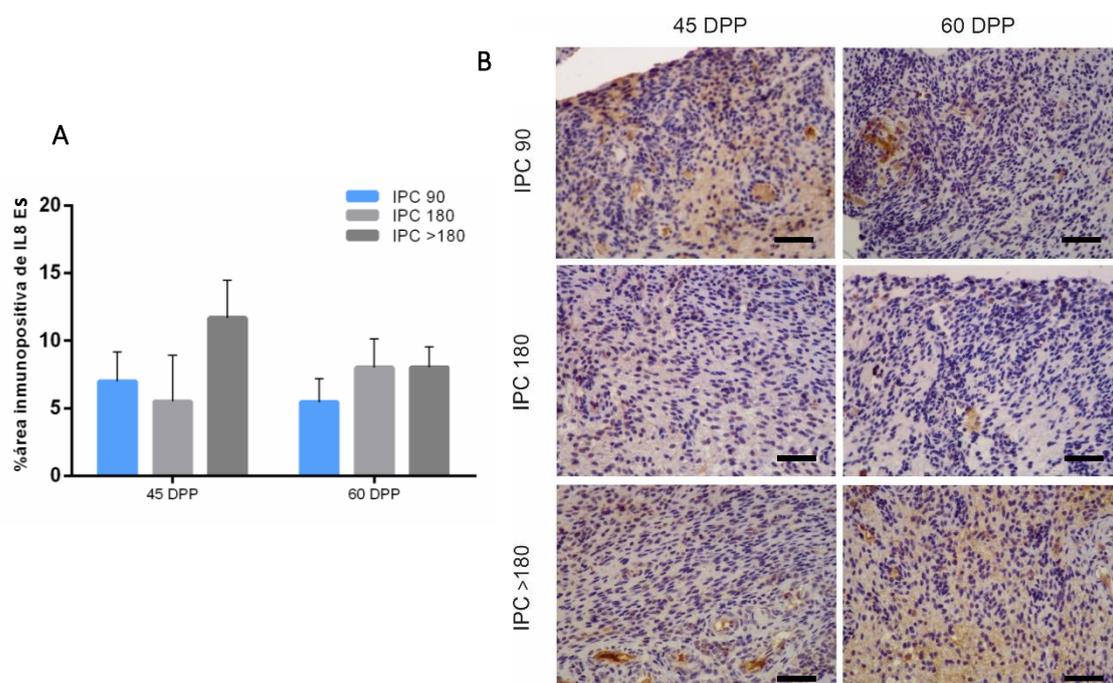
En la figura 37 B se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL8 en EL a los 45 DPP, para cada uno de los grupos en estudio. Mientras que en las figuras 38 B y 39 B, se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL8 en Es y EG, respectivamente, a los 45 y 60 DPP, para cada uno de los grupos evaluados.



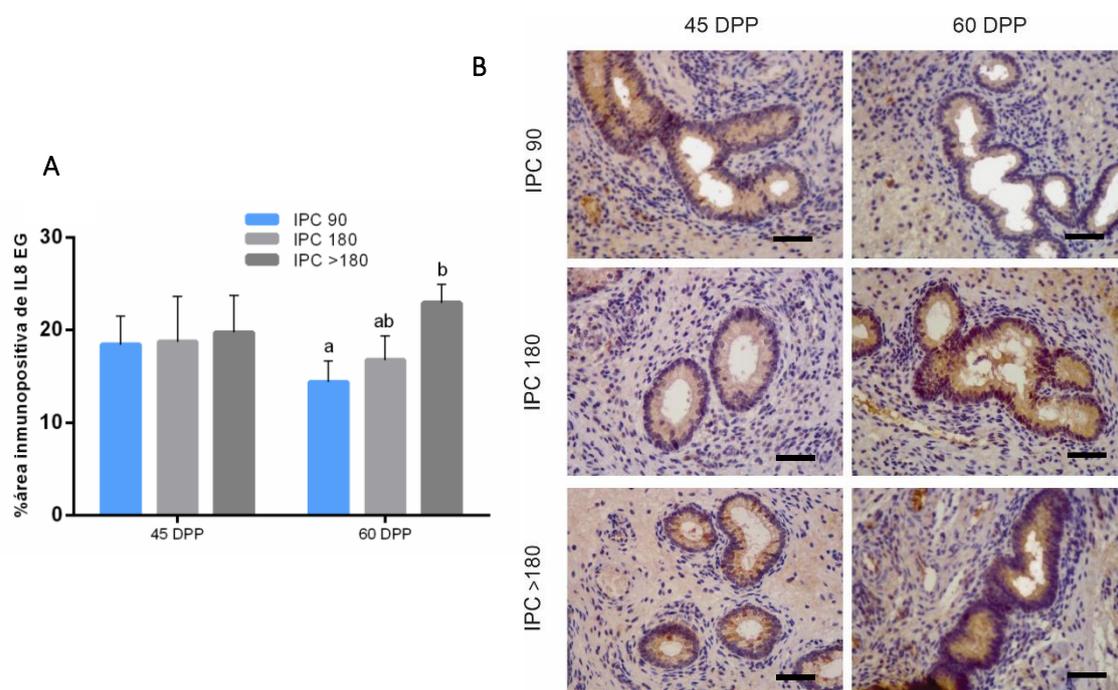
**Figura 36.** Niveles de expresión génica de IL8 a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ).



**Figura 37.** (A) Niveles de expresión proteica de IL8 en EL a los 45 entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL8 en EL a los 45 en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 38.** (A) Niveles de expresión proteica de IL8 en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL8 en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



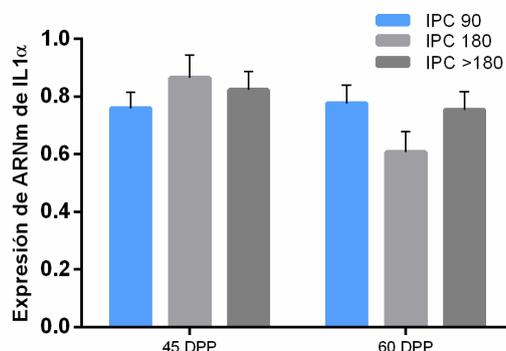
**Figura 39.** (A) Niveles de expresión proteica de IL8 en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL8 en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

#### 4.3.1.5. Niveles de expresión de la interleuquina 1 alfa.

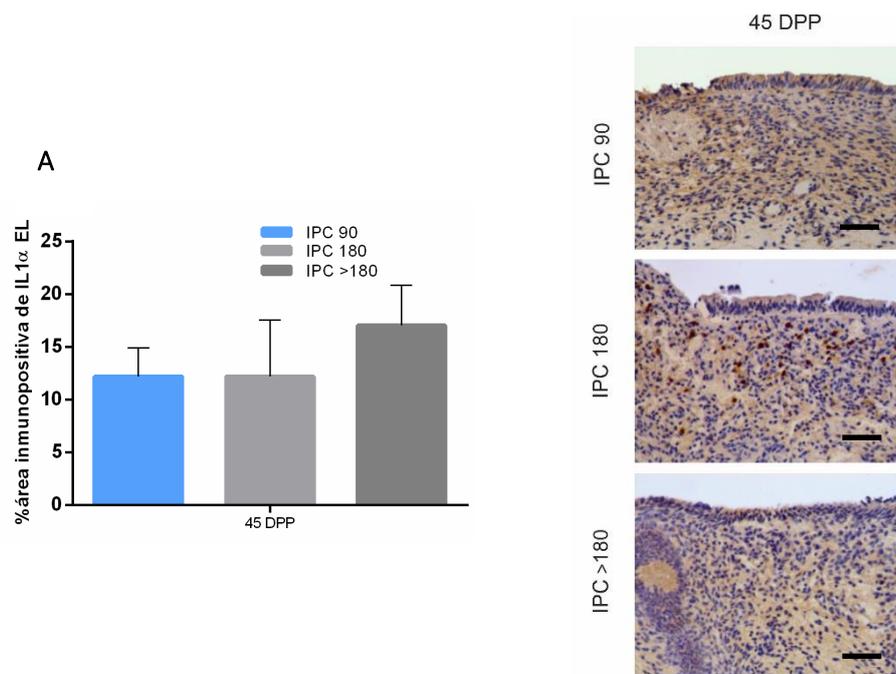
A los 45 DPP, los niveles de expresión génica de IL1 $\alpha$  no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,515$ ) (Figura 40). Del mismo modo, los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en EL, Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,557$ ,  $p = 0,437$  y  $p = 0,285$ , respectivamente) (Figura 41 A, 42 A y 43 A, respectivamente).

A los 60 DPP, los niveles de expresión génica de IL1 $\alpha$  no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,165$ ) (Figura 40). Del mismo modo, los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,669$  y  $p = 0,290$ ) (Figura 42 A y 43 A, respectivamente). Para los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en EL, no fue posible realizar el análisis estadístico correspondiente dado que las porciones de tejido sobre las que se hicieron las determinaciones por IHQ no presentaron cantidad suficiente y representativa de dicho estrato para la evaluación de la inmunomarcación.

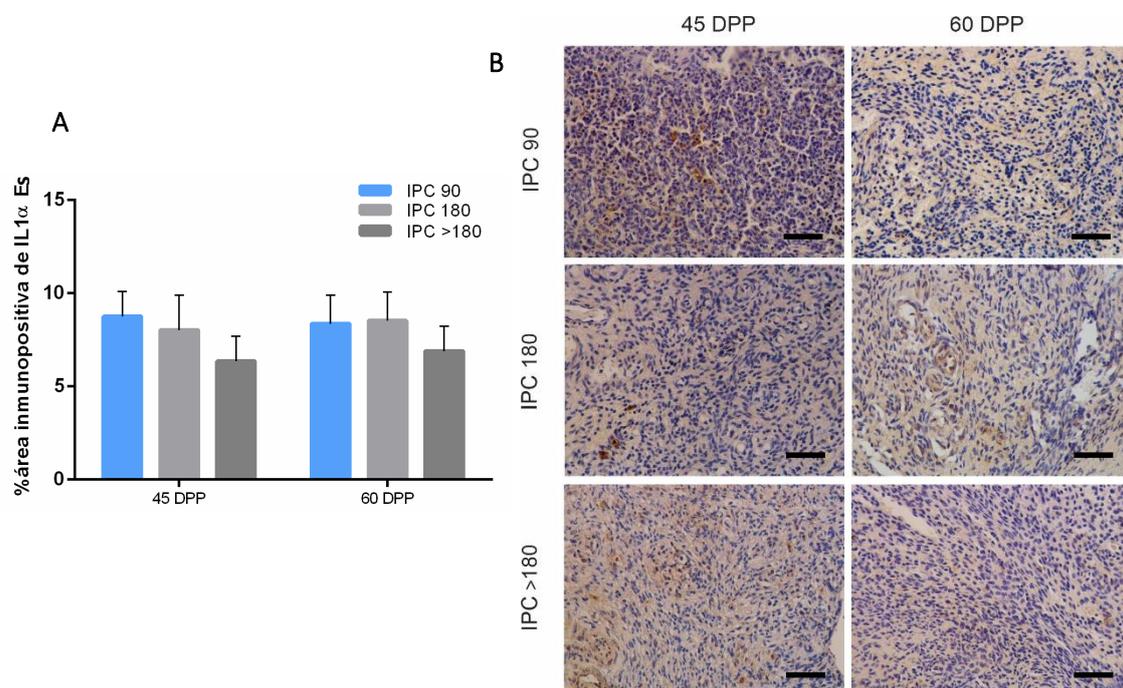
En la figura 41 B se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\alpha$  en EL a los 45 DPP, para cada uno de los grupos en estudio. Mientras que en las figuras 42 B y 43 B, se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\alpha$  en Es y EG, respectivamente, a los 45 y 60 DPP, para cada uno de los grupos evaluados.



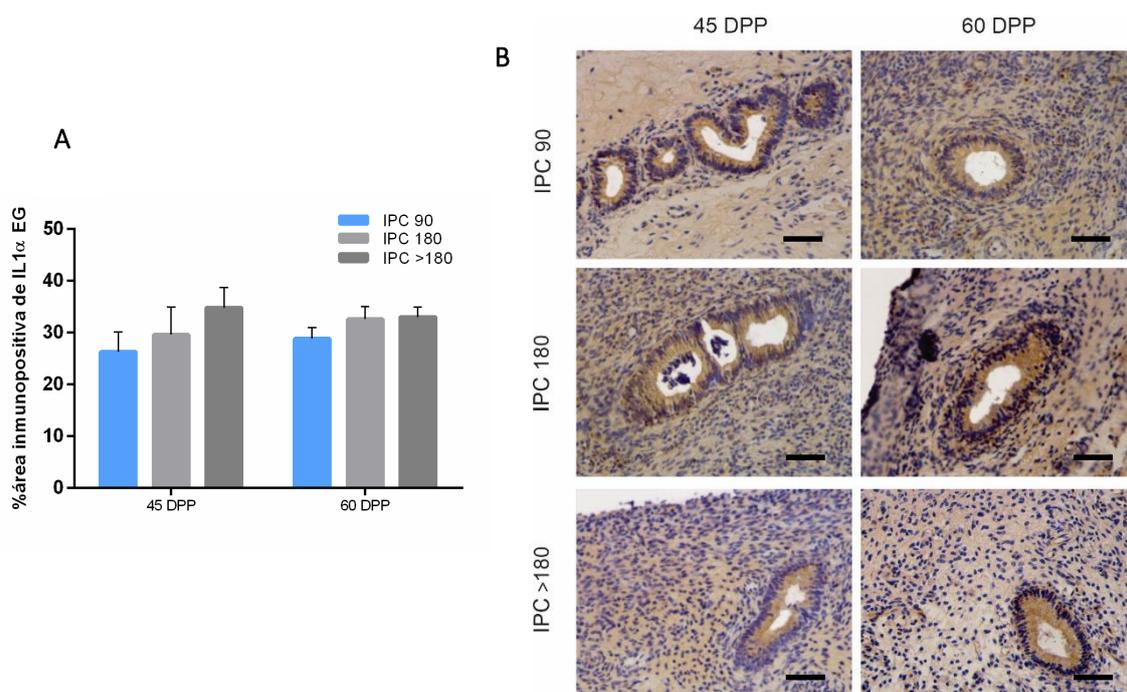
**Figura 40.** Niveles de expresión génica de IL1 $\alpha$  a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ).



**Figura 41.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en EL a los 45 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\alpha$  en EL a los 45 en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25.  $\mu$ m.



**Figura 42.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\alpha$  en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



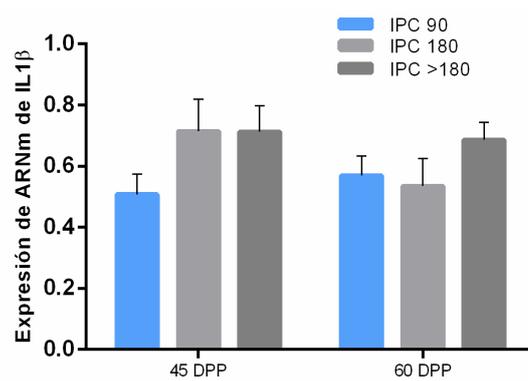
**Figura 43.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\alpha$  en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

#### 4.3.1.6. Niveles de expresión de la interleuquina 1 beta.

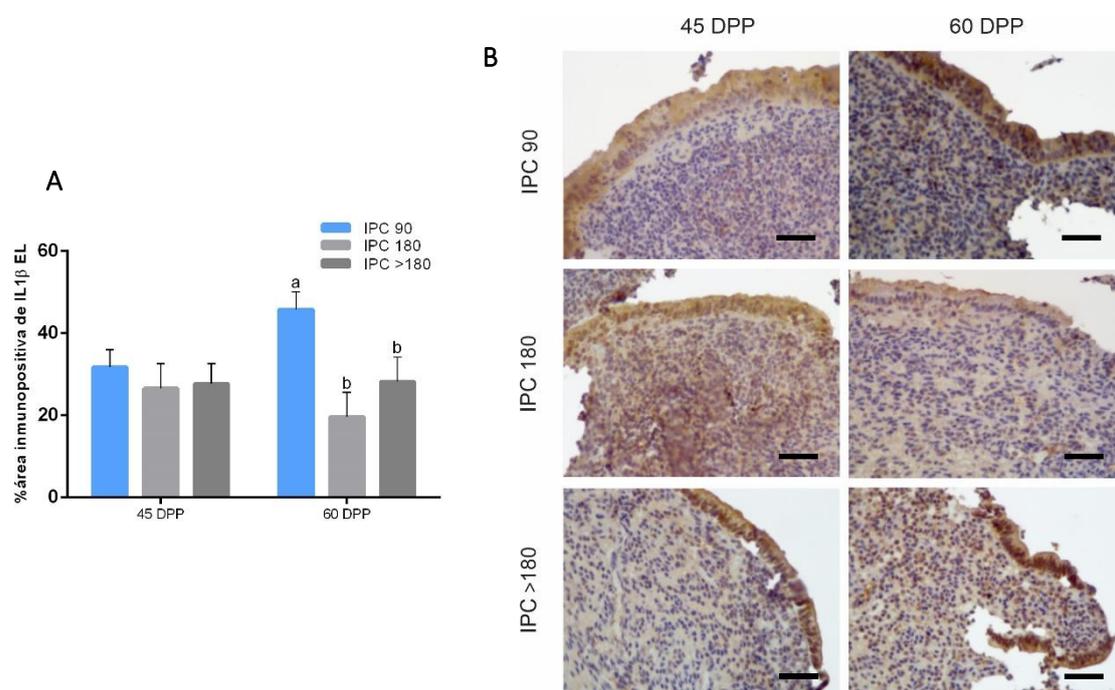
A los 45 DPP, los niveles de expresión génica de IL1 $\beta$  no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,084$ ) (Figura 44). Por el contrario, los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en EG mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,044$ ). Específicamente, los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en EG fueron significativamente mayores para el grupo IPC<sub>90</sub> en comparación al grupo IPC<sub>180</sub> (Figura 47 A). Los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en EL y Es no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,721$  y  $p = 0,896$ , respectivamente) (Figura 45 A y 46 A, respectivamente).

A los 60 DPP, los niveles de expresión génica de IL1 $\beta$  no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,239$ ) (Figura 44). Por el contrario, los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en EL, Es y EG mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,001$ ,  $p = 0,035$  y  $p = 0,001$ , respectivamente). Específicamente, los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en EL, Es y EG fueron significativamente mayores para el grupo IPC<sub>90</sub> en comparación al grupo IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub> (Figura 45 A, 46 A y 47 A, respectivamente).

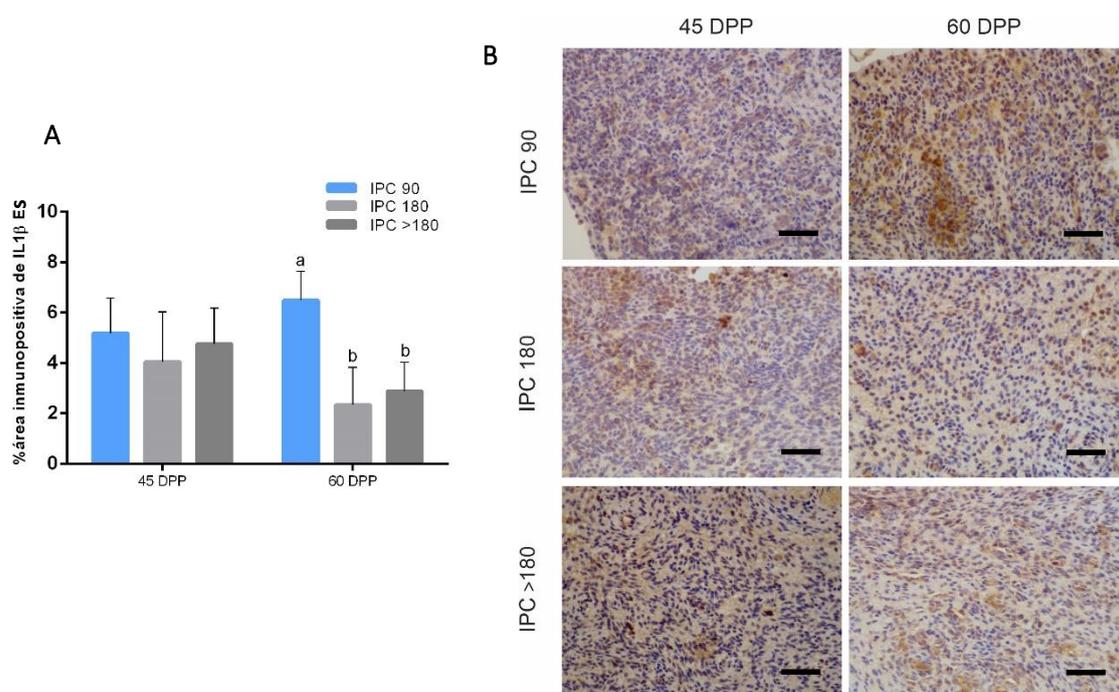
En las figuras 45 B, 46 B y 47 B se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\beta$  en EL, Es y EG, respectivamente, a los 45 y 60 DPP, para cada uno de los grupos en estudio.



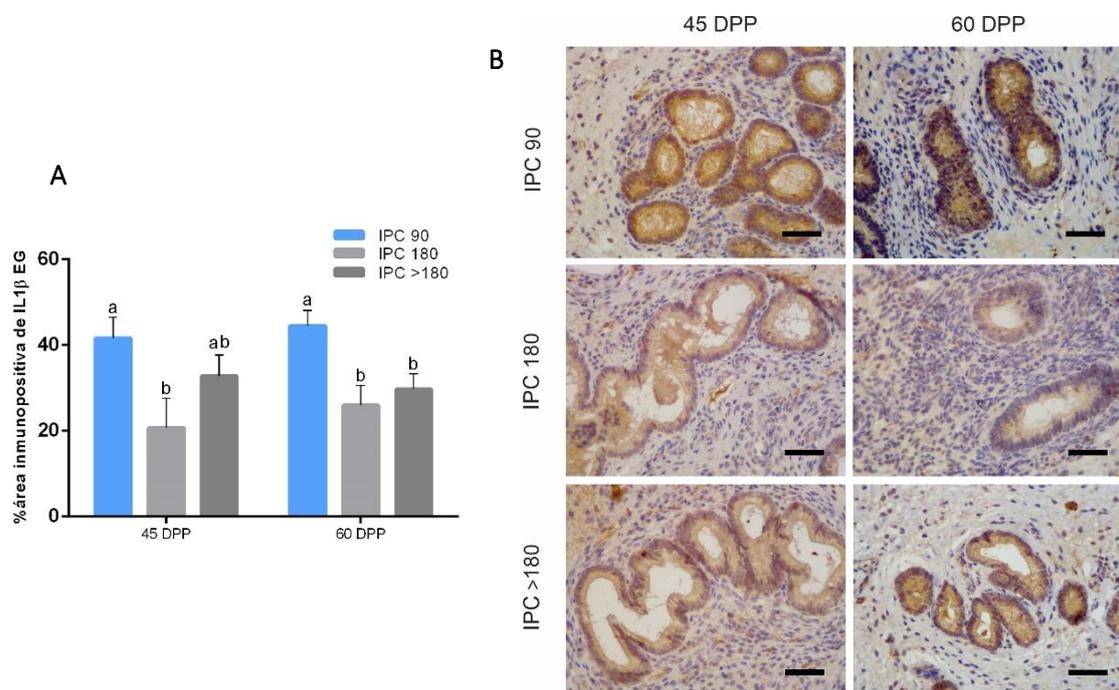
**Figura 44.** Niveles de expresión génica de IL1β a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ).



**Figura 45.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1β en EL a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1β en EL a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25 μm.



**Figura 46.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\beta$  en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



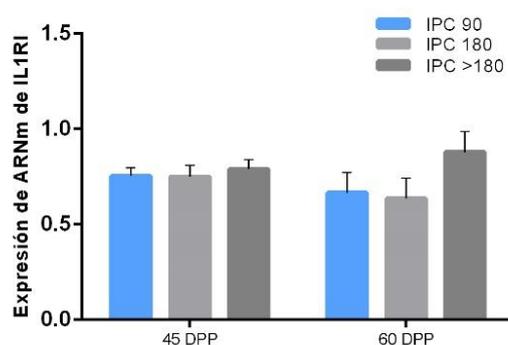
**Figura 47.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1 $\beta$  en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

#### 4.3.1.7. Niveles de expresión del receptor I de la interleuquina 1.

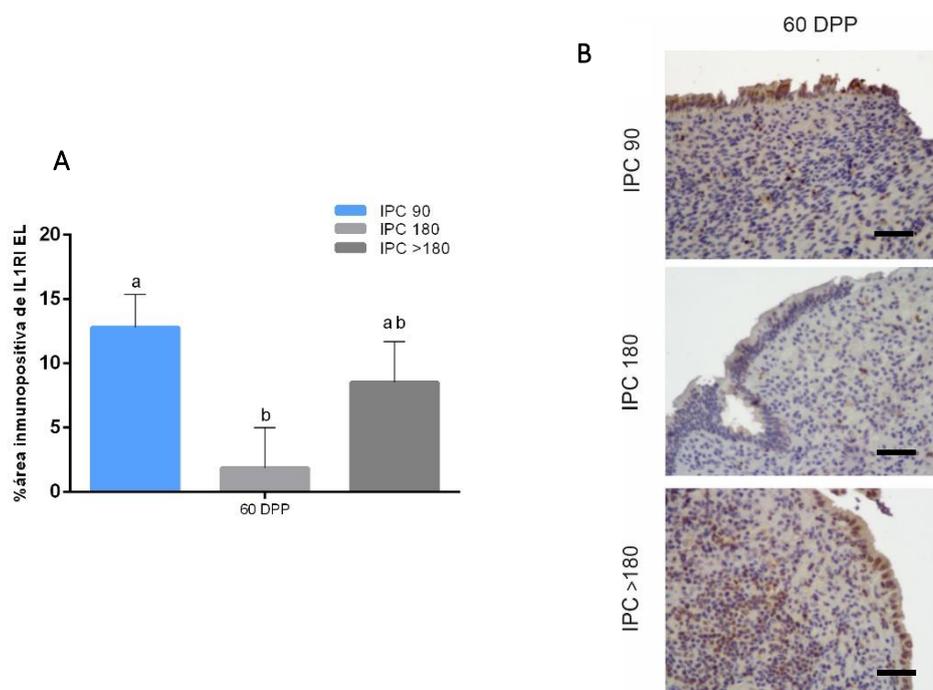
A los 45 DPP, los niveles de expresión génica de IL1RI no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,827$ ) (Figura 48). Para los niveles de expresión proteica de IL1RI en EL, Es y EG no fue posible realizar el análisis estadístico correspondiente dado que las porciones de tejido sobre las que se hicieron las determinaciones por IHQ no presentaron cantidad suficiente y representativa de dicho estrato para la evaluación de la inmunomarcación.

A los 60 DPP, los niveles de expresión génica de IL1RI no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,212$ ) (Figura 48). Por el contrario, los niveles de expresión proteica de IL1RI en EL mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,027$ ). Específicamente, los niveles de expresión proteica de IL1RI en EL fueron significativamente mayores para el grupo IPC<sub>90</sub> en comparación al grupo IPC<sub>180</sub> (Figura 49 A). Los niveles de expresión proteica de IL1RI en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,436$  Y  $p = 0,187$ , respectivamente) (Figura 50 A y 51 A, respectivamente).

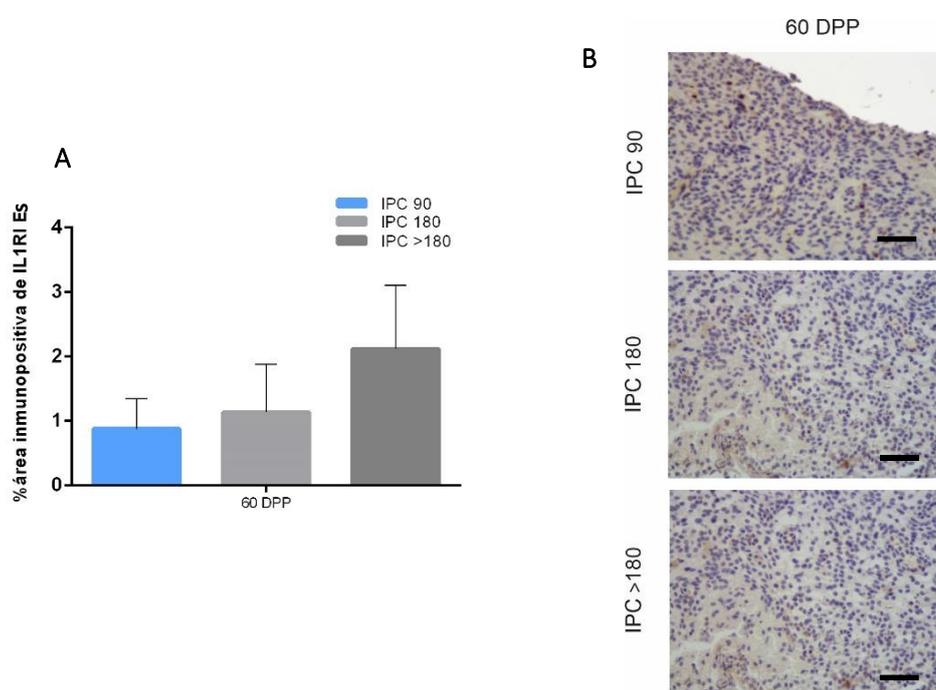
En las figuras 49 B, 50 B y 51 B, se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RI en EL, Es y EG, respectivamente, a los 60 DPP, para cada uno de los grupos en estudio.



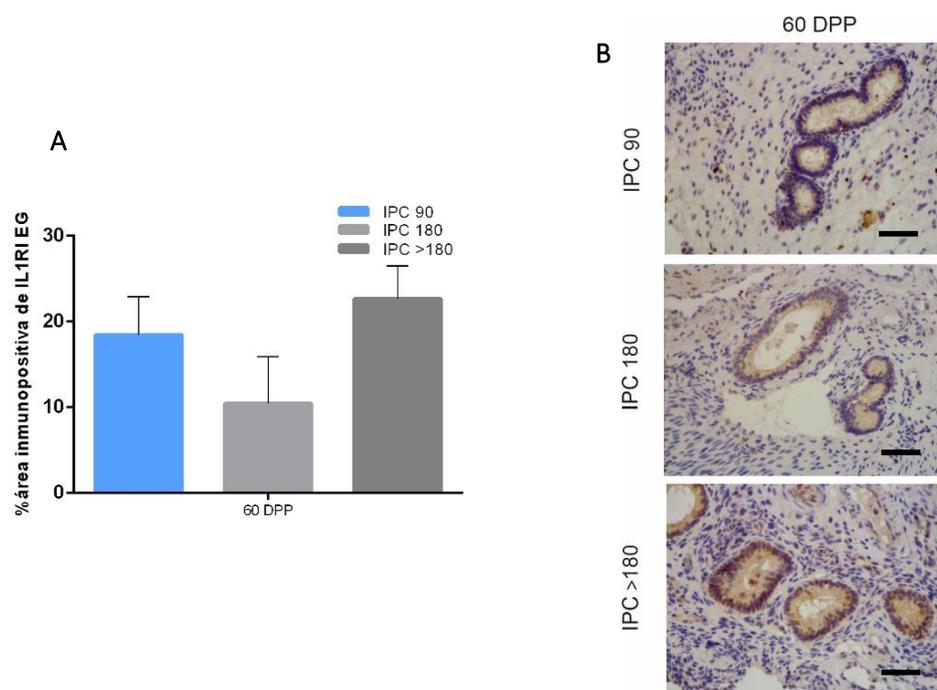
**Figura 48.** Niveles de expresión génica de IL1RI a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ).



**Figura 49.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1RI en EL a los 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RI en EL a los 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 50.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1RI en Es a los 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RI en Es a los 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 51.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1RI en EG a los 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RI en EG a los 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

#### 4.3.2. Niveles de expresión génica y proteica de citoquinas antiinflamatorias durante la lactancia temprana.

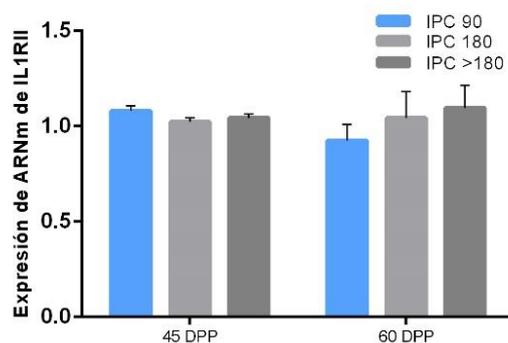
##### 4.3.2.1. Niveles de expresión del receptor II de la interleuquina 1.

A los 45 DPP, los niveles de expresión génica de IL1RII no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,265$ ) (Figura 52). Del mismo modo, los niveles de expresión proteica de IL1RII en EL, Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,533$ ,  $p = 0,460$  y  $p = 0,166$ , respectivamente) (Figura 53 A, 54 A y 55 A, respectivamente).

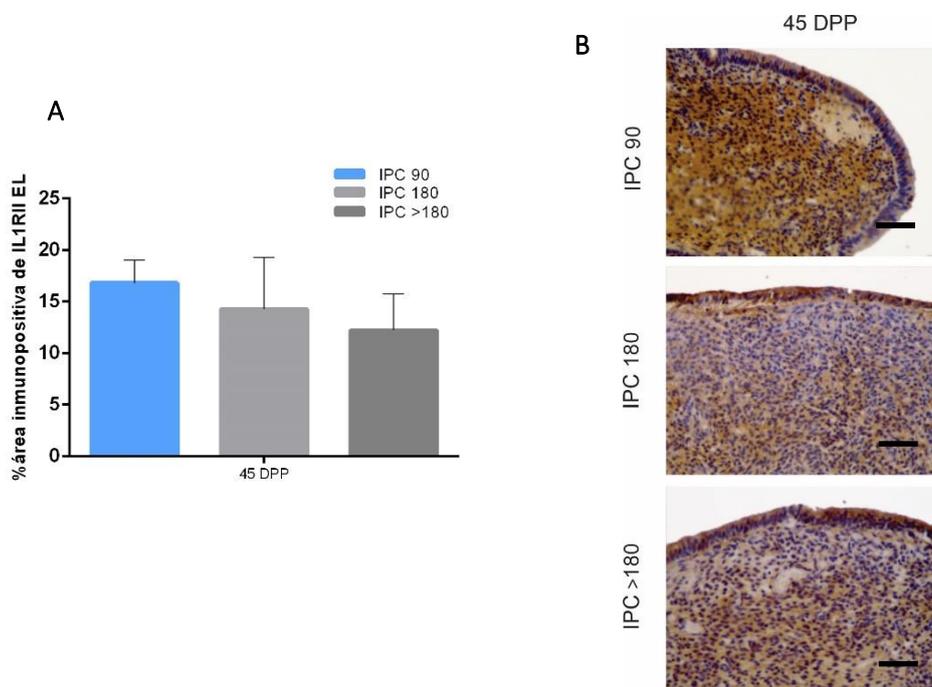
A los 60 DPP, los niveles de expresión génica de IL1RII no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,460$ ) (Figura 52). Del mismo modo, los niveles de expresión proteica de IL1RII en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,298$  y  $p = 0,191$ , respectivamente) (Figura 54 A y 55 A, respectivamente). Para los niveles de expresión proteica de IL1RII en EL no fue posible realizar el análisis estadístico correspondiente dado que las porciones de tejido sobre las que se hicieron las determinaciones por IHQ no

presentaron cantidad suficiente y representativa de dicho estrato para la evaluación de la inmunomarcación.

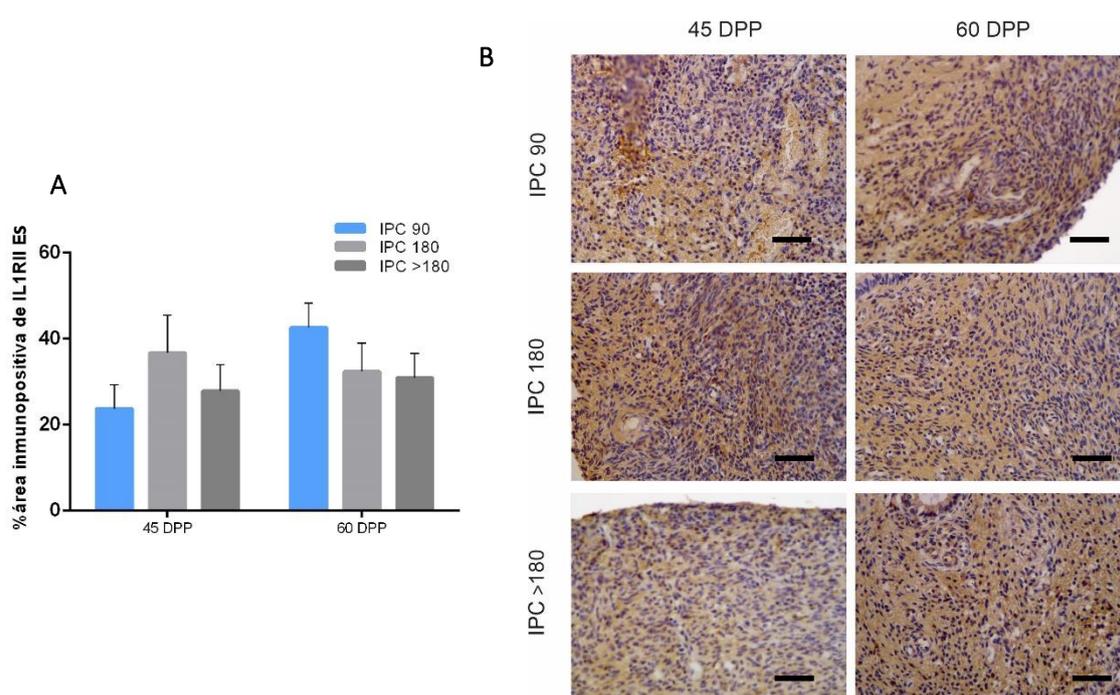
En la figura 53 B se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RII en EL a los 45 DPP, para cada uno de los grupos en estudio. Mientras que en las figuras 54 B y 55 B, se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RII en Es y EG, respectivamente, a los 45 y 60 DPP, para cada uno de los grupos evaluados.



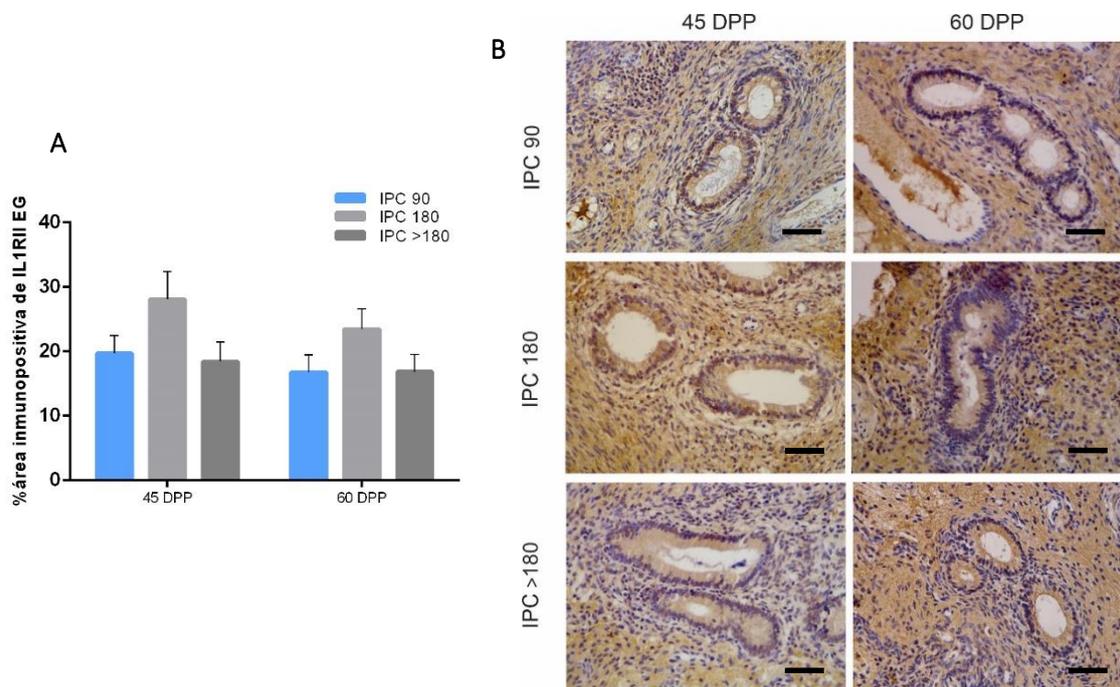
**Figura 52.** Niveles de expresión génica de IL1RII a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ).



**Figura 53.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1RII en EL a los 45 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RII en EL a los 45 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 54.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1RII en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RII en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



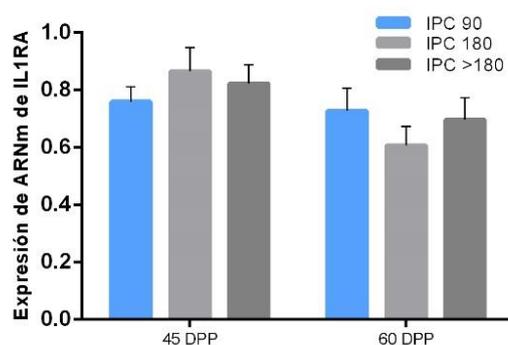
**Figura 55.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1RII en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RII en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

#### 4.3.2.2. Niveles de expresión del antagonista del receptor I de la interleuquina 1.

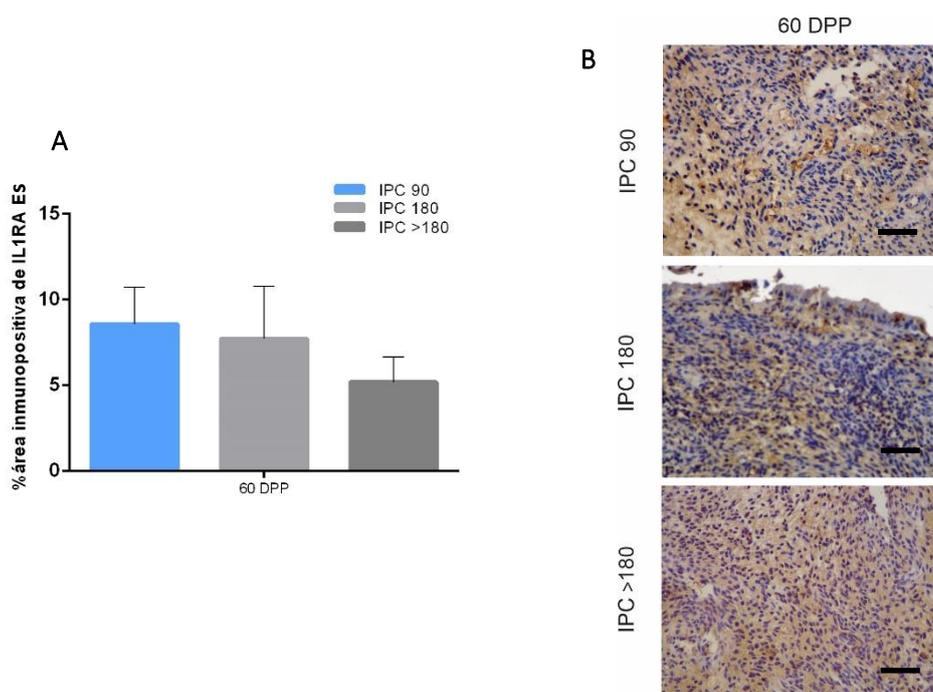
A los 45 DPP, los niveles de expresión génica de IL1RA no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,510$ ) (Figura 56). Para los niveles de expresión proteica de IL1RA en EL, Es y EG no fue posible realizar el análisis estadístico correspondiente dado que las porciones de tejido sobre las que se hicieron las determinaciones por IHQ no presentaron cantidad suficiente y representativa de dicho estrato para la evaluación de la inmunomarcación.

A los 60 DPP, los niveles de expresión génica de IL1RA no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,472$ ) (Figura 56). Del mismo modo, los niveles de expresión proteica de IL1RA en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,390$  y  $p = 0,191$ , respectivamente) (Figura 57 A y 58 A, respectivamente). Para los niveles de expresión proteica de IL1RA en EL no fue posible realizar el análisis estadístico correspondiente dado que las porciones de tejido sobre las que se hicieron las determinaciones por IHQ no presentaron cantidad suficiente y representativa de dicho estrato para la evaluación de la inmunomarcación.

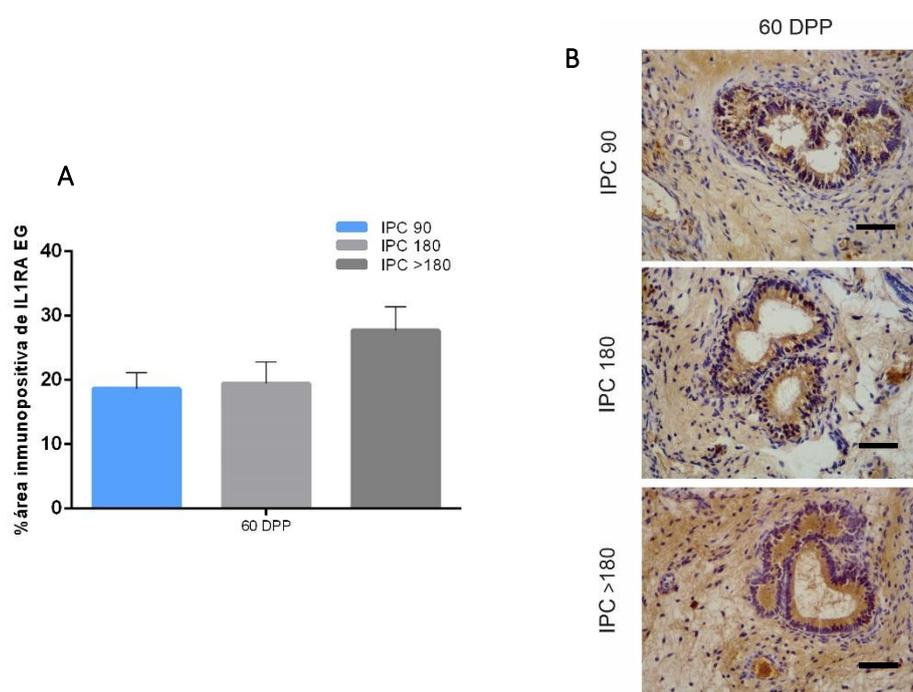
En las figuras 57 B y 58 B, se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RA en Es y EG, respectivamente, a los 60 DPP, para cada uno de los grupos en estudio.



**Figura 56.** Niveles de expresión génica de IL1RA a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ).



**Figura 57.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1RA en Es a los 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RA en Es a los 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



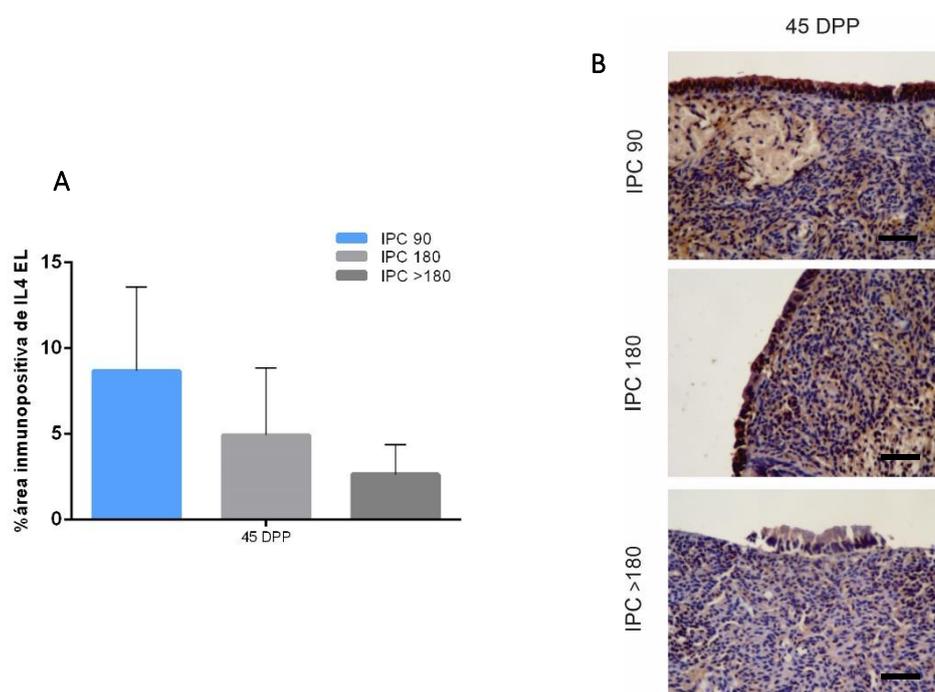
**Figura 58.** (A) Niveles de expresión proteica de IL1RA en EG a los 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL1RA en EG a los 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

#### 4.3.2.3. Niveles de expresión de la interleuquina 4.

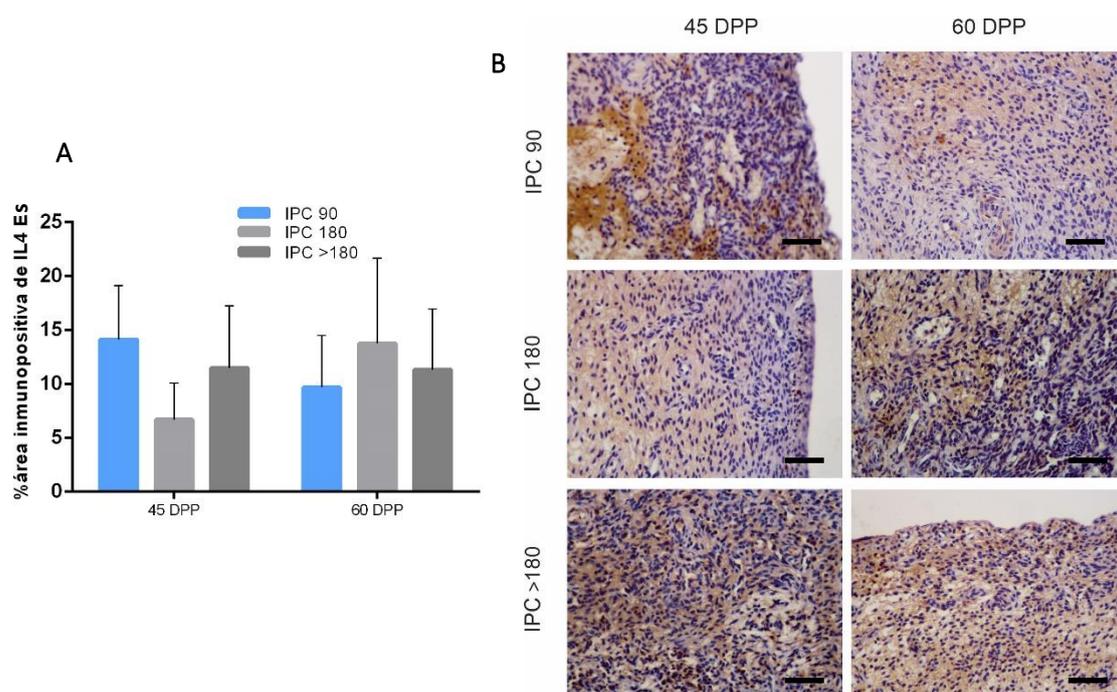
A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de IL4 en EL, Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,384$ ,  $p = 0,477$  y  $p = 0,702$ , respectivamente) (Figura 59 A, 60 A y 61 A, respectivamente).

A los 60 DPP, los niveles de expresión proteica de IL14 en Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,898$  y  $p = 0,280$ , respectivamente) (Figura 60 A y 61 A, respectivamente). Para los niveles de expresión proteica de IL4 en EL no fue posible realizar el análisis estadístico correspondiente dado que las porciones de tejido sobre las que se hicieron las determinaciones por IHQ no presentaron cantidad suficiente y representativa de dicho estrato para la evaluación de la inmunomarcación.

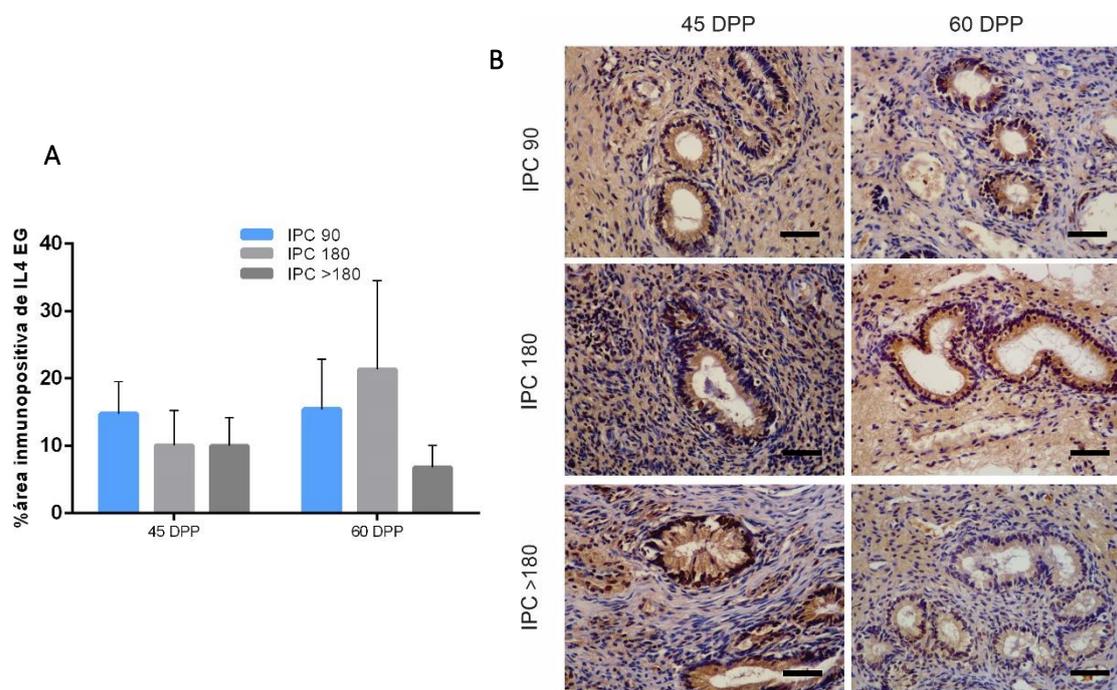
En la Figura 59 B se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL4 en EL a los 45 DPP, para cada uno de los grupos en estudio. Mientras que en las figuras 60 B y 61 B, se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de IL4 en Es y EG, respectivamente, a los 45 y 60 DPP, para cada uno de los grupos evaluados.



**Figura 59.** (A) Niveles de expresión proteica de IL4 en EL a los 45 DPP entre los grupos  $IPC_{90}$ ,  $IPC_{180}$  e  $IPC_{>180}$ . Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL4 en EL a los 60 DPP en los grupos  $IPC_{90}$ ,  $IPC_{180}$  e  $IPC_{>180}$ . Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 60.** (A) Niveles de expresión proteica de IL4 en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL4 en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.



**Figura 61.** (A) Niveles de expresión proteica de IL4 en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de IL4 en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

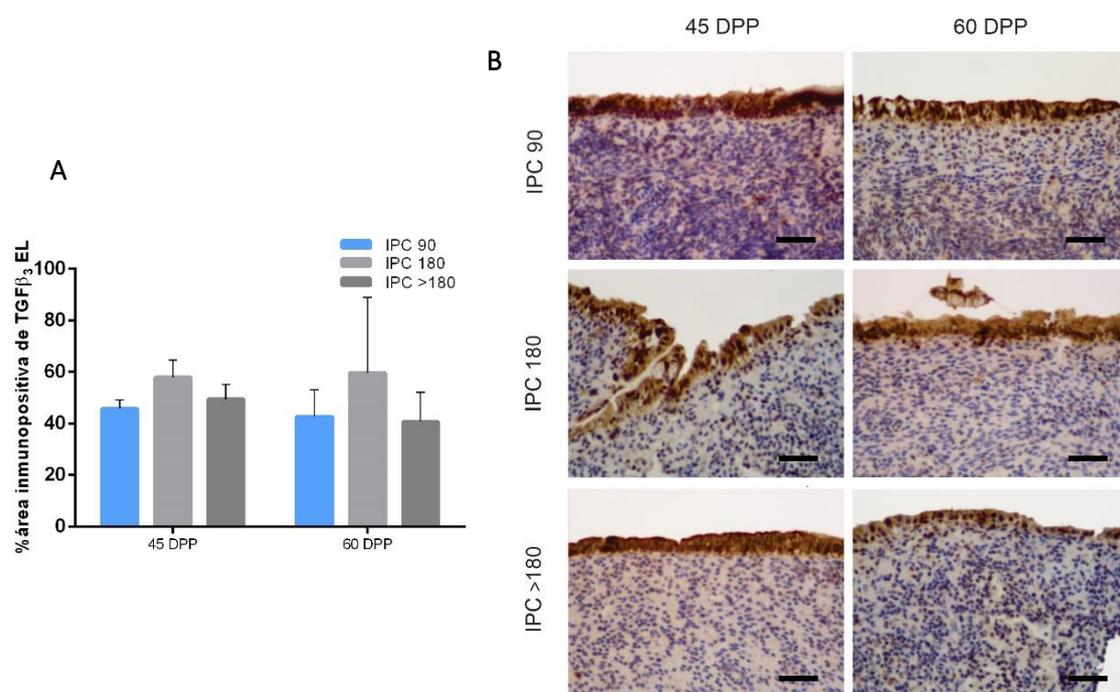
En relación a los niveles de expresión génica, a pesar de numerosos intentos y diseño de distintos pares de cebadores que permitieran su amplificación, no fue posible cuantificar la expresión del ARNm correspondiente a IL4.

#### *4.3.2.4. Niveles de expresión del factor de crecimiento transformante beta 3.*

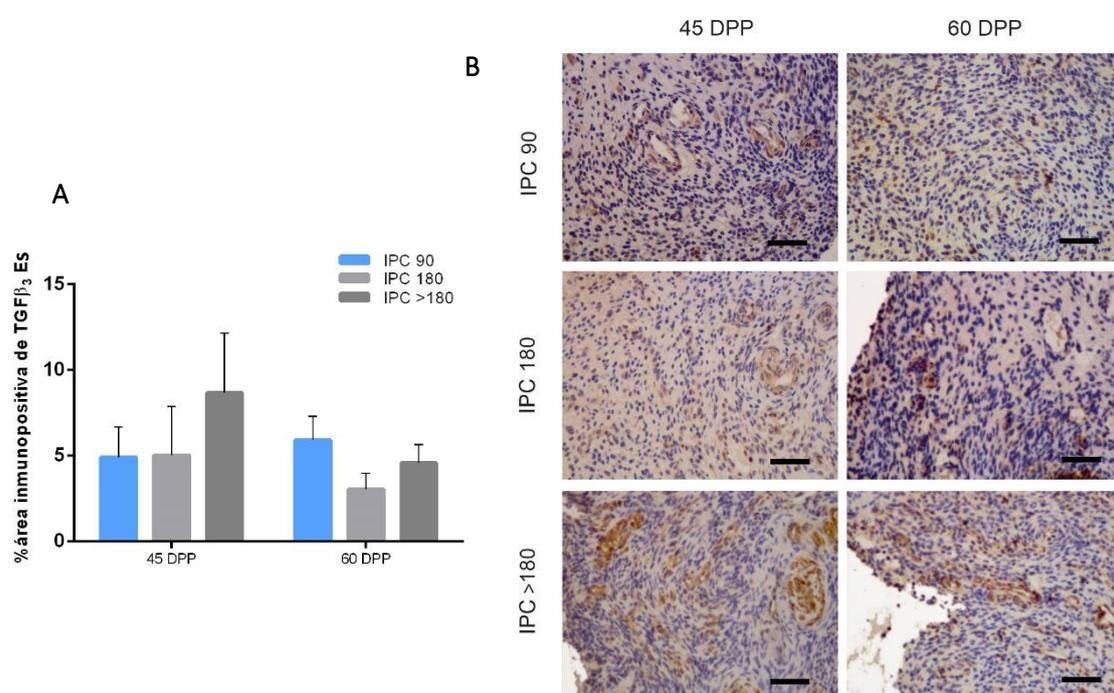
A los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de TGF $\beta_3$  en EG mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,001$ ). Específicamente, los niveles de expresión proteica de TGF $\beta_3$  en EG fueron significativamente menores para el grupo IPC $_{90}$  en comparación al grupo IPC $_{180}$  e IPC $_{>180}$  (Figura 64 A). Los niveles de expresión proteica de TGF $\beta_3$  en EL y Es no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,222$  y  $p = 0,533$ , respectivamente) (Figura 62 A y 63 A, respectivamente).

A los 60 DPP, los niveles de expresión proteica de TGF $\beta_3$  en EL, Es y EG no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,788$ ,  $p = 0,223$  y  $p = 0,883$ , respectivamente) (Figura 62 A, 63 A y 64 A, respectivamente).

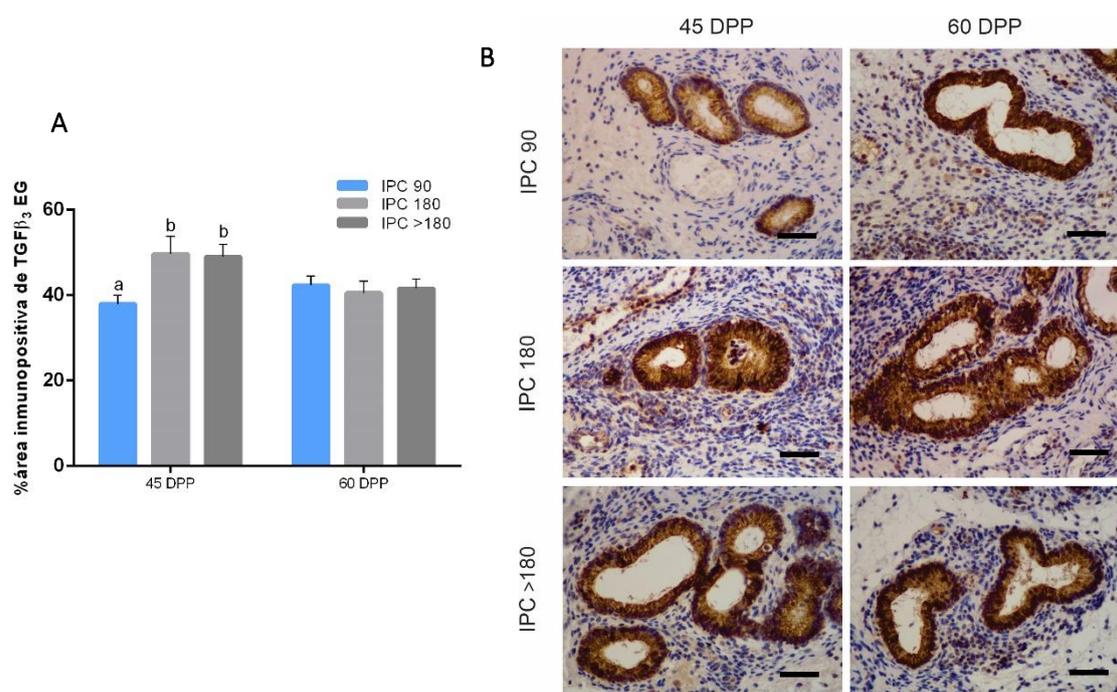
En las figuras 62 B, 63 B y 64 B, se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de TGF $\beta_3$  en EL, Es y EG, respectivamente, a los 45 y 60 DPP, para cada uno de los grupos en estudio.



**Figura 62.** (A) Niveles de expresión proteica de TGFβ<sub>3</sub> en EL a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de TGFβ<sub>3</sub> en EL a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25 μm.



**Figura 63.** (A) Niveles de expresión proteica de TGFβ<sub>3</sub> en Es a los 45 y 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media ± desviación estándar de la media ( $p > 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de TGFβ<sub>3</sub> en Es a los 45 y 60 DPP en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Magnificación 400X. Barra = 25 μm.

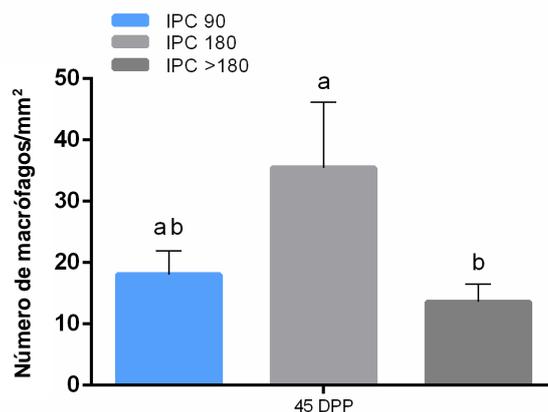


**Figura 64.** (A) Niveles de expresión proteica de  $TGF\beta_3$  en EG a los 45 y 60 DPP entre los grupos  $IPC_{90}$ ,  $IPC_{180}$  e  $IPC_{>180}$ . Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (B) Imágenes representativas de la inmunotinción de  $TGF\beta_3$  en EG a los 45 y 60 DPP en los grupos  $IPC_{90}$ ,  $IPC_{180}$  e  $IPC_{>180}$ . Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

En relación a los niveles de expresión génica, a pesar de numerosos intentos y diseño de distintos pares de cebadores que permitieran su amplificación, no fue posible cuantificar la expresión del ARNm correspondiente a  $TGF\beta_3$ .

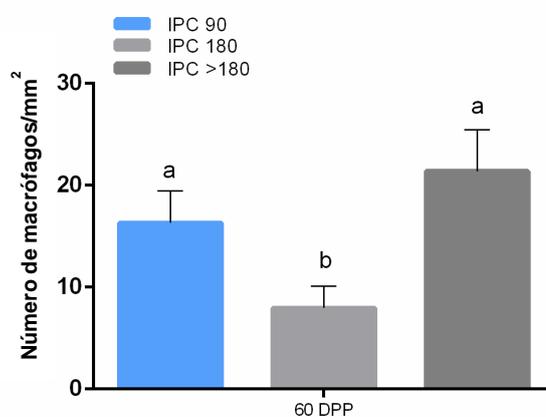
#### 4.4. Evaluación de la presencia de macrófagos infiltrantes en endometrio de vacas lecheras durante la lactancia temprana y su posible relación con la duración del intervalo parto-concepción.

A los 45 DPP, el número de macrófagos infiltrantes en endometrio mostró diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,034$ ). Específicamente, el número de macrófagos infiltrantes fue significativamente mayor para el grupo  $IPC_{180}$  en comparación al grupo  $IPC_{>180}$  (Figura 65).



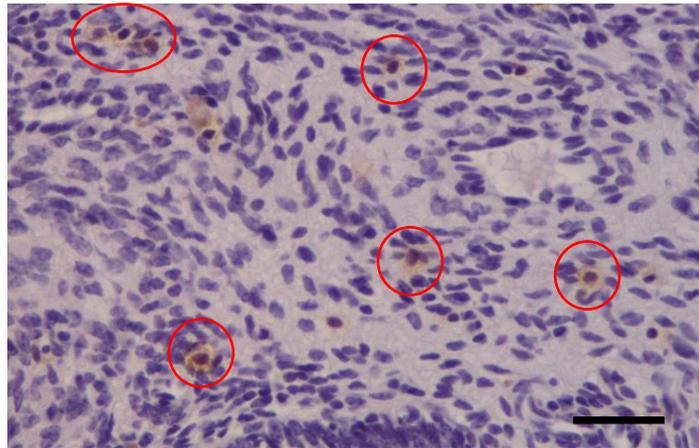
**Figura 65.** Número de macrófagos infiltrantes en endometrio a los 45 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

A los 60 DPP, el número de macrófagos infiltrantes en endometrio mostró diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p = 0,011$ ). Específicamente, el número de macrófagos infiltrantes fue significativamente menor para el grupo IPC<sub>180</sub> en comparación a los grupos IPC<sub>90</sub> e IPC<sub>>180</sub> (Figura 66).



**Figura 66.** Número de macrófagos infiltrantes en endometrio a los 60 DPP entre los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 67 se muestra una imagen representativa de la inmunotinción de los macrófagos en endometrio.



**Figura 67.** Imagen representativa de la inmunotinción de los macrófagos en endometrio. Los mismos se delimitan con un círculo rojo. Magnificación 400X. Barra = 25  $\mu$ m.

#### 4.5. Efectos de las alteraciones inmunes endometriales y sistémicas halladas en vacas durante la lactancia sobre el establecimiento de la preñez.

##### 4.5.1. Efecto de la actividad y capacidad fagocítica sobre el establecimiento de la preñez.

###### 4.5.1.1. Efecto de la actividad fagocítica sobre el establecimiento de la preñez.

La asociación entre los niveles de AF y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,766$ ). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de AF ( $133 \pm 18$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de AF ( $130 \pm 15$  DPP) (Figura 68).

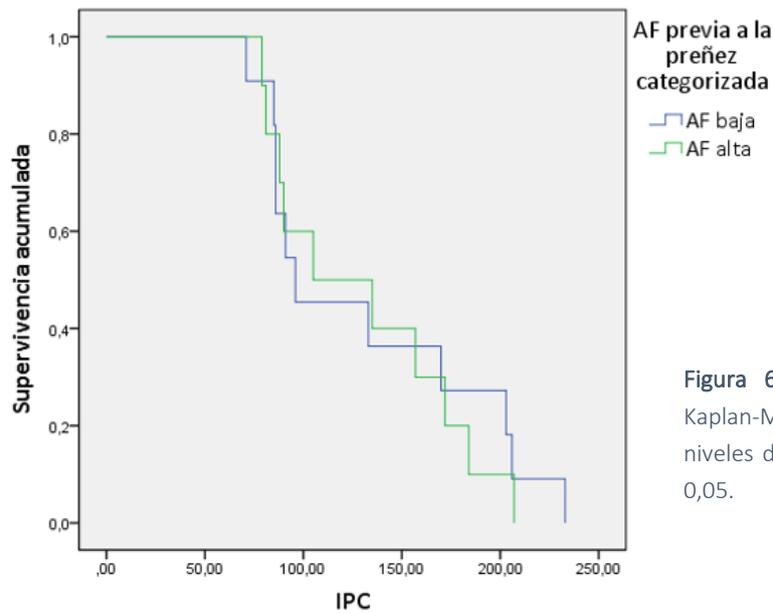


Figura 68. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de AF previos a la concepción.  $p > 0,05$ .

#### 4.5.1.2. Efecto de la capacidad fagocítica sobre el establecimiento de la preñez.

La asociación entre los niveles de CF y el retraso en la concepción fue significativa ( $p = 0,001$ ). Específicamente, aquellos animales con menores niveles de CF lograron la preñez con mayor celeridad ( $98 \pm 7$  DPP) en relación a aquellos con altos niveles de CF ( $168 \pm 15$  DPP) (Figura 69).

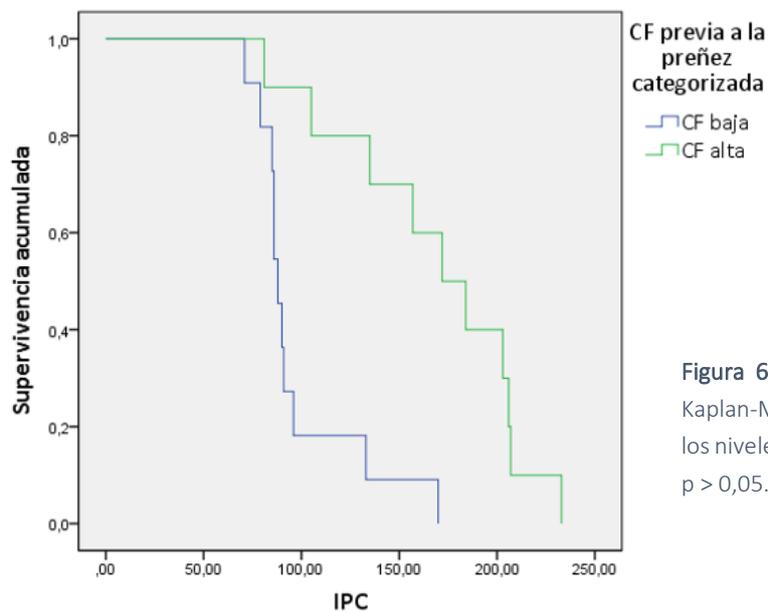


Figura 69. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de CF previos a la concepción.  $p > 0,05$ .

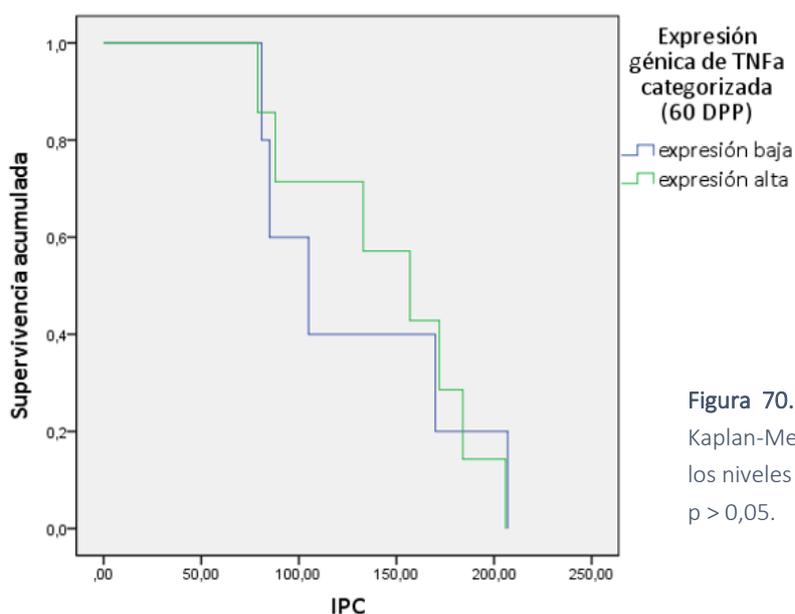
#### 4.5.2. Efecto de los niveles de expresión endometrial génica y proteica de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias sobre el establecimiento de la preñez.

En la sección 4.3. se evaluaron los niveles de expresión génica y proteica de citoquinas pro y antiinflamatorias para los diferentes grupos en estudio, tanto a los 45 y 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 alguna/s citoquina/s en particular, en un momento de la lactancia. Por este motivo, se realizó un análisis estadístico complementario, considerando los niveles de expresión de cada citoquina en particular a los 60 DPP, es decir, el momento previo a que los animales se liberaron a servicio. De esta manera, se logró determinar si el retraso en la concepción estuvo asociado a dichos niveles temporales de expresión diferencial de una o varias citoquinas a nivel endometrial.

##### *4.5.2.1. Efecto de los niveles de expresión endometrial génica y proteica de citoquinas proinflamatorias sobre el establecimiento de la preñez.*

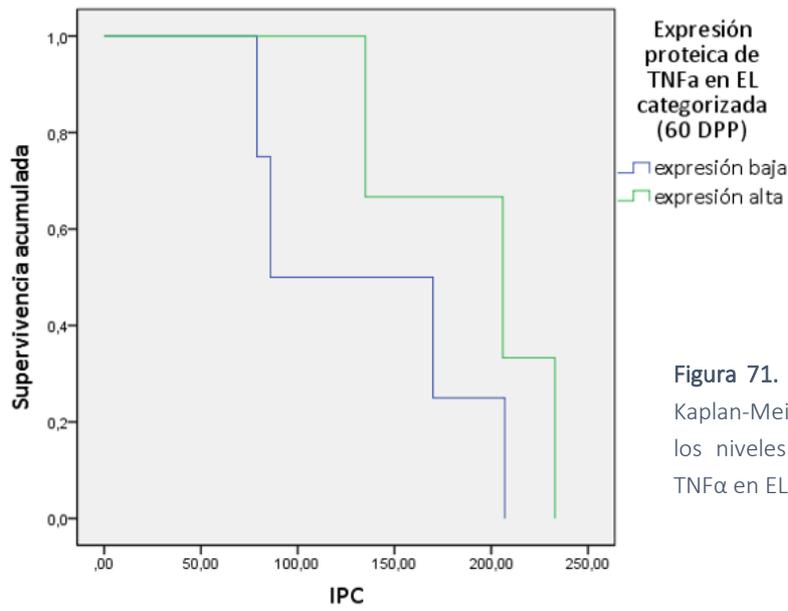
###### *4.5.2.1.1. Factor de necrosis tumoral alfa.*

La asociación entre los niveles de expresión génica de TNF $\alpha$  y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,959$ ). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión génica ( $130 \pm 25$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión génica ( $146 \pm 18$  DPP) (Figura 70).

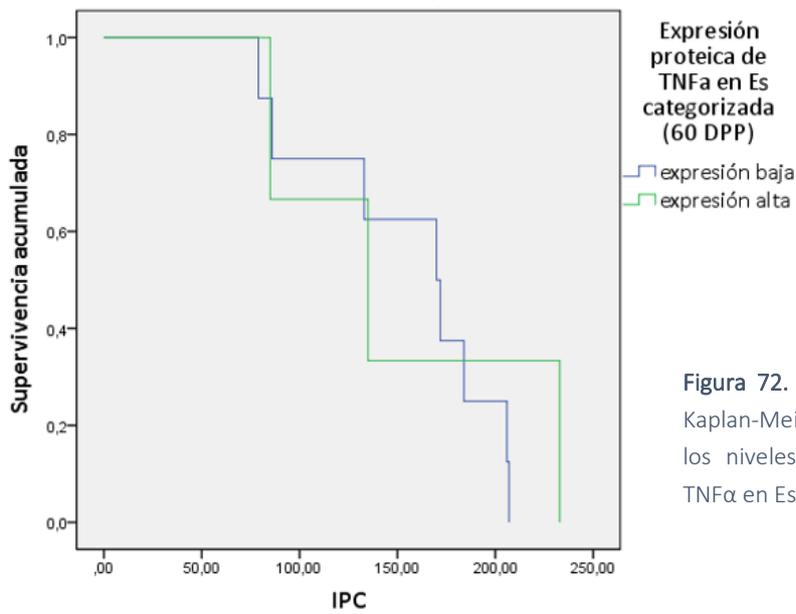


**Figura 70.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de TNF $\alpha$ .  $p > 0,05$ .

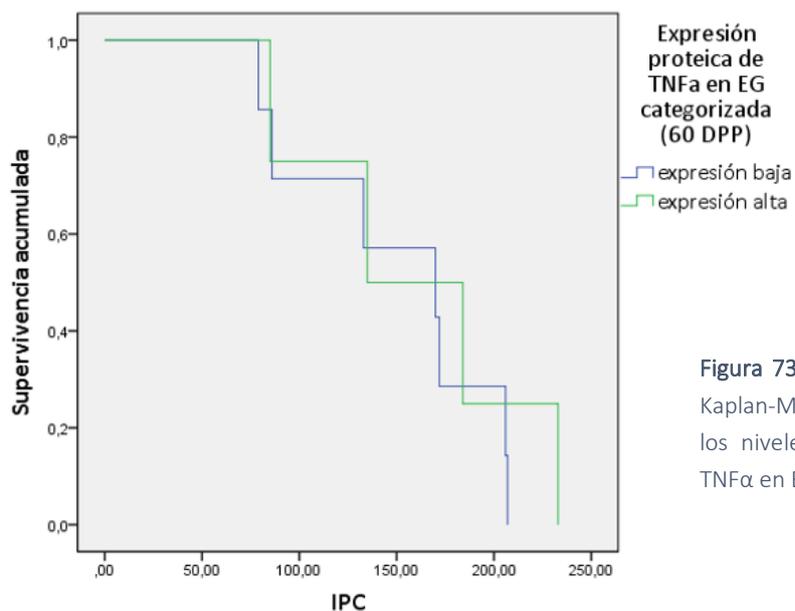
En relación con los niveles de expresión proteica de TNF $\alpha$  en EL, Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ( $p = 0,322$ ,  $p = 0,574$  y  $p = 0,529$ , respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EL ( $136 \pm 32$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $191 \pm 29$  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 ( $155 \pm 18$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $151 \pm 43$  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 ( $150 \pm 20$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $159 \pm 32$  DPP) (Figura 73).



**Figura 71.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TNFα en EL.  $p > 0,05$ .



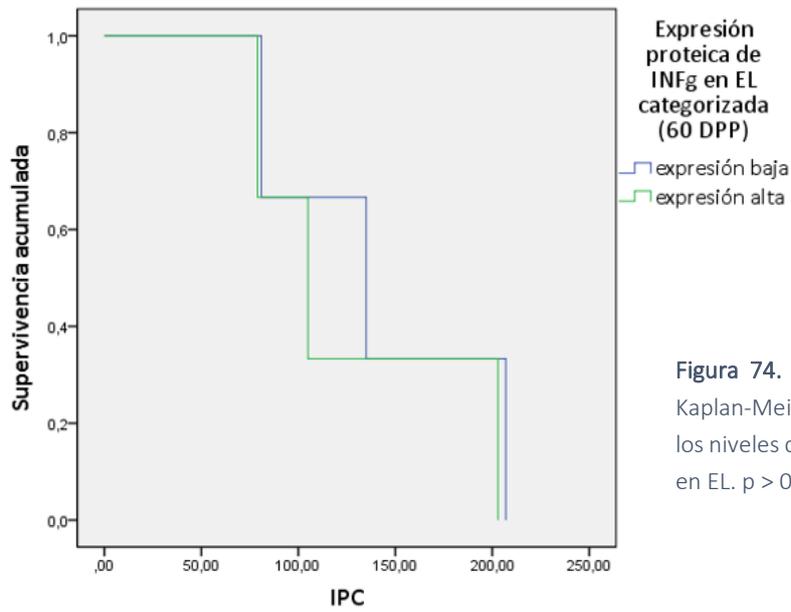
**Figura 72.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TNFα en Es.  $p > 0,05$ .



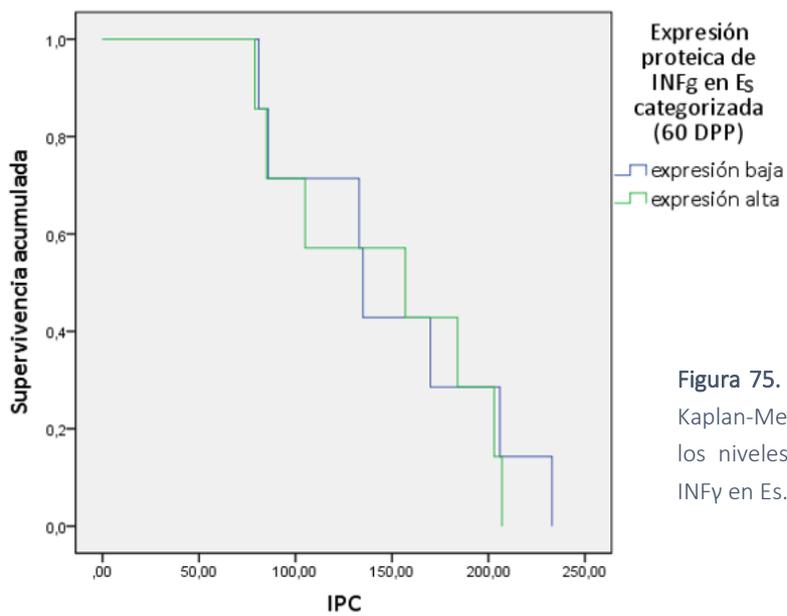
**Figura 73.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TNFα en EG.  $p > 0,05$ .

#### 4.5.2.1.2. Interferón gama.

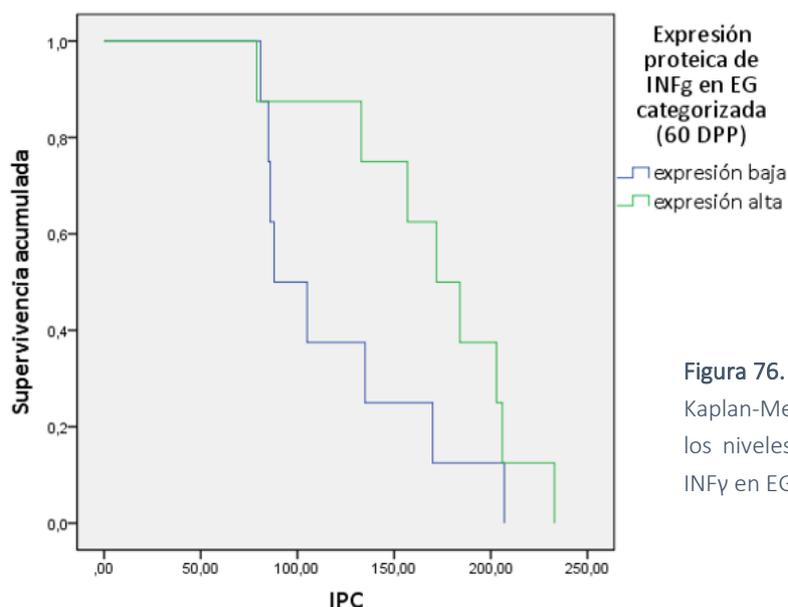
La asociación entre los niveles de expresión proteica de INFγ en EL, Es y EG, y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,486$ ,  $p = 0,723$  y  $p = 0,149$ , respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión proteica en EL ( $141 \pm 36$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $129 \pm 38$  DPP) (Figura 74). 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 ( $149 \pm 22$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $146 \pm 21$  DPP) (Figura 75). 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 ( $120 \pm 17$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $171 \pm 17$  DPP) (Figura 76).



**Figura 74.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de INFγ en EL.  $p > 0,05$ .



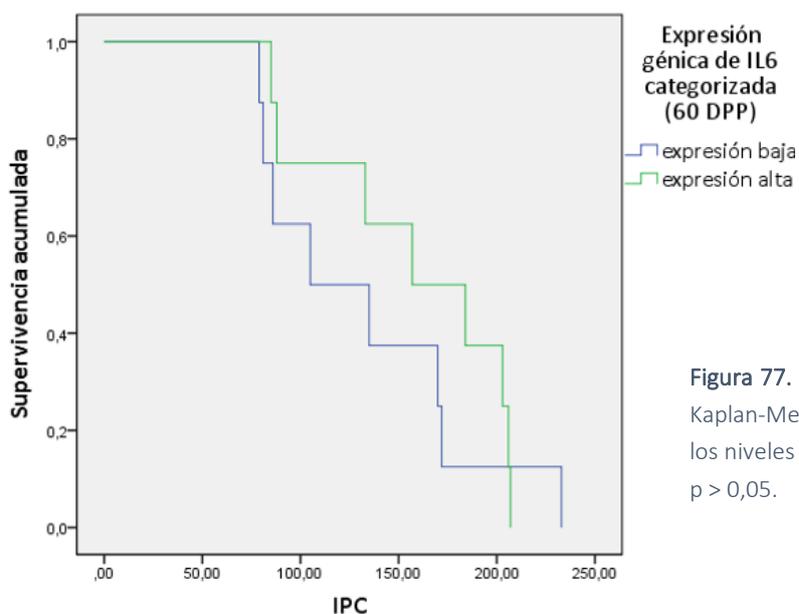
**Figura 75.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de INFγ en Es.  $p > 0,05$ .



**Figura 76.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de INFγ en EG.  $p > 0,05$ .

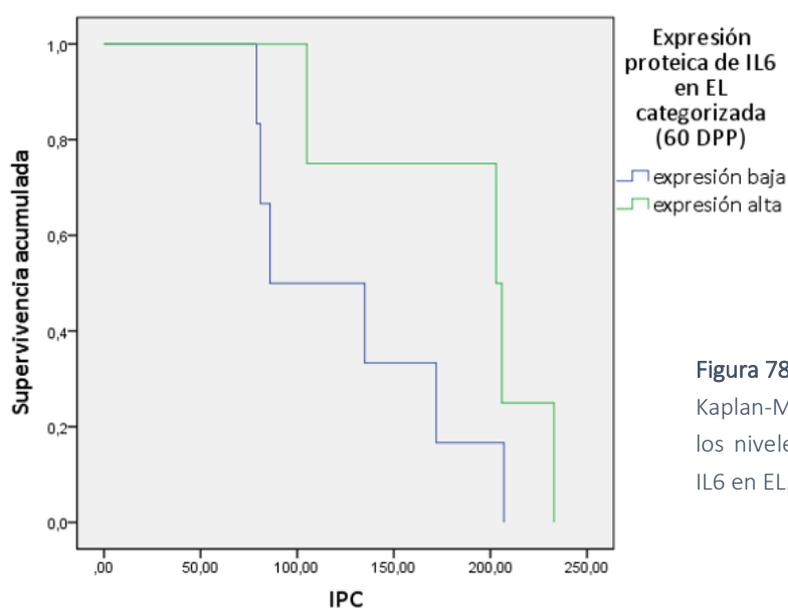
#### 4.5.2.1.3. Interleuquina 6.

La asociación entre los niveles de expresión génica de IL6 y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,590$ ). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión génica ( $133 \pm 20$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión génica ( $158 \pm 18$  DPP) (Figura 77).

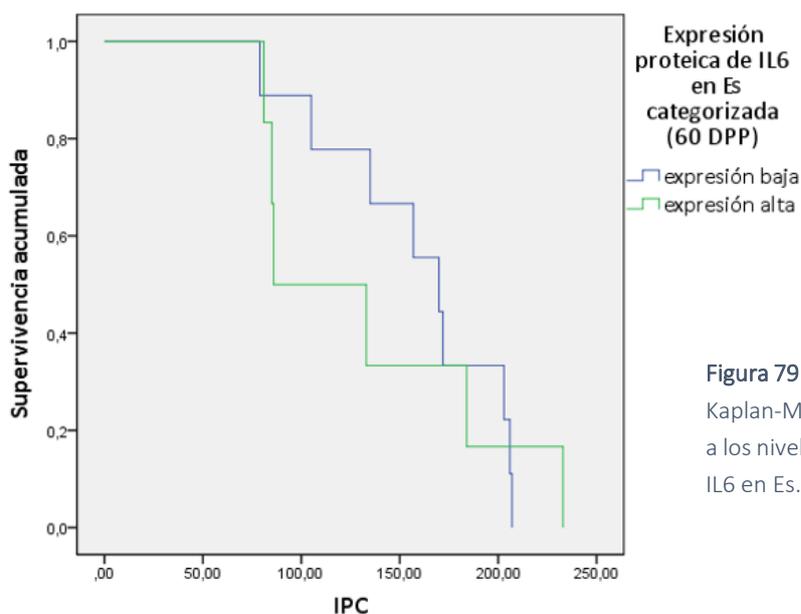


**Figura 77.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL6.  $p > 0,05$ .

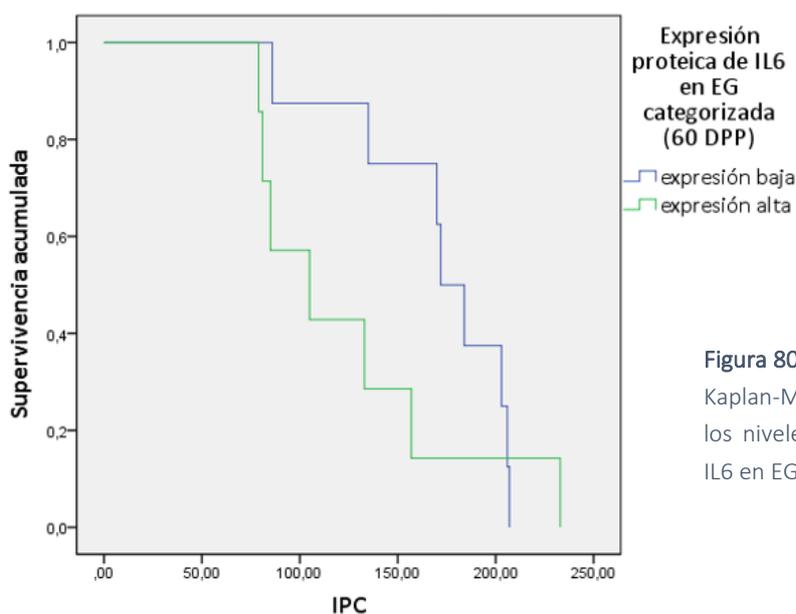
En relación con los niveles de expresión proteica de IL6 en EL, Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ( $p = 0,186$ ,  $p = 0,861$  y  $p = 0,325$ , respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EL ( $127 \pm 22$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $187 \pm 28$  DPP) (Figura 78). Del mismo modo, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles en Es ( $159 \pm 15$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $134 \pm 26$  DPP) (Figura 79). Finalmente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles en EG ( $170 \pm 15$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $125 \pm 21$  DPP) (Figura 80).



**Figura 78.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL6 en EL.  $p > 0,05$ .



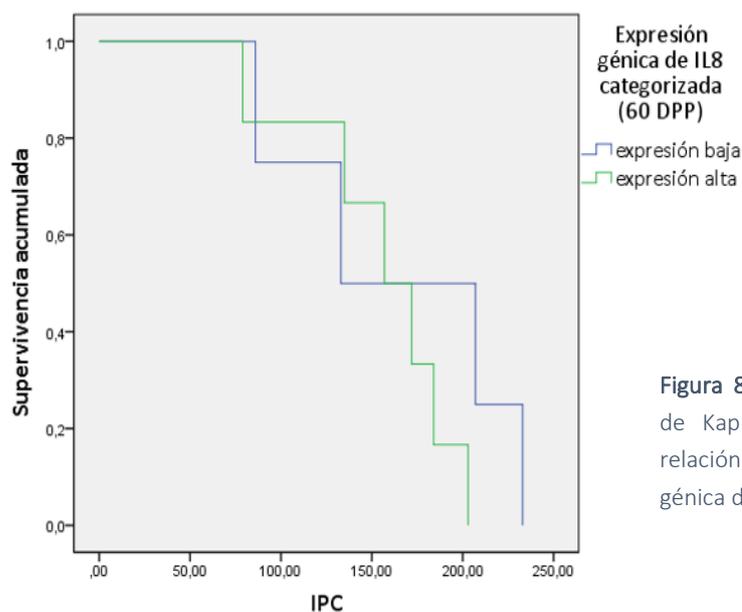
**Figura 79.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL6 en Es.  $p > 0,05$ .



**Figura 80.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL6 en EG.  $p > 0,05$ .

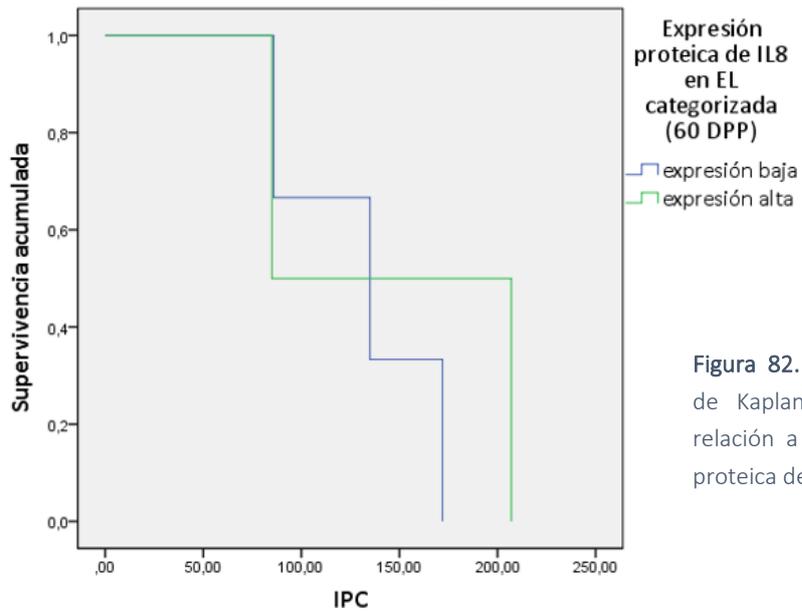
#### 4.5.2.1.4. Interleuquina 8.

La asociación entre los niveles de expresión génica de IL8 y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,303$ ). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión génica de IL8 ( $165 \pm 34$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión génica ( $155 \pm 18$  DPP) (Figura 81).

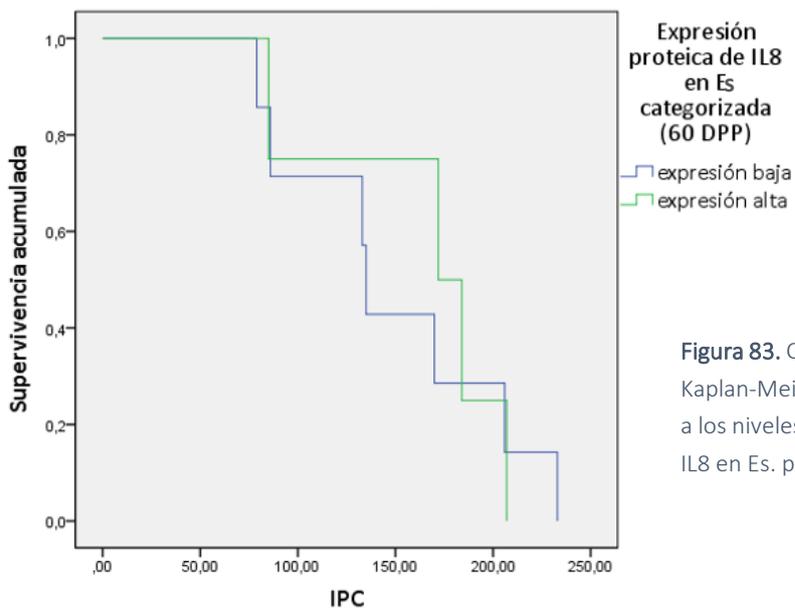


**Figura 81.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL8.  $p > 0,05$ .

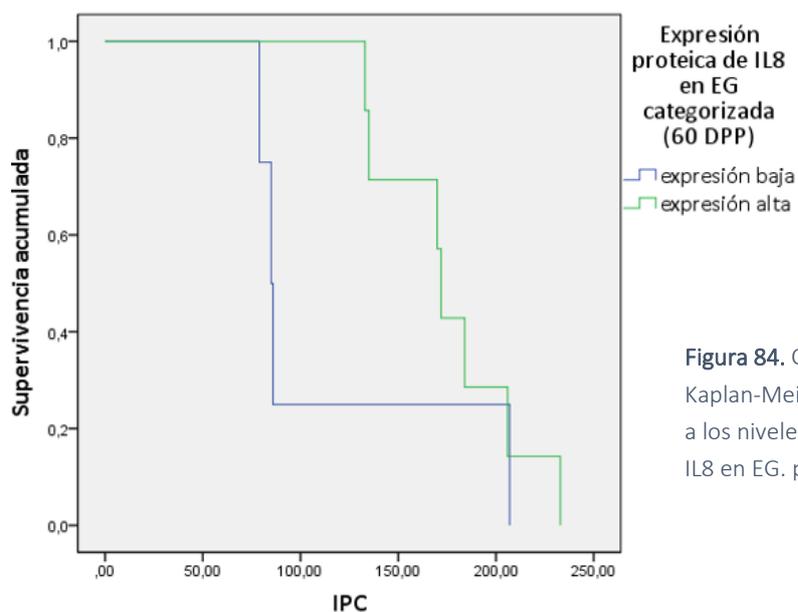
En relación con los niveles de expresión proteica de IL8 en EL, Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ( $p = 0,610$ ,  $p = 0,829$  y  $p = 0,299$ , respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EL ( $131 \pm 25$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $146 \pm 61$  DPP) (Figura 82). 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 ( $149 \pm 22$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $162 \pm 27$  DPP) (Figura 83). Finalmente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica de IL8 en EG ( $114 \pm 31$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $176 \pm 14$  DPP) (Figura 84).



**Figura 82.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL8 en EL.  $p > 0,05$ .



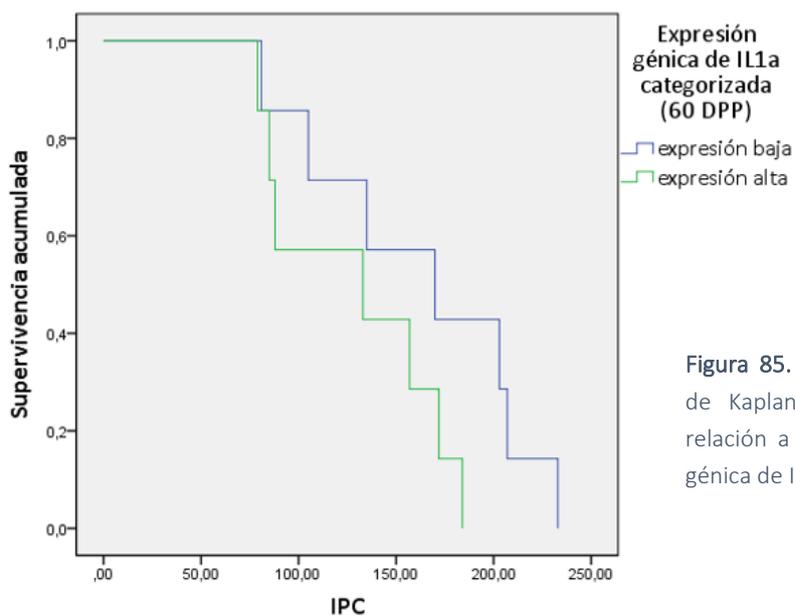
**Figura 83.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL8 en Es.  $p > 0,05$ .



**Figura 84.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL8 en EG.  $p > 0,05$ .

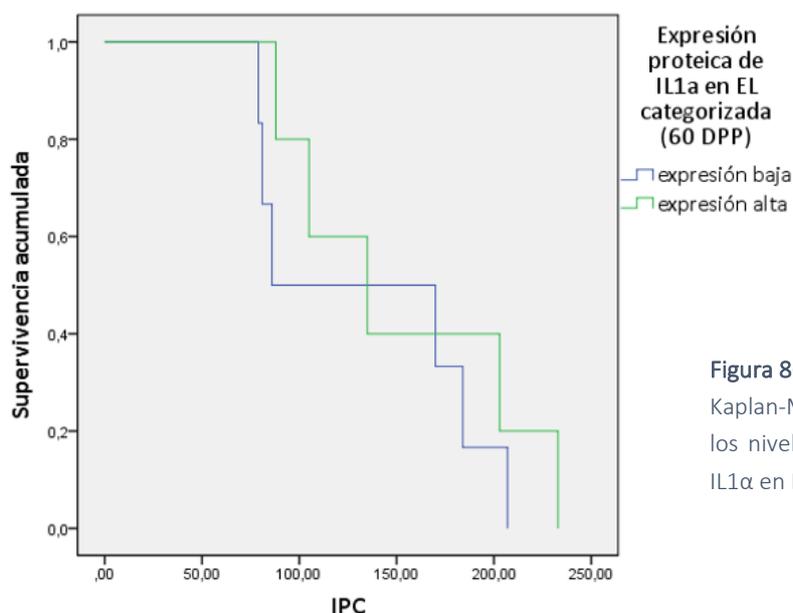
#### 4.5.2.1.5. Interleuquina 1 alfa.

La asociación entre los niveles de expresión génica de IL1 $\alpha$  y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,129$ ). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión génica ( $162 \pm 21$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión génica ( $128 \pm 17$  DPP) (Figura 85).



**Figura 85.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1 $\alpha$ .  $p > 0,05$ .

En relación con los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en EL, Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ( $p = 0,415$ ,  $p = 0,061$  y  $p = 0,146$ , 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 ( $135 \pm 24$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $153 \pm 28$  DPP) (Figura 86). Con respecto a los niveles de expresión en Es, si bien el análisis muestra que habría una tendencia a que los mayores niveles de expresión proteica favorezcan la concepción temprana, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión en Es ( $173 \pm 22$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $133 \pm 18$  DPP) (Figura 87). 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 ( $128 \pm 16$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $173 \pm 20$  DPP) (Figura 88).



**Figura 86.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en EL.  $p > 0,05$ .

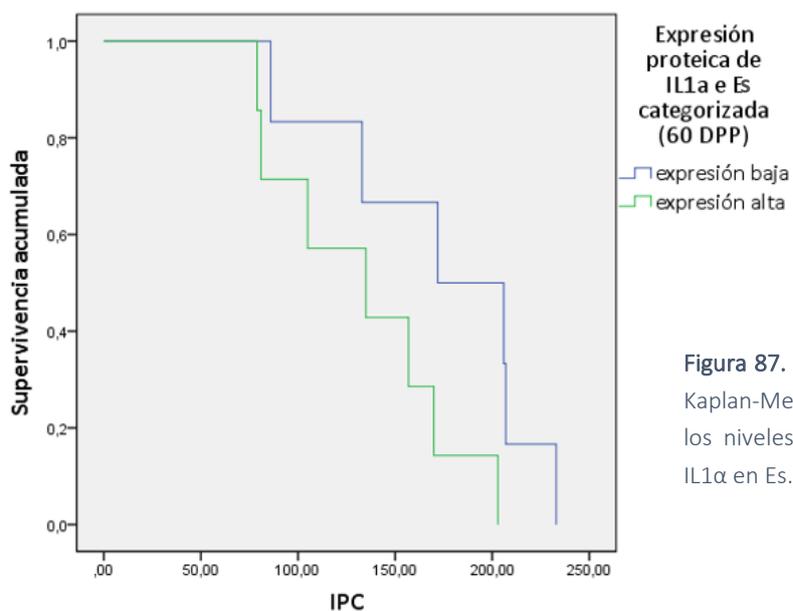


Figura 87. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en Es.  $p > 0,05$ .

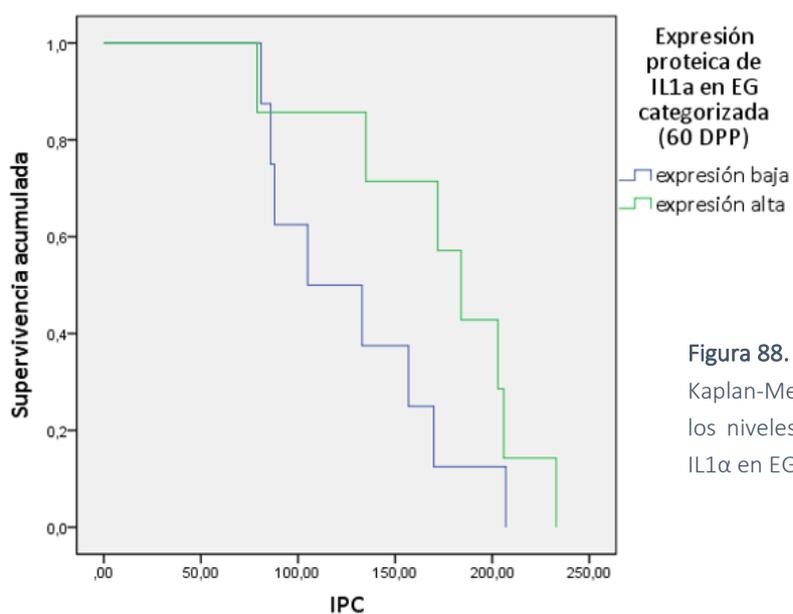
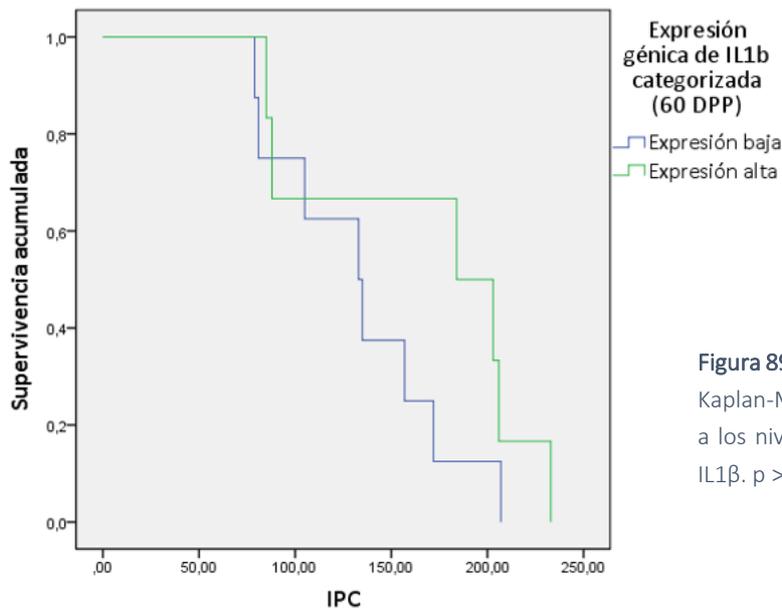


Figura 88. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\alpha$  en EG.  $p > 0,05$ .

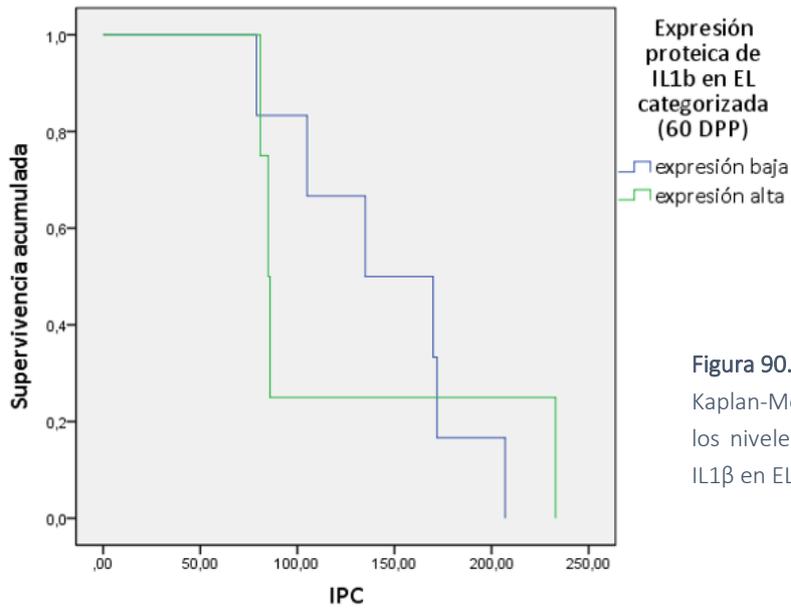
#### 4.5.2.1.6. Interleuquina 1 beta.

La asociación entre los niveles de expresión génica de IL1 $\beta$  y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,217$ ). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión génica de IL1 $\beta$  ( $134 \pm 16$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión génica ( $167 \pm 26$  DPP) (Figura 89).

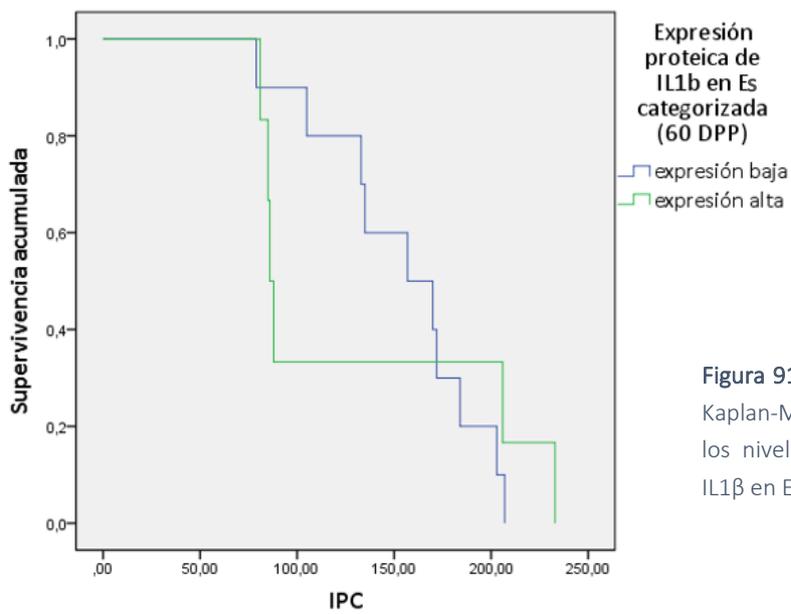


**Figura 89.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1 $\beta$ .  $p > 0,05$ .

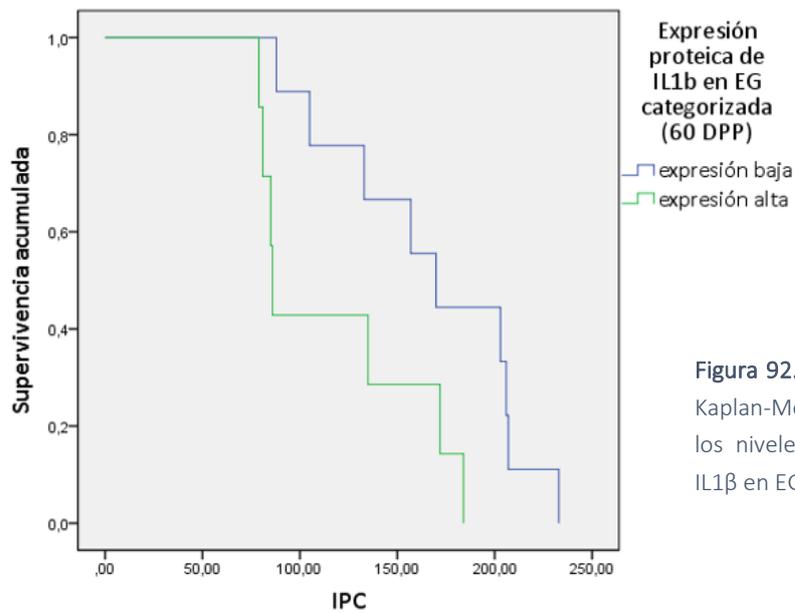
En relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en EL y Es, no hubo asociación con el retraso en la concepción ( $p = 0,974$  y  $p = 0,897$ , respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EL ( $145 \pm 19$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $121 \pm 37$  DPP) (Figura 90). 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 ( $155 \pm 13$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $130 \pm 29$  DPP) (Figura 91). Por el contrario, la asociación entre los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en EG y el retraso en la concepción fue significativa ( $p = 0,039$ ). Específicamente, aquellos animales con mayores niveles de expresión proteica en EG lograron la preñez con mayor celeridad ( $117 \pm 17$  DPP) en relación a aquellos con menores niveles de expresión proteica ( $167 \pm 17$  DPP) (Figura 92).



**Figura 90.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en EL.  $p > 0,05$ .



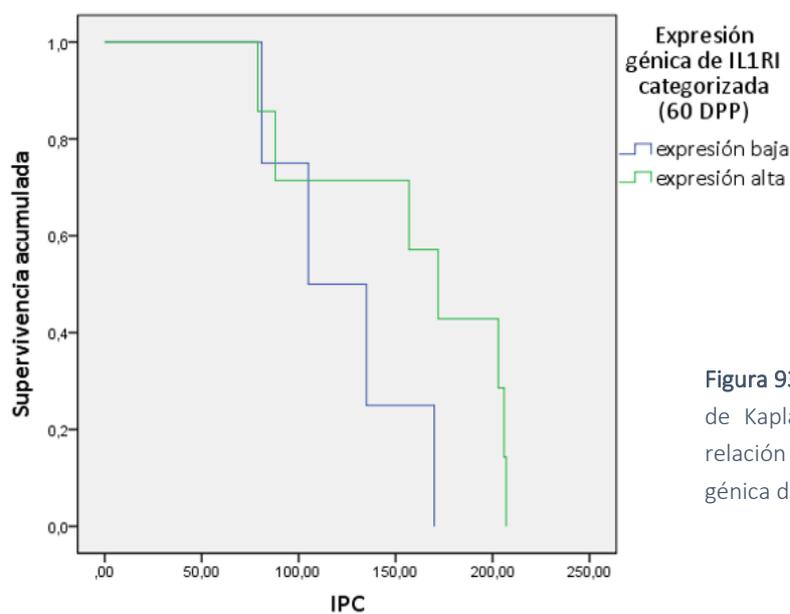
**Figura 91.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1 $\beta$  en Es.  $p > 0,05$ .



**Figura 92.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1β en EG.  $p < 0,05$ .

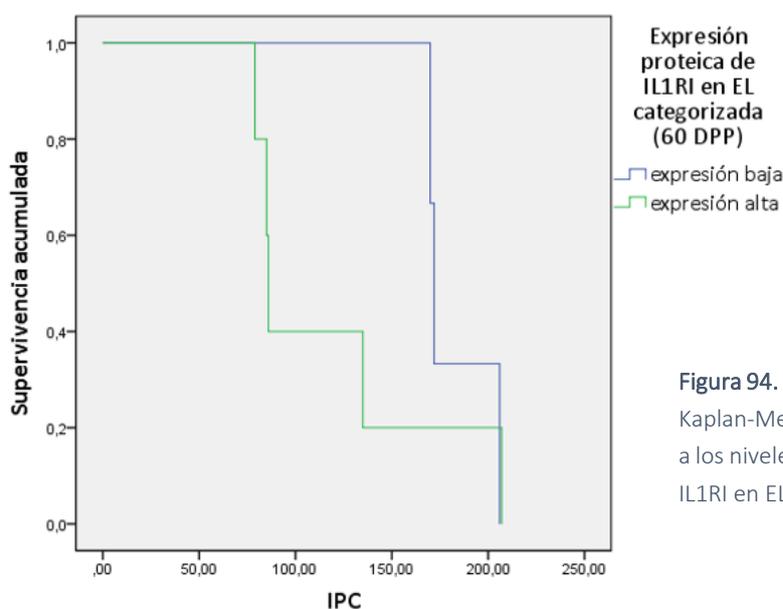
#### 4.5.2.1.7. Receptor I de la interleuquina 1.

La asociación entre los niveles de expresión génica de IL1RI y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,117$ ). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión génica de IL1RI ( $123 \pm 19$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión génica ( $159 \pm 21$  DPP) (Figura 93).

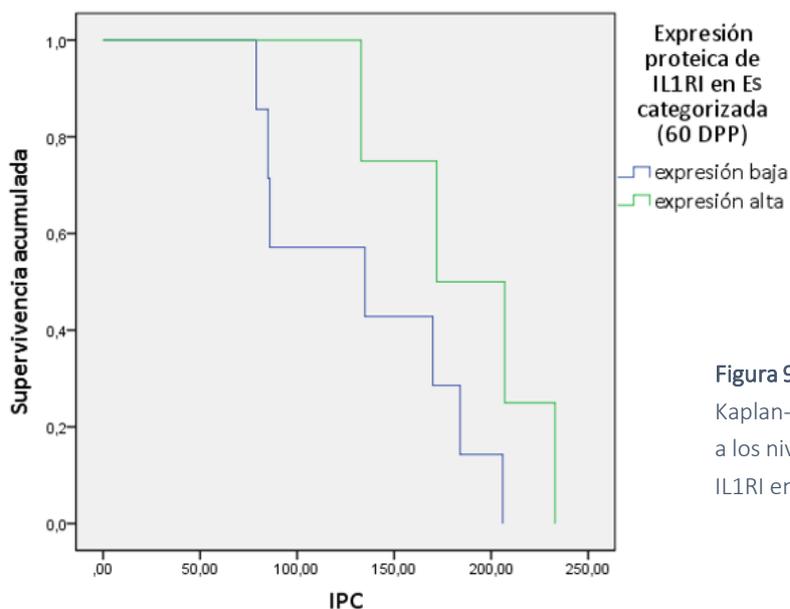


**Figura 93.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1RI.  $p > 0,05$ .

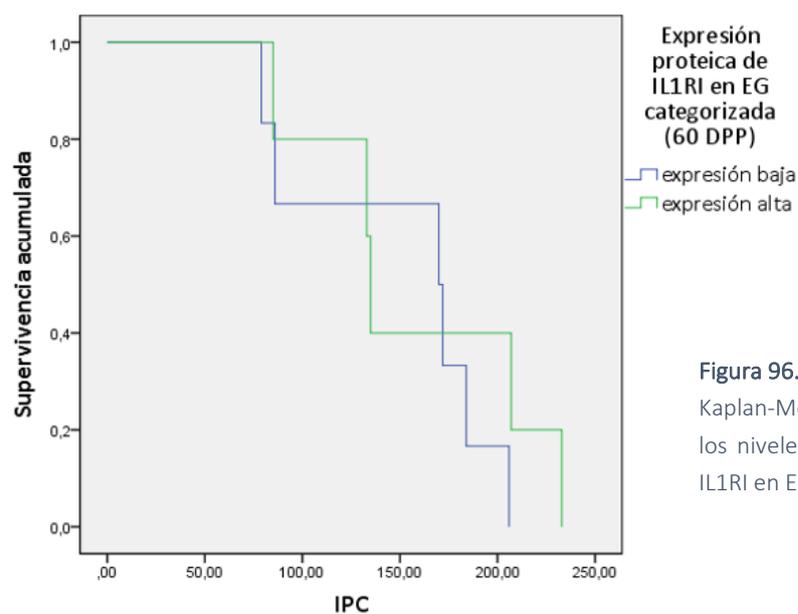
En relación a los niveles de expresión proteica de IL1RI en EL, Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ( $p = 0,520$ ,  $p = 0,103$  y  $p = 0,405$ , respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EL ( $183 \pm 12$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $118 \pm 24$  DPP) (Figura 94). 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 ( $135 \pm 20$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $186 \pm 22$  DPP) (Figura 95). 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 ( $150 \pm 22$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $158 \pm 27$  DPP) (Figura 96).



**Figura 94.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RI en EL.  $p > 0,05$ .



**Figura 95.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RI en Es.  $p > 0,05$ .



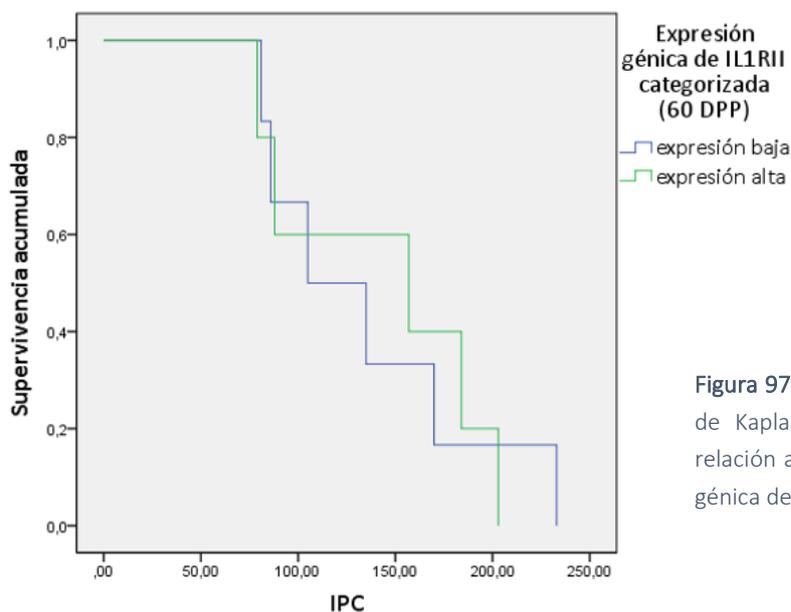
**Figura 96.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RI en EG.  $p > 0,05$ .

#### 4.5.2.2. Efecto de los niveles de expresión endometrial génica y proteica de citoquinas antiinflamatorias sobre el establecimiento de la preñez.

##### 4.5.2.2.1. Receptor II de la interleuquina 1.

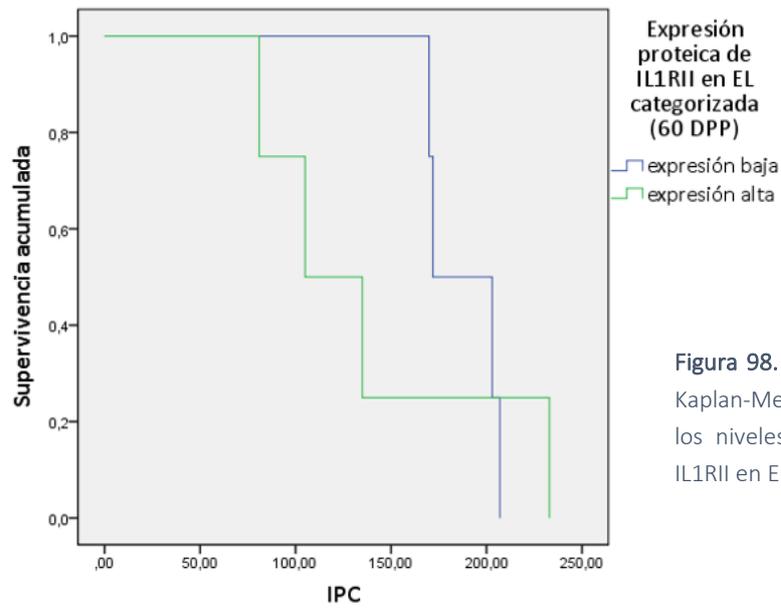
La asociación entre los niveles de expresión génica de IL1RII y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,997$ ). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión

génica ( $135 \pm 24$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión génica ( $142 \pm 25$  DPP) (Figura 97).

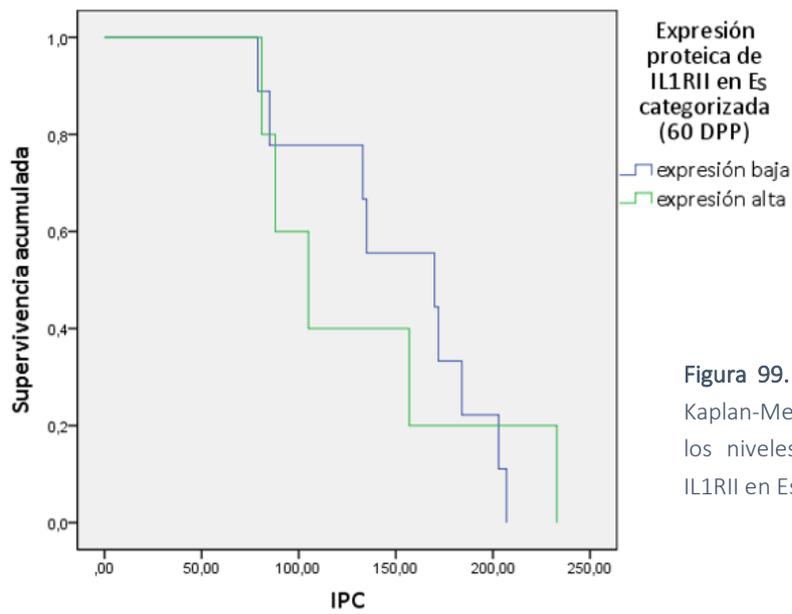


**Figura 97.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1RII.  $p > 0,05$ .

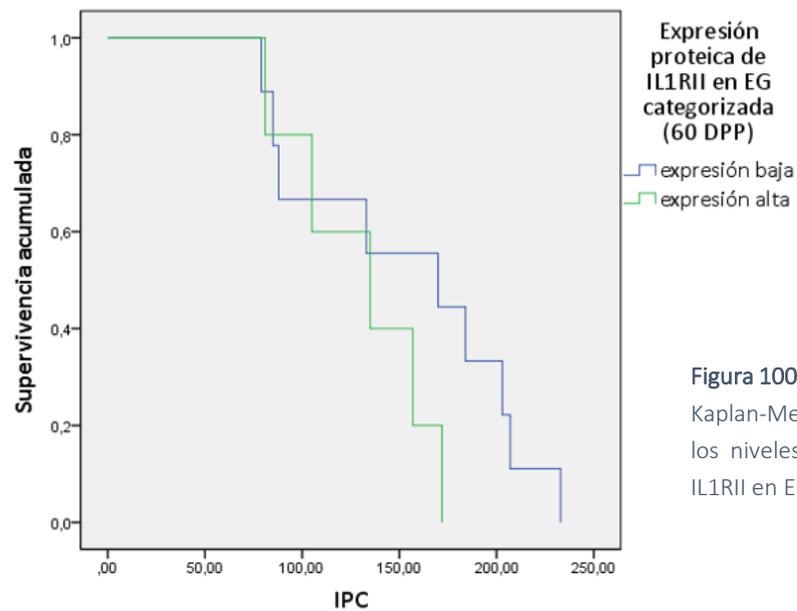
En relación a los niveles de expresión proteica de IL1RII en EL, Es y EG, no hubo asociación con el retraso en la concepción ( $p = 0,714$ ,  $p = 0,974$  y  $p = 0,216$ , respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EL ( $188 \pm 10$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $139 \pm 34$  DPP) (Figura 98). 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 de IL1RII en Es ( $152 \pm 16$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $133 \pm 28$  DPP) (Figura 99). 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 ( $154 \pm 20$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $130 \pm 17$  DPP) (Figura 100).



**Figura 98.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RII en EL.  $p > 0,05$ .



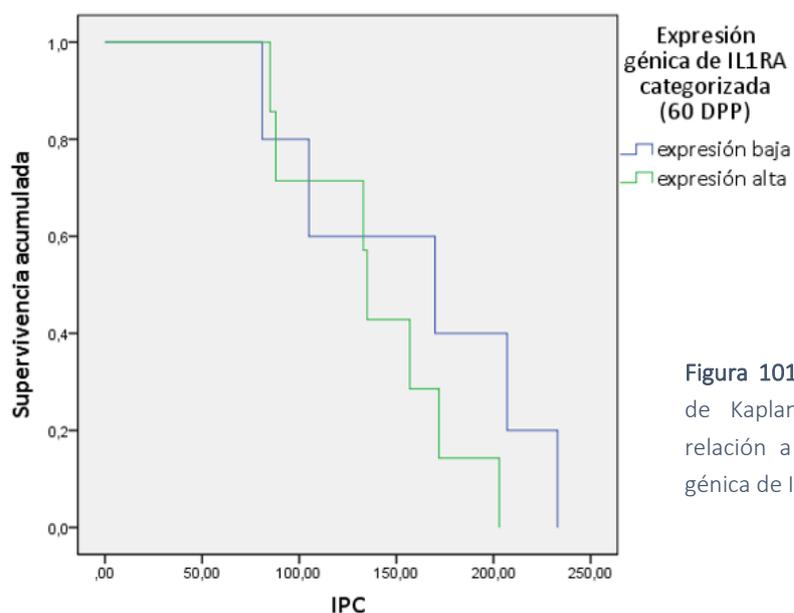
**Figura 99.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RII en Es.  $p > 0,05$ .



**Figura 100.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RII en EG.  $p > 0,05$ .

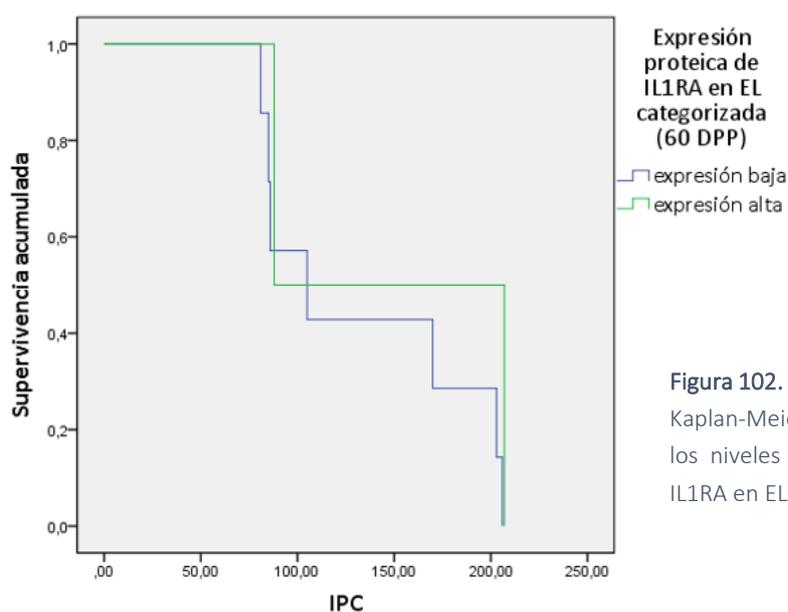
#### 4.5.2.2.2. Antagonista del receptor de la interleuquina1.

La asociación entre los niveles de expresión génica de IL1RA y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,274$ ). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión génica ( $159 \pm 29$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión génica ( $139 \pm 16$  DPP) (Figura 101).

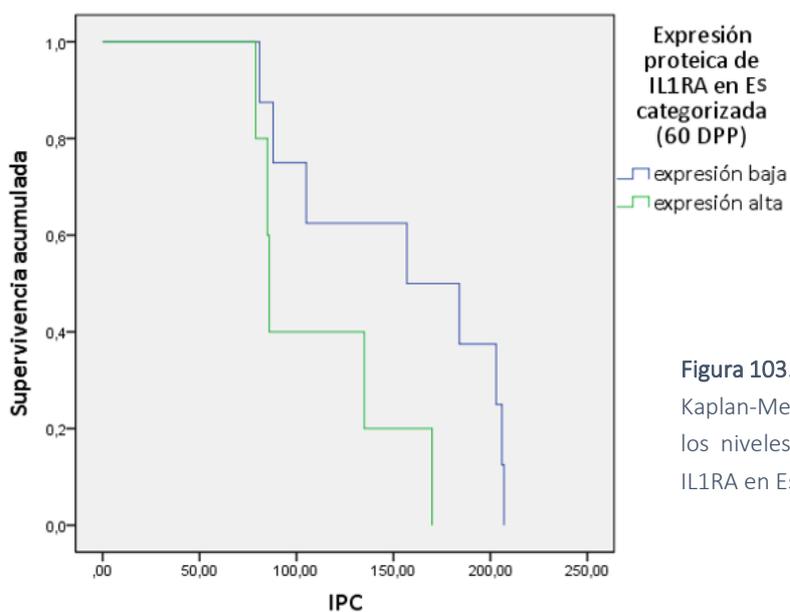


**Figura 101.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión génica de IL1RA.  $p > 0,05$ .

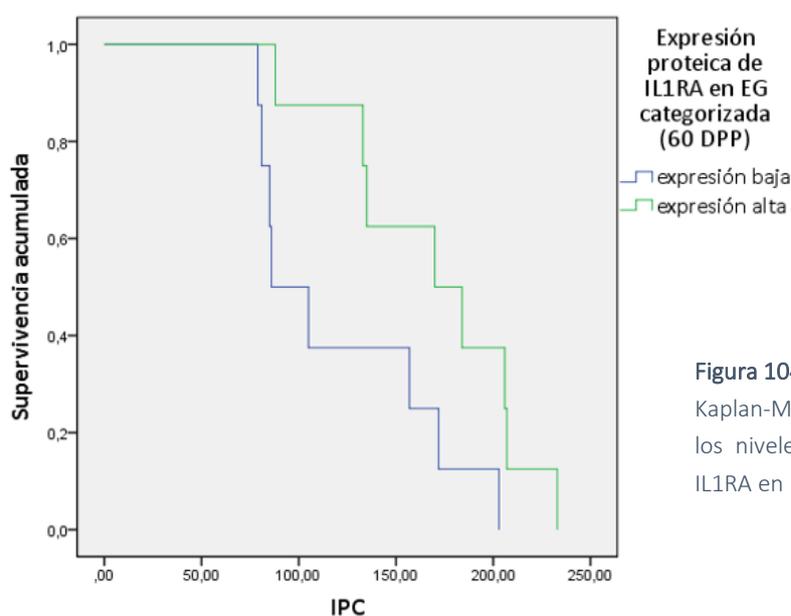
En relación a los niveles de expresión proteica de IL1RA en EL y Es, no hubo asociación con el retraso en la concepción, si bien el análisis muestra que habría una tendencia a que los mayores niveles de expresión proteica en Es favorezcan la concepción temprana ( $p = 0,278$  y  $p = 0,060$ , respectivamente). 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 ( $134 \pm 22$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $148 \pm 60$  DPP) (Figura 102). Del mismo modo, no hubo diferencias significativas en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en Es ( $154 \pm 19$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $111 \pm 18$  DPP) (Figura 103). Por el contrario, la asociación entre los niveles de expresión proteica de IL1RA en EG y el retraso en la concepción fue significativa ( $p = 0,042$ ). Específicamente, aquellos animales con menores niveles de expresión proteica en EG lograron la preñez con mayor celeridad ( $121 \pm 17$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $170 \pm 17$  DPP) (Figura 104).



**Figura 102.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RA en EL.  $p > 0,05$ .



**Figura 103.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RA en Es.  $p > 0,05$ .

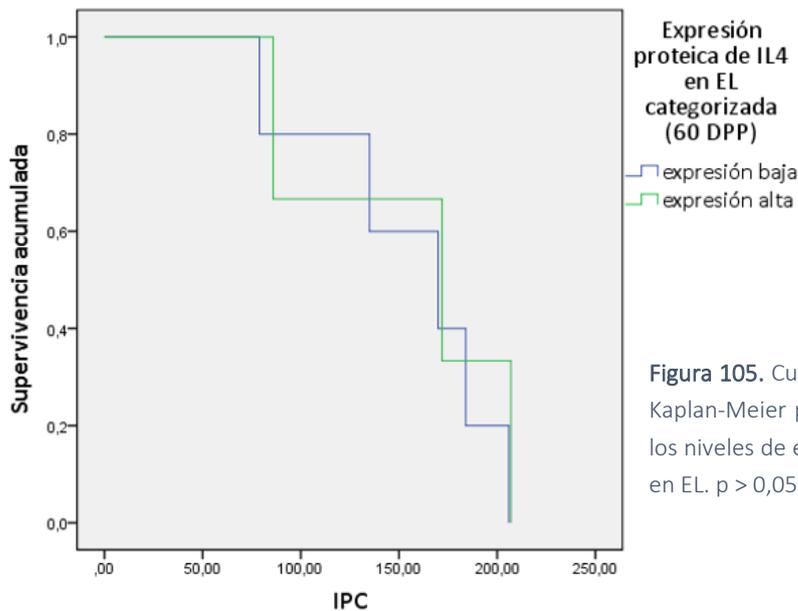


**Figura 104.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL1RA en EG.  $p < 0,05$ .

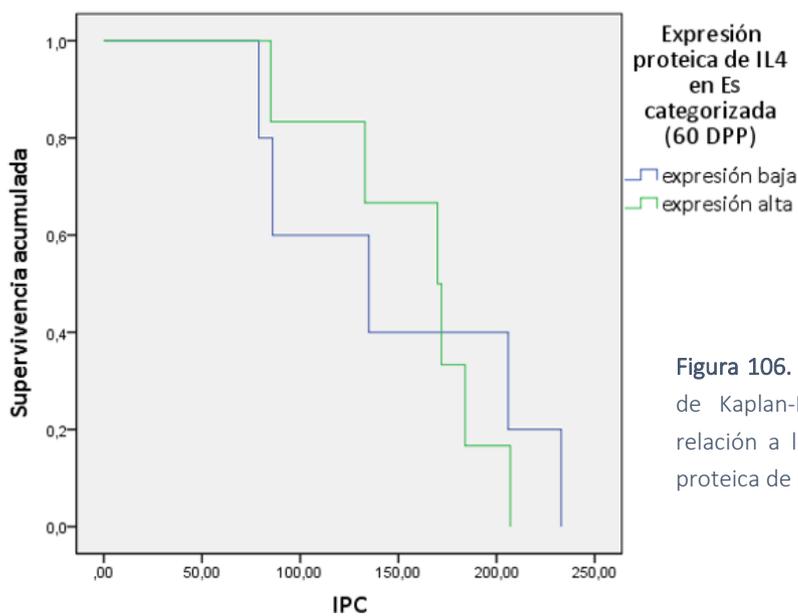
#### 4.5.2.2.3. Interleuquina 4.

La asociación entre los niveles de expresión proteica de IL4 en EL, Es y EG, y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,500$ ,  $p = 0,746$  y  $p = 0,590$ , respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión proteica en EL ( $155 \pm 22$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $155 \pm 36$  DPP) (Figura 105). 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 ( $148 \pm 31$  DPP) en relación a aquellos

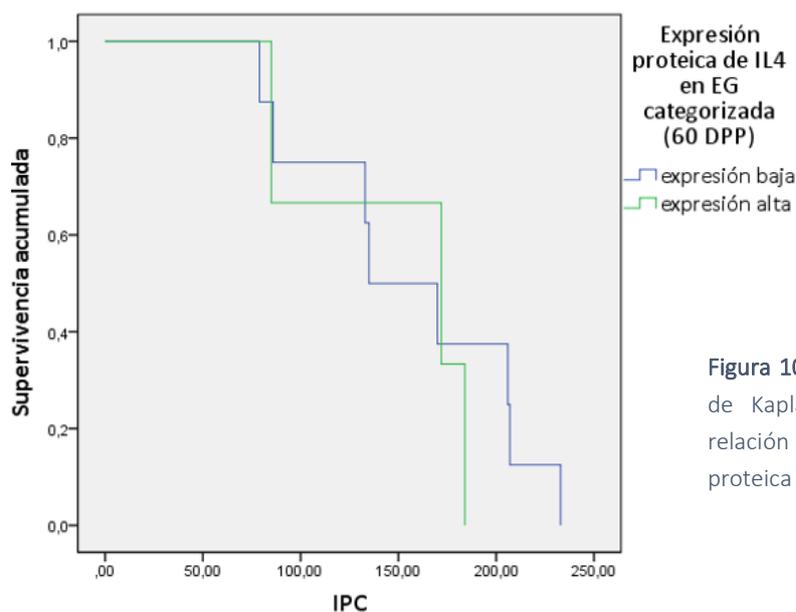
con mayores niveles de expresión proteica ( $159 \pm 18$  DPP) (Figura 106). Finalmente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez los animales con menores niveles de expresión proteica en EG ( $156 \pm 20$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $147 \pm 31$  DPP) (Figura 107).



**Figura 105.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL4 en EL.  $p > 0,05$ .



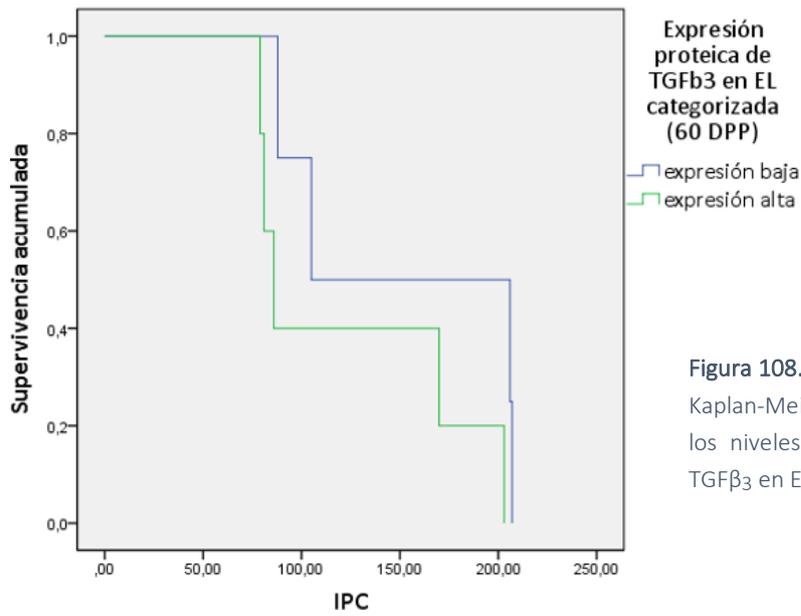
**Figura 106.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL4 en Es.  $p > 0,05$ .



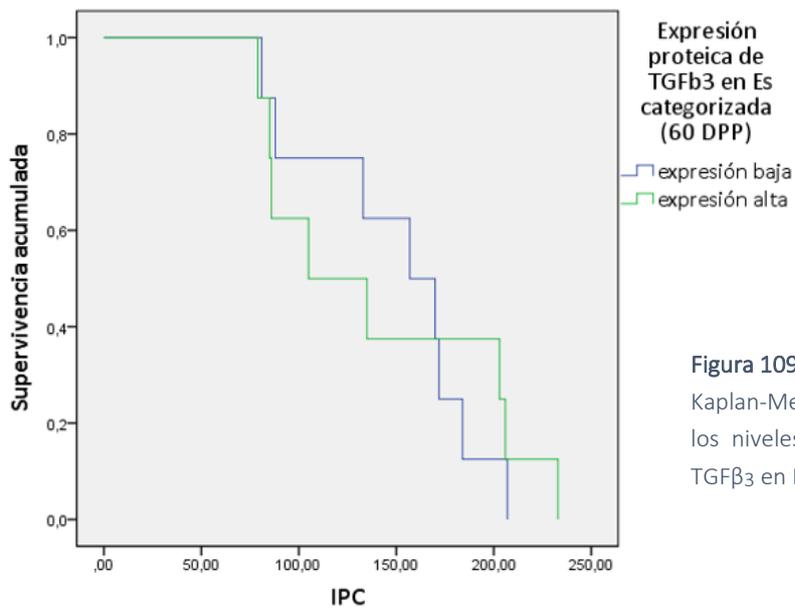
**Figura 107.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de IL4 en EG.  $p > 0,05$ .

#### 4.5.2.2.4. Factor de crecimiento transformante beta.

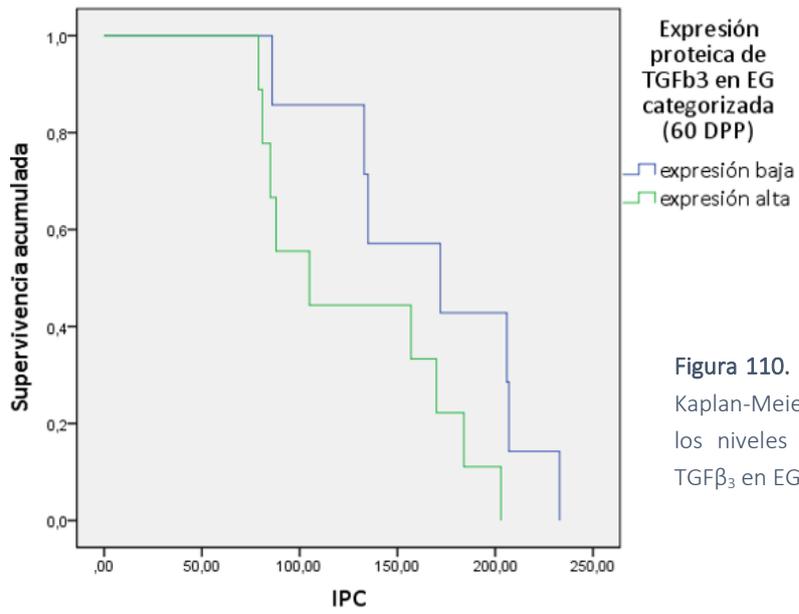
La asociación entre los niveles de expresión proteica de  $TGF\beta_3$  en EL, Es y EG, y el retraso en la concepción no fue significativa ( $p = 0,132$ ,  $p = 0,807$  y  $p = 0,067$ , respectivamente). Específicamente, no hubo diferencias en la cantidad de días que demoraron en lograr la preñez (días abiertos) los animales con menores niveles de expresión proteica en EL ( $152 \pm 32$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $124 \pm 26$  DPP) (Figura 108). 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 ( $149 \pm 16$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $142 \pm 22$  DPP) (Figura 109). 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, si bien el análisis muestra que habría una tendencia a que los mayores niveles de expresión proteica en EG favorezcan la concepción temprana ( $167 \pm 20$  DPP) en relación a aquellos con mayores niveles de expresión proteica ( $128 \pm 17$  DPP) (Figura 110).



**Figura 108.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TGFβ<sub>3</sub> en EL.  $p > 0,05$ .



**Figura 109.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TGFβ<sub>3</sub> en Es.  $p > 0,05$ .



**Figura 110.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IPC en relación a los niveles de expresión proteica de TGFβ<sub>3</sub> en EG.  $p > 0,05$ .

## 5. DISCUSIÓN

## 5.1. Componentes del sistema inmunológico a nivel sistémico y su posible relación con el logro de la preñez en vacas lecheras.

En vacas lecheras, el número de leucocitos totales circulantes varía como consecuencia de los eventos que ocurren durante el período de transición, probablemente debido a su migración a tejidos o focos donde deben participar en la eliminación de patógenos o resolución de procesos infecciosos (Kim *et al.*, 2005; Islam *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2019). Entre los eventos más relevantes podemos mencionar: el parto y la involución uterina necesaria e indispensable para la restitución de las funciones fisiológicas del endometrio. En estos procesos la inmunidad juega un rol fundamental (Stephen *et al.*, 2019; Velázquez *et al.*, 2019) y es a partir de esta premisa que planteamos evaluar qué rol podrían cumplir distintos factores de la inmunidad en una etapa posterior al período de transición (entre los 45 y 180 DPP) donde ocurren otras adaptaciones propias del desempeño reproductivo normal de las vacas. A partir de este estudio pudimos observar que el número de monocitos se modificó significativamente a lo largo de la lactancia y la preñez, en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Del mismo modo, el número de neutrófilos, se modificó significativamente en los grupos IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>120</sub> e IPC<sub>180</sub>. Es importante mencionar que, en este período, ocurren eventos cruciales que afectan el éxito reproductivo del rodeo y en consecuencia la producción, tales como son la concepción y el sostenimiento de la preñez. Por lo tanto, los cambios observados a lo largo del tiempo en estas poblaciones leucocitarias, estarían sugiriendo su potencial participación y asociación al logro de la concepción y a la preñez. Según lo reportado en la bibliografía, la preñez en vacas lecheras está asociada a cambios en el número de células inmunes, tanto a nivel sistémico como a nivel uterino (Oliveira y Hansen, 2008; Ott, 2020; Fiorenza *et al.*, 2021). Se ha demostrado en varias especies de mamíferos, que los macrófagos son reclutados hacia el endometrio durante la gestación (Mincheva-Nilsson *et al.*, 1995; Tekin y Hansen, 2004; Fest *et al.*, 2007; McIntire *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010; Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Fair, 2015b; Ott, 2020). Específicamente en bovinos, la presencia de macrófagos en endometrio es evidente a partir del día 13 de gestación (Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Fair, 2015b) y el número se incrementa notablemente entre los días 54 y 100 de la misma (Oliveira y Hansen, 2008). Sumado a esto, durante la gestación temprana en bovinos, se ha observado un aumento de la MCP 1 y 2, y del receptor de Pentraxin 3 en endometrio, lo que refuerza la teoría migratoria de los macrófagos hacia el útero (Walker *et al.*, 2010; Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Velázquez *et al.*, 2019). Estos antecedentes, podrían explicar la disminución en el recuento de macrófagos circulantes observadas en el presente trabajo, conforme las vacas lograron la preñez más tempranamente (grupo IPC<sub>90</sub>); no viéndose este comportamiento para aquellos grupos que lograron concebir desde el día 180 PP en adelante.

En relación a los neutrófilos, es sabido que en bovinos, se incrementan en sangre notablemente al momento del parto, y persisten hasta 12 horas después del mismo (Preisler *et al.*, 2000). Sin embargo, más allá del período de transición no hay antecedentes en relación a su recuento en circulación. Por lo tanto, los resultados del presente estudio, son los primeros reportes relacionados al recuento de neutrófilos a nivel sistémico, conforme los animales superan el período de transición, es decir, durante el curso de la preñez y la lactancia. Estudios previos afirman que los neutrófilos son la principal subpoblación leucocitaria involucrada en la remoción de bacterias patógenas durante el posparto (Hussain, 1989; Gilbert *et al.*, 2007; Chapwanya *et al.*, 2009), mientras que los monocitos y macrófagos tienen un papel más relevante en la inmunomodulación de la respuesta inmune (Butterfield *et al.*, 2006; Galvão *et al.*, 2012). Los hallazgos del presente estudio mostraron que el número de neutrófilos circulantes disminuye en momentos previos a la concepción, lo cual induce a pensar que éste podría ser un signo de la ausencia de inflamación y/o modulación de la misma necesaria para alcanzar la próxima preñez.

En función de lo expuesto y dado que hemos orientado el estudio a evaluar parámetros funcionales de los monocitos mediante la determinación de su AF y CF, nos centraremos en discutir su potencial relación con el éxito reproductivo en vacas lecheras. Los resultados obtenidos indican que, mayores niveles de CF de los monocitos/macrófagos, en momentos previos a la concepción, podrían estar asociados con intervalos parto-concepción más prolongados, lo que reforzaría el postulado anterior a cerca de su rol potencial en el logro de la preñez. En bovinos, no existen reportes previos en relación a los niveles de AF o CF de monocitos/macrófagos más allá del período de transición, durante la lactancia o gestación. Sin embargo, en humanos se ha demostrado que la función fagocítica de monocitos en mujeres embarazadas es menor en relación a lo hallado en mujeres no gestantes, lo que podría estar relacionado con la inmunosupresión materna característica de este período, esencial para el desarrollo normal del feto (Lampé *et al.*, 2015; Jena *et al.*, 2019). Si bien en el presente estudio los niveles de capacidad fagocítica se agruparon en rangos (alta / baja CF) conforme a los valores obtenidos, pudiendo no reflejar la distribución de otros estudios, los resultados mostraron que aquellas vacas con una capacidad fagocítica mayor tardaron aproximadamente 70 días más en concebir. Es importante tener en cuenta que, si bien es sabido que problemas en el parto como son la distocia, la muerte fetal o el aborto, pueden afectar el desempeño reproductivo posterior y producir infecciones uterinas, en el presente estudio, estos efectos fueron excluidos seleccionando animales con tracto reproductivo y parto normales. Además, todas las vacas estaban ciclando al inicio del muestreo y sus intervalos parto-primer servicio fueron similares. Por lo tanto, estos hallazgos indicarían que, la inmunosupresión materna, también podría ser un

mecanismo fisiológico requerido en bovinos, no solo durante el desarrollo del embrión/feto sino también en estadios previos a la concepción (Peralta *et al.*, 2021).

A su vez, la evaluación de estos parámetros funcionales de los monocitos/macrófagos en su contexto, permitió arribar a resultados que sugieren que tanto la AF como la CF de los mismos estarían reguladas por la disponibilidad de diferentes metabolitos y hormonas a lo largo de la lactancia y la preñez. Especialmente haciendo foco en momentos previos a la concepción de los diferentes grupos evaluados encontramos que los niveles de AF estarían asociados de forma inversa con los niveles de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y BHB. Mientras que, la AF estaría asociada de manera directa con los niveles de glucosa. De la misma manera los niveles de CF, estarían asociados de manera directa con los niveles de  $17\beta$ -estradiol y de manera inversa con los niveles de BHB. En este sentido, se ha demostrado en vacas lecheras que el  $17\beta$ -estradiol puede modular algunas funciones de las células polimorfonucleares tales como la quimiotaxis, la fagocitosis y el estallido respiratorio (Hoedemaker *et al.*, 1992; Da Silva *et al.*, 1998; Lamote *et al.*, 2004, 2006). Además, es sabido que hacia el final de la preñez esta hormona puede modular la diferenciación y maduración de células dendríticas derivadas de monocitos, promoviendo y manteniendo una preñez viable que concluya a término, sin desarrollo de respuestas antígeno específicas (Lamote *et al.*, 2006). Sin embargo, los conocimientos en relación a los efectos de esta hormona sobre la función particular de monocitos es limitada (Arck *et al.*, 2007; Pomeroy *et al.*, 2016). En mujeres, los efectos de los estrógenos sobre el sistema inmunológico están bien documentados. Dependiendo de la concentración, los estrógenos pueden desempeñar un papel proinflamatorio o antiinflamatorio (Nguyen *et al.*, 2014). Del mismo modo, en el presente estudio encontramos que mayores niveles de  $17\beta$ -estradiol estarían asociados a menores niveles de AF previo a la concepción para el grupo IPC<sub>90</sub>; mientras que, mayores niveles de  $17\beta$ -estradiol, estarían relacionados con mayores niveles de CF en el grupo IPC<sub>>180</sub>. Por lo tanto, el  $17\beta$ -estradiol podría tener un efecto dual sobre la funcionalidad de los monocitos/macrófagos según la concentración, lo que podría estar impactando a su vez sobre el logro de la preñez. Específicamente, en relación a la CF, se reforzaría el hecho de que, un perfil con mayor capacidad de fagocitar de los monocitos/macrófagos, podría estar retrasando el logro de la preñez (Peralta *et al.*, 2021). Por otro lado, los resultados del presente estudio indicarían una asociación inversa entre la AF y la progesterona en momentos previos a la concepción para el grupo IPC<sub>90</sub>, IPC<sub>120</sub> e IPC<sub>>180</sub>. Es decir, mayores niveles de progesterona, estarían asociados a menores niveles de AF. Estudios previos en ganado lechero mostraron que tratamientos *in vitro* con progesterona tienen efectos inmunosupresores sobre la función de neutrófilos y linfocitos (Ndiaye *et al.*, 2012; Pomeroy *et al.*, 2016). Sin embargo, los resultados del presente estudio proporcionan la primera evidencia que

describe la posible asociación inmunosupresora de la progesterona sobre la AF de monocitos/macrófagos en vacas lecheras, más allá del período de transición. En efecto, se abren nuevos interrogantes en relación a estos hallazgos que implicarían realizar estudios complementarios que permitan profundizar en esta asociación encontrada entre la funcionalidad de los monocitos y el contexto hormonal que acompaña el logro de la concepción.

Por otro lado, el presente estudio muestra que el contexto metabólico también estaría modulando dichas funciones de los monocitos/macrófagos circulantes. Se ha encontrado que, cercano al momento de la concepción, el BHB estaría asociado de manera inversa con la AF y la CF, en el grupo  $IPC_{120}$  e  $IPC_{>180}$ , respectivamente. Si bien no hay antecedentes en relación a la AF y CF de monocitos/macrófagos en períodos posteriores al de transición, se ha visto que durante el parto el BHB tiene efectos negativos sobre la quimiotaxis, el estallido oxidativo y la fagocitosis de neutrófilos en vacas lecheras (Grinberg *et al.*, 2008; Ingvarsen y Moyes, 2013, 2015). De manera similar, se ha demostrado que los linfocitos tienen una menor capacidad de respuesta a estímulos frente a agentes mitogénicos y los LB producen menor cantidad de inmunoglobulinas (Nonnecke *et al.*, 2003; Lacetera *et al.*, 2005; Ster *et al.*, 2012). Los resultados del presente trabajo son los primeros que describen una asociación entre el BHB y la AF y CF de monocitos/macrófagos bovinos, lo cual podría sugerir la posible participación del BHB en el efecto inmunosupresor sobre esta población celular, influyendo así en el momento del logro de la preñez de los animales. En relación a la glucosa, se ha encontrado que alrededor del momento de la concepción, estaría relacionada de manera directa con la AF de monocitos/macrófagos en el grupo  $IPC_{120}$ . Es sabido que, dicho metabolito, es utilizado por las células como fuente de energía primaria y precursor biosintético (Pithon-Curi *et al.*, 2004; Eger *et al.*, 2016). Por lo tanto, es necesario para la proliferación, viabilidad, diferenciación, quimiotaxis y fagocitosis de los monocitos (Ingvarsen y Moyes, 2013). Experimentos *in vitro* mostraron que hay un aumento sustancial en el consumo de glucosa de células activadas (Calder *et al.*, 2007; Palsson-McDermott y O'Neill, 2013; Kvidera *et al.*, 2017). Por este motivo, la glucosa es considerada un factor inmunoestimulador (Kvidera *et al.*, 2017) y los resultados del presente estudio refuerzan este postulado debido a la asociación directa encontrada entre dicho metabolito y la CF de los monocitos. En este sentido, una mayor disponibilidad de glucosa como fuente de energía podría favorecer que un mayor número de monocitos con capacidad de responder a los estímulos de activación desarrolle sus funciones fagocíticas, influyendo posiblemente así el logro de la concepción.

Si bien se ha argumentado que tanto la AF como la CF de monocitos/macrófagos estaría influenciada por el contexto hormonal y metabólico que la acompaña, y que esto a su vez, podría

estar relacionado con el logro de la preñez de los animales; encontramos que la CF de aquellos animales que lograron la preñez tempranamente, alrededor de los 90 DPP, no estaría asociada con el contexto hormonal y metabólico (Peralta *et al.*, 2021). Por lo tanto, la celeridad con la que logró concebir dicho grupo de animales, podría asociarse meramente a las características funcionales y capacidad de los monocitos/macrófagos evaluada en ese momento del posparto, sin verse afectada por el contexto que la acompaña. Por el contrario, más allá de los 90 DPP, la combinación de factores hormonales y metabólicos podría estar modulando de diversas formas la funcionalidad de estas células y como consecuencia, afectar la celeridad o el retardo con el que logran la preñez los animales.

## 5.2. Componentes del sistema inmunológico a nivel local y su posible relación con el logro de la preñez en vacas lecheras.

A lo largo del ciclo estral, el endometrio de los mamíferos sufre cambios morfológicos y funcionales que son importantes para el establecimiento de la preñez. Tanto la implantación como el desarrollo placentario, son procesos uterinos complejos estrechamente regulados, en los que el sistema inmunológico juega un rol crucial (Ott, 2019, 2020; Velázquez *et al.*, 2019). Sin embargo, son limitados los conocimientos en relación a los mecanismos y componentes inmunológicos implicados en el período peri-implantatorio (Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2019).

Existen antecedentes que demuestran que la presencia de macrófagos en el endometrio es esencial para la inmunoregulación y la tolerancia fetal (Mansouri-Attia *et al.*, 2012; Ott, 2019; Sánchez *et al.*, 2019). En el presente estudio, encontramos variaciones en los porcentajes de macrófagos encontrados en útero, en los tres grupos evaluados, previo a que los animales sean liberados a servicio (45 y 60 DPP). Si bien el número de macrófagos no se encontró asociado significativamente con un retraso en la concepción de vacas lecheras, el porcentaje elevado de los mismos que se halló en endometrio a los 60 DPP en el grupo de animales que concibieron tempranamente (IPC<sub>90</sub>), refuerza el hecho de que existiría una migración de monocitos hacia el útero que probablemente esté relacionada con las funciones fisiológicas que deben cumplir localmente, antes y durante la preñez. Esto refuerza lo encontrado a nivel sistémico, donde se observó una depleción en el número de monocitos circulantes alrededor del momento de la concepción para el grupo IPC<sub>90</sub>. Para los grupos de animales que concibieron más tardíamente (IPC<sub>180</sub> e IPC<sub>>180</sub>) los porcentajes de macrófagos encontrados localmente en momentos previos a

ser liberados a servicio (60 DPP), no necesariamente se encontraron respetando la asociación antes descrita con las variaciones sistémicas, y esto se podría atribuir a la lejanía de los procesos peri-implantatorios que, al tratarse de animales que logran la concepción a otros tiempos (> 90 DPP), no pueden ser cotejadas a nivel endometrial cuando los animales ya se liberaron a servicio.

Además de las poblaciones celulares presentes en endometrio, en condiciones fisiológicas, el ambiente de citoquinas está estrechamente relacionado con las funciones uterinas normales de las vacas, incluido el ciclo estral y el mantenimiento de la preñez (Koh *et al.*, 2018). Sin embargo, la relación de las citoquinas con ciertas variables relacionadas al desempeño reproductivo, como por ejemplo el microambiente pre-implantatorio y adecuado para la concepción y establecimiento de la preñez, aun no se ha dilucidado. Los resultados obtenidos nos permitieron constatar que las citoquinas expresadas a nivel endometrial, previo a que los animales sean liberados a servicio, podrían servir como predictores de un ambiente endometrial adecuado que favorezca una concepción temprana en vacas lecheras. Específicamente, a los 45 DPP, los niveles de expresión proteica de INF $\gamma$ , IL6 y TGF $\beta_3$  observados a nivel endometrial en el grupo IPC<sub>90</sub> en comparación con los grupos de animales que tardaron más en preñarse, indicarían un posible rol de estas citoquinas en el logro temprano de la preñez. Del mismo modo a los 60 DPP, los niveles de expresión proteica de IL8, IL1 $\beta$  e IL1RI observados en el grupo IPC<sub>90</sub> en comparación con el resto de los grupos evaluados, también podrían estar indicando un ambiente adecuado para la concepción temprana. Dado que la IL6 es una citoquina que regula la transición de una respuesta inmunológica dominada por neutrófilos, a una respuesta dominada por macrófagos (Hurst *et al.*, 2021; Healy *et al.*, 2015), los mayores niveles de IL6 observados a los 45 DPP en el grupo que concibió más tempranamente en comparación al resto de los grupos evaluados, podría estar reforzando la idea de que los macrófagos participarían activamente en etapas previas a la concepción a nivel endometrial. Sumado a esto, los niveles disminuidos de IL8, quimiocina implicada en la atracción de neutrófilos, encontrados a los 60 DPP en el mismo grupo, estaría en concordancia con este hecho (Quayle, 2002; Dadarwal *et al.*, 2017). Por otra parte, los niveles disminuidos de INF $\gamma$  encontrados a los 45 DPP en el grupo que concibió más tempranamente, podrían estar indicando una menor activación de los macrófagos presentes en endometrio. Esto implicaría que la preñez lograda con mayor celeridad se vea precisamente favorecida por dicha atenuación en la actividad de monocitos/macrófagos observada no sólo a nivel sistémico, como se ha discutido anteriormente, sino también a nivel endometrial. En relación a los niveles de expresión proteica de las citoquinas TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$  e IL1RII, que no variaron entre los grupos evaluados a los 45 ni a los 60 DPP, podríamos inferir que dicha expresión inalterada sea parte de un entorno endometrial equilibrado que los animales presentan en condiciones fisiológicas, tales

como las del muestreo realizado, sin interferir en el logro de la preñez temprana. Específicamente, para el caso de la IL1 $\alpha$  se sabe que se trata de una citoquina de expresión constitutiva en los epitelios (Garlanda *et al.*, 2013; Dinarello, 2018) lo que se ve reflejado en sus niveles estables para todos los grupos. Para el caso de IL1RII, podríamos sugerir que su expresión constante estaría denotando una ausencia de acción moduladora sobre IL1 $\beta$ , citoquina por la cual presenta gran afinidad (Boraschi y Tagliabue, 2013). Esto permitiría a su vez que, la activación del IL1RI por parte de dicho ligando agonista (IL1 $\beta$ ) sea efectiva y favorable, como ocurre en aquellos animales del grupo IPC<sub>90</sub>, para permitir el logro de la preñez con mayor celeridad. Este contexto a su vez, estaría en concordancia con los niveles disminuidos de IL1RA en dichos animales, tal como se discute a continuación.

Dentro de todas las citoquinas analizadas a nivel endometrial, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir del análisis de supervivencia, el equilibrio local dado específicamente por mayores niveles de IL1 $\beta$  y menores niveles de IL1RA a los 60 DPP, podrían ser cruciales para la concepción temprana. En bovinos se ha reportado que los animales que desarrollan metritis y endometritis luego del parto, presentan altos niveles de IL1 $\beta$  (Galvão *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2018). En efecto, el ambiente inflamatorio causado por enfermedades características de este período, sería una de las principales causas de disminución de los índices de fertilidad en el ganado lechero (Galvão *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2018). Sin embargo, la distinción entre la inflamación que forma parte del proceso de involución, y la inflamación patológica del endometrio bovino y su influencia en el desempeño reproductivo aún no se ha esclarecido completamente. En mujeres, se ha demostrado que los niveles de IL1 $\beta$  presentes en endometrio pueden comprometer la fertilidad (Jie Yua *et al.*, 2017). Reforzando esta teoría, hay estudios que demuestran que la expresión de IL1 $\beta$  en el endometrio de mujeres infértiles se encuentra alterado en comparación a lo observado en mujeres fértiles (Fitzgerald *et al.*, 2016). A pesar de que no existen estudios que demuestren la asociación entre la IL1 $\beta$  y la celeridad para la concepción en vacas lecheras, los experimentos *in vitro* demuestran que la IL1 $\beta$  podría alterar la producción de mediadores inflamatorios en las células estromales y epiteliales. Esto sugiere que un entorno uterino alterado podría influir en el rendimiento reproductivo de vacas lecheras (Koh *et al.*, 2018). Por lo tanto, y teniendo en cuenta nuestros hallazgos, la IL1 $\beta$  podría ser considerada un mediador local con un rol relevante en el logro de la preñez temprana en vacas de producción.

En relación a la IL1RA se sabe que, en bovinos, una alteración en los niveles de expresión podría contribuir a la anovulación y persistencia folicular (Stassi *et al.*, 2018). Sin embargo, no hay antecedentes en relación a la función de esta interleuquina a nivel endometrial y su posible asociación con parámetros reproductivos de vacas lecheras. En ratas, se ha visto que inyecciones

repetidas de IL1RA en animales preñados provocan que los blastocistos no se adhirieran al epitelio luminal con el consiguiente fracaso de la implantación (Simón *et al.*, 1998). De la misma manera, los cambios en los niveles de IL1RA en moco cervical de mujeres infértiles se han relacionado estrechamente con la infertilidad, pudiendo tener un rol potencial en la implantación (Bourdiec *et al.*, 2014). Por lo anteriormente expuesto, podríamos asumir que la expresión proteica de IL1 $\beta$  e IL1RA encontrada a nivel endometrial podría ser parte del mecanismo de respuesta inmune materno necesario para propiciar la concepción temprana y probablemente el mantenimiento de la preñez.

Finalmente, a partir del presente trabajo se ha podido determinar la presencia de macrófagos en endometrio más allá del período de transición y de la involución uterina, así como la expresión local de las citoquinas IL1 $\beta$  e IL1RA, los que conjuntamente podrían ser catalogados como componentes relevantes y posibles predictores a nivel uterino del éxito de la concepción y logro temprano de la preñez de vacas lecheras.

## 6. CONCLUSIONES

- A nivel sistémico, la CF disminuida de los monocitos/macrófagos, previo a la concepción, podría estar favoreciendo una concepción temprana. Si bien se ha encontrado que la disponibilidad de diferentes metabolitos y hormonas en diferentes puntos de la lactancia y la preñez modularían la funcionalidad de estas células, en el grupo de animales que alcanzaron la preñez más tempranamente no habría una asociación directa de la CF con el contexto metabólico/hormonal. Por el contrario, más allá de los 90 DPP, la combinación de factores hormonales y metabólicos podría estar modulando la funcionalidad de estas células y como consecuencia, afectar el desempeño reproductivo.

- A nivel endometrial, las citoquinas expresadas localmente previo a la liberación a servicio de los animales, podrían ser posibles predictores de un ambiente local favorable para el logro temprano de la preñez en vacas lecheras. Específicamente, el equilibrio dado entre las citoquinas IL1 $\beta$  e IL1RA, conjuntamente con la presencia de macrófagos encontrados a nivel local, podrían estar asociados con mayor celeridad para la concepción.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que la celeridad con la que logran preñarse las vacas lecheras podría estar estrechamente asociado con diferentes factores inmunológicos expresados tanto a nivel sistémico como a nivel endometrial, que propiciarían un contexto peri-implantatorio adecuado para la concepción y establecimiento de la preñez. Por lo tanto, estos estudios representan una nueva perspectiva sobre el desempeño reproductivo de vacas lecheras, teniendo en cuenta que las vacas con mayor producción de leche están sujetas a muchos trastornos que se atenúan con respuestas adaptativas efectivas. Estas adaptaciones implicarían variaciones en los índices inmunológicos, metabólicos y hormonales, que podrían verse reflejados a nivel sistémico o local, como los descriptos en este manuscrito.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agnew DW, Munson L, Cobo ER, Olesen D, Corbeil LB y BonDurant RH** (2008) Comparative histopathology and antibody responses of non-Trichostrongylus axei trichostrongylid and Trichostrongylus axei genital infections in virgin heifers. *Veterinary parasitology* **151** 170–180.
- Aleri JW, Hine BC, Pyman MF, Mansell PD, Wales WJ, Mallard B y Fisher AD** (2016) Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. *Research in Veterinary Science* **108** 8–17.
- Angeli E, Trionfini V, Gareis NC, Matiller V, Huber E, Rey F, Salvetti NR, Ortega HH y Hein GJ** (2019) Protein and gene expression of relevant enzymes and nuclear receptor of hepatic lipid metabolism in grazing dairy cattle during the transition period. *Research in Veterinary Science* **123** 223–231.
- Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP y Szekeres-Bartho J** (2007) Progesterone During Pregnancy: Endocrine-Immune Cross Talk in Mammalian Species and the Role of Stress. *American Journal of Reproductive Immunology* **58** 268–279.
- Arosh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J y Fortier MA** (2002) Expression of Cyclooxygenases 1 and 2 and Prostaglandin E Synthase in Bovine Endometrial Tissue During the Estrous Cycle. *Biology of Reproduction* **67** 161–169.
- Atkinson BA** (1984) Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biology of Reproduction* **30** 763–774.
- Azab ME y Abdel-Maksoud HA** (1999) Changes in some hematological and biochemical parameters during prepartum and postpartum periods in female Baladi goats. *Small Ruminant Research* **34** 77–85.
- Baravalle C, Dallard BE, Cadoche MC, Pereyra EAL, Neder VE, Ortega HH y Calvino 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.
- Beccaria C, Silvestrini P, Renna MS, Ortega HH, Calvino LF, Dallard BE y Baravalle C** (2018) *Panax ginseng* extract reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells but does not affect macrophages phagocytic activity. *Microbial Pathogenesis* **122** 63–72.
- Blazquez NB, Batten EH, Long SE y Perry GC** (1987) Histology and histochemistry of the bovine reproductive tract caudal to the cervix part I. The vestibule and associated glands. *British*

- Veterinary Journal* **143** 328–337.
- Bonnett BN, Miller RB, Martin SW, Etherington WG y Buckrell BC** (1991) Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. II. Correlations between histological criteria. *Canadian journal of veterinary research* **55** 162–167.
- Boraschi D y Tagliabue A** (2013) The interleukin-1 receptor family. *Semin Immunol* **25** 394–407
- Bourdiec A, Martel V y Akoum A** (2014) Synchronous regulation of the determinants of endometrial receptivity to interleukin 1 at key stages of early embryo implantation in vivo. *Fertility and Sterility* **101** 1183–1193.
- Brodzki P, Kostro K, Brodzki A y Lisiecka U** (2014) Determination of selected parameters for non-specific and specific immunity in cows with subclinical endometritis. *Animal Reproduction Science* **148** 109–114.
- Budras KD, Habel RE, Mülling CKW, Greenough PR, Jahrmärker G, Richter R y Starke D** (2011) *Bovine Anatomy. An Illustrated Text*. 2da Edición.
- Burton JL, Madsen SA, Chang LC, Weber PSD, Buckham KR, Van Dorp R, Hickey MC y Earley B** (2005) Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: A new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **105** 197–219.
- Butt BM, Besser TE, Senger PL y Widders PR** (1993) Specific antibody to *Haemophilus somnus* in the bovine uterus following intramuscular immunization. *Infection and immunity* **61** 2558–2562.
- Calder PC, Dimitriadis G y Newsholme P** (2007) Glucose metabolism in lymphoid and inflammatory cells and tissues. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **10** 531–540.
- Cattaneo L, Barberis FC, Stangaferro ML, Signorini Porchietto ML, Ruiz MF, Zimmermann R, Bo GA, Hein GJ y Ortega HH** (2013) Evaluación de indicadores metabólicos y bioquímicos sanguíneos en vacas en lactancia con Enfermedad Quística Ovárica. *InVet* **15** 7–15.
- Chandra S, Tripathi AK, Mishra S, Amzarul M y Vaish AK** (2012) Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion* **28** 144–146.
- Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee JF, Doherty ML, Callanan JJ y O’Farrelly C**

- (2010) Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology* **73** 988–994.
- Contreras GA, Strieder-Barboza C y De Koster J** (2018) Symposium review: Modulating adipose tissue lipolysis and remodeling to improve immune function during the transition period and early lactation of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **101** 2737–2752.
- Corbeil LB, Schurig GD, Duncan JR, Corbeil RR y Winter AJ** (1974) Immunoglobulin classes and biological functions of Campylobacter (Vibrio) fetus antibodies in serum and cervicovaginal mucus. *Infection and immunity* **10** 422–429.
- Corbeil LB, Munson L, Campero C y BonDurant RH** (2001) Bovine trichomoniasis as a model for development of vaccines against sexually-transmitted disease. *American journal of reproductive immunology* **45** 310–319.
- Corbeil LB, Campero CM, Rhyan JC, Anderson ML, Gershwin LJ, Agnew DW, Munson L y BonDurant RH** (2005) Uterine mast cells and immunoglobulin-E antibody responses during clearance of *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary pathology* **42** 282–290.
- Correia-Álvarez E, Gómez E, Martín D, Carrocera S, Pérez S, Otero J, Peynot N, Giraud-Delville C, Caamaño JN y Sandra O** (2015) Expression and localization of interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor (type I) in the bovine endometrium and embryo. *Journal of Reproductive Immunology* **110** 1–13.
- Cronin JG, Turner ML, Goetze L, Bryant CE y Sheldon IM** (2012) Toll-Like Receptor 4 and MYD88-Dependent Signaling Mechanisms of the Innate Immune System Are Essential for the Response to Lipopolysaccharide by Epithelial and Stromal Cells of the Bovine Endometrium1. *Biology of Reproduction* **86** 51.
- Crookenden MA, Heiser A, Murray A, Dukkipati VSR, Kay JK, Looor JJ, Meier S, Mitchell MD, Moyes KM y Walker CG** (2016) Parturition in dairy cows temporarily alters the expression of genes in circulating neutrophils. *Journal of Dairy Science* **99** 6470–6483.
- Cui L, Wang H, Ding Y, Li J y Li J** (2019) Changes in the blood routine, biochemical indexes and the pro-inflammatory cytokine expressions of peripheral leukocytes in postpartum dairy cows with metritis. *BMC Veterinary Research* **15** 157.
- Dadarwal D, Palmer C y Griebel P** (2017) Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract. *Theriogenology* **104** 62–71.
- Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White JO, Conlan RS, O’Farrelly C y Sheldon IM** (2008) Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine

- endometrium. *Reproductive biology and endocrinology* **6** 53.
- Dellmann HD** (1994) *Histología Veterinaria*. 2da Edición. Editorial ACRIBIA, S.A.
- Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J, Ellis WA y Baker JR** (1996) Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of heifers after experimental intrauterine inoculation with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Research in veterinary science* **60** 157–162.
- Díaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L y Ortega HH** (2015) Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology* **84** 1149–1160.
- Diskin MG, Parr MH y Morris DG** (2012) Embryo death in cattle: An update. *Reproduction, Fertility and Development* **24** 244–251.
- Drackley JK** (1999) Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *Journal of Dairy Science* **82** 2259–2273.
- Dyce KM** (1999) *Anatomía Veterinaria*. 2da Edición. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F.
- Eger M, Hussen J, Koy M, Dänicke S, Schuberth HJ y Breves G** (2016) Glucose transporter expression differs between bovine monocyte and macrophage subsets and is influenced by milk production. *Journal of Dairy Science* **99** 2276–2287.
- Eren U, Kum S, Bozkurt M y Gules O** (2010) MHC class II expression by mast cells in the genital tract of cows. *Veterinary research communications* **34** 405–411.
- Espinoza-Santillán D, Martínez-Juárez V, Peralta-Ortiz J, Molina-Mendoza P, OlaveLeyva J y Ávila-Castillo R** (2016) Bacterial study in uterus from slaughtered cows at the municipal slaughterhouse in Tulancingo, Hidalgo. *Abanico Veterinario*. **6** 22-28.
- Fahey JV, Schaefer TM, Channon JY y Wira CR** (2005) Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Human reproduction* **20** 1439-1446
- Fair T** (2015a) The Contribution of the Maternal Immune System to the Establishment of Pregnancy in Cattle. *Frontiers in Immunology* **6** 1–8.
- Fair T** (2015b) The contribution of the maternal immune system to the establishment of pregnancy in cattle. *Frontiers in Immunology* **6**.
- Fernández A y Dimoso ZJK** (1984) Estudio cualitativo y cuantitativo de la flora bacteriológica de

- las secreciones cervicouterinas de vacas clínicamente sanas. Facultad de Ciencia Animal. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara. Cuba.
- Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Chen R, Chavez SL, Romero R y Mor G** (2007) Trophoblast-Macrophage Interactions: a Regulatory Network for the Protection of Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* **57** 55–66.
- Fiorenza MF, Amaral S, Raquel A y Almeida D** (2021) Possible impact of neutrophils on immune responses during early pregnancy in ruminants. **18** 1–15.
- Fitzgerald HC, Salamonsen LA, Rombauts LJR, Vollenhoven BJ y Edgell TA** (2016) The proliferative phase underpins endometrial development: Altered cytokine profiles in uterine lavage fluid of women with idiopathic infertility. *Cytokine* **88** 12–19.
- Foley C, Chapwanya A, Creevey CJ, Narciandi F, Morris D, Kenny EM, Cormican P, Callanan JJ, O’Farrelly C y Meade KG** (2012) Global endometrial transcriptomic profiling: Transient immune activation precedes tissue proliferation and repair in healthy beef cows. *BMC Genomics* **13** 1–13.
- Forero E** (2004) Conceptos sobre Metritis Bovina, un problema poco considerado en la Ganadería Actual. *Asistente Dirección Científica Laboratorios PROVET S.A* 1–2.
- Fox A, Lee CS, Brandon MR y Meeusen ENT** (1998) Effects of pregnancy on lymphocytes within sheep uterine interplacentomal epithelium. *American journal of reproductive immunology* **40** 295–302.
- Gabler C, Fischer C, Drillich M, Einspanier R y Heuwieser W** (2010) Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reproductive biology and endocrinology* **8** 152.
- Galvão KN, Felipe MJB, Brittin SB, Sper R, Fraga M, Galvão JS, Caixeta L, Guard CL, Ricci A y Gilbert RO** (2012) Evaluation of cytokine expression by blood monocytes of lactating Holstein cows with or without postpartum uterine disease. *Theriogenology* **77** 356–372.
- Garlanda C, Dinarello CA y Mantovani A** (2013) The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* **39** 1003-1018.
- Gartner LP y Hiatt JL** Texto atlas de histología. 2era edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Ghasemi F, Gonzalez-Cano P, Griebel PJ y Palmer C** (2012) Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology* **78** 1538–1547.

- Gilbert RO** (2019) Symposium review: Mechanisms of disruption of fertility by infectious diseases of the reproductive tract. *Journal of Dairy Science* **102** 3754–3765.
- Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN y Arenas-Hernandez M** (2014) Immune cells in term and preterm labor. *Cellular & molecular immunology* **11** 571–581.
- Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I y Shpigel NY** (2008)  $\beta$ -hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **76** 2802–2807.
- Grummer RR** (1995) Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of animal science* **73** 2820–2833.
- Grummer RR, Mashek DG y Hayirli A** (2004) Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* **20** 447–470.
- Guzman E, Hope J, Taylor G, Smith AL, Cubillos-Zapata C y Charleston B** (2014) Bovine  $\gamma\delta$  T cells are a major regulatory T cell subset. *Journal of immunology* **193** 208–222.
- Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP y Walters JL** (2006) Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **113** 21–29.
- Hansen PJ** (2013) Physiology and endocrinology symposium: Maternal immunological adjustments to pregnancy and parturition in ruminants and possible implications for postpartum uterine health: Is there a prepartum–postpartum nexus?. *Journal of Animal Science* **91** 1639–1649.
- Hashimoto D, Miller J y Merad M** (2011) Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* **35** 323–335.
- Healy LL, Cronin JG y Sheldon IM** (2015) Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Scientific Reports* **4** 7060.
- Heiser A, McCarthy A, Wedlock N, Meier S, Kay J, Walker C, Crookenden MA, Mitchell MD, Morgan S y Watkins K** (2015) Grazing dairy cows had decreased interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor, and interleukin-17, and increased expression of interleukin-10 during the first week after calving. *Journal of Dairy Science* **98** 937–946.
- Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE y Sheldon IM** (2009) Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F<sub>2</sub>alpha to prostaglandin E<sub>2</sub> in bovine endometrium. *Endocrinology* **150** 1912–1920.

- Hoedemaker M, Lund LA y Wagner WC** (1992) Influence of arachidonic acid metabolites and steroids on function of bovine polymorphonuclear neutrophils. *American journal of veterinary research* **53** 1534–1539.
- Hopper RM** (2014) *Bovine Reproduction*. 1era Edición. Editorial Wiley.
- Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N y Jones SA** (2001) IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* **14** 705–714.
- Hussain AM, Daniel RCW y O'Boyle D** (1990) Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology* **34** 291–302.
- Ibrahim M, Peter S, Gärtner MA, Michel G, Jung M, Einspanier R y Gabler C** (2016) Increased mRNA expression of selected antimicrobial peptides around ovulation and during inflammatory processes in the bovine endometrium postpartum. *Theriogenology* **86** 2040–2053.
- Imakawa K, Nagaoka K, Nojima H, Hara Y y Christenson RK** (2005) Changes in immune cell distribution and IL-10 production are regulated through endometrial IP-10 expression in the goat uterus. *American Journal of Reproductive Immunology* **53** 54–64.
- Ingvartsen KL y Moyes KM** (2015) Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. *Japanese Journal of Veterinary Research* **63** S15–S24.
- Ingvartsen KL y Moyes K** (2013) Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal* **7** 112–122.
- Iriadam M** (2007) Variation in certain hematological and biochemical parameters during the peripartum period in Kilis does. *Small Ruminant Research* **73** 54–57.
- Islam R, Kumar H y Krishnan BB** (2014) Investigation on leukocyte profile of periparturient cows with or without postpartum reproductive disease. *Asian Pacific Journal of Reproduction* **3** 57–63.
- Jain NC** (1993) *Essentials of Veterinary Hematology*. 1er Edición. Editorial Lea & Febiger.
- Janeway CA** (2001) How the immune system protects the host from infection. *Microbes and Infection* **3** 1167–1171.
- Jena MK, Nayak N, Chen K y Nayak NR** (2019) Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **67** 295–309.

- Jones ML y Allison RW (2007) Evaluation of the Ruminant Complete Blood Cell Count. *Vet Clin Food Anim* **23** 377–402.
- Kamat MM, Vasudevan S, Maalouf SA, Townson DH, Pate JL y Ott TL (2016) Changes in myeloid lineage cells in the uterus and peripheral blood of dairy heifers during early pregnancy. *Biology of Reproduction* **95** 1–12.
- Kim IH, Na KJ y Yang MP (2005) Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. *Journal of Reproduction and Development* **51** 757–764.
- Koh YQ, Mitchell MD, Almughlliq FB, Vaswani K y Peiris HN (2018) Regulation of inflammatory mediator expression in bovine endometrial cells: effects of lipopolysaccharide, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. *Physiological Reports* **6** 1–13.
- Kojima Y y Selander U (1970a) Fine structure of bovine surface endometrial cells in the estrous and luteal phases. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* **104** 557–571.
- Kojima Y y Selander U (1970b) Cyclical changes in the fine structure of bovine endometrial gland cells. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* **104** 69–86.
- Kolls JK, McCray PB y Chan YR (2008) Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nature Reviews Immunology* **8** 829–835.
- Kvidera SK, Horst EA, Abuajamieh M, Mayorga EJ, Fernandez MVS y Baumgard LH (2017) Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **100** 2360–2374.
- Lamote I, Meyer E, Duchateau L y Burvenich C (2004) Influence of 17 $\beta$ -estradiol, progesterone, and dexamethasone on diapedesis and viability of bovine blood polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Dairy Science* **87** 3340–3349.
- Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, Duchateau L y Burvenich C (2006) Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* **65** 1082–1098.
- Lampé R, Kövér Á, Szucs S, Pál L, Árnys E, Ádány R y Póka R (2015) Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology* **107** 26–30.
- Leblanc S (2010) Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of*

- Reproduction and Development*. *J. Reprod. Dev* **56** 29–35.
- LeBlanc S** (2012) Interactions of Metabolism, Inflammation, and Reproductive Tract Health in the Postpartum Period in Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals* **47** 18–30.
- Leno-Durán E, Muñoz-Fernández R, García Olivares E y Tirado-González I** (2014) Liaison between natural killer cells and dendritic cells in human gestation. *Cellular & molecular immunology* **11** 449–455.
- Lewis GS** (2003) Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reproductive biology and endocrinology* **1** 117.
- Liew FY, Girard JP y Turnquist HR** (2016) Interleukin-33 in health and disease. *Nature reviews. Immunology* **16** 676–689.
- Mackintosh SB, Schuberth HJ, Healy LL y Sheldon IM** (2013) Polarised bovine endometrial epithelial cells vectorially secrete prostaglandins and chemotactic factors under physiological and pathological conditions. *Reproduction* **145** 57–72.
- Mann S, Sipka AS y Grenier JK** (2019) The degree of postpartum metabolic challenge in dairy cows is associated with peripheral blood mononuclear cell transcriptome changes of the innate immune system. *Developmental and Comparative Immunology* **93** 28–36.
- Mansouri-Attia N, Oliveira LJ, Forde N, Fahey AG, Browne JA, Roche JF, Sandra O, Reinaud P, Lonergan P y Fair T** (2012) Pivotal Role for Monocytes/Macrophages and Dendritic Cells in Maternal Immune Response to the Developing Embryo in Cattle. *Biology of Reproduction* **87** 1–12.
- Mateus L, da Costa LL, Carvalho H, Serra P y Robalo Silva J** (2002) Blood and Intrauterine Leukocyte Profile and Function in Dairy Cows that Spontaneously Recovered from Postpartum Endometritis. *Reproduction in Domestic Animals* **37** 176–180.
- McIntire RH, Ganacias KG y Hunt JS** (2008) Programming of human monocytes by the uteroplacental environment. *Reproductive Sciences* **15** 437–447.
- Medzhitov R** (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454** 428–435.
- Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Yeung MMW, Hammarstrom S y Hammarstrom ML** (1995) Immunomorphologic studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **371** 367–371.
- Mokhtar D** (2015) Microscopic and histochemical characterization of the bovine uterine tube during the follicular and luteal phases of estrous cycle. *Journal of microscopy and*

*ultrastructure* **3** 44.

- De Moraes AAS, Paula-Lopes FF, Chegini N y Hansen PJ** (1999) Localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the bovine reproductive tract. *Journal of reproductive immunology* **42** 135–145.
- Mulira GL y Saunders JR** (1994) Immune response of heifers to vaginal submucosal or subcutaneous vaccination and intravaginal challenge with *Ureaplasma diversum*. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **58** 109–113.
- Mulligan FJ y Doherty ML** (2008) Production diseases of the transition cow. *Veterinary journal* **176** 3–9.
- Mullins KJ** (2003) Illustrated Anatomy of the Bovine Male and Female Reproductive Tracts. 1era Edición. Editorial Natl Assn of Animal Breeders.
- Ndiaye K, Poole DH, Walusimbi S, Cannon MJ, Toyokawa K, Maalouf SW, Dong J, Thomas P y Pate JL** (2012) Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors. *Journal of Reproductive Immunology* **95** 15–26.
- Nguyen P V, Kafka JK, Ferreira VH, Roth K y Kaushic C** (2014) Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. *Cellular and Molecular Immunology* **11** 410–427.
- Núñez Ochoa L y Bouda J** (2007) Patología Clínica Veterinaria. 2da Edición. Editorial: Comité Editorial de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de México.
- Oliveira LJ y Hansen PJ** (2008) Deviations in populations of peripheral blood mononuclear cells and endometrial macrophages in the cow during pregnancy. *Reproduction* **136** 481–490.
- Oliveira LJ, McClellan S y Hansen PJ** (2010) Differentiation of the Endometrial Macrophage during Pregnancy in the Cow. *PLoS ONE* **5** e13213.
- Oliveira LJ, Mansourri-attia N, Fahey AG, Browne J, Forde N, James F, Lonergan P y Fair T** (2013) Characterization of the Th Profile of the Bovine Endometrium during the Oestrous Cycle and Early Pregnancy. **8** 1–13.
- Ortega HH, Lorente JA, Mira GA, Baravalle C y 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, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG y 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.
- Ospina PA, Nydam D V, Stokol T y Overton TR** (2010) Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal of Dairy Science* **93** 3595–3601.
- Ott TL** (2019) Symposium review: Immunological detection of the bovine conceptus during early pregnancy. *Journal of Dairy Science* **102** 3766–3777.
- Ott TL** (2020) Immunological detection of pregnancy: Evidence for systemic immune modulation during early pregnancy in ruminants. *Theriogenology* **150** 498–503.
- Ott TL y Gifford CA** (2010) Effects of early conceptus signals on circulating immune cells: Lessons from domestic ruminants. *American Journal of Reproductive Immunology* **64** 245–254.
- Padua MB y Hansen PJ** (2010) Evolution and function of the uterine serpins (SERPINA14). *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* **64** 265–274.
- Palsson-McDermott EM y O'Neill LAJ** (2013) The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. *BioEssays* **35** 965–973.
- Peralta MB, Cainelli S, Stassi AF, Angeli E, Renna MS, Signorini ML, Gareis NC, Durante L, Rey F y Ortega HH** (2021) Association between phagocytic activity of monocytes and days to conception after parturition in dairy cows when considering the hormonal and metabolic milieu. *Animal Reproduction Science* **232** 106818.
- 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.
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29** E45.
- Pinedo PJ, Galvão KN y Seabury CM** (2013) Innate immune gene variation and differential susceptibility to uterine diseases in Holstein cows. *Theriogenology* **80** 384–390.
- Pithon-Curi TC, De Melo MP y Curi R** (2004) Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: A comparative study. *Cell Biochemistry and Function* **22** 321–326.
- Pomeroy B, Sipka A, Klaessig S y Schukken Y** (2016) Longitudinal characterization of bovine monocyte-derived dendritic cells from mid-gestation into subsequent lactation reveals

- nadir in phenotypic maturation and macrophage-like cytokine profile in late gestation. *Journal of Reproductive Immunology* **118** 1–8.
- Preisler MT, Weber PSD, Tempelman RJ, Erskine RJ, Hunt H y Burton JL** (2000a) Glucocorticoid receptor expression profiles in mononuclear leukocytes of periparturient Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **83** 38–47.
- Preisler MT, Weber PSD, Tempelman RJ, Erskine RJ, Hunt H y Burton JL** (2000b) Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient cows. *American Journal of Veterinary Research* **61** 14–19.
- Quayle AJ** (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J. Reproduction Immunology* **57** 61–79.
- Recce S** (2013) Utilización del metricheck™ para el diagnóstico de las endometritis en bovinos lecheros. Tesis de maestría en Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Rodríguez FM, Salvetti NR, Panzani CG, Barbeito CG, Ortega HH y Rey F** (2011) Influence of insulin-like growth factor-binding proteins-2 and -3 in the pathogenesis of cystic ovarian disease in cattle. *Animal Reproduction Science* **128** 1–10.
- Salvetti NR, Gimeno EJ, Lorente JA y Ortega HH** (2004) Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs* **178** 117–125.
- Salvetti NR, Alfaro NS, Velázquez MML, Amweg AN, Matiller V, Díaz PU y 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.
- Sánchez JM, Simintiras CA y Lonergan P** (2019) Aspects of embryo-maternal communication in establishment of pregnancy in cattle. *Animal Reproduction* **16** 376.
- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ y Wiltbank MC** (2002) Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* **85** 2803–2812.
- Schumacher A, Sharkey DJ, Robertson SA y Zenclussen AC** (2018) Immune cells at the fetomaternal interface: how the microenvironment modulates immune cells to foster fetal development. *The Journal of Immunology* **201** 325–334.
- Seals RC, Matamoros I y Lewis GS** (2002) Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-PGF 2 $\alpha$  concentrations in Holstein cows and their susceptibility to

- endometritis. *Journal of Animal Science* **80** 1068–1073.
- Segerson EC y Gunsett FC** (1993) Interference with the Cytolytic Activity of Interleukin-2-Treated Lymphocytes by Bovine Uterine Luminal Protein. *Biology of Reproduction* **48** 1036–1041.
- Sens A y Heuwieser W** (2013) Presence of *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*,  $\alpha$ -hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometritis. *Journal of dairy science* **96** 6347–6354.
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G y Schuberth H-J** (2009) Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction* **81** 1025–1032.
- Da Silva FM, Burvenich C, Leën AMM y Brossé L** (1998) Assessment of blood neutrophil oxidative burst activity in dairy cows during the period of parturition. *Animal Science* **67** 421–426.
- Simón C, Valbuena D, Krüssel J, Bernal A, Murphy CR, Shaw T, Pellicer A y Polan ML** (1998) Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertility and Sterility* **70** 896–906.
- Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J y 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 G y Grossman JD** (1982) Anatomía de los animales domésticos. 5ta edición. Tomo I. Editorial Masson.
- Skopets B, Li J, Thatcher WW, Roberts RM y Hansen PJ** (1992) Inhibition of lymphocyte proliferation by bovine trophoblast protein-1 (Type I trophoblast interferon) and bovine interferon- $\alpha$ 1. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **34** 81–96.
- Slama H, Vaillancourt D y Goff AK** (1991) Pathophysiology of the puerperal period: Relationship between prostaglandin E2 (PGE2) and uterine involution in the cow. *Theriogenology* **36** 1071–1090.
- Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Forcada F, Martin GB, Palacín I y Meikle A** (2009) Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domestic Animal Endocrinology* **36** 13–23.
- Stassi AF, Baravalle ME, Belotti EM, Amweg AN, Angeli E, Velázquez MML, Rey F, Salvetti NR y Ortega HH** (2018) Altered expression of IL-1 $\beta$  IL-1RI, IL-1RII, IL-1RA and IL-4 could contribute

- to anovulation and follicular persistence in cattle. *Theriogenology* **110** 61–73.
- Stephen CP, Johnson WH, Leblanc SJ, Foster RA y Chenier TS** (2019) The impact of ecbolic therapy in the early postpartum period on uterine involution and reproductive health in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* **81** 491–498.
- Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A y Heuwieser W** (2013) Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of Dairy Science* **96** 2925–2938.
- Swangchan-Uthai T, Lavender CRM, Cheng Z, Fouladi-Nashta AA y Wathes DC** (2012) Time Course of Defense Mechanisms in Bovine Endometrium in Response to Lipopolysaccharide. *Biology of Reproduction* **87** 1–13.
- Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T y Szereday L** (2001) Progesterone as an immunomodulatory molecule. *International Immunopharmacology* **1** 1037–1048.
- Tekin S y Hansen PJ** (2004) Regulation of Numbers of Macrophages in the Endometrium of the Sheep by Systemic Effects of Pregnancy, Local Presence of the Conceptus, and Progesterone. *American Journal of Reproductive Immunology* **51** 56–62.
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z y Miniati A** (2012) Mast cells and inflammation. *Biochimica et biophysica acta* **1822** 21–33.
- Tuo W y Ott TL BF** (1993) Natural Killer Cell Activity of Lymphocytes Exposed to Ovine, Type I, Trophoblast Interferon. *American Journal of Reproductive Immunology* **29** 26–34.
- Turner ML, Cronin JG, Healey GD y Sheldon IM** (2014) Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1, and TLR6. *Endocrinology* **155** 1453–1465.
- Vailati-Riboni M, Kanwal M, Bulgari O, Meier S, Priest NV, Burke CR, Kay JK, McDougall S, Mitchell MD y Walker CG** (2016) Body condition score and plane of nutrition prepartum affect adipose tissue transcriptome regulators of metabolism and inflammation in grazing dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science* **99** 758–770.
- Velazquez MML, Alfaro NS, Dupuy CRF, Salvetti NR, Rey F y Ortega HH** (2010) Heat shock protein patterns in the bovine ovary and relation with cystic ovarian disease. *Animal Reproduction Science* **118** 201–209.

- Velázquez MML, Peralta MB, Angeli E, Stassi AF, Gareis NC, Durante L, Cainelli S, Salvetti NR, Rey F y Ortega HH (2019) Immune status during postpartum, peri-implantation and early pregnancy in cattle: An updated view. *Animal Reproduction Science* **206** 1–10.
- Wagener K, Grunert T, Prunner I, Ehling-Schulz M y Drillich M (2014) Dynamics of uterine infections with *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in postpartum dairy cows and their association with clinical endometritis. *Veterinary journal* **202** 527–532.
- Wagner WC, Saatman R y Hansel W (1969) Reproductive physiology of the post partum cow. II. Pituitary, adrenal and thyroid function. *Journal of Reproduction and Fertility* **18** 501–508.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Roberts AB y Sporn MB (1987) Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84** 5788–5792.
- Walker CG, Meier S, Littlejohn MD, Lehnert K, Roche JR y Mitchell MD (2010) Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. *BMC Genomics* **11** 474.
- Wang GQ, Hou JL, Huang HY y Yuan CW (2016) Role of mast cells in cow metritis. *Journal of Veterinary Research (Poland)* **60** 177–180.
- Watson ED, Diehl NK y Evans JF (1990) Antibody response in the bovine genital tract to intrauterine infusion of *Actinomyces pyogenes*. *Research in veterinary science* **48** 70–75.
- Weber PSD, Madsen-Bouterse SA, Rosa GJM, Sipkovsky S, Ren X, Almeida PE, Kruska R, Halgren RG, Barrick JL y Burton JL (2006) Analysis of the bovine neutrophil transcriptome during glucocorticoid treatment. *Physiological Genomics* **28** 97–112.
- Welsch U (2014) Sobotta. Histología. Con La Colaboración De Thomas Deller. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana.
- Werner A, Suthar V, Plöntzke J y Heuwieser W (2012) Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *Journal of Dairy Science* **95** 7105–7114.
- Wiebold JL (1988) Embryonic mortality and the uterine environment in first-service lactating dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* **84** 393–399.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE, Dobson H y Sheldon IM (2005) Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the

immune response in cattle. *Theriogenology* **63** 102–117.

**Wolf E, Arnold GJ, Bauersachs S, Beier HM, Blum H, Einspanier R, Fröhlich T, Herrler A, Hiendleder S y Kölle S** (2003) Embryo-maternal communication in bovine - Strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reproduction in Domestic Animals* **38** 276–289.

**Wonfor RE, Creevey CJ, Natoli M, Hegarty M, Nash DM y Rose MT** (2020) Interaction of preimplantation factor with the global bovine endometrial transcriptome. *PLoS ONE* **15** 1–21.

**Woods A** (1994) Laboratory histopathology : a complete reference. Editorial Churchill Livingstone.

**Yu J, Berga SL, Zou W y Taylor RN** (2019) Interleukin-1 $\beta$  inhibits estrogen receptor- $\alpha$ , progesterone receptors A and B and biomarkers of human endometrial stromal cell differentiation: implications for endometriosis. *Molecular Human Reproduction* **25** 625–637.

**Zhang J, Chen Z, Smith GN y Croy BA** (2011) Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cellular & molecular immunology* **8** 1–11.

## 8. ANEXO

## 8.1. Publicaciones en relación con la tesis.

**Peralta MB**, Cainelli S, Stassi AF, Angeli E, Rey F, Ortega HH, Salvetti NR, Velázquez MML (2022) The endometrial expression of IL-1 family: their involvement in delayed conception of dairy cows. En revisión.

**Peralta MB**, Cainelli S, Stassi AF, Angeli E, Renna MS, Signorini ML, Gareis NC, Durante L, Rey F, Ortega HH, Salvetti NR, Velázquez MML (2021) *Association between phagocytic activity of monocytes and days to conception after parturition in dairy cows when considering the hormonal and metabolic milieu. Animal Reproduction Science* **232** 1–10. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106818

## 8.2. Otras publicaciones.

Berengeno AL, Matiller V, Díaz PU, Rebelindo E, Rodríguez MF, Amweg AN, Silvestrini P, Cattaneo ML, **Peralta MB**, Durante LI, Notaro US, Cainelli S, Taborda P, Stalder V, Etchevers L, Rey F, Salvetti NR, Ortega HH (2021) Generación de una colonia de ratones transgénicos homocigotas K18-hACE2 para la evaluación de candidatos vacunales y terapéuticos contra el SARS-CoV-2. *Revista FAVE*. En prensa.

Barcarolo D, Addona SM, Angeli E, **Peralta MB**, Ortega HH, Hein GJ (2021) Desarrollo y validación de metodología analítica para cuantificar tulatromicina en tejidos bovinos y porcinos por cromatografía líquida de alta performance en tandem con ionización por electrospray y detección por espectrometría de masas/masas (LC ESI MS/MS). *Revista InVet*. En revisión.

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. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.05.010

**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. *Journal of Comparative Pathology*. **156** 191-201. DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.10.012