



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

El desarrollo de placentitis induce en las yeguas gestantes la secreción de la citocina proinflamatoria IL-1 β y la actividad de las metaloproteinasas de matriz extracelular de tipo -2 y -9.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
María Margarita Morales Vázquez

Héctor Flores Herrera
DEPARTAMENTO DE INMUNOBIOQUÍMICA, INPER

Ana Myriam Boeta Acosta
DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, FMVZ UNAM

Rogelio Alonso Morales
LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR, FMVZ UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Maestría en Ciencias de la Producción y de la
Salud Animal

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**El desarrollo de placentitis induce en las yeguas gestantes la secreción de la
citocina proinflamatoria IL-1 β y la actividad de las metaloproteinasas de
matriz extracelular de tipo -2 y -9.**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MARGARITA MORALES VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

Héctor Flores Herrera

Departamento de Inmunobioquímica, INPER

COMITÉ TUTOR

Ana Myriam Boeta Acosta
Departamento de reproducción animal.
FMVZ-UNAM

Rogelio Alonso Morales
Laboratorio de genética molecular.
FMVZ-UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México 2022

Dedicatorias.

Para las personas que trabajan todos los días en alcanzar sus sueños sin importar que tan difíciles o probables sean, si el día es bueno o malo o si nadie cree en ustedes. Muchas gracias por su valentía.

Para todas las personas que bajo un impulso de curiosidad y a pesar de la incertidumbre, dedican sus vidas a descubrir los secretos de la naturaleza, a entender la vida y la enfermedad, y a mantener este planeta con un poco más de tiempo vital. El conocimiento y educación forma un país, así que ustedes son la base de las generaciones futuras y el buen porvenir. Muchas gracias por su trabajo.

Agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT). Agradezco la beca que recibí durante los dos años de estudio del posgrado. Sin la ayuda, el realizar este proyecto hubiera sido muy difícil.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), así como al posgrado de Ciencias de la Producción y Salud Animal. Muchas gracias por estar presente y escucharme en momentos donde prevalecían las dudas.

A la MMVZ Europa Meza Serrano quien me proporcionó las muestras biológicas utilizadas en este proyecto, además de su apoyo en todo momento.

Al Instituto Nacional de Perinatología. Agradezco el permitirme ingresar a sus laboratorios, remarcando la importancia del equipo y de la cooperación entre instituciones como eje fundamental de la investigación en México.

A la doctora Ana Rodríguez Cortés quien me apoyó en la realización del ELISA. Le agradezco todos los conocimientos, consejos y experiencia que me brindó.

A la doctora Myriam Boeta Acosta y al doctor Rogelio Alonso Morales, por su tiempo y guía durante estos dos años.

Y finalmente **al doctor Héctor Flores Herrera.** Gracias por confiar en mí y permitirme ser parte de este proyecto.

RESUMEN.

La placentitis equina es una condición caracterizada por un proceso de infección e inflamación de la placenta. El desarrollo experimental de la placentitis equina ha hecho posible evaluar diferentes marcadores asociados con la respuesta inflamatoria y la contracción uterina, sin embargo, hasta el momento, no existen reportes que describan el perfil espacio temporal de estos marcadores en el transcurso de la gestación en yeguas. Los principales objetivos del presente estudio fueron: 1) cuantificar a los 240 y 320 días de gestación la concentración de IL-1 β y la actividad de la *proMMP-2* y *proMMP-9* en el suero de yeguas sanas y en yeguas con diagnóstico de placentitis. 2) determinar la asociación de estos marcadores con el desarrollo de la placentitis y con el bienestar del potro. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de 16 yeguas gestantes de raza Pura Sangre Inglesa bajo las siguientes categorías: 1) yeguas sanas con una gestación a término; 2) yeguas con datos sugestivos de placentitis y 3) yeguas con datos evidentes de placentitis según monitoreo ultrasonográfico. En todos los casos, la salud del potro fue evaluada. La cuantificación de la eIL-1 β se realizó mediante el ensayo de ELISA. La actividad de la *proMMP-2* y de la *proMMP-9* fue determinada por Zimografía. Nuestros resultados indican que: 1) en el plasma del grupo control, es decir, en yeguas clínicamente sanas, la concentración de eIL-1 β incrementa significativamente 16.6 veces del día 240 al 320 de gestación; mientras que, *proMMP-2* y *proMMP-9* disminuyen con respecto al grupo control; 2) en yeguas con signos sugestivos o evidentes de placentitis, la concentración de eIL-1 β y la actividad de *proMMP-9* y *proMMP-2* se incrementa en asociación con la mortalidad del potro. Estos resultados en su conjunto sugieren que eIL-1 β , *proMMP-2* y *proMMP-9* pueden ser utilizados como marcadores de daño en el binomio yegua-potro.

Palabras clave: Placentitis equina, metaloproteinasas de matriz extracelular, gestación en las yeguas, citocinas inflamatorias.

ABSTRACT

Equine placentitis is a condition characterized by infection and inflammation of the placental. The experimental development of equine placentitis has made it possible to evaluate different markers associated with the inflammatory response, uterine and myometrial contraction; however, there are no reports that describe the spatio-temporal profile of these markers in mares during their gestation. The purpose of this study was to quantify the concentration of eIL-1 β and determine the activity of *proMMP-2* and *proMMP-9* in serum of equine placentitis at 240 and 320 days of gestation and establish whether equine placentitis are associated with changes in the profile secretion of these markers. The blood samples were obtained from sixteen English Thoroughbred pregnant mares obtained from 1) healthy mares with full term gestation; 2) mares with data suggestive of placentitis; and 3) mares with evident data of placentitis. In all cases the health of the foal was considered. The quantification of eIL-1 β was carried out by the ELISA assay, and gelatin zymography was performed for evaluation of *proMMP-2* and *proMMP-9* activity. Our results indicate that 1) in the plasma of healthy pregnant mares, the concentration of eIL-1 β increased significantly 16.5-fold from day 240 to day 320 of gestation, meanwhile *proMMP-2* and *proMMP-9* slightly decreased; 2) in mares with signs suggestive or evident of placentitis, the concentration of eIL-1 β and the activity of *proMMP-9* and *proMMP-2* were increased and were associated with the mortality of the foal. These observations suggest that these markers can be used as indicators of damage in the mare-foal relationship.

Keywords: Equine placentitis; extracellular matrix metalloproteinases; pregnant mares; inflammatory cytokine

Contenido

1.0 INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
2.0 ANTECEDENTES.....	- 3 -
2.1 Desarrollo de la placenta equina.....	- 3 -
2.2 Etiología de la placentitis.....	- 7 -
2.3 La infección intrauterina induce la secreción de las citocinas proinflamatorias y la expresión de las metaloproteasas de matriz extracelular.	- 8 -
2.4 Interleucina 1 beta (IL-1 β).....	- 10 -
2.4.1 Receptor de IL-1 β	- 13 -
2.4.2 Inhibidores endógenos de la IL-1.	- 14 -
2.5 Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP).	- 16 -
2.5.1 Clasificación de las MMPs.	- 18 -
2.5.2 Estructura general de las MMPs.....	- 19 -
2.5.2.1 Dominios.	- 20 -
2.5.2.2 Activación de las MMPs por disrupción del Switch de cisteína.	- 23 -
2.5.2.3 Acción proteolítica de las MMPs.....	- 24 -
2.5.2.4 Moléculas reguladoras de las MMPs. Los TIMPs.....	- 25 -
2.5.2.5 Gelatinasas MMP-2 y MMP-9.....	- 27 -
3.0 JUSTIFICACIÓN	- 29 -
4.0 HIPÓTESIS.....	- 32 -
5.0 OBJETIVO GENERAL.....	- 32 -
5.1 Objetivos particulares.....	- 32 -
6.0 MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 33 -
6.1 Yeguas de estudio.	- 33 -
6.2 Características del estudio.	- 33 -
6.2.1 Criterios de inclusión.....	- 33 -
6.2.2 Criterios de exclusión.....	- 36 -
6.2.3 Criterios de eliminación.....	- 36 -
6.3 Obtención y procesamiento del suero.....	- 36 -

6.4 Cuantificación de la eIL-1 β	- 36 -
6.5 Actividad de la MMP-2 y MMP-9.....	- 38 -
6.6 Análisis estadístico.....	- 39 -
7.0 RESULTADOS.....	- 40 -
7.1 Características de las yeguas de estudio.....	- 40 -
7.2 Cuantificación de la eIL-1 β	42
7.2.1 Cuantificación de eIL-1 β a los 240 días de gestación.....	42
7.2.2 Cuantificación de la eIL-1 β a los 320 días de gestación.....	42
7.3 Actividad de la proMMP-2 a los 240 y 320 días de gestación.....	44
7.3.1 Actividad de la proMMP-2 a los 240 días de gestación.....	44
7.3.2 Actividad de la proMMP-2 a los 320 días de gestación.....	45
7.4 Actividad de la proMMP-9 a los 240 y 320 días de gestación.....	47
7.4.1 Actividad de la proMMP-9 a los 240 días de gestación.....	47
7.4.2 Actividad de la actMMP-9 a los 240 días de gestación.....	49
7.4.3 Actividad de la proMMP-9 a los 320 días de gestación.....	49
7.4.4 Actividad de la actMMP-9 a los 320 días de gestación.....	50
8.0 DISCUSIÓN.....	51
8.1 Principales resultados en nuestro estudio.....	51
8.1.1 Yeguas sanas.....	51
8.1.2 Yeguas evidentes y sugerentes de placentitis.....	53
8.1.3 Interacción entre las yeguas con placentitis y potro séptico o muerto.....	55
8.1.4 Relación entre las yeguas con placentitis y potros sanos.....	57
9.0 CONCLUSIONES.....	60
10.0 REFERENCIAS.....	61
11.0 ANEXOS.....	68
11.1 Preparación de las soluciones para la cuantificación de eIL-1 β	68
11.2 Protocolo del ELISA para la cuantificación de eIL-1 β	69
11.3 Preparación de las soluciones y equipo requerido para la realización de la Zimografía.....	73
11.4 Protocolo para la Zimografía.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Clasificación de las MMPs y sustratos que degradan.....	- 16 -
CUADRO 2. Clasificación de las MMPs de acuerdo con su estructura.....	- 19 -
CUADRO 3. Asignación de las yeguas por el ultrasonido.....	- 36 -
CUADRO 4. Características de las yeguas en relación con la viabilidad de los potros.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Localización del cinturón coriónico	- 4 -
FIGURA 2. Formación de las copas endometriales	- 4 -
FIGURA 3. Microcotiledón de la placenta equina.....	- 6 -
FIGURA 4. Areolas.....	- 6 -
FIGURA 5. Estructura de la IL-1 β	- 11 -
FIGURA 6. Vías de activación de la IL-1 β	- 12 -
FIGURA 7. Estructura y señalización del receptor para IL-1 β	- 14 -
FIGURA 8. Antagonistas de la IL-1 β	- 15 -
FIGURA 9. Proteínas adaptadoras o en asociación con las MMPs solubles.....	- 18 -
FIGURA 10. Dominios de las MMPs	- 20 -
FIGURA 11. Switch de cisteína.....	- 22 -
FIGURA 12. Giro de metionina en el dominio catalítico de MMP-1	- 22 -
FIGURA 13. Producción y activación de las MMPs.....	- 23 -
FIGURA 14. Interacción de las MMPs con su sustrato.....	- 25 -
FIGURA 15. TIMP. Interacción con la MMP	- 27 -
FIGURA 16. Activación de la MMP-2	- 28 -
FIGURA 17. Esquema tipo árbol de decisiones para clasificar a las yeguas en los grupos evidente y sugerente de placentitis	- 35 -
FIGURA 18. Comparación de eIL-1 β en el suero de las yeguas a los 240 días de gestación	43
FIGURA 19. Comparación de eIL-1 β en el suero de las yeguas a los 320 días de gestación	44
FIGURA 20. Actividad de la proMMP-2 en el suero de las yeguas a los 240 y 320 días de gestación	46
FIGURA 21. Actividad de la proMMP-9 y actMMP-9 en el suero de las yeguas a los 240 y 320 días de gestación	48
FIGURA 22. Participación de las células inflamatorias durante el parto en la yegua.....	53
FIGURA 23. Participación de eIL-1 β , MMP-2 y MMP-9 durante la placentitis equina.....	57
FIGURA 24. Participación del potro clínicamente sano durante la placentitis	59

1.0 INTRODUCCIÓN.

El término placentitis hace referencia a la presentación y desarrollo de inflamación en la placenta (Loux y Ball 2018). En equinos, la placentitis afecta aproximadamente hasta el 10% de las yeguas gestantes y es una de las principales causas asociadas a los abortos espontáneos (Cummins et al. 2008), y a las infecciones de los potros en el útero (Hong et al. 1993).

Se ha demostrado que el desarrollo de la placentitis es inducido por bacterias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiela* spp., *Salmonella abortus equi*), bacterias gram-positivas (*Streptococcus equi* susp. *zooepidemicus*, *Streptococcus equisimilis*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Nocardia* spp.) (Hong et al. 1993), virus (gammaherpesvirus, herpesvirus equino), y otros microorganismos patógenos (LeCuyer et al. 2015). Las infecciones uterinas se producen tanto por la vía ascendente asociadas a las bacterias que migran desde la vagina hasta el cérvix para contactar con el cuerpo y cuernos uterinos (Fernandes et al. 2019, McGlothlin et al. 2004, Peric et al. 2019), o bien, vía sistémica (Pusterla et al. 2011).

Este proceso infeccioso induce la respuesta materna mediante la secreción de citocinas inflamatorias (IL-1 β , -6, y -8) (Fedorka et al. 2019, LeBlanc et al. 2012) y de factores uterotónicos como la prostaglandina (PGE₂) (Li et al. 2019, Zhang et al. 2019) lo que estimula en la siguiente fase la producción de diversas metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) como la MMP-2 y MMP-9 (Barton and Gehlen 2016, Rossi et al. 2017).

Las MMPs son proteínas de una amplia familia de proteasas dependientes de Zinc (Zn²⁺) de las cuales existen dos tipos: secretoras (MMP-1,-2,-3,-9) y transmembranales (MT-MMP14, -15 -16, -24) (Somerville, Oblander y Apte 2003). Las MMPs secretoras tienen como principal función degradar diferentes

componentes de la matriz extracelular, en tanto que las MT-MMPs regulan la activación de las MMP secretoras en el espacio extracelular (Butler y Overall 2013, Somerville, Oblander y Apte 2003).

Previos estudios en el laboratorio han demostrado mediante un modelo experimental de infección que las membranas fetales humanas al ser infectadas con *E. coli* incrementan la respuesta inflamatoria, así como la secreción de la MMP-2, y -9. Estas MMPs actúan sobre el colágeno que compone al corioalantoides y al amnios, causando un rompimiento y debilitamiento de la fuerza tensil y soporte de dichos tejidos, provocando aborto o parto prematuro con complicaciones neonatales (Flores-Herrera et al. 2012).

2.0 ANTECEDENTES.

2.1 Desarrollo de la placenta equina.

Posterior a que el blastocito equino ingresa al útero en el día seis después de la ovulación (Okuda y Vrenken 2013) este se encuentra rodeado de una cápsula formada por glucoproteínas similares a la mucina (Allen y Wilsher 2009). Dicha capa empieza a degradarse hacia el día 20-21 post ovulación, dando paso al establecimiento del intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el embrión a través de la interacción del epitelio columnar del corión que se coloca en aposición con el epitelio luminal uterino (placenta epiteliocorial) (Allen y Stewart 2001). El establecimiento embrionario se caracteriza por el acercamiento de este hacia las glándulas endometriales que le brindarán soporte nutricional a través del histotrofo (Allen y Wilsher 2009). Al mismo tiempo, el alantoides que hasta este momento es solo un pequeño saco adyacente al intestino grueso, empieza a expandirse hasta rodear todo el embrión, fusionándose con el corión al día 28 de la gestación formando el alantocorión, lo que inicia con el desarrollo de la placenta (Allen y Wilsher 2009) **(Figura 1)**. Estos dos tejidos también se encuentran en asociación con el mesodermo, cuyos vasos sanguíneos se expanden formando el mesodermo alantoideo (Allen 2001). Entre el día 25 a 34 de gestación sobre la superficie del corión entre la región del alantoides en expansión y el saco vitelino en regresión se forma un engrosamiento del trofoblasto en forma de anillo que rodea al embrión (Allen 2001). Este engrosamiento se denomina cinturón coriónico (Allen y Stewart 2001) **(Figura 1)**.

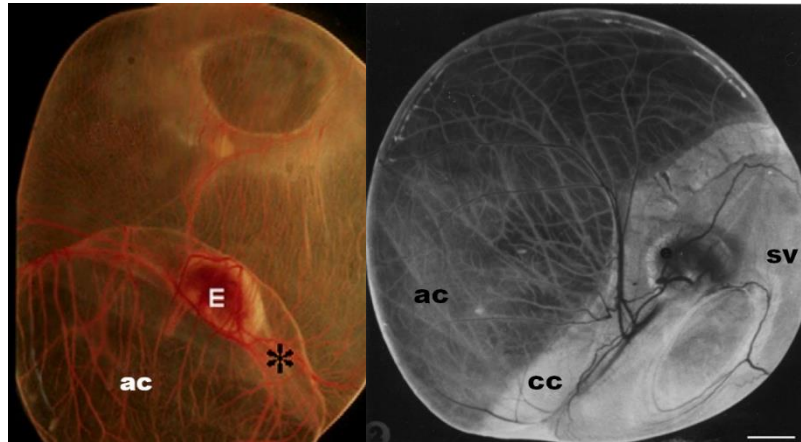


Figura 1. Adaptado de: A review of implantation and Early Placentation in the Mare, (W.R Allen 2009), Placenta y de Equine placentation, (Allen 2001) Reproduction, Fertility and Development. **Localización del cinturón coriónico.** **Izquierda:** Embrión equino de 28 días de gestación en el que se muestra la distribución de la vascularización del alantocorión (ac) con respecto a la posición del embrión (E). El cinturón coriónico es apenas visible como una cinta de color pálido rodeando al embrión (*) (Modificado de (Allen and Wilsher 2009)). **Derecha:** Embrión equino de 36 días de gestación donde se muestra el cinturón coriónico (cc) entre el alantocorión (ac) y el saco vitelino en regresión (sv). La barra inferior derecha representa 1.5cm

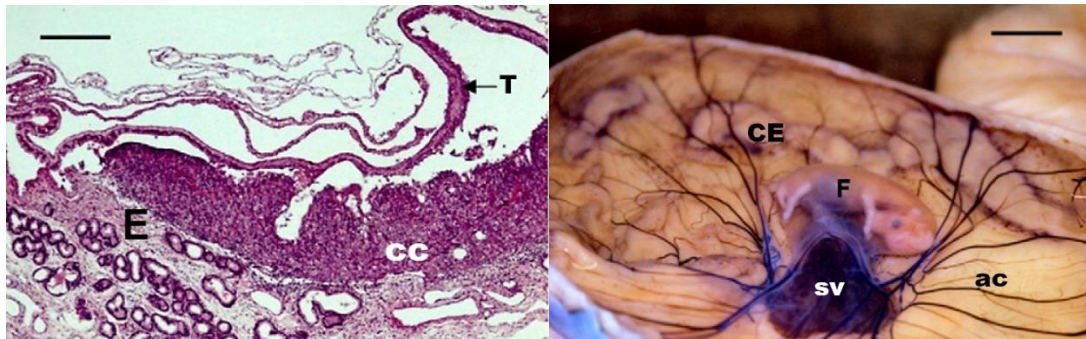


Figura 2. Adaptado de: A review of implantation and Early Placentation in the Mare, (W.R Allen, 2009), Placenta. **Formación de las copas endometriales.** **Derecha:** Fotomicrografía de las células que conforman el cinturón coriónico (cc) en aposición con el endometrio equino (E) iniciando la invasión del estroma al día 37 de gestación. Se puede visualizar las células del trofoblasto en la parte superior de la imagen (T). La barra color negro corresponde a 45µm. **Izquierda:** Embrión equino *in situ* de 46 días de gestación donde se puede visualizar las copas endometriales (CE) completamente formadas invadiendo el endometrio, así como la estructura resultante de la regresión del saco vitelino (sv) (F= feto, ac= alantocorión, Barra= 15mm).

Las células trofoblásticas del cinturón coriónico rápidamente forman pliegues y crestas debido a hiperplasia celular (Allen and Wilsher 2009). Además, las células más superficiales del cinturón liberan una secreción tipo pegamento que une al embrión con el tejido endometrial adyacente (Allen 2001).

Wooding y Fowden (2006) han descrito que la interacción entre la madre y el embrión se establece entre el día 35 a 42 de gestación, cuando las células del cinturón coriónico se desprenden y las células trofoblásticas binucleadas migran hacia el epitelio uterino invadiéndolo, formando conjuntos de células dentro del estroma denominadas copas endometriales (Allen y Wilsher 2009) **(Figura 2)**.

Las copas endometriales son fuente de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Wilsher y Allen 2012) cuya función es la formación de cuerpos lúteos secundarios con la consecuente producción de progesterinas y mantenimiento de la gestación (Aurich y Budik 2015).

Una vez establecidas las copas endometriales, el alantocorión no invasivo, comienza a formar una asociación con el epitelio endometrial adyacente a través del desarrollo de microvellosidades (Wilsher y Allen 2012). Al mismo tiempo y hasta el día 80 a 85 de gestación, el alantocorión se expande, formando sobre el total de su superficie prolongaciones en forma de dedos (vellosidades) (Allen 2001). Estas prolongaciones a su vez se interdigitan con depresiones endometriales (Samuel, Allen y Steven 1974).

A partir de este punto comienza una ramificación tanto de las vellosidades del alantocorión como de sus correspondientes depresiones sobre el endometrio, formando hacia el día 120 de gestación una estructura final denominada microcotiledones (Allen 2001) **(Figura 3)**.

Durante este tiempo (día 120 de gestación), las glándulas uterinas continúan secretando histotrofo, por lo que el tejido trofoblástico adyacente a los microcotiledones se especializa en absorber este líquido a través de la elongación

y pseudoestratificación celular (Allen y Wilsher 2009). A estas áreas de células trofoblásticas especializadas en la absorción de histotrofo se les denomina areolas (Wilsher and Allen 2012) (**Figura 4**).

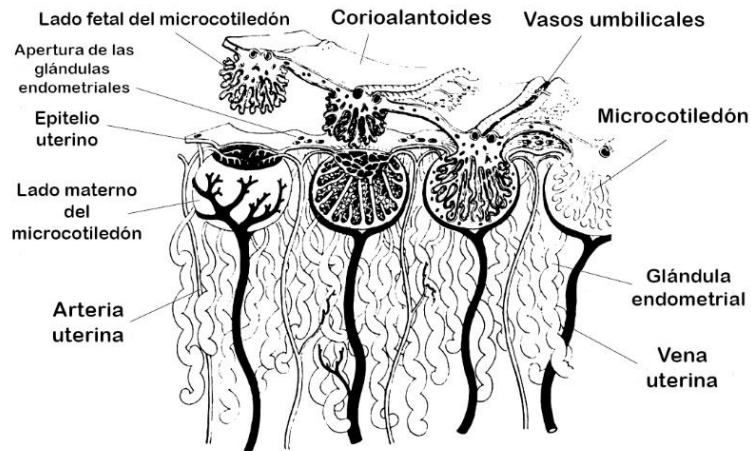


Figura 3. Equine placentation, (Allen and Stewart 2001) *Reproduction, Fertility and Development*. **Microcotiledón de la placenta equina.** El epitelio uterino con el epitelio trofoblástico que no participa en la formación de las copas endometriales se ramifica e interdigita, aumentando la superficie de contacto entre la yegua y el potro sin invadir el estroma uterino. A las estructuras resultantes se les denomina microcotiledones.

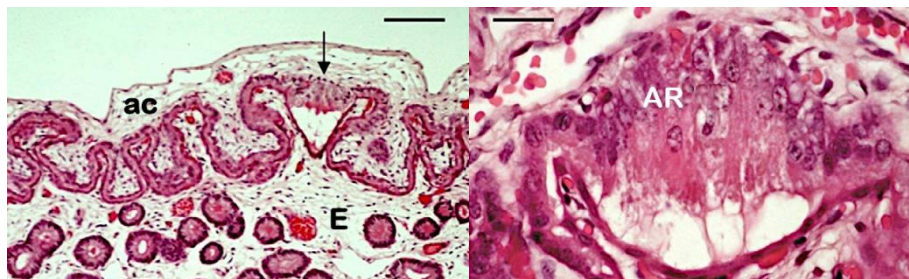


Figura 4. Adaptado de: A review of implantation and Early Placentation in the Mare, (W.R Allen, 2009), *Placenta*. **Areolas. Derecha:** Fotomicrografía que muestra la aposición del tejido alantocorionico (**ac**) con el endometrio equino (**E**) al día 68 de gestación. Las células del trofoblasto adyacente a los microcotiledones y en la cercanía de la apertura de las glándulas endometriales se desarrolla y especializa en la absorción del histotrofo, formando las areolas (**Flecha**) (**Barra= 125µm**). **Izquierda:** Fotomicrografía de las células trofoblásticas pseudoestratificadas que forman la areola (**AR**) (**Barra= 45µm**).

Por su parte, las copas endometriales alcanzan su máximo tamaño a los 70 días de gestación para luego comenzar a degenerar hasta desaparecer por completo entre el día 120 a 150 de gestación (Allen y Wilsher 2009), lo que coincide con la formación final de los microcotiledones y con ello el desarrollo óptimo de la placenta que la hace capaz de secretar progesterinas, continuando con el mantenimiento de la gestación hasta el parto (Aurich y Budik 2015). Estas características indican que los equinos presentan una placenta epiteliocorial, difusa y microcotiledonaria, cuyo desarrollo finaliza hasta el día 150 de gestación (Wooding y Fowden 2006).

2.2 Etiología de la placentitis.

Una de las causas más importantes por la que se presentan nacimientos prematuros y abortos en equinos es la placentitis (Canisso, Loux y Lima 2020). Se ha establecido que la forma más común de placentitis es aquella donde las bacterias patógenas que forman parte del microbioma de la vagina ascienden (Macpherson y Bailey 2008), cruzan la barrera cervical y colonizan e infectan a las membranas fetales provocando necrosis supurativa, sobre todo en el polo caudal de la membrana corioalantoidea en la zona denominada estrella cervical (LeBlanc et al. 2012). Lo anterior se asocia a un adelgazamiento y separación del tejido placentario del útero materno, lo que desencadena un parto prematuro que compromete el bienestar del binomio yegua-potro (Coleman y Whitfield-Cargile 2017). Los signos clínicos más comunes de placentitis equina son: desarrollo prematuro de la glándula mamaria y descarga vulvar, así como un aumento del grosor de la unidad útero-placenta medida por ultrasonido (Macpherson y Bailey 2008), sin embargo, estos pueden no presentarse hasta que las lesiones placentarias están muy avanzadas, por ello, resulta de suma importancia reconocer el mecanismo inmunológico temprano de la patología que permita desarrollar un diagnóstico oportuno (LeBlanc 2010).

Los análisis microbiológicos han demostrado que el 53% de los agentes causantes de la infección son bacterias, de las cuales, el 28% corresponde a *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus*, mientras que el resto se ha asociado con *Escherichia coli*, *Leptospira spp*, *Pseudomonas spp*, *Streptococcus equisimilis*, *Klebsiella spp* y *Actinobacillus spp* (LeBlanc et al. 2012, Lyle 2014).

2.3 La infección intrauterina induce la secreción de las citocinas proinflamatorias y la expresión de las metaloproteasas de matriz extracelular.

Durante la gestación, la placenta y el tejido uterino poseen diferentes mecanismos de regulación inmunológica, los cuales están encaminados a favorecer el establecimiento de la gestación y dar una reacción oportuna ante las infecciones sin comprometer la inmunotolerancia al embrión y con ello mantener la gestación (Olmos-Ortiz et al. 2019). En la placenta decidual residen células inmunes maternas como las células Natural Killer deciduales (dNK), linfocitos TCD4+ y CD8+, macrófagos y células dendríticas (Heerema-McKenney 2018).

La migración, el establecimiento, la proliferación, y la activación de estas células inmunológicas está regulada por la interleucina 2 (IL-2) e IL-15 así como por la progesterona (Olmos-Ortiz et al. 2019). Las infecciones intrauterinas modifican el equilibrio inmunológico, estimulando el incremento de la producción de citocinas embriotóxicas como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el interferón gamma (INFG) comprometiendo el dialogo entre los tejidos maternos y el embrión (Robertson et al. 2018).

Se ha demostrado que el establecimiento de la infección y la respuesta inmunológica no controlada por parte de las células profesionales activan prematuramente el trabajo de parto (Keelan 2018), por ejemplo: se ha sugerido que

la IL-1 β liberada durante un proceso inflamatorio participa en la inducción del parto estimulando la producción de PGE₂ y de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) (Lyle 2014, Mulla y Buckingham 1999). Por su parte, los neutrófilos como la primera línea de defensa son activados y movilizados por citocinas quimiotácticas como la IL-8 favoreciendo la fagocitosis de los patógenos que los activó. En este proceso, los neutrófilos también liberan factores antimicrobianos, incluyendo especies reactivas de oxígeno, defensinas y proteasas como las metaloproteasas de neutrófilos (MMP-25) y la MMP-8 (Keelan 2018).

El desarrollo de un modelo experimental de infección ha permitido demostrar que las membranas fetales humanas responden activamente ante la infección secretando IL-1 β y TNF- α . La respuesta inflamatoria resultante activa la expresión de la MMP-2 y MMP-9, las cuales degradan los componentes estructurales y de soporte de las membranas fetales provocando el debilitamiento y separación del tejido materno del fetal (Flores-Herrera et al. 2012).

De igual forma, Zhang (2019) demostraron mediante cultivo *in vitro* de células endometriales bovinas que la estimulación con *Escherichia coli* (10⁶ UFC/mL) por 12 horas incrementa la secreción de PGE₂ mediada por la expresión del ciclo oxigenasa 2 (COX-2). El incremento de la PGE₂/COX-2 se asoció con la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-8, y TNF α (Zhang et al. 2019).

En el caso de los equinos, Leblanc (2012) demostraron mediante un modelo experimental de placentitis que la inoculación con 10⁹ UFC/mL de *Streptococcus equi subesp zooepidemicus* a yeguas gestantes entre los 285 a 291 días induce la sobre expresión del mRNA para IL-1 β , IL-8, IL-6 y TNF- α en el tejido de la corioalantoides, especialmente en la zona de la estrella cervical. En este mismo estudio, los autores demostraron que el aumento en la concentración de PGE₂ y PGF₂ α en el líquido alantoideo son asociadas con abortos (LeBlanc et al. 2012).

En yeguas, un parto prematuro es un evento adverso debido a que el potro requiere de un aumento en la concentración de cortisol para la activación de eventos

requeridos en la vida neonatal como: la inducción de enzimas glucogénicas hepáticas (Fowden et al. 1991), el aumento en la concentración de la hormona triyodotironina (T3) (Silver et al. 1991) y de la presión arterial fetal (Forhead et al. 2000), así como la maduración final del sistema respiratorio y gastrointestinal (Ousey 2004). Sin embargo, las concentraciones de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y de cortisol se mantienen muy bajas durante la gestación (Silver 1990) hasta que 2 o 3 días antes del parto el cortisol aumenta significativamente y la maduración final del potro ocurre (Lester 2005).

Como parte de una estrategia cuyo objetivo sería inducir madurez precoz sin dañar la salud del potro, Ousey y colaboradores (2000) administraron a ponis de 300 días de gestación 5mg de hormona ACTH vía intramuscular (n=14) cada 24 horas durante tres días. Sus principales observaciones indicaron que dicha dosis de ACTH induce el parto ligeramente antes (318 días vs 327 días) en yeguas cuyas gestaciones iniciaron al final de la temporada reproductiva. Se ha establecido que el potro prematuro es aquel que nace antes de los 320 días de gestación. Estos potros presentan debilidad generalizada, pobre desarrollo muscular y de reflejo de succión, así como dificultad para levantarse y un conteo menor de leucocitos totales. (Lester 2005)

Además, Ousey y equipo determinaron altas concentraciones de progestagénos y cortisol posterior a las dosis de ACTH en yeguas con gestaciones tardías, cuyos potros finalmente nacieron con bajo peso o muertos (n=2) (Ousey et al. 2000).

2.4 Interleucina 1 beta (IL-1 β).

La IL-1 β pertenece a un subgrupo de la superfamilia Interleucina 1 compuesta por: IL-1 α , IL-1 β e IL-33 debido a que presentan largos péptidos precursores (Scott et al. 2017).

Los genes que codifican tanto para IL-1 β como para IL-1 α se encuentran en el cromosoma 2 en humanos (Lafage et al. 1989) y en el cromosoma 15 en caballos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Equus+caballus+IL>).

Ambas interleucinas comparten una estructura en forma de trébol compuesta por 12 hebras u hojas β ($\beta 1 - \beta 12$) que forman un núcleo hidrofóbico y seis horquillas o bucles (Fields, Gunther y Sundberg 2019) (**Figura 5**).

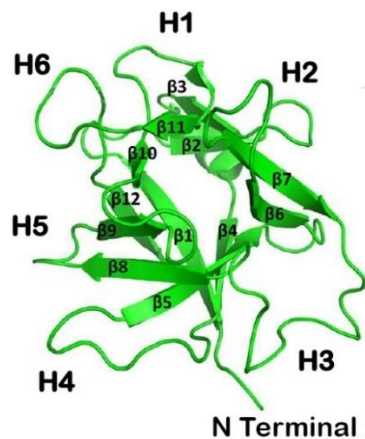


Figura 5. Adaptado de: Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling (Fields, 2019), *frontiers in Immunology*. **Estructura de la IL-1 β .** Compuesta por 12 hebras β ($\beta 1 - \beta 12$) y 6 horquillas o bucles (**H1-H6**) que le da la apariencia de un trébol.

Tanto IL-1 β como IL-1 α son producidas por monocitos, macrófagos y en menor grado por neutrófilos, queratinocitos, células epiteliales y endoteliales, así como por linfocitos, células musculares y fibroblastos (Kaneko et al. 2019).

La familia de la IL-1 carece de péptido señal, por lo que dichas citocinas se localizan en el citoplasma en su forma inactiva (*proIL-1 β* , *proIL-1 α*) (Dinarello 2018), sin embargo, la *proIL- α* se produce de forma constitutiva (Fields, Gunther y Sundberg 2019), mientras que la *proIL-1 β* tiene que ser inducida por un estímulo inflamatorio y liberada al espacio extracelular (Dinarello 2018).

Las isoformas *proIL-1* (β/α) pesan 31 kDa, en tanto que sus formas activas o maduras *actIL-1* ($\beta/1\alpha$) son de aproximadamente 17 kDa (Negrini, Gorgoulis y Halazonetis 2010). En su forma activa, ambas isoformas solo comparten el 25% de similitud.

La producción de $IL-1\beta$ puede ser mediada por la activación de los receptores tipo Toll presentes en monocitos. Estos, almacenarán la interleucina en los inflamasomas, un complejo de proteínas que se expresan en el citoplasma durante la inflamación, lo que favorecerá la rápida respuesta al momento de la infección. (Krumm, Xiang y Deng 2014)

Así, la activación de la $IL-1\beta$ puede ser a través de la caspasa 1 regulada por el inflamasoma (Gabay, Lamacchia y Palmer 2010), o bien, a través de la escisión por MMPs como la MMP-9 (Dinarello 2018) (**Figura 6**).

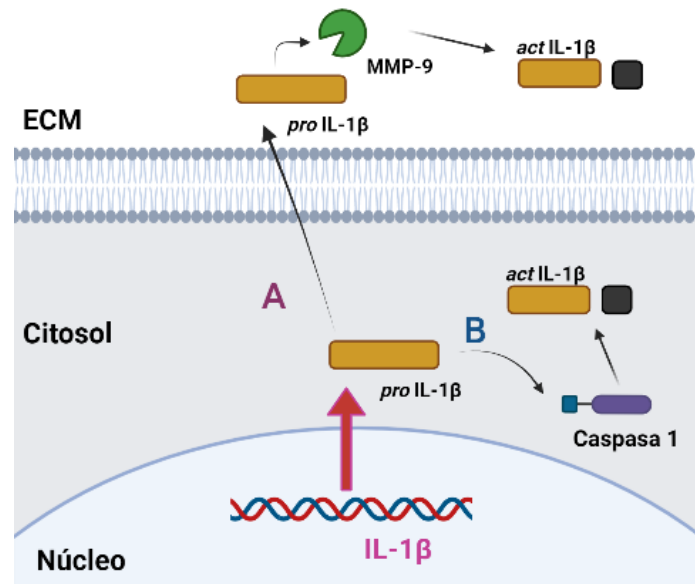


Figura 6. Adaptado de: IL-1 pathways in inflammation and human disease, (Gabay, 2010 y creado en BioRender) Nature Reviews Rheumatology. **Vías de activación de la $IL-1\beta$.** La vía clásica por la cual la isoforma *proIL-1* β es activada (*actIL-1* β) esta mediada por la caspasa 1 (B). La vía alterna, es cuando la *proIL-1* β es secretada al espacio extracelular en donde es escindida por enzimas como la MMP-9 (A).

2.4.1 Receptor de IL-1 β .

De los 10 tipos de receptores para la familia IL-1 existentes, la IL-1 β como la IL-1 α ejercen sus funciones a través de la unión con el receptor para IL-1 tipo I (IL-1RI) (Dinarello 2011). Este receptor está formado por tres dominios extracelulares tipo inmunoglobulinas y un dominio intracelular parecido a los receptores tipo Toll (dominio TIR: Toll Interleukin 1-receptor) (Krumm, Xiang y Deng 2014) (**Figura 7**).

La interacción de la IL-1 β con su receptor (IL-1RI) induce el reclutamiento de otro receptor denominado proteína accesoria del IL-1R (IL-1RAcP). Estas tres moléculas con sus dominios TIR asociados (IL-1 β /IL-1RI/IL-1RAcP) inician la cascada intracelular con el reclutamiento del factor de diferenciación 88 (MYD88) (Dinarello 2018). Posteriormente, la unión TIR-MYD88 activa a las quinasas asociadas a IL-1R o al Factor 6 asociado al receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFF6). Estos, a su vez, activan al NF κ B o a las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Krumm, Xiang y Deng 2014) (**Figura 7**).

La IL-1 promueve el reclutamiento de células de respuesta a inflamación a través de la expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales así como por la estimulación de la liberación de quimiocinas por las células estromales (Krumm, Xiang y Deng 2014). La IL-1 también induce la producción de enzimas como la fosfolipasa A2, la COX-2, la óxido nítrico sintetasa (NO) y MMPs (Jacques et al. 2006).

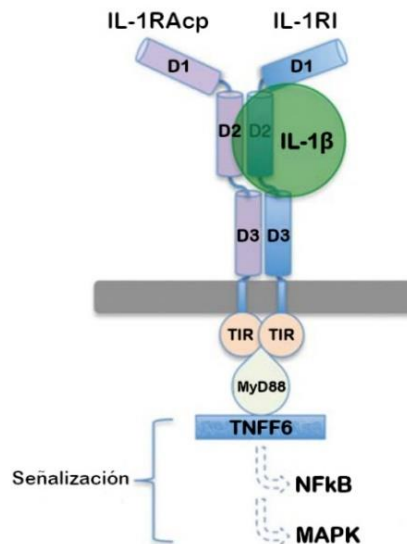


Figura 7. Adaptado de: Structural biology of the IL-1 superfamily: Key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses, (Krumm, 2014), Protein science. **Estructura y señalización del receptor para IL-1 β .** El receptor para IL-1 β está formado por tres dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (D1-D3) y un dominio intracelular tipo Toll (TIR). La unión de IL-1 β con su receptor (IL-1R) estimula el reclutamiento de la proteína accesoria de IL-1R (IL-1RAcP) que cuenta con los mismos dominios. El trinomio IL-1R/L-1 β /IL-1RAcP con sus dominios TIR asociados inician la cascada celular con el reclutamiento del factor de diferenciación 88 (MYD88), el cual activa al factor 6 asociado al receptor del TNF (TNFF6) que a su vez reclutará al Factor de transcripción nuclear kB (NFkB) o a las proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPK).

2.4.2 Inhibidores endógenos de la IL-1.

Existen tres principales inhibidores endógenos para la IL-1 que se describen a continuación:

Antagonista del receptor para IL-1 (IL-1Ra): IL-1Ra es un citocina antagonista de IL-1 debido a que una vez que se une al receptor IL-1RI, el binomio resultante no es capaz de reclutar a IL-1RAcP, inhibiendo así la señal (Arend et al. 1998) (**Figura 8**).

Se han descrito dos principales isoformas de IL-1Ra: una de 17 kDa secretada por monocitos, macrófagos y neutrófilos y otra de 18kDa expresada por células epiteliales y fibroblastos (Arend 1993).

Receptor para interleucina tipo II (IL-1RII): pertenece a la familia del IL-1R pero este presenta un dominio citoplasmático muy corto (29 aminoácidos) que difiere con el dominio tipo Toll de IL-1R, debido a esto, una vez que IL-1 β se une a IL-1RI y a IL-1RII en lugar de IL-1RAcP, el complejo resultante carece de la asociación de los dominios TIR y la señal intracelular no ocurre (Krumm, Xiang y Deng 2014) **(Figura 8)**. Existe una forma soluble de IL-1RII (sIL-1RII) que se une con IL-1 en el espacio extracelular (Peters, Joesting y Freund 2013).

Molécula relacionada al IL-1R o SIGIRR: esta molécula también pertenece a la familia del IL-1R; posee un dominio extracelular tipo inmunoglobulina y 100 aa adicionales en el dominio tipo TIR intracelular. Este último, inhibe la activación de NF κ B, ERKs y JNKs (Garlanda, Anders y Mantovani 2009).

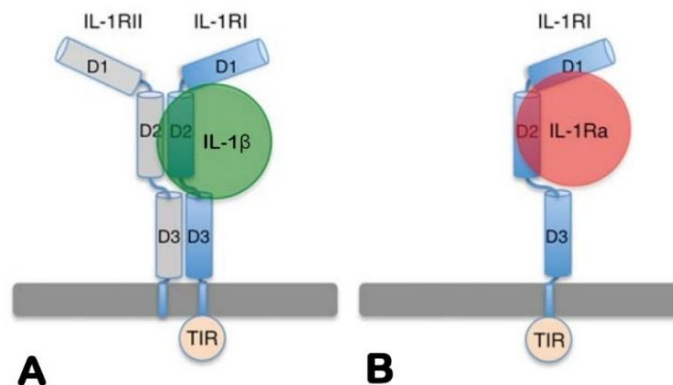


Figura 8. Adaptado de: Structural biology of the IL-1 superfamily: Key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses, (Krumm, 2014), Protein science **Antagonistas de la IL-1 β .** **A: El Receptor para interleucina tipo II (IL-RII)** contiene un dominio intracelular muy corto, por lo que una vez que se forma el complejo IL-1RI/IL-1 β /IL-1RII este carece de la asociación de los dominios TIR, por lo que la señalización no ocurre. **B: El Antagonista del receptor para IL-1 (IL-1Ra)** es una proteína que se une a IL-RI en lugar de IL-1 β , sin embargo, esta es incapaz de reclutar a IL-RAcP, por lo que no se genera la señal.

2.5 Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP).

Las metaloproteinasas (MMPs) son enzimas de tipo endoproteasas dependientes de zinc, cuyo papel clásico en los tejidos es la remodelación y degradación de proteínas en la matriz extracelular (MEC) (Klein y Bischoff 2011), sin embargo, también participan en diferentes procesos celulares como la proliferación, migración y diferenciación celular, apoptosis, angiogénesis, reparación tisular y respuesta inmune (Cui, Hu y Khalil 2017, Tomlinson et al. 2008). Debido a su naturaleza degradativa, las MMPs también pueden afectar moléculas en la superficie celular y modular señalizaciones intracelulares (Somerville, Oblander y Apte 2003).

Las MMPs son secretadas por las células proinflamatorias y uteroplacentarias como los fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales, macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células del citotrofoblasto (Cui, Hu y Khalil 2017).

Robert Somerville (2003) describió 23 tipos de MMPs en humanos (**Cuadro 1**), cada una de ellas transcrita por su propio gen. La mayoría de estos genes están localizados en el cromosoma 11. (Somerville, Oblander y Apte 2003)

Cuadro 1. Clasificación de las MMPs y sustratos que degradan

Nombre	Nombre alternativo	Substrato (colágenos)	Otros sustratos	Sustratos componentes fuera de la ECM
MMP-1	Colagenasa-1	Colágeno tipo I, II, III, VII, X y gelatina	Agrecano, caseína, nidógeno, serpina, versican, perlecana, proteínas de unión a proteoglicanos y tenascina-C	α 1-antitripsina/ α 1-antitripsina/ α 1-inhibidor de proteinasas IGFBP-3, IGFBP-5, IL-1 β , L-selectina, ovostatina, péptido de TNF- α recombinante y SDF-1
MMP-2	Gealtinasa-A	Colágeno tipo I, IV, V, VII, X, XI, XIV y gelatina	Agrecano, elastina, fibronectina, laminina, nidógeno, proteínas de unión a proteoglicanos y versican.	MMP-9 activo, MMP13 activo, FGFR1, IGF-BP3, IGF-BP5, IL-1 β , péptido recombinante de TNF- α , y TNF- β
MMP-3	Estromelisin-1	Colágeno tipo II, IV, IX, X y gelatina	Agrecano, caseína, decorina, elastina, fibronectina, laminina, nidógeno, perlecana, proteoglicanos, proteínas de unión a proteoglicanos y versican	α 1-antitripsina, α 1-inhibidor de proteasas, antitrombina III, E-cadherina, fibrinógeno, IGF-BP3, L-selectina, ovostatina, pro-HB-EFG, pro-IL-1 β , pro-MMP1, pro-MMP8, pro-MMP9, pro-TNF α y SDF-1

Continuación Cuadro 1

Nombre	Nombre alternativo	Substrato (colágenos)	Otros sustratos	Sustratos componentes fuera de la ECM
MMP-7	Matrisilina-1 colagenasa de neutrófilos	Colágeno tipo I, II, III, V, IV, y X	Agrecano, caseína, elastina, entactina, laminina, y la proteína de unión a proteoglucanos	β 4 integrina, decorina, defensina, E-cadherina, Fas-L, plasminógeno, pro-MMP2, pro-MMP7, pro-TNF α , transferrina, sindescan.
MMP-8	Colagenasa-2	Colágeno tipo I, II, III, V, VII, X y gelatina	Agrecano, laminina y nidógeno.	α 2-antiplasmina y pro-MMP8
MMP-9	Gelatinasa-B	Colágeno tipo IV, V, VII, X y XIV	Fibronectina, laminina, nidógeno, proteína de unión a proteoglucanos y versican	CXCL5, IL-1 β , IL2-R, plasminógeno, pro-TNF α , SDF-1 y TGF- β
MMP-10	Estromelisina-2	Colágeno tipo III, IV, V y gelatina	Fibronectina, laminina y nidógeno	Pro-MMP1, pro-MMP8 y pro-MMP10
MMP-11	Estromelisina-3		Laminina	α 1- antitripsina, α 1-inhibidor de proteinasas y IGFBP-1
MMP-12	Macrófago metaloproteinasa		Elastina	Plasminógeno
MMP-13	Colagenasa-3	Colágeno tipo I, II, III, IV, V, IX, X, XI y gelatina	Agrecano, fibronectina, laminina, perlecano y tenascina	Activador de plasminógeno 2, pro-MMP9, pro-MMP13 y SDF-1
MMP-14	MT1-MMP	Colágeno tipo I, II, III, y gelatina	Agrecano, dermatán sulfato, proteoglucanos, fibrina, fibronectina, laminina, nidógeno, perlecano, tenascina y vitronectina	Integrina $\alpha\beta$ 3, CD44, gC1qR, pro-MMP2, pro-MMP13, pro-TNF α , SDF-1, transglutaminasas de tejidos.
MMP-15	MT2-MMP	Colágeno tipo I, II, III y gelatina	Agrecano, fibronectina, laminina, nidógeno, perlecan, tenascina y vitronectina	Pro-MMP2, pro-MMP13 y transglutaminasas de tejidos
MMP-16	MT3-MMP	Colágeno tipo I, III y gelatina	Agrecano, caseína, fibronectina, laminina, perlecano y vitronectina	Pro-MMP2 y pro-MMP13
MMP-17	MT4-MMP	Gelatina	Fibrina y fibronectina	
MMP-19	RASI-1	Colágeno tipo I, IV y gelatina	Agrecano, caseína, fibronectina, laminina, nidógeno y tenascina	
MMP-20	Enamelisina		Agrecano, amelogenina y proteína oligomérica de cartílago.	
MMP-21				α 1- antitripsina
MMP-23	CA-MMP	Gelatina		
MMP-24	MT5-MMP	Gelatina	Condrotín sulfato, dermatán sulfato y fibronectina	Pro-MMP2 y Pro-MMP13
MMP-25	MT6-MMP Leucolisina	Colágeno tipo IV y gelatina	Fibrina y fibronectina	Pro- MMP2
MMP-26	Matrisilina-2 endometasa	Colágeno tipo IV y gelatina	Caseína, fibrinógeno y fibronectina	β 1-inhibidor de proteinasas
MMP-28	Epilisina		Caseína	

Se presenta cada una de las MMPs con su nombre clásico y alternativo, así como sus diferentes tipos de sustratos componentes de la matriz extracelular (colágenos y no colágenos) y hallados fuera de esta

2.5.1 Clasificación de las MMPs.

Las MMPs se han clasificado según su sustrato y estructura en MMPs solubles que se localizan en el espacio extracelular y MMPs membranales (MT-MMPs) que se encuentran localizadas en la membrana celular a través de un dominio de anclaje a glicosil fosfatidil inositol (GPI por su nombre en inglés: Glycosyl Phosphatidyl Inositol) (Barton et al. 2019) (Somerville, Oblander y Apte 2003) **(Cuadro 2)**.

Las MMPs solubles también pueden localizarse en la membrana celular en asociación con la proteína extracelular de inducción de metaloproteinasas EMMPRIN/CD147 o a integrinas (Somerville, Oblander y Apte 2003). La MMP-2 se une a la integrina $\alpha\beta3$, la MMP-1 a la $\alpha2\beta1$ (Parks, Wilson y Lopez-Boado 2004) y la MMP-9 al receptor del ácido hialurónico (CD44) (Yu y Stamenkovic 2000). Esto sugiere que las integrinas y el CD44 funcionan como factores accesorios **(Figura 9)**.

Las MMPs también pueden estar en asociación con heparán sulfato proteoglicanos (sindecanos) o con las propias MMPs transmembranales (Itoh 2015, Ryu et al. 2009).

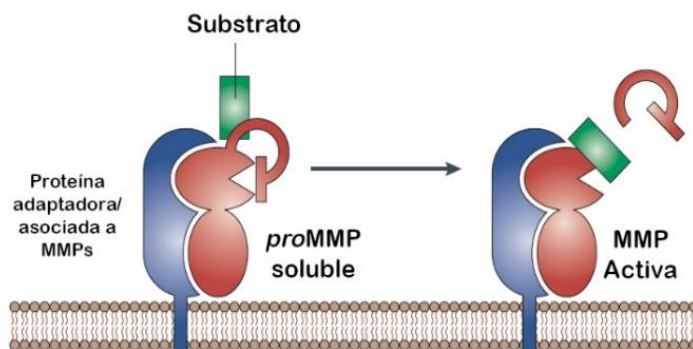


Figura 9. Adaptado de: Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity, (Parks, 2004) Nature Review Immunology. **Proteínas adaptadoras o en asociación con las MMPs solubles.** Las MMPs solubles pueden estar asociadas a la membrana a través de proteínas como las integrinas, la proteína extracelular de inducción de metaloproteinasas (EMMPRIN) o a otras metaloproteinasas membranales. Se ha sugerido que *in vivo*, estas proteínas son requeridas como adaptadoras durante el proceso de proteólisis requerido en la activación de las *proMMP*.

Cuadro 2. Clasificación de las MMPs de acuerdo con su estructura

MMPs SOLUBLES		MMPs MEMBRANALES	
Según sustrato			
Colagenasas	<ul style="list-style-type: none"> • MMP-1 • MMP-8 • MMP-13 • MMP-18 	MMPs transmembranales	<ul style="list-style-type: none"> • MMP-14 • MMP-15 • MMP-16 • MMP-24
Gelatinasas	<ul style="list-style-type: none"> • MMP-2 • MMP-2 • MMP-9 	MMPs membranales ancladas a GPI	<ul style="list-style-type: none"> • MMP-17 • MMP-25
Estromelisinias	<ul style="list-style-type: none"> • MMP-3 • MMP-10 	OTRAS	<ul style="list-style-type: none"> • MMP-23
Matrisilinas	<ul style="list-style-type: none"> • MMP-7 • MMP-26 		
OTRAS			
<ul style="list-style-type: none"> • MMP-19 • MMP-28 • MMP-18 • MMP-20 			

Las MMPs solubles se encuentran en el espacio extracelular mientras que las MMPs transmembranales se encuentran como una proteína transmembranal o en asociación a la membrana mediante un anclaje a glicosil fosfatidil inositol (**GPI**).

2.5.2 Estructura general de las MMPs.

Cui (2017) han descrito que las MMPs comparten tres características generales: dominios catalíticos y auxiliares similares, switch de cisteína y sitio catalítico dependiente de zinc (Cui, Hu y Khalil 2017).

2.5.2.1 Dominios.

Todas las MMPs excepto MMP-7, MMP-23 y MMP-26 consisten en dos dominios conectados por un péptido tipo bisagra. Uno de los dominios es tipo proteasa mientras que el segundo dominio es auxiliar (dominio hemopexina). El dominio proteasa, a su vez, se conforma de un péptido señal, el prodominio y el módulo catalítico (Somerville, Oblander y Apte 2003) (**Figura 10**).

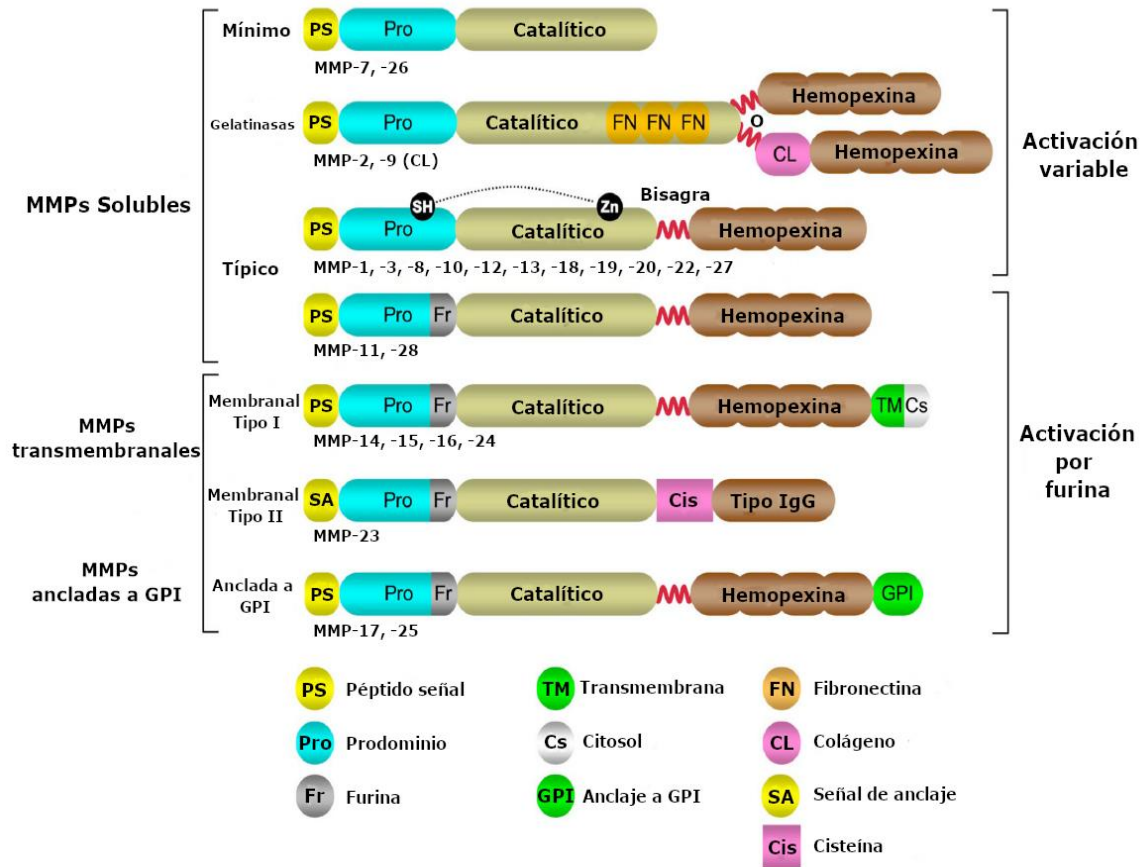


Figura 10. Adaptado de Control of Matrix Metalloprotease Catalytic Activity, (Ra, 2007), Matrix Biology. **Dominios de las MMPs.** De forma general, la estructura de las MMPs consiste en un dominio proteasa y un dominio auxiliar o tipo **hemopexina**, ambos divididos por una **región bisagra**. A su vez, el dominio proteasa está formado por el péptido señal (**PS**), el prodominio (**Pro**) y el dominio **catalítico**. Este último contiene al ión Zinc en unión con el grupo -SH de la cisteína del prodominio que mantiene a las MMPs en su forma inactiva. Las gelatinasas MMP-2, -9, contienen dentro del dominio catalítico, tres repeticiones de fibronectina tipo II (**FN**), además, la MMP-9 también presenta entre la región bisagra y el dominio hemopexina un inserto de colágeno tipo V (**CL**). Las MMPs solubles son activadas por otras proteasas o MT-MMPs en el espacio extracelular, mientras que las MMPs membranales y MMP-11 y 28 son activadas por la enzima furina (**Fr**) dentro de la célula.

El prodominio se caracteriza por presentar una secuencia PRCXXPD (P: Prolina, R: Arginina, C: Cisteína, D: Ácido aspártico X: Cualquier aa), mientras que el dominio catalítico presenta la secuencia HEXXHXXGXXH (H: Histidina, E: Ácido glutámico G: Glicina X: cualquier aa) (Parks, Wilson y Lopez-Boado 2004). Además, el dominio catalítico contiene un ion de zinc (Zn^{2+}) que se encuentra en asociación a los tres residuos histidina (Klein y Bischoff 2011).

De esta manera, el grupo tiol (-SH) del residuo cisteína en el prodominio liga con el ion Zinc en el sitio catalítico manteniendo a la enzima estable e inactiva (zimógeno). A la interacción entre las histidinas, el átomo de Zinc y el grupo -SH de la cisteína se le denomina Switch de Cisteína (Chen et al. 2013) **(Figura 11)**.

Adyacente al switch de cisteína, el dominio catalítico sufre un plegamiento sobre un residuo de metionina denominado giro de metionina. Este giro provoca que la unión de los residuos histidina con el átomo de zinc queden aislados en una bolsa hidrofóbica (Bolsa S1) lo que estabiliza la estructura (Laronha y Caldeira 2020) **(Figura 12)**.

Después del dominio catalítico se encuentra el dominio bisagra y finalmente el dominio hemopexina (Parks, Wilson y Lopez-Boado 2004). El dominio hemopexina consiste en cuatro repeticiones parecidas a hemopexina o vitronectina que pueden funcionar como reconocimiento al sustrato (Visse y Nagase 2003).

La MMP-2 y MMP-9, también llamadas gelatinasas difieren de las otras MMPs ya que presentan tres repeticiones de fibronectina tipo II dentro del módulo catalítico cuya función es mediar la unión de la enzima con la gelatina (Klein y Bischoff 2011). La MMP-9 además, tiene un inserto adicional dentro de la región bisagra similar al colágeno tipo V (Somerville, Oblander y Apte 2003) **(Figura 10)**.

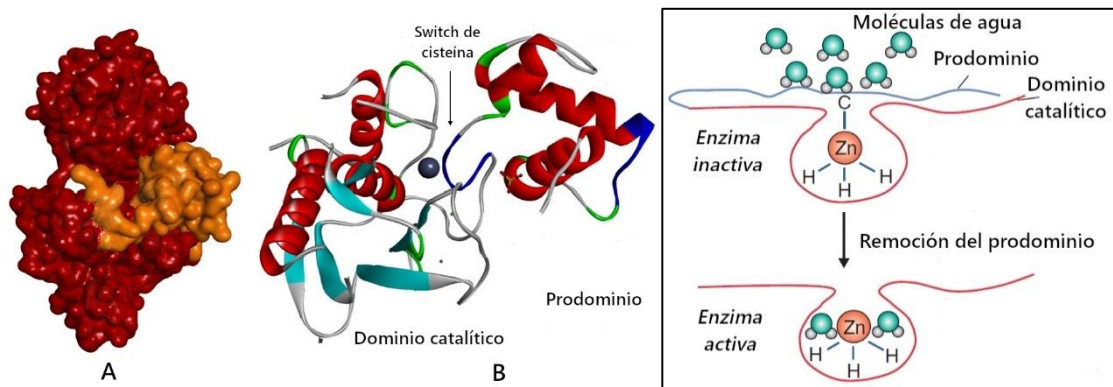


Figura 11. Adaptado de: Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases (Laronha, 2020), Cells y Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks, (Somerville, 2003), Genome Biology. **Switch de cisteína. Derecha. A:** Estructura tridimensional de la gelatinasa A u MMP-2 en donde se presenta al prodominio en color naranja y el dominio catalítico en rojo. **B:** Localización del Switch de cisteína en la MMP-2 que muestra la presencia del átomo de Zinc (esfera azul) en el centro de la estructura entre el prodominio y el dominio catalítico). **Izquierda.** La asociación del ión zinc con los tres residuos de histidina en el sitio catalítico se une con un grupo -SH de la cisteína localizada en el prodominio formando una barrera que impide el ingreso de las moléculas de agua requeridas para el funcionamiento proteolítico de las MMPs, manteniendo la enzima en su forma de zimógeno.

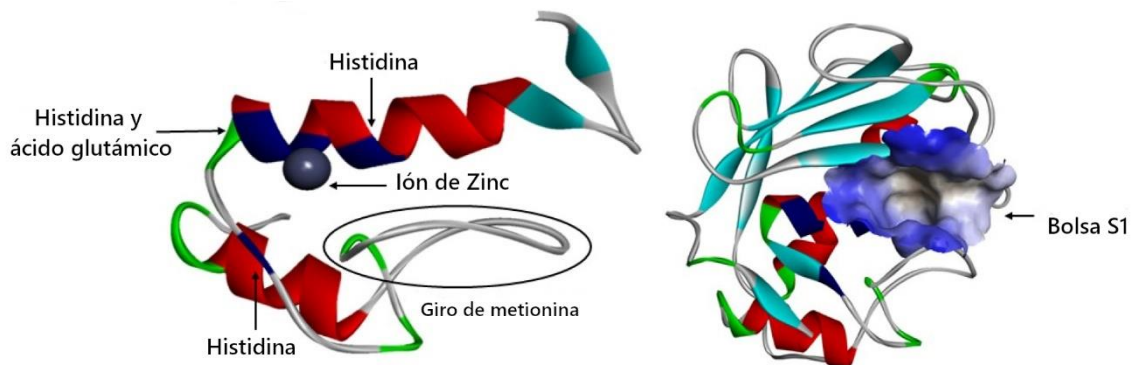


Figura 12. Adaptado de: Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases (Laronha, 2020), Cells. **Giro de metionina en el dominio catalítico de MMP-1.** Adyacente a la asociación del Ión Zinc con los residuos histidinas del grupo catalítico, una metionina provoca un plegamiento (**giro de metionina**) cuyo resultado es la formación de una bolsa hidrofóbica (**Bolsa S1**) que encierra la unión Zinc-Histidina y estabiliza la estructura.

2.5.2.2 Activación de las MMPs por interrupción del Switch de cisteína.

Como se ha mencionado, las MMPs se encuentran en forma inactiva o zimógeno gracias a la asociación del grupo -SH de la cisteína del prodominio con el ión Zinc posicionado en el dominio catalítico (Chen et al. 2013).

Las MMPs se secretan en forma de zimógeno, excepto la estromelisin 3 (MMP-11), la MMP-28 y las MT-MMP ya que entre el prodominio y el dominio catalítico presentan una región de reconocimiento a furina, lo que les permite ser activadas intracelularmente (Das et al. 2003, Ra and Parks 2007) (**Figura 10, y 13**).

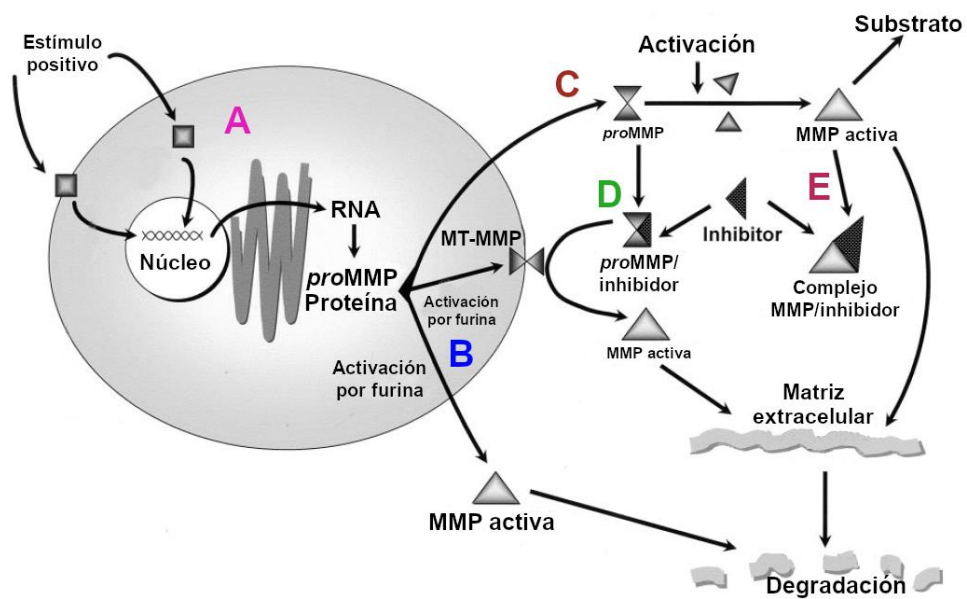


Figura 13. Adaptado de: The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle, (Curry, 2003), Endocrine Review. **Producción y activación de las MMPs.** **A:** El estímulo inflamatorio provoca la síntesis de MMPs, las cuales se producirán en forma de zimógeno, es decir, con el prodominio asociado al dominio catalítico. **B:** Algunas MMPs solubles como la MMP-11, MMP-28 y el total de las MMPs membranales contienen en su estructura una región de unión a furina. La furina es una proteasa capaz de remover el prodominio y activar a las MMPs dentro de la célula. Es por ello, que dichas MMPs ya se encuentran activas una vez que llegan a su destino blanco (espacio extracelular o membrana). **C:** El resto de MMPs solubles se secretan en forma inactiva, por lo que es en el espacio extracelular que son activadas por enzimas como la plasmina. **D:** La MMP-2 es un caso particular, debido a que, paradójicamente, requiere de la unión de un inhibidor específico (TIMP) y de una MT-MMP para activarse y llegar a cabo su función proteolítica. **E:** Finalmente, cuando las MMPs han realizado su función se unen con inhibidores específicos.

Para el resto de las MMPs, su activación se lleva a cabo en el espacio extracelular, en donde sufren una remoción del prodominio gracias a otras enzimas como la plasmina y MMPs activas (Curry y Osteen 2003), así como por especies reactivas de oxígeno (Klein y Bischoff 2011). La remoción del prodominio deja libre la asociación histidinas-zinc del sitio catalítico, lo que desencadena la actividad proteolítica de la MMP sobre su sustrato (Visse y Nagase 2003).

2.5.2.3 Acción proteolítica de las MMPs.

La actividad catalítica de las MMPs depende de la interacción del átomo de Zinc con los residuos de histidina, el ácido glutámico y el sustrato (Cui, Hu y Khalil 2017).

El residuo de ácido glutámico adyacente a un residuo histidina en el sitio catalítico atrae una molécula de agua (Ra y Parks 2007). El ácido glutámico, a su vez, se asocia con el átomo de Zinc a través del átomo de oxígeno de la molécula de agua que atrajo (Visse y Nagase 2003) (**Figura 14A**). La proteína sustrato interactúa con el átomo de Zinc a través de la unión de uno de sus grupos carbonilo con un átomo de hidrogeno de otra molécula de agua (Laronha y Caldeira 2020) (**Figura 14B**).

El rompimiento de la proteína sustrato se lleva a cabo cuando el grupo hidrógeno que une al sustrato con el Zinc se libera y la molécula de agua unida al ácido glutámico forma dos nuevos enlaces con el sustrato: el átomo de oxígeno de la molécula de agua con un átomo de carbono del sustrato y un átomo de hidrógeno del agua con un átomo nitrógeno del sustrato (**Figura 14C**). De esta manera, el sustrato se escinde en dos (Cui, Hu y Khalil 2017) (**Figura 14D**).

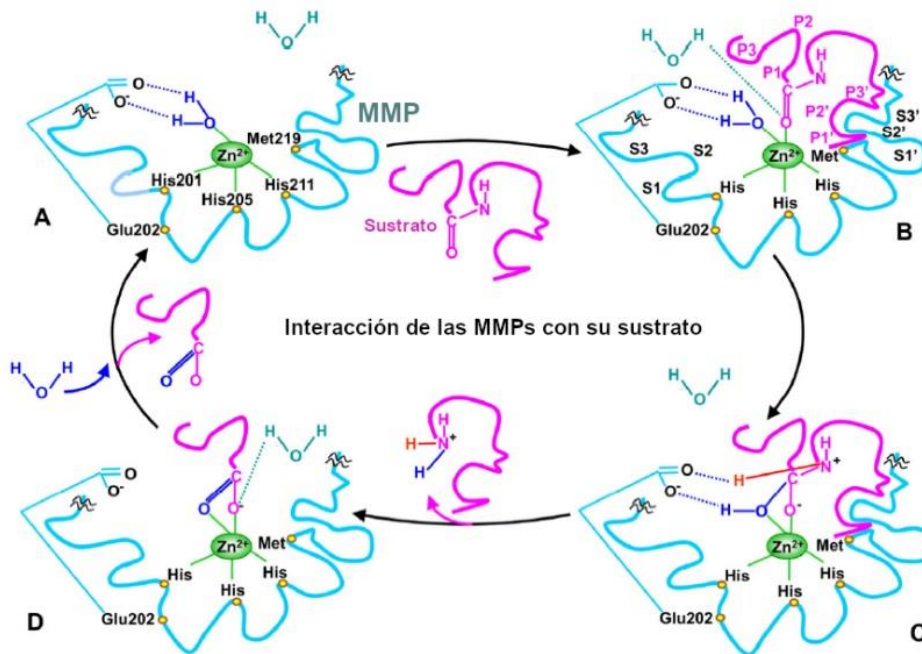


Figura 14. Adaptado de *Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases*, (Cui, 2018), *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. **Interacción de las MMPs con su sustrato.** **A:** Un residuo de ácido glutámico adyacente a la histidina atrae una molécula de agua que utiliza para asociarse al átomo de Zinc. **B:** El sustrato interactúa con el átomo de zinc de la MMP a través de un grupo carbonilo y un átomo de hidrógeno de otra molécula de agua. **C:** El rompimiento del sustrato se lleva a cabo cuando el átomo de hidrógeno que une al grupo carbonilo con el Zinc se libera, provocando que la molécula de agua unida al ácido glutámico forme dos nuevos enlaces: el átomo de oxígeno del agua con un carbono del sustrato y el átomo de hidrógeno del agua con un átomo nitrógeno del sustrato. **D:** Los dos nuevos enlaces entre una molécula de agua y el sustrato resultan en el rompimiento de la molécula.

2.5.2.4 Moléculas reguladoras de las MMPs. Los TIMPs.

Se han descrito dos tipos de reguladores de MMPs: los inespecíficos como las macroglobulinas y los específicos como los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) (Klein y Bischoff 2011).

Las macroglobulinas son proteínas muy pesadas (180-725kDa) localizadas en el suero que tienen la habilidad de inhibir a una gran cantidad de proteinasas incluyendo a las MMPs (Nissinen y Kahari 2014). Dentro de las macroglobulinas se

encuentra la α 2 macroglobulina, la α 1 macroglobulina, α 1 inhibidor de la proteína de gestación zonal y la ovomacroglobulina (ovostatina) (Curry y Osteen 2003).

Los TIMPs son proteínas de entre 21 a 30 kDa producidas localmente que inhiben específicamente MMPs. Hasta la fecha en vertebrados se han identificado cuatro TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) (Li, Tay y Yiu 2019).

Los TIMPs funcionan a través de la interacción de su dominio N terminal con el sitio catalítico de la MMP (Zakiyanov et al. 2019).

El dominio N terminal del TIMP contiene un residuo cisteína, este residuo junto con un grupo amino y un grupo carbonilo, se unen al átomo de Zinc de la MMP y expelen la molécula de agua asociada al ácido glutámico, inhibiendo así, el sitio catalítico de la MMP (Visse y Nagase 2003) (**Figura 15**).

Un desbalance entre la producción de MMPs y TIMPs puede aumentar el daño tisular, por ello, las MMPs han sido asociadas a la patogénesis de diversos procesos degradativos de los tejidos como: esclerosis múltiple, pérdida de dientes, progresión y metástasis tumoral, arterioesclerosis y formación de aneurismas. (Cui, Hu y Khalil 2017)

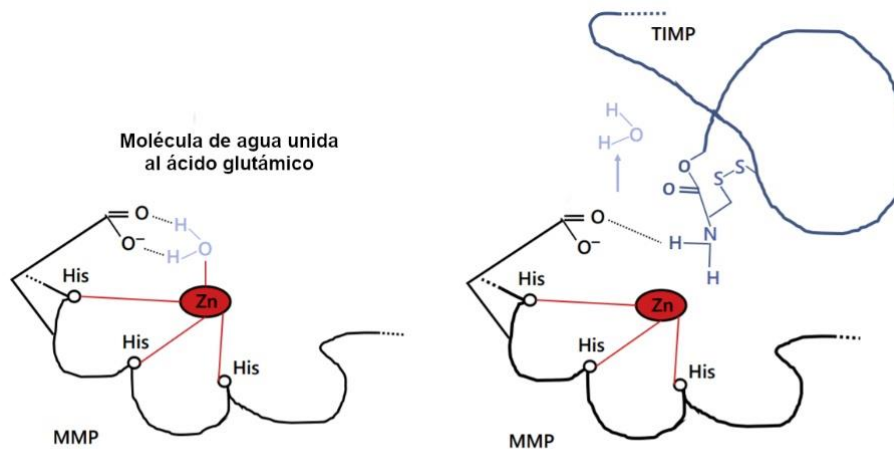


Figura 15. Adaptado de: Matrix Metalloproteinases in Renal Diseases: A critical Appraisal, (Zakiyanov, 2019), Kidney and Blood Pressure Research. **TIMP. Interacción con la MMP.** El TIMP interactúa con la enzima a través de la asociación de su región amino terminal, un grupo cisteína y un grupo carbonilo con el átomo de zinc de la MMP. Esto provoca que se disocie la molécula de agua unida al ácido glutámico de la MMP impidiendo la reacción catalítica con el sustrato.

2.5.2.5 Gelatinasas MMP-2 y MMP-9.

La MMP-2 de 72 kDa y 63 kDa en su forma inactiva y activa respectivamente, así como la MMP-9 de 92kDa y 86kDa (Cui, Hu, and Khalil 2017) son reconocidas por ser las que más contribuyen a la degradación de la MEC (Matriz Extracelular), esto ha conducido a ser asociadas en la regulación tanto de procesos fisiológicos como patológicos incluyendo: el crecimiento embrionario, la angiogénesis, la presentación de enfermedades vasculares, en la reacción inflamatoria, progresión de infecciones (al activar a la IL-1 β), el desarrollo de enfermedades degenerativas cerebrales y sobre todo en progresión de cáncer (al inhibir la actividad de las integrinas) (Cui, Hu y Khalil 2017).

Diferentes estudios han encontrado concentraciones elevadas de MMP-2 y MMP-9 en el líquido sinovial proveniente de distintas enfermedades articulares en humano, en perro y en equino, así como en lavados bronqueo alveolares de equinos con un cuadro de inflamación crónica pulmonar y hallazgo histológico de acumulación de neutrófilos (Rossi et al. 2017).

Además, la MMP-9 se ha asociado a la ruptura prematura de membranas fetales (PPROM) en humanos debido a una disrupción de la red de colágeno dentro del amnios (Tchirikov et al. 2018).

La MMP-2 se encuentra localizada en la superficie celular unida por su extremo carboxilo terminal a la integrina $\alpha\beta 3$ o al complejo MMP-14 (MT-MMP1) /TIMP-2, mientras que la cadena $\alpha 2$ del colágeno IV se une a MMP-9 con una gran afinidad incluso cuando MMP-9 está inactiva (Somerville, Oblander y Apte 2003).

La activación de MMP-2 es provocada por la habilidad del dominio C terminal del TIMP-2 de unirse a la *proMMP-2* para formar el complejo MMP-2/TIMP-2. Este complejo, a su vez, se une al dominio extracelular de MT-MMP1. Finalmente, el prodominio de la *proMMP-2* dentro del trinomio MT1-MMP/TIMP-2/*proMMP-2* localizado en la superficie celular es escindido por otra MT1-MMP adyacente activando a la gelatinasa (Curry y Osteen 2003) **(Figura 16)**.

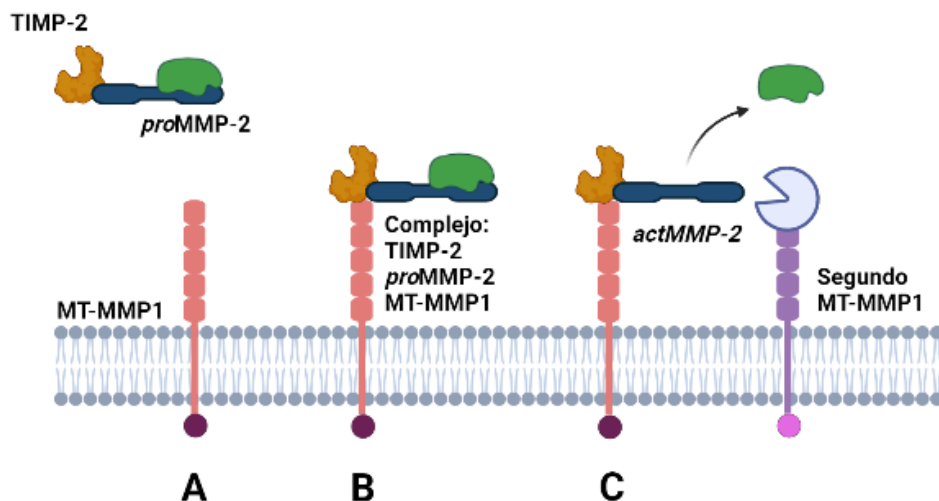


Figura 16. Adaptado de: The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle, (Curry, 2003), Endocrine Review y creado en BioRender. **Activación de la MMP-2.** **A:** Para que la gelatinasa A o *proMMP-2* pase de su forma de zimógeno a su forma activa requiere unirse al inhibidor TIMP-2. **B:** Posteriormente *proMMP-2* junto con TIMP-2 se unen a la metaloproteína membranar MT-MMP1. **C:** Finalmente, una segunda MT-MMP1 adyacente al complejo *proMMP-2*/TIMP-2/MT-MMP1 es la encargada de escindir el prodominio de la *proMMP-2* activando la enzima (*actMMP-2*).

3.0 JUSTIFICACIÓN

La placentitis equina se ha asociado como causa de abortos espontáneos y muerte de yeguas y potros hasta en un 10% de los casos (Cummins et al. 2008). Los signos principales de la placentitis son el desarrollo prematuro de la glándula mamaria y la descarga vulvar, sin embargo, estos pueden presentarse de forma tardía (entre los 244 y 316 días de gestación) (Ousey et al. 2005) lo que dificulta el tratamiento y compromete el bienestar de la yegua y del potro (Macpherson y Bailey 2008).

En la práctica clínica, una de las principales acciones a realizar en las yeguas gestantes con diagnóstico de placentitis es el retrasar las señales de parto debido a que el desarrollo final de la cría ocurre tan solo de 4 a 5 días antes de finalizar la gestación (Fowden, Giussani y Forhead 2020). Los nacimientos prematuros derogan altos costos, así como de cuidados especiales en los potros para salvaguardar su vida; sin embargo, esto no garantiza que goce de plena salud para tener una vida atlética, por lo tanto, el diagnóstico y tratamiento oportuno de la placentitis es clave para la sobrevivencia de la cría (LeBlanc 2010).

La técnica de diagnóstico comúnmente utilizada para la detección de la placentitis es el ultrasonido transrectal en la que se evalúa el grosor del útero y de la placenta; pero, si la patología se presenta de forma subclínica, la enfermedad puede pasar desapercibida (Macpherson 2006).

Diferentes investigaciones han propuesto el uso diagnóstico de biomarcadores endocrinos en circulación como el 17β estradiol y la progesterona total (Fedorka et al. 2019), siendo esta última la más utilizada, sin embargo, el monitoreo de la concentración de esta hormona puede ser contradictorio, ya que la progesterona que es sintetizada por el feto equino es rápidamente metabolizada en una gran variedad de progestinas (Macpherson y Bailey 2008). Además, Wynn et al., (2018) demostraron que la concentración de las progestinas en yeguas con placentitis es variable y depende de la evolución de la infección (Wynn et al. 2018).

Este grupo de investigación indujo placentitis con *Streptococcus equi subs zooepidemicus* a yeguas entre los 260-280 días de gestación y las clasificaron en dos grupos: las yeguas que presentaron aborto antes de los 8 días post inoculación en el grupo infección aguda, mientras que si el aborto se presentó después de los 8 días post inoculación dichas yeguas formaron parte del grupo infección crónica.

Aquellas yeguas del grupo infección crónica presentaron concentraciones plasmáticas de progestinas mayores comparadas con el grupo control, mientras que, las yeguas del grupo infección aguda presentaron concentraciones plasmáticas de progestinas por debajo del grupo control. Este hecho coloca en disyuntiva el diagnóstico de placentitis por concentración de la progesterona total, debido a que se tendría que tomar en cuenta el curso de la enfermedad en cada yegua.

Otros marcadores que se han utilizado para el diagnóstico de placentitis en yeguas son las proteínas de fase aguda como el fibrinógeno o la proteína amiloide sérica A (Canisso, Loux y Lima 2020), no obstante, el fibrinógeno no mostró cambios significativos entre las yeguas con placentitis con respecto a las sanas (Canisso et al. 2014), mientras que, la concentración de la proteína amiloide sérica si aumenta durante la placentitis en yeguas (Canisso et al. 2014), sin embargo, la expresión de esta molécula es fácilmente sobre regulada por la presencia de artritis (Jacobsen, Thomsen y Nanni 2006) o el ejercicio (Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019).

La IL-6 y la proteína C-reactiva también han sido evaluadas como marcadores de amnionitis, funisitis y sepsis neonatal tanto en líquido amniótico como en cordón umbilical (Hatzidaki et al. 2005), sin embargo, a pesar que la concentración media determinada para las diferentes patologías si fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control, el rango resultante es muy amplio (11.6-4485ng/mL en grupo control con respecto a 44.3-7401ng/mL en el grupo con amnionitis) lo que, por ahora, dificulta el uso de estas moléculas como marcadores (Tasci et al. 2006, Yoon et al. 2003).

Por otro lado, en humanos se ha demostrado que, durante la ruptura prematura de membranas fetales con el consiguiente parto prematuro o aborto, la IL-1 β se produce en mayores concentraciones por estímulo bacteriano, es por ello se ha sugerido a la IL-1 β como un marcador temprano de infección de los tejidos fetales y maternos durante la gestación (Scott et al. 2017).

Finalmente, se ha demostrado en diferentes modelos la presencia de MMPs durante distintos procesos reproductivos, dentro de los que se encuentra la gestación y el parto, así como en procesos patológicos durante el embarazo como la preeclamsia (Chen and Khalil 2017). Además, particularmente, en equinos se ha asociado una desregulación en la secreción de MMPs con la retención placentaria en yeguas (Jaworska and Janowski 2019).

Con base en lo anterior, consideramos importante conocer si algunos marcadores inmunes de inflamación durante un proceso de placentitis en equinos pueden ser asociados a la enfermedad y a la vez evaluados en circulación, para ello, en el presente trabajo determinamos en el suero de yeguas sanas y en casos con desarrollo de placentitis tanto la concentración de la IL-1 β equina (eIL-1 β) como la actividad degradativa de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 a los 240 y 320 días de gestación.

4.0 HIPÓTESIS.

La presentación de placentitis en las yeguas gestantes incrementará la concentración sérica de la eIL-1 β y la actividad colagenolítica de la MMP-2, y -9 con respecto a las yeguas sanas.

5.0 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el perfil de secreción de la respuesta proinflamatoria y de las metaloproteinasas de matriz extracelular en el suero de yeguas con diagnóstico de placentitis a los 240 y 320 días de gestación.

5.1 Objetivos particulares.

1. Comparar la concentración de la eIL-1 β en el suero de yeguas sanas y con parto a término con respecto a las yeguas que desarrollaron placentitis.
2. Comparar la actividad degradativa de la MMP-2 y -9 en el suero de yeguas sanas y con parto a término con respecto a las yeguas que desarrollaron placentitis.
3. Evaluar como marcadores de presentación de placentitis los niveles en el suero de yeguas gestantes de eIL-1 β y de MMP-2 y 9.

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Yeguas de estudio.

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de 16 yeguas pura sangre inglesa (PSI) con un promedio de edad de 12 años y entre los 500-600 Kg de peso pertenecientes a un criadero de caballos privado de la localidad de Atizapán de Zaragoza, Estado de México.

Las yeguas viven en pradera, donde tienen agua a libre acceso y un área de comederos. Su alimentación es a base de heno de alfalfa y avena que les administran una vez al día, más un suplemento de granos dos veces al día.

La gestación se estableció por monta natural. La temporada de partos ocurrió durante los meses de enero a mayo del 2019. Las yeguas, durante la gestación, el parto, y el posparto, así como los primeros días de vida de los potros, estuvieron bajo supervisión constante tanto de los cuidadores como por los médicos veterinarios.

6.2 Características del estudio.

6.2.1 Criterios de inclusión.

Se diagnosticó con placentitis a aquellas yeguas que presentaron descarga vulvar y/o crecimiento de glándula mamaria antes de las 4 semanas finales a la fecha probable de parto (McAfoos, Ellerbrock y Canisso 2019). Así mismo, si presentó aborto o si durante el parto la placenta mostró edema, congestión, necrosis o exudado purulento, ya sea local o generalizado (Cummins et al. 2008, LeBlanc 2010).

Adicionalmente, en el día 240 y 230 días de gestación se realizó un ultrasonido transrectal. Durante el análisis ultrasonográfico, las yeguas que presentaron un

grosor de útero y placenta (CTUP) mayor a 7mm en el día 240 de gestación y/o mayor a 10mm en el día 320, fueron consideradas dentro del grupo evidentes de placentitis (n=3), mientras que, si el resultado del ultrasonido fue normal pero presentaban los signos clínicos o cambios en la placenta antes mencionados se agruparon en el grupo sugerentes de placentitis (n=7) (Cummins et al. 2008) **(Figura 17)**.

En conjunto con lo anterior, la salud del potro también fue evaluada para determinar la relación potro séptico asociado a placentitis (Borba et al. 2020). De esta manera, los grupos a evaluar se integraron según los signos clínicos asociados a placentitis, la medición del CTUP por ultrasonido y la condición clínica del potro **(Cuadro 3)**.

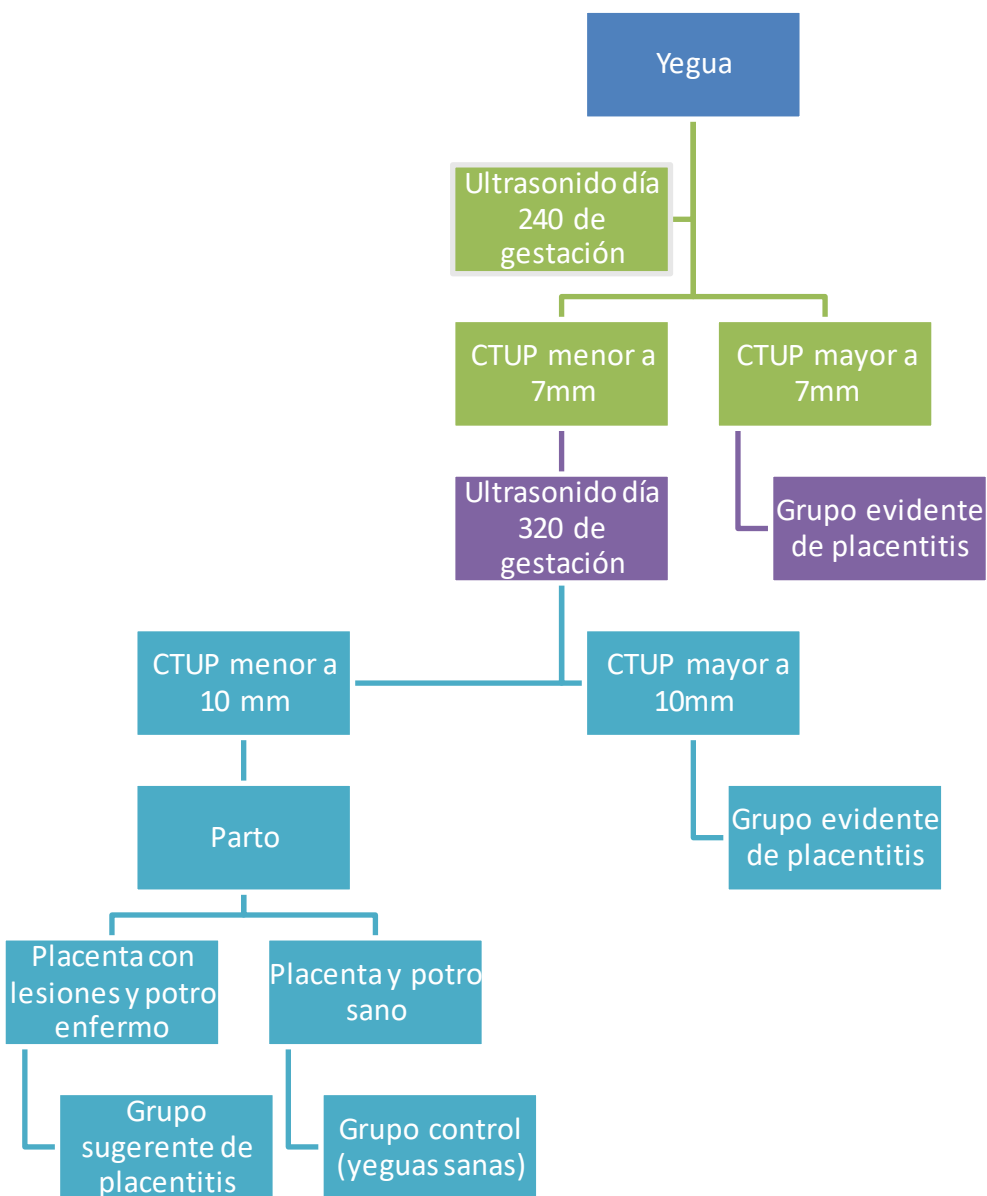


Figura 17. Esquema tipo árbol de decisiones para clasificar a las yeguas en los grupos evidente y sugere[n]te de placentitis

Cuadro 3. Asignación de las yeguas por el ultrasonido

Ultrasonido Yeguas	Potro	N
Sanas	Sano	6
Sugerentes de placentitis	Sano	3
	Séptico	1
	Muerto	3
Evidentes de placentitis	Séptico	3

6.2.2 Criterios de exclusión.

Yeguas gestantes que hayan recibido tratamientos antimicrobianos a lo largo de su gestación.

6.2.3 Criterios de eliminación.

Cuando la muestra de plasma fue < a 1200 μ L para la determinación de la eIL-1 β y de la MMP-2 y MMP-9.

6.3 Obtención y procesamiento del suero.

En los días 240 y 320 de gestación se tomó una muestra sanguínea periférica. La sangre fue depositada en tubos BD Vacutainer (Becton Dickibson & Company) e inmediatamente centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. Se recolectó el suero y este se almacenó a -70°C hasta la cuantificación de la eIL-1 β mediante la técnica de ELISA y la actividad de la MMP-2 y -9 la cual se realizó mediante geles de poliacrilamida.

6.4 Cuantificación de la eIL-1 β .

La eIL-1 β fue determinada a partir de 100 μ L de suero en un kit específico de ELISA tipo sándwich (DY3340, R&D System, Minneapolis, MN, USA). El ensayo se realizó mediante las recomendaciones de la casa comercial y como ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación (**Ver Anexo: Protocolo del ELISA sección 11.2**) (Alvarez-Cabrera et al. 2018, Flores-Herrera et al. 2012). De forma

breve: el procedimiento consistió en incubar una placa de 96 pozos toda la noche a temperatura ambiente con 100µL por pozo del anticuerpo de captura (Goat Anti-Equine IL-1β) a una concentración de 800ng/mL diluido en solución amortiguadora de fosfato salino (PBS). Posteriormente, la placa fue sellada con una membrana adhesiva para evitar evaporación.

Al día siguiente se realizó la aspiración y lavado de la placa con solución de lavado que contiene 0.05% de Tween 20 en solución PBS. Este paso se repitió tres veces. Posteriormente, se adicionó 100 µL por pozo de solución de bloqueo que contiene 1% de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS. La placa se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.

Después del tiempo de incubación de la solución de bloqueo, se realizó un nuevo lavado y se colocaron las muestras y los estándares. En los primeros pozos se colocó 100µL de la curva estándar que corresponden a 7 diluciones dobles seriadas de 125 a 8000pg/mL de eIL-1β (primeras dos columnas de la placa). En la siguiente columna se adicionó en cada pozo 100µL del suero de cada una de las yeguas por duplicado. La placa fue incubada por 2 horas a temperatura ambiente.

Al término del tiempo de incubación de la curva estándar y las muestras séricas, se realizó un nuevo lavado de la placa como se mencionó previamente y se agregó 100µL por pozo del anticuerpo de detección (Biotinylated Goat Anti-Equine IL-1β Detection Antibody) a una concentración de 150 ng/mL diluido en solución de bloqueo 1% BSA. El anticuerpo de detección se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la placa y se agregó 100µL a cada pozo de estreptavidina asociada a peroxidasa de rábano (Streptavidin-HRP) en una dilución 1/200 según el vial disponible en el kit (**Ver Anexo: Protocolo del ELISA**). La placa se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente cubriéndola de la luz.

Finalmente, se realizó un último lavado de la placa y se colocó 100µL por pozo de

una solución de tetrametilbencidina (TMB) con peróxido de hidrógeno a una proporción 1:1 por 20 minutos y se adicionó la solución de paro que consiste en ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄).

La placa fue leída en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm y los resultados fueron expresados en unidades de pg/mL.

6.5 Actividad de la MMP-2 y MMP-9.

Las muestras fueron procesadas como ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación (**Ver Anexo: Protocolo para la Zimografía sección 11.4**). (Flores-Herrera et al. 2012) Geles de SDS poliacrilamida 8.0% fueron copolimerizados con 5 mg/mL de gelatina porcina como sustrato.

En el primer pozo se colocó 15 µL del marcador de movilidad estándar para *proMMP-2* y *proMMP-9* U937 derivado de células de promielocito (ATCC, CRL-1593.2; Manassas, VA, USA). En los siguientes pozos se colocaron las diferentes muestras de suero derivadas de las yeguas a una concentración de 0.75µg/µL de proteína (concentración determinada previamente mediante el método Bradford) diluidas en 5 µL de buffer de carga compuesto por Tris Base (0.5M pH 6.8), 10% de glicerol y 0.1% de azul de bromofenol, así como 9 µL de PBS (**Ver Anexo: Preparación de las Soluciones y equipo para Zimografía sección 11.3**).

Los geles se corrieron a voltaje constante de 25 mA a 4°C por 90 minutos en una solución compuesta por Tris Base, glicina y SDS (**Ver anexo: Soluciones Zimografía**). Después de este tiempo, los geles fueron lavados dos veces por 15 minutos a temperatura ambiente con Triton 2.5% en constante agitación.

Posteriormente, los geles fueron incubados toda la noche a 37°C en una solución de activación compuesta por 50Mm Tris (pH 7.4), 0.1M CaCl₂, 0.15M NaCl, y

0.2mg/mL NaN₃. A continuación, los geles fueron teñidos por una hora en una solución con 1% de azul de Coomassie diluido en metanol: ácido acético: glicerol: agua (10:10:10:70) a temperatura ambiente. Al término de esta incubación los geles fueron lavados en solución de metanol: ácido acético: agua (10:10:80) por 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

Finalmente, las bandas de lisis se visualizaron en el transiluminador (EpiChem Darkroom gel documentation system) y semicuantificadas mediante el programa ImageJ cuya medición fue expresada como unidades relativas de densidad óptica.

6.6 Análisis estadístico.

La diferencia de la edad de las yeguas, fecha de parto entre los grupos, la concentración de la eIL-1 β y la densidad óptica de las bandas de lisis de la MMP-2 y -9 se determinó mediante la prueba estadística de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) considerando diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$. Los valores se presentan como la media \pm desviación estándar.

7.0 RESULTADOS.

7.1 Características de las yeguas de estudio.

En el **cuadro 4** se observan las características entre las yeguas sanas con potros sanos (grupo control; n=6) y yeguas con diagnóstico de placentitis que se determinó por signos clínicos y examen físico e histológico de la placenta (n=10) y las cuales fueron divididas en dos grupos de acuerdo al monitoreo de ultrasonido en sugerente de placentitis (n=7) para las yeguas cuyas mediciones de CTUP fueron normales pero la evaluación clínica final tanto de la placenta como del potro durante el parto fue consistente a diagnóstico de placentitis; y en grupo evidente de placentitis (n=3) para aquellas yeguas cuyas mediciones de CTUP se hallaron incrementadas.

La edad promedio de las yeguas sanas fue de 12.5 ± 4.8 años y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las edades de las yeguas de los casos sugestivos y evidentes de placentitis ($p = 0.799$).

En las yeguas sanas no se presentaron complicaciones clínicas evidentes al término de su gestación, la cual fue de 344.8 ± 5.3 días, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las yeguas con signos sugestivos o evidentes de placentitis ($p = 0.065$), excepto en una que abortó a los 308 días ($p \leq 0.05$), y en un caso de yegua con signos sugestivos de placentitis que parió a los 332 días a un potro séptico muerto ($p \leq 0.05$; **Cuadro 4**).

El peso de los potros en el grupo de las yeguas sanas fue de 51.3 ± 5.7 Kg, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al peso de los potros de los casos sugerentes y evidentes de placentitis ($p = 0.134$).

Cuadro 4. Características de las yeguas en relación con la viabilidad de los potros

Variable	SANAS (n=6)	CASOS (n=10)			
		Con signos sugestivos de placentitis (n=7)		Con signos evidentes de placentitis (n=3)	
	Potro vivos (n=6)	potro Vivos (n=3)	potros sépticos PSeV (n=1)	potros sépticos Muertos (n=3)	potros sépticos Vivos (n=3)
Yeguas					
Edad, años (rango)	12.5±4.8 (9-22)	9.3±4.1 (6-14)	14	14.6±4.9 (9-18)	9.0±3.6 (6-13)
Parto, días (rango)	344.8±5.3 (338-350)	337.3±11.9 (329-351)	351	321±11.5 ^a (308-329)	329.0±3.6 (325-332)
Potros					
Peso, Kg (rango)	51.3±5.7 (44-57)	45±3.6 (42-49)	50.0	44.0	41.6±8.7 (32-49)

Los valores se muestran como la media ± desviación estándar. Dato no determinado (ND) ya que la yegua termino su gestación a los 308 antes de la segunda toma de la muestra (320 días). (a) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de yeguas sanas p= 0.0122

7.2 Cuantificación de la eIL-1 β .

La concentración de la eIL-1 β en el suero de las yeguas gestantes sanas y de las yeguas con placentitis se realizó a los 240 (**Figura 17**) y a los 320 días de gestación (**Figura 18**).

7.2.1 Cuantificación de eIL-1 β a los 240 días de gestación.

La concentración de la eIL-1 β en las yeguas sanas fue de 20.17 \pm 3.8 ng/mL la cual aumentó 2.6-veces en las yeguas sugerentes de placentitis con potro vivo (sP-PV); sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de las yeguas sanas ($p>0.999$; **Figura 17**). La concentración de la eIL-1 β en el grupo sugerente de placentitis aumentó significativamente 263.6-veces ($p<0.0001$) con potro séptico vivo (sP-PSeV), y 373.4-veces ($p<0.0001$) si la yegua presentaba un potro muerto (sP-PM) con respecto al grupo de las yeguas sanas (**Figura 18**).

En el grupo de yeguas con evidencias clínicas de placentitis y con potro séptico vivo (eP-PSeV) la concentración de eIL-1- β disminuyó 2.05-veces; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto a las yeguas sanas ($p>0.9999$) (**Figura 18**).

7.2.2 Cuantificación de la eIL-1 β a los 320 días de gestación.

La concentración de la eIL-1 β en las yeguas sanas fue de 333.21 \pm 88.9 ng/mL, la cual disminuyó 1.2-veces en las yeguas sugerentes de placentitis con potro vivo; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo de las yeguas sanas (**Figura 19**).

La concentración de eIL-1 β aumentó significativamente en 7.8-, 18.7-, y 5.8-veces en las yeguas sugerentes de placentitis y potro séptico vivo ($p=0.0004$), potro séptico muerto ($p<0.0001$), y en las yeguas con evidencias clínicas de placentitis

con potro séptico vivo ($p=0.0014$) respectivamente en relación con las yeguas sanas (Figura 19).

En la siguiente fase de la respuesta inflamatoria se activan las metaloproteinasas de matriz extracelular, por lo que se determinó mediante la técnica de zimografía el perfil de actividad lítica de la *proMMP-2* y *proMMP-9* en el suero de las yeguas como ha sido reportado en las membranas fetales en otros modelos de infección (Flores-Herrera et al. 2012, Nissinen y Kahari 2014).

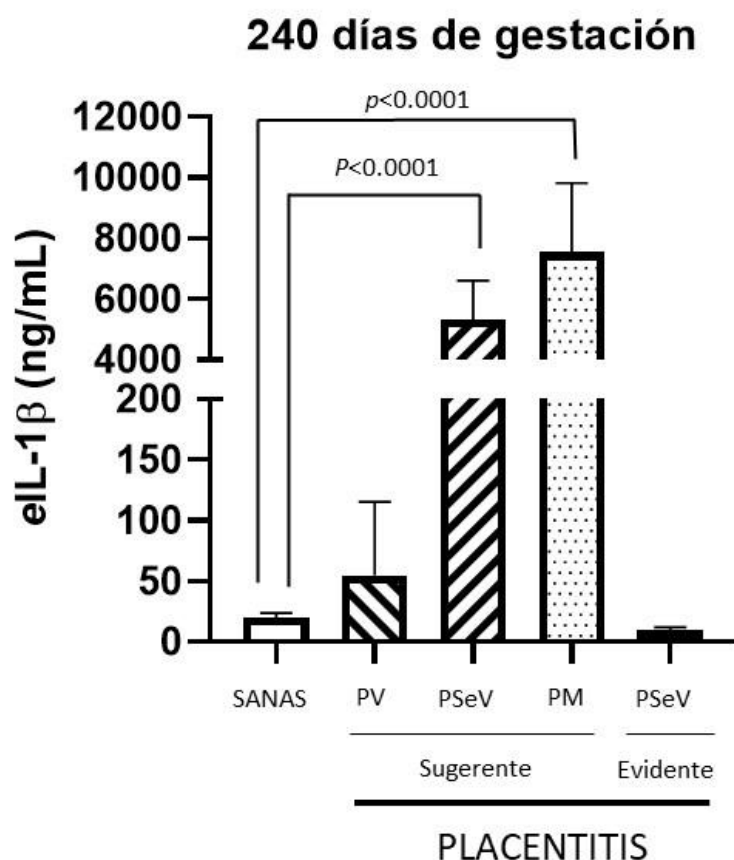


Figura 18 Comparación de eIL-1 β en el suero de las yeguas a los 240 días de gestación. Se muestra la concentración de eIL-1 β en: yeguas sanas (n=6), yeguas sugerentes (sP; n=7) y evidentes de placentitis (eP; n=3). Potro vivo (PV), potro séptico vivo (PSeV) y potro muerto (PM). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar.

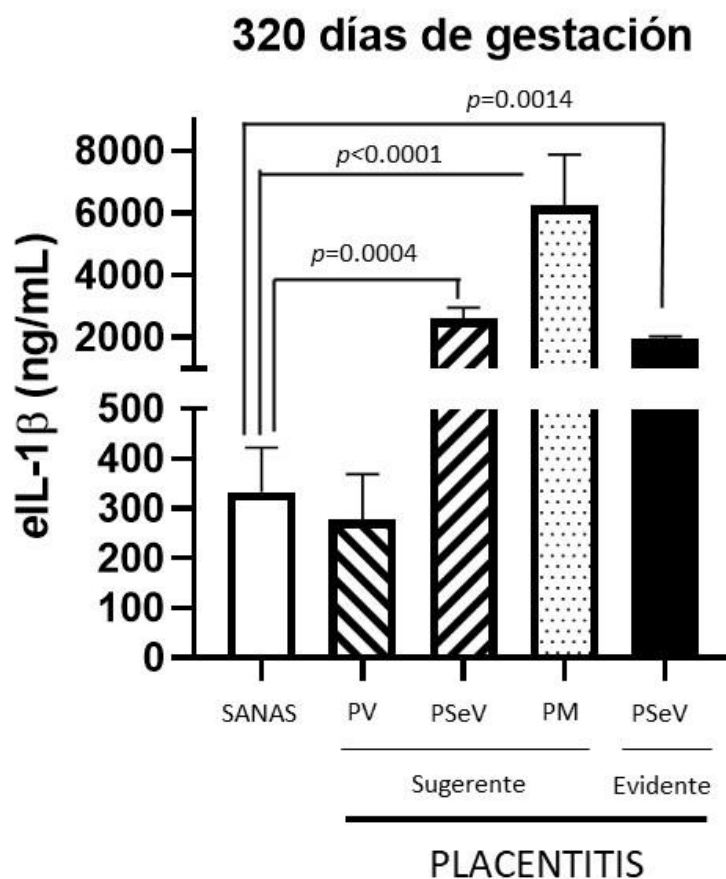


Figura 19 Comparación de eIL-1 β en el suero de las yeguas a los 320 días de gestación. Se muestra la concentración de eIL-1 β en: yeguas sanas (n=6), yeguas sugerentes (sP; n=7) y evidentes de placentitis (eP; n=3). Potro vivo (PV), potro séptico vivo (PSeV) y potro muerto (PM). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar.

7.3 Actividad de la proMMP-2 a los 240 y 320 días de gestación.

La **Figura 20** muestra el perfil de actividad de la forma inactiva de la MMP-2 (proMMP-2) en las yeguas sanas y en las yeguas con y sin evidencias clínicas de placentitis a los 240 (**Figura 20B**) y 320 días de gestación respectivamente (**Figura 20C**).

7.3.1 Actividad de la proMMP-2 a los 240 días de gestación.

En las yeguas sanas se determinó que la proMMP-2 a los 240 días fue de 924.4 ± 233.2 (**Figura 20B**). Este perfil de secreción disminuye 1.1-veces en las yeguas con datos sugestivos de placentitis con potro vivo; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control ($p=0.9858$; **Figura 20B**).

En las yeguas sugestivas de placentitis y con potro séptico vivo y en las yeguas con potro muerto se encontró un aumento de 1.5- ($p=0.5472$) y 1.1- ($p=0.9335$) veces la actividad de la *proMMP-2*; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo de yeguas sanas (**Figura 20B**).

En las yeguas con evidencia de placentitis y potro séptico vivo, se observó un incremento de 1.1-veces; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de las yeguas sanas ($p=0.9770$; **Figura 20B**)

7.3.2 Actividad de la *proMMP-2* a los 320 días de gestación.

En las yeguas sanas se determinó que la *proMMP-2* a los 320 días de gestación fue de 876.7 ± 257.4 (**Figura 20C**). Este perfil de secreción disminuye 1.04-veces en yeguas con signos sugestivos de placentitis con potro vivo, sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control ($p=0.8517$; **Figura 20C**).

En yeguas sugerentes de placentitis con potro séptico vivo y potro muerto, se encontró un incremento de 1.52-veces ($p=0.2532$) y 1.27-veces ($p=0.1003$) en la actividad de la *proMMP-2* respectivamente, sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de las yeguas sanas (**Figura 20C**).

En yeguas con evidencia de placentitis y potro séptico vivo, se observó un incremento de 1.18-veces; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de las yeguas sanas ($p=0.4085$; **Figura 20C**).

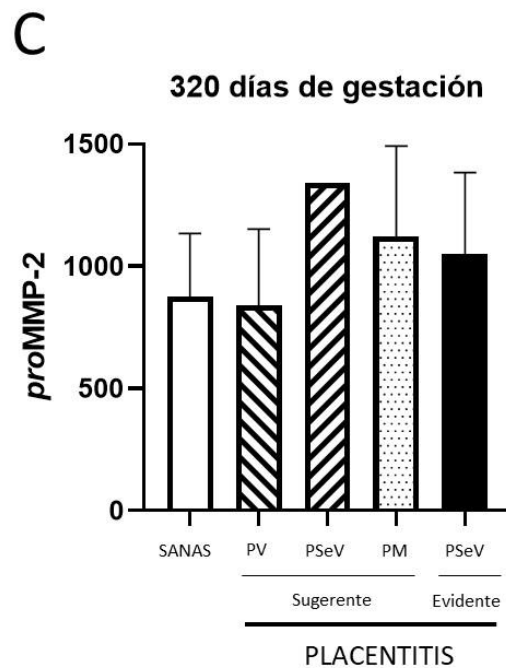
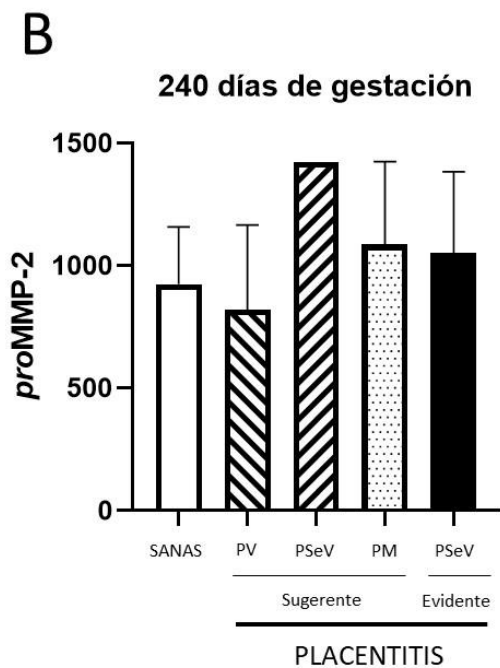
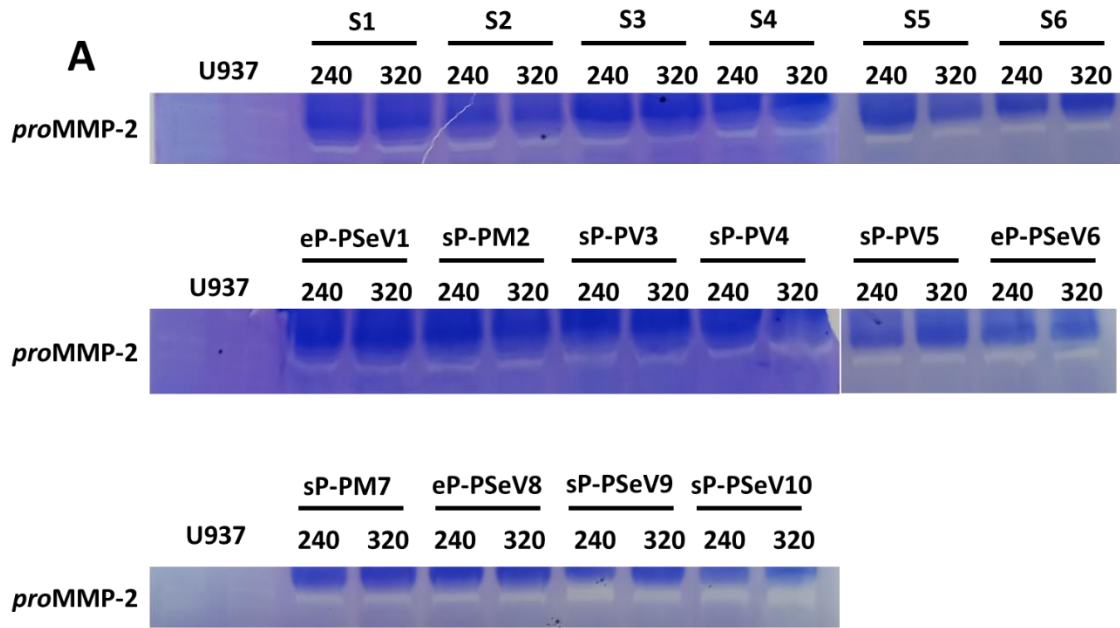


Figura 20. Actividad de la *proMMP-2* en el suero de las yeguas a los 240 y 320 días de gestación. Se muestra la banda de actividad del marcador de movilidad electroforética U937 (carril 1 y 2) y de las muestras de las yeguas sanas (S1-6), de las yeguas sugerentes (sP) y evidentes de placentitis (eP). Potro vivo (PV), potro séptico vivo (PSeV) y potro muerto (PM). **(A)**. Se determinó la densidad óptica de cada banda de lisis a los 240 **(B)** y 320 días de gestación **(C)**. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar.

7.4 Actividad de la proMMP-9 a los 240 y 320 días de gestación.

La **figura 20** muestra el perfil de actividad tanto de *proMMP-9* como de la forma activa (*actMMP-9*) en las yeguas sanas y en las yeguas con y sin evidencias clínicas de placentitis a los 240 (**Figura 21B**) y 320 días de gestación (**Figura 21C**).

7.4.1 Actividad de la proMMP-9 a los 240 días de gestación.

En las yeguas sanas, la *proMMP-9* a los 240 días fue de 573.2 ± 209.6 (**Figura 21B**). Este perfil de secreción disminuye 1.05-veces para la *proMMP-9* en las yeguas con datos sugestivos de placentitis con potro vivo; sin embargo, no fue estadísticamente significativas con respecto a las yeguas sanas ($p=0.8710$; **Figura 21B**). En las yeguas sugestivas de placentitis y con potro séptico vivo, y en las yeguas con potro muerto se observó un aumento para la *proMMP-9* de 1.3- ($p=0.9921$), y 1.16-veces ($p=0.9921$); sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo de yeguas sanas (**Figura 21B**).

En las yeguas con evidencias de placentitis y con potro séptico vivo se encontró un aumento de 1.35-veces; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de yeguas sanas ($p=0.8754$; **Figura 21B**).

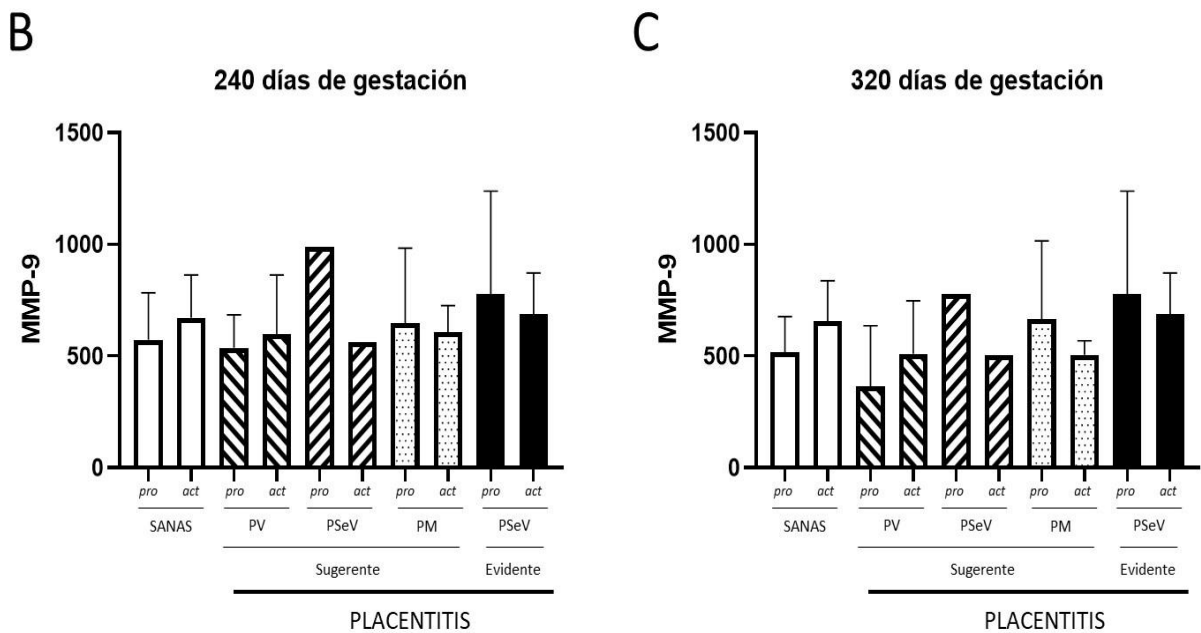
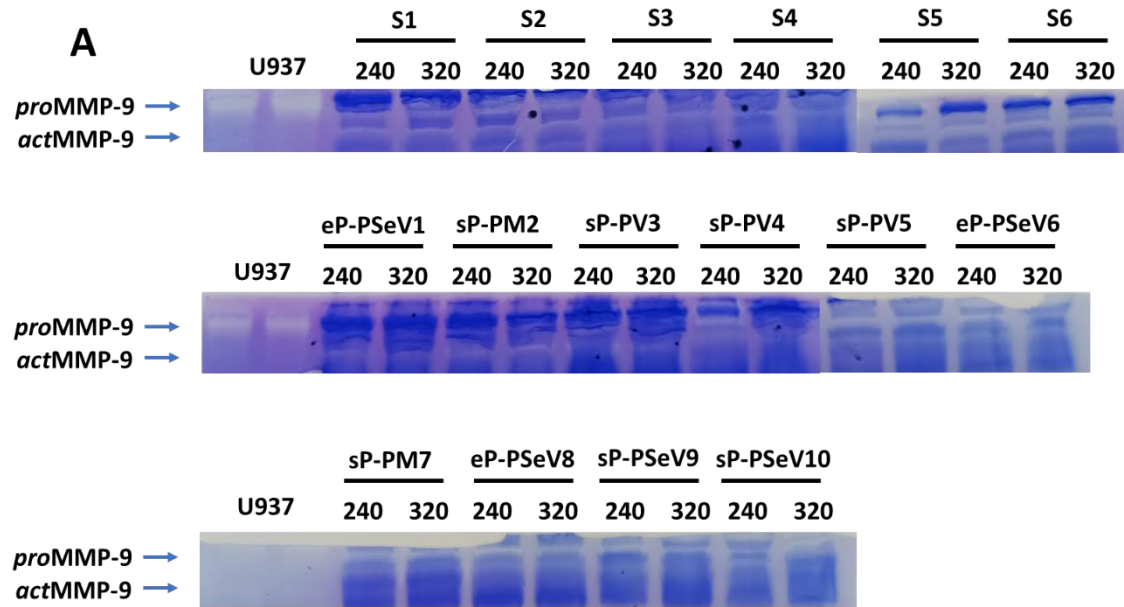


Figura 21. Actividad de la *proMMP-9* y *actMMP-9* en el suero de las yeguas a los 240 y 320 días de gestación. Se muestra la banda de actividad del marcador de movilidad electroforética U937 (carril 1 y 2) y de las muestras de las yeguas sanas (S1-6), de las yeguas sugерentes (sP) y evidentes de placentitis (eP). Potro vivo (PV), potro séptico vivo (PSeV), potro muerto (PM). (A). Se determinó la densidad óptica de cada banda de lisis a los 240 (B) y 320 días de gestación (C). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar.

7.4.2 Actividad de la actMMP-9 a los 240 días de gestación.

En las yeguas sanas se localizó la isoforma activa de la MMP-9 a los 240 días de gestación, la cual fue de 671.9 ± 191.1 (**Figura 21B**). Este perfil de secreción disminuye 1.12-veces para la actMMP-9 en las yeguas con datos sugestivos de placentitis con potro vivo; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto a las yeguas sanas ($p=0.9805$; **Figura 21B**).

En las yeguas sugestivas de placentitis y con potro séptico vivo, y en las yeguas con potro muerto se encontró una disminución de 1.19- ($p=0.9838$), y 1.10-veces ($p=0.9883$); sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo de yeguas sanas (**Figura 21B**).

En las yeguas con evidencias de placentitis y con potro séptico vivo, se observó un aumento de 1.02-veces en la actMMP-9; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de yeguas sanas ($p<0.9999$; **Figura 21B**).

7.4.3 Actividad de la proMMP-9 a los 320 días de gestación.

En las yeguas sanas se determinó que la proMMP-9 a los 320 días fue de 517.2 ± 160.3 (**Figura 21C**). Este perfil de secreción disminuye 1.41-veces para la proMMP-9 en las yeguas con datos sugestivos de placentitis con potro vivo; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto a las yeguas sanas ($p=0.9460$; **Figura 21C**). En las yeguas sugestivas de placentitis y con potro séptico vivo, y en las yeguas con potro muerto se encontró un aumento de 1.5- ($p=0.9186$), y 1.28-veces ($p=0.9486$); sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo de yeguas sanas (**Figura 21C**).

En las yeguas con evidencias de placentitis y con potro séptico vivo, se observó un aumento de 1.5-veces en la actividad de la proMMP-9; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de yeguas sanas ($p=0.9271$; **Figura 21C**).

7.4.4 Actividad de la actMMP-9 a los 320 días de gestación.

En las yeguas sanas se localizó la isoforma activa de la MMP-9 a los 320 días de gestación la cual fue de 655.5 ± 182.2 (**Figura 21C**). Este perfil de secreción disminuye 1.28-veces para la actMMP-9 en las yeguas con datos sugestivos de placentitis con potro vivo; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto a las yeguas sanas ($p=0.7800$; **Figura 21C**).

En las yeguas sugestivas de placentitis y con potro séptico vivo, y en las yeguas con potro muerto se observó una disminución de 1.29- ($p=0.9341$) y 1.29-veces ($p=0.7649$) respectivamente; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo de yeguas sanas (**Figura 21C**).

En las yeguas con evidencias de placentitis y con potro séptico vivo, se encontró un aumento de 1.04-veces en la actMMP-9; sin embargo, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de yeguas sanas ($p=0.9992$; **Figura 21C**).

8.0 DISCUSIÓN

La inflamación es esencial para el desarrollo fisiológico en diferentes procesos como la ovulación (Duffy et al. 2019), la implantación (Dekel et al. 2014), la decidualización (Fujiwara et al. 2020), la placentación y el parto (Flores-Herrera et al. 2012); sin embargo, un incremento descontrolado en la producción de las citocinas pro/anti-inflamatorias está asociado a patologías como parto prematuro, aborto (Keelan 2018) y placentitis (Cummins et al. 2008, LeBlanc 2010).

La placentitis es el proceso patológico desarrollado por la inflamación placentaria (LeBlanc 2010), y es una de las principales causas asociadas al aborto tardío en las yeguas gestantes (LeBlanc et al. 2012, LeCuyer et al. 2015). La placentitis es producida por la infección de diferentes bacterias localizadas en el cérvix que por vía ascendente colonizan la cavidad uterina y al contactar al tejido del corioalantoides pueden desencadenar prematuramente la contracción uterina (Li et al. 2019), la separación del corioalantoides del endometrio (McGlothlin et al. 2004), y el nacimiento prematuro con mortalidad de los potros (Loux and Ball 2018).

8.1 Principales resultados en nuestro estudio.

8.1.1 Yeguas sanas

En el suero de las yeguas gestantes sanas se incrementó significativamente 16.5 veces la concentración de la eIL-1 β hacia el día 320 de gestación con respecto al día 240 (**Figura 18 y 19**), mientras que la actividad de las tres isoformas de MMPs estudiadas (*proMMP-2*, *proMMP-9* y *actMMP-9*) disminuyeron entre el día 240 y 320 de gestación (**Figura 20 y 21**).

Actualmente, no existen estudios que describan el perfil de expresión de la eIL- β o MMPs a lo largo de la gestación en las yeguas; sin embargo, nuestros resultados coinciden con los reportes donde se ha demostrado el incremento de la IL-1 β hacia el trabajo de parto en humanos (Hadley et al. 2018).

El parto es un proceso inflamatorio en el que la participación y coordinación del feto y de la madre son fundamentales para lograr la expulsión de la cría una vez que esta ha completado su desarrollo (Reinl y England 2015).

Carole Mendelson y colaboradores (2004) demostraron que al inocular 3.0 µg por saco embrionario de la proteína surfactante A en el líquido amniótico de ratones en el día 15 de gestación provoca hacia el día 17 la migración de macrófagos localizados en el líquido amniótico hacia el miometrio, así como un incremento de los niveles de IL-1β uterinos (Condon et al. 2004) **(Figura 22A)**. Sivarajasingman, et al; (2016) describió que los macrófagos en el miometrio son los responsables de la secreción de diferentes tipos de citocinas como la IL-8, IL-1β, IL-6 y TNF-α (Sivarajasingam, Imami y Johnson 2016) **(Figura 22B)**.

Los macrófagos también son fuente de MMPs (Gomez-Lopez et al. 2014). Ping Xu y equipo (2002) demostraron que sobre las membranas fetales humanas se incrementa la expresión de la MMP-9 durante el trabajo de parto, facilitando el rompimiento de las membranas fetales (Xu, Alfaidy, and Challis 2002) **(Figura 22C)**, sin embargo, nuestros resultados demuestran una disminución de *proMMP-2*, *proMMP-9* y *actMMP-9* en el día 320 con respecto al día 240 de gestación.

Durante el desarrollo del presente estudio, la sangre fue colectada a los 320 días de gestación, 22 días antes del promedio del parto en las yeguas sanas. Yiping Dang y colaboradores (2014) reportaron una disminución de la expresión de *proMMP-2*, *MMP-2* y *MMP-9* en la placenta de ratas durante la gestación tardía (19 días), mientras que sobre el tejido uterino las mismas MMPs incrementan, (Chen y Khalil 2017), probablemente como parte del remodelado de la matriz extracelular necesaria para el inicio del parto (Shynlova et al. 2013). Esto sugiere que la presentación y concentración de las MMPs son dependientes del tejido.

Según el modelo propuesto por Carole Mendelson antes mencionado, en las yeguas sanas, la presentación disminuida tanto de *proMMP-2* como de las dos isoformas de *MMP-9* (*proMMP-9* y *actMMP-9*) podría estar involucrada con la madurez del sistema respiratorio del potro, específicamente por la presencia de surfactante que

parece producirse hacia el día 300 de gestación o incluso más tarde (Pattle et al. 1975), mientras que los progestágenos sintetizados por el binomio yegua-potro podrían mantener la integridad de las membranas fetales y la quiescencia uterina, a pesar del aumento en la concentración de $eIL-1\beta$ (Shynlova et al. 2013).

Debido a lo anterior, se requiere mayor investigación para determinar los elementos inflamatorios que integran el antes durante y después del parto en el binomio yegua-potro.

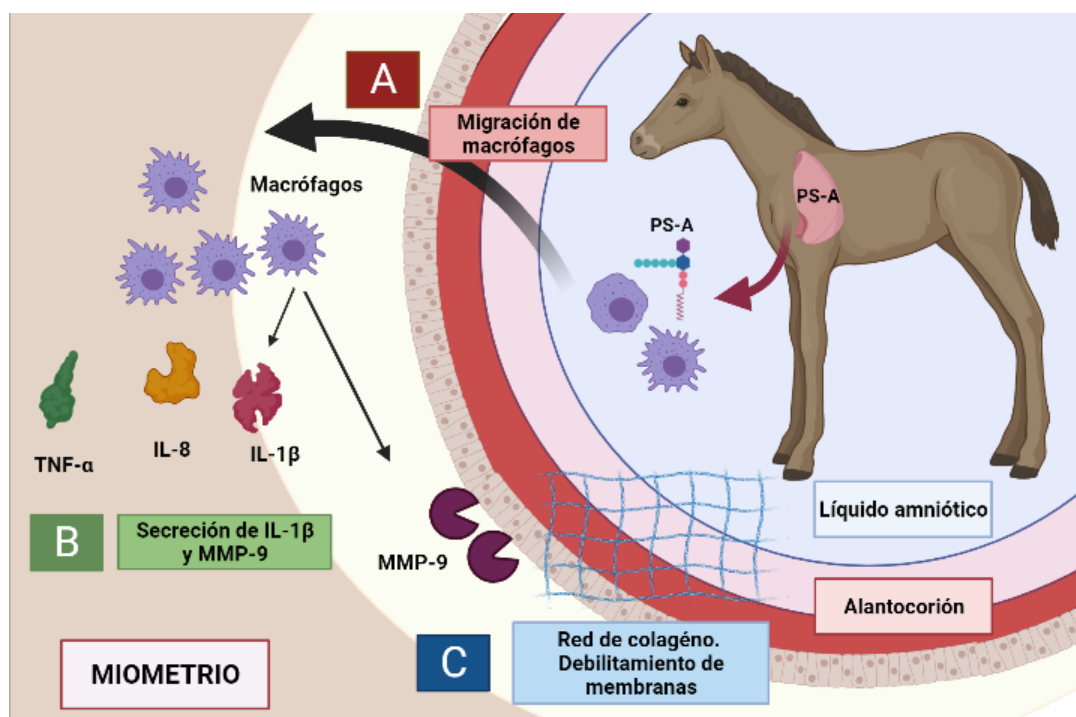


Figura 22. Participación de las células inflamatorias durante el parto en la yegua. (A) Los pulmones fetales maduros sintetizan proteína surfactante A (PS-A). Esta molécula sobre el líquido amniótico recluta macrófagos y los hace migrar hacia el miometrio. (B) Los macrófagos miometriales son fuente de interleucinas como la IL-1 β y de proteasas como la MMP-9. (C): La MMP-9 secretada por los macrófagos facilita el rompimiento de las membranas durante el parto (Creado en BioRender).

8.1.2 Yeguas evidentes y sugerentes de placentitis.

A pesar de que la $eIL-1\beta$, la *proMMP-2*, la *proMMP-9* y la *actMMP-9* si están presentes en fechas próximas al parto, un proceso inflamatorio como la placentitis provoca una mayor secreción de citocinas como la IL-1 β , TNF- α y el INF γ en la

interfase materna fetal provocando el nacimiento prematuro con poca probabilidad de sobrevivencia (Peltier 2003).

Nuestros resultados indican que en las yeguas con signos sugerentes y evidentes de placentitis se incrementa hasta 265 veces la expresión de la eIL-1 β asociado al estado clínico del potro, siendo el aumento mayor (373.4 veces) si el potro muere al día 240 de gestación (**Figura 18**). Sin embargo, en estos mismos grupos (potro vivo séptico y muerto) la concentración de eIL-1 β disminuye en el día 320 de gestación con respecto al día 240 (**Figura 19**).

Estos resultados en su conjunto sugieren que el proceso de placentitis activa la respuesta inflamatoria mediada por la IL-1 β como ha sido demostrado en modelos de placentitis inducida (LeBlanc et al. 2012).

Al evaluar a las MMPs, no encontramos diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al número de yeguas; sin embargo, encontramos un aumento tanto de la *proMMP-2* como de la *proMMP-9* asociadas al estado del potro (vivo séptico o muerto) con respecto al grupo control (**Figura 20**). Por su parte, la densidad óptica de las MMPs evaluadas disminuye al día 320 de gestación con respecto al 240 (**Figura 21**).

A pesar de que el estímulo inflamatorio durante el parto es dominado por la infiltración de macrófagos en el miometrio (Shynlova et al. 2013), durante una infección sobre los tejidos gestacionales las células de defensa predominantes son los neutrófilos (Kan, Razzaghian y Lavoie 2016) (**Figura 23A**). Los neutrófilos activados son fuente de citocinas como IL-1 β (Peltier 2003), así como de MMP-9 (Janciauskiene et al. 2018). La MMP-9 activa a la IL-8 (Janciauskiene et al. 2018) un agente quimioatrayente de neutrófilos (Kim et al. 2015) (**Figura 23B**), mientras que la MMP-2 puede romper y activar a *proIL-1 β* (Gabay, Lamacchia y Palmer 2010) y a la ocludina, un componente transmembranal de las uniones endoteliales y con ello contribuir a una mayor acumulación de neutrófilos en el sitio de infección con la consecuente producción de más citocinas y enzimas proinflamatorias (Nissinen y Kahari 2014) (**Figura 23C**).

En el endometrio equino se ha identificado la presencia de neutrófilos como parte del sistema inmune endometrial (Skarzynski et al. 2020). Además, cuando se induce una placentitis ascendente con *Streptococcus equi* subesp *zooepidemicus* a yeguas gestantes se encuentra un aumento significativo en la concentración de la IL-1 β , IL-6 e IL-10 en el líquido amniótico (Fedorka et al. 2019). Por su parte, Charlotta Oddsdóttir (2008) demostró que las gelatinasas MMP-9 y MMP-2 son inducidas durante la endometritis equina ya sea por bacterias o por monta natural (Fedorka et al. 2019).

Nuestros resultados sugieren que un proceso de tipo infeccioso como la placentitis desencadena una producción mayor de IL-1 β y de *proMMP-2*, *proMMP-9* y *actMMP-9*, este último solo en yeguas evidentes de placentitis, probablemente como resultado de una migración mayor de neutrófilos al sitio de infección en comparación a la migración de macrófagos durante el parto (Gomez-Lopez et al. 2017) contribuyendo así, al desprendimiento de membranas (Peltier 2003) y desencadenando un parto prematuro (Gomez-Lopez et al. 2014).

Cabe resaltar que en nuestros resultados las yeguas expresan altos niveles de eIL-1 β a pesar de no presentar signos clínicos evidentes de placentitis con respecto al ultrasonido. Este fenómeno es similar al caso descrito por Campos y colaboradores (2020) donde una yegua presentó amnionitis no infecciosa, caracterizada por el aborto al día 240 de gestación. La cara alantoidea de la placenta se observó congestionada, pero sin necrosis o exudado, mientras que la cara coriónica no presentó ningún cambio (Campos et al. 2020).

8.1.3 Interacción entre las yeguas con placentitis y potro séptico o muerto.

En dos de los subgrupos de las yeguas con placentitis los potros nacieron muertos o se les diagnosticó con sepsis, lo que denota que la cría fue afectada directamente por los agentes patógenos causantes de la placentitis.

Usando un modelo de placentitis ascendente por *Streptococcus equi* subesp *zooepidemicus* en yeguas gestantes, Calderwood Mays y equipo (2002)

determinaron que las bacterias causantes de infección ingresan por el cérvix, infectando la estroma cervical y dándose paso hacia el líquido amniótico a través del cordón umbilical, para finalmente instalarse predilectamente en los pulmones fetales (Steiner, Uhl y Brown 1993) **(Figura 23D)**.

Durante una corioamnionitis experimental, se ha observado una mayor expresión de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-17 en sangre, timo, pulmones e intestino en fetos de borregos, macacos y cerdos (Sabic y Koenig 2020) **(Figura 23E)**. Por su parte, en equinos, se ha determinado que la septicemia en potros es una secuela de la placentitis (Macpherson y Bailey 2008).

Un proceso de estrés sobre el potro derivado de la septicemia estimulará la producción de cortisol y con ello la maduración pulmonar precoz con un desarrollo anormal de la estructura pulmonar (Wolfs et al. 2012) así como la producción de pregnenolona por parte del feto y el subsecuente metabolismo de esta hormona en los tejidos placentarios hacia progesterona (Fowden, Giussani y Forhead 2020, Wynn et al. 2018) **(Figura 23F)**.

William Marinello (2020) determinó en células amnióticas humanas *in vitro* que la Medroxiprogesterona una progestina sintética inhibe la inducción del mRNA tanto de la MMP-1 como de IL-8 estimulado por IL-1 β mediante el receptor para glucocorticoides (Marinello, Feng y Allen 2020) **(Figura 23G)**. Este bloqueo de interleucinas por progesterona se podría deber a que la IL-1 β es producida principalmente por leucocitos, cuyo influjo depende de la señalización de macrófagos, pero su actividad es bloqueada por la progesterona (Keelan 2018, Peltier 2003).

Con base en lo anterior, si los receptores a progesterona presentes durante esta patología son los tipos A, el resultado será la estimulación de las reacciones proinflamatorias **(Figura 23G)** lo que explicaría la secreción aumentada de *proMMP-2* observada tanto en los grupos evidente y sugerente de placentitis con potros vivos sépticos y muertos en ambos días de gestación evaluados. Pero, si existe un cambio de receptores hacia los tipos B esto explicaría el descenso de eIL-1 β , *proMMP-9* y

actMMP-9 hacia el día 320 de gestación (Goldman y Shalev 2007) (**Figura 23G**). Por ello, resulta interesante conocer la distribución de los receptores de progesterona durante la placentitis equina.

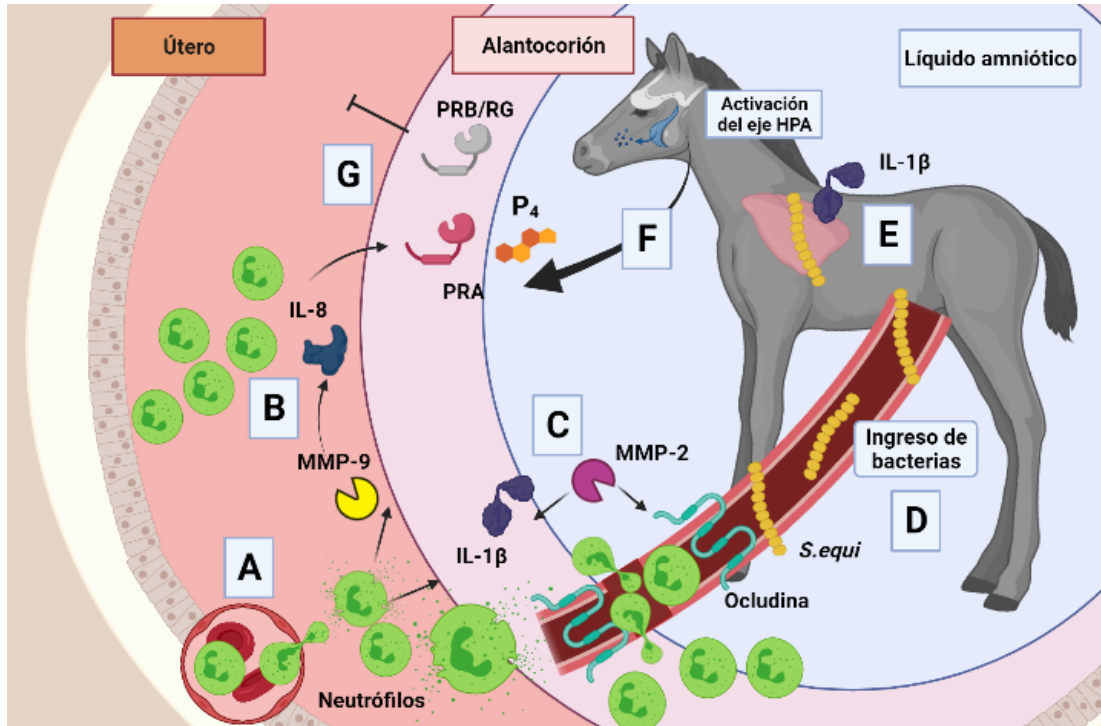


Figura 23. Participación de eIL-1 β , MMP-2 y MMP-9 durante la placentitis equina. (A): La célula de defensa predominante durante una infección sobre los tejidos gestacionales son los **neutrófilos**. Los neutrófilos son fuente de **proIL-1 β** y **MMP-9**. (B) La MMP-9 activa a la **IL-8** quimioatrayente de neutrófilos. (C) La **MMP-2** Activa a **IL-1 β** y a la **occludina** facilitando la migración de neutrófilos desde los vasos sanguíneos. (D) Las bacterias ingresan al feto a través del cordón umbilical instalándose finalmente en los pulmones. (E): Los pulmones fetales, así como otros órganos inician la producción de **IL-1 β** . (F): La IL-1 β así como el estímulo de estrés en general, provoca la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (**HPA**) con la consiguiente producción exacerbada por parte de la unidad feto placentaria de progesterona (**P₄**). (G) La **P₄** puede unirse con el receptor para progesterona tipo B (**PRB**) o al receptor para glucocorticoides (**RG**) inhibiendo la migración de células inmunes, o bien, la **P₄** se puede unir a **PRA** incrementando el estímulo inflamatorio (Creado en BioRender).

8.1.4 Relación entre las yeguas con placentitis y potros sanos.

Nuestros resultados demuestran que el aumento significativo de eIL-1 β en el suero de las yeguas gestantes con placentitis está asociado al estado clínico del potro (vivo séptico o muerto) a los 240 (**Figura 18**) y 320 días (**Figura 19**) produciendo el 40% de mortalidad de los potros (**Cuadro 4**).

Sin embargo, en las yeguas con signos sugerentes y evidentes de placentitis con potros vivos y sanos no existieron diferencias significativas en la expresión de la eIL-1 β con respecto a las yeguas sanas, mientras que la tendencia en la expresión de las MMPs analizadas (*proMMP-2*, *proMMP-9*, *actMMP-9*) fue la de disminuir con respecto al grupo control (**Figura 20 y Figura 21**). Esto podría indicar una participación del potro en la defensa inmunológica contra la infección.

El sistema inmune equino madura durante la vida fetal, encontrándose actividad linfocítica (sistema inmune adaptativo) desde el día 120 de gestación (Giguere y Polkes 2005). Por lo tanto, en nuestro estudio es probable que, a los 240 y 320 días de gestación, el feto equino presenta los elementos inmunes necesarios para enfrentar una infección bacteriana relacionada con placentitis.

Se ha observado que los fetos de corderos a cuyas madres se les indujo corioamnionitis promueven la maduración de los monocitos pulmonares, los cuales activan la capacidad de producir citocinas proinflamatorias en respuesta a un estímulo (Sabic y Koenig 2020) (**Figura 24C**).

Imran N. Mir y colaboradores (2018) estudiaron la contribución del feto o de la placenta en la síntesis de citocinas proinflamatorias durante el parto a través del inmunoanálisis de la concentración de las citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 y TNF- α en la sangre del cordón umbilical, bajo la premisa de si la mayor concentración se encontraba en la vena umbilical la secreción de citocinas era materna, mientras que si la mayor concentración se encontraba en las arterias, la producción era fetal (Mir et al. 2018). Sus resultados muestran que: el grupo de mujeres sin complicaciones en la gestación y sin problemas de salud en los neonatos pero con parto espontáneo presentaron mayores concentraciones de IL-6 e IL-8 en las arterias umbilicales comparado con las venas umbilicales (16.7 y 18.4 Vs 0.29 y 0.74 pg/mL) demostrando una producción fetal y metabolismo placentario, lo cual se confirmó con la presencia incrementada de ambas citocinas en la placenta comparada con el grupo que no presentó labor de parto (**Figura 24C**).

Además, el 53% del grupo mostró infiltración neutrofílica activa en el corión asociado a corioamnionitis aguda, a pesar de que ninguna de estas mujeres fue diagnosticada con infección durante su gestación y los bebés nacieron completamente sanos (Mir et al. 2018).

Por otra parte, Gómez López y colaboradores (2017) a través de la técnica de análisis de huellas genéticas (DNA fingerprints) concluyeron que los neutrófilos que se observan en el líquido amniótico en mujeres con infección intra amniótica pueden ser de origen materno como fetal, siendo de este último el predominante. Además, en ciertos casos, la infiltración de neutrófilos fetales en la placenta no causa una reacción inflamatoria en el tejido (Gomez-Lopez et al. 2017) (**Figura 24D**).

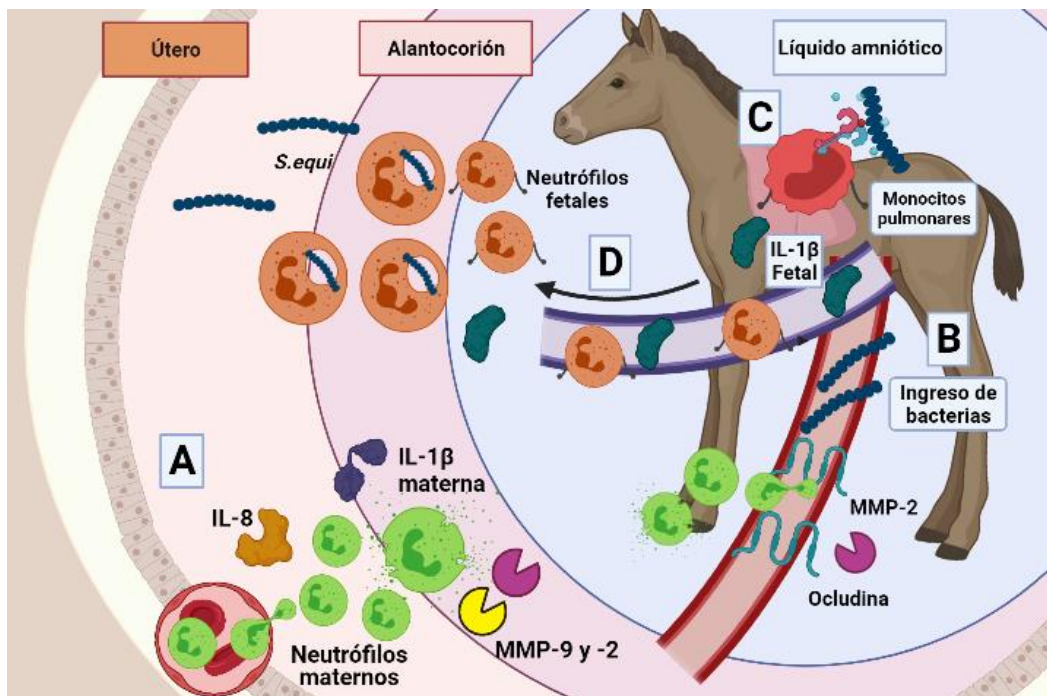


Figura 24. Participación del potro clínicamente sano durante la placentitis. (A) La infección se establece en los tejidos placentarios con la llegada de los **neutrófilos** como primera línea de defensa y la consecuente producción de **IL-1β**, **MMP-2** y **MMP-9**. **(B)** Las bacterias ingresan por el cordón umbilical y migran hasta los pulmones. **(C)** Esto provoca en un potro clínicamente sano una maduración oportuna de los **monocitos pulmonares** y la secreción de interleucinas fetales como la **IL-1β** que puede migrar a través de la arteria umbilical hacia la placenta y el útero. **(D)** El potro, a su vez, también podría participar en la defensa ante la infección a través de la migración de neutrófilos de su sistema inmunológico hacia los tejidos placentarios. Dichos neutrófilos podrían ser capaces de fagocitar microorganismos sin exacerbar el estímulo inflamatorio (Creado en BioRender).

Si esto ocurre de una forma similar en el binomio yegua-potro explicaría las concentraciones disminuidas de eIL-1 β y de MMPs en el suero de la madre con potro sano a pesar de estar presente la placentitis.

Finalmente, cabe destacar que la mayoría de los estudios sobre placentitis equina se diseñan bajo una inducción de la infección (Beachler et al. 2021, El-Sheikh Ali et al. 2020); sin embargo, este método provoca comúnmente la aparición de descarga vulvar y aborto que no siempre está presente en el curso natural de la enfermedad (Macpherson y Bailey 2008) como se ha reportado en nuestros resultados, donde incluso la infección pasó desapercibida al ultrasonido.

9.0 CONCLUSIONES.

El presente proyecto determinó la concentración sérica de la IL-1 β , *proMMP-2*, *proMMP-9* y *actMMP-9* en los días 240 y 320 de gestación en yeguas gestantes sanas y con placentitis. Los resultados muestran que en yeguas sanas la eIL-1 β incrementa significativamente del día 240 al 320 de gestación, mientras que las MMPs evaluadas disminuyen. Por su parte, en yeguas con signos sugestivos o evidentes de placentitis la concentración de eIL-1 β y la actividad de *proMMP-9* y *proMMP-2* se incrementa en asociación con la mortalidad del potro. Lo anterior es un precedente de la existencia de una asociación entre el sistema inmune del potro con el de la yegua. No obstante, y debido al número de yeguas y potros evaluados, los resultados solo nos muestran diferencia estadística para IL-1 β por lo que esta molécula podría ser utilizada como marcador de la infección y del estado de salud del potro, mientras que para la MMP-2 y MMP-9 se necesitarán de más estudios para confirmar los resultados encontrados.

10.0 REFERENCIAS.

- Allen, W. R. 2001. "Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy." *Reproduction* 121 (4):513-27.
- Allen, W. R., and F. Stewart. 2001. "Equine placentation." *Reprod Fertil Dev* 13 (7-8):623-34. doi: 10.1071/rd01063.
- Allen, W. R., and S. Wilsher. 2009. "A review of implantation and early placentation in the mare." *Placenta* 30 (12):1005-15. doi: 10.1016/j.placenta.2009.09.007.
- Alvarez-Cabrera, M. C., E. Barrientos-Galeana, A. Barrera-Garcia, M. Osorio-Caballero, J. F. Acevedo, O. Flores-Herrera, N. F. Diaz, A. Molina-Hernandez, G. Garcia-Lopez, and H. Flores-Herrera. 2018. "Secretion of heat shock -60, -70 kD protein, IL-1beta and TNFalpha levels in serum of a term normal pregnancy and patients with pre-eclampsia development." *J Cell Mol Med* 22 (11):5748-5752. doi: 10.1111/jcmm.13824.
- Arend, W. P. 1993. "Interleukin-1 receptor antagonist." *Adv Immunol* 54:167-227. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60535-0.
- Arend, W. P., M. Malyak, C. J. Guthridge, and C. Gabay. 1998. "Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology." *Annu Rev Immunol* 16:27-55. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.27.
- Aurich, C., and S. Budik. 2015. "Early pregnancy in the horse revisited - does exception prove the rule?" *J Anim Sci Biotechnol* 6:50. doi: 10.1186/s40104-015-0048-6.
- Barton, A. K., and H. Gehlen. 2016. "Pulmonary Remodeling in Equine Asthma: What Do We Know about Mediators of Inflammation in the Horse?" *Mediators Inflamm* 2016:5693205. doi: 10.1155/2016/5693205.
- Barton, A. K., T. Shety, J. Klier, S. Geis, R. Einspanier, and H. Gehlen. 2019. "Metalloproteinases and their Inhibitors under the Course of Immunostimulation by CPG-ODN and Specific Antigen Inhalation in Equine Asthma." *Mediators Inflamm* 2019:7845623. doi: 10.1155/2019/7845623.
- Beachler, T. M., H. S. Gracz, D. R. Morgan, S. A. Bembenek Bailey, L. Borst, K. E. Ellis, K. A. Von Dollen, S. K. Lyle, A. Nebel, N. C. Andrews, J. Koipalli, J. E. Gadsby, and C. S. Bailey. 2021. "Plasma metabolomic profiling of healthy pregnant mares and mares with experimentally induced placentitis." *Equine Vet J* 53 (1):85-93. doi: 10.1111/evj.13262.
- Borba, L. A., C. E. W. Nogueira, F. R. P. Bruhn, G. C. da Silva, L. S. Feijo, I. F. Canisso, and B. D. R. Curcio. 2020. "Peripheral blood markers of sepsis in foals born from mares with experimentally ascending placentitis." *Vet Rec*. doi: 10.1136/vr.104710.
- Butler, G. S., and C. M. Overall. 2013. "Matrix metalloproteinase processing of signaling molecules to regulate inflammation." *Periodontol 2000* 63 (1):123-48. doi: 10.1111/prd.12035.
- Campos, I., B. Batista, A. C. Matos, F. Dutra, G. Gomes, A. Pinna, J. Leite, and A. Ferreira. 2020. "Pregnancy loss due to amnionitis in anglo-arabian mare-Case report." *Reprod Domest Anim* 55 (4):438-441. doi: 10.1111/rda.13625.
- Canisso, I. F., B. A. Ball, C. Cray, N. M. Williams, K. E. Scoggin, G. M. Davolli, E. L. Squires, and M. H. Troedsson. 2014. "Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration." *Am J Reprod Immunol* 72 (4):376-85. doi: 10.1111/aji.12278.
- Canisso, I. F., S. C. Loux, and F. S. Lima. 2020. "Biomarkers for placental disease in mares." *Theriogenology* 150:302-307. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.073.
- Chen, J., and R. A. Khalil. 2017. "Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia." *Prog Mol Biol Transl Sci* 148:87-165. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.001.

- Chen, Q., M. Jin, F. Yang, J. Zhu, Q. Xiao, and L. Zhang. 2013. "Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling." *Mediators Inflamm* 2013:928315. doi: 10.1155/2013/928315.
- Coleman, M. C., and C. Whitfield-Cargile. 2017. "Orthopedic Conditions of the Premature and Dysmature Foal." *Vet Clin North Am Equine Pract* 33 (2):289-297. doi: 10.1016/j.cveq.2017.03.001.
- Condon, J. C., P. Jeyasuria, J. M. Faust, and C. R. Mendelson. 2004. "Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (14):4978-83. doi: 10.1073/pnas.0401124101.
- Cui, N., M. Hu, and R. A. Khalil. 2017. "Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases." *Prog Mol Biol Transl Sci* 147:1-73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
- Cummins, C., S. Carrington, E. Fitzpatrick, and V. Duggan. 2008. "Ascending placentitis in the mare: A review." *Ir Vet J* 61 (5):307-13. doi: 10.1186/2046-0481-61-5-307.
- Curry, T. E., Jr., and K. G. Osteen. 2003. "The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle." *Endocr Rev* 24 (4):428-65. doi: 10.1210/er.2002-0005.
- Das, S., M. Mandal, T. Chakraborti, A. Mandal, and S. Chakraborti. 2003. "Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview." *Mol Cell Biochem* 253 (1-2):31-40. doi: 10.1023/a:1026093016148.
- Dekel, N., Y. Gnainsky, I. Granot, K. Racicot, and G. Mor. 2014. "The role of inflammation for a successful implantation." *Am J Reprod Immunol* 72 (2):141-7. doi: 10.1111/aji.12266.
- Dinarello, C. A. 2011. "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases." *Blood* 117 (14):3720-32. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417.
- Dinarello, C. A. 2018. "Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity." *Immunol Rev* 281 (1):8-27. doi: 10.1111/imr.12621.
- Duffy, D. M., C. Ko, M. Jo, M. Brannstrom, and T. E. Curry. 2019. "Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes." *Endocr Rev* 40 (2):369-416. doi: 10.1210/er.2018-00075.
- El-Sheikh Ali, H., E. L. Legacki, K. E. Scoggin, S. C. Loux, P. Dini, A. Esteller-Vico, A. J. Conley, S. D. Stanley, and B. A. Ball. 2020. "Steroid synthesis and metabolism in the equine placenta during placentitis." *Reproduction* 159 (3):289-302. doi: 10.1530/REP-19-0420.
- Fedorka, C. E., B. A. Ball, K. E. Scoggin, S. C. Loux, M. H. T. Troedsson, and A. A. Adams. 2019. "The fetomaternal immune response to equine placentitis." *Am J Reprod Immunol* 82 (5):e13179. doi: 10.1111/aji.13179.
- Fernandes, C. B., B. A. Ball, S. C. Loux, Y. L. Boakari, K. E. Scoggin, H. El-Sheikh Ali, B. Cogliati, and A. Esteller-Vico. 2019. "Uterine cervix as a fundamental part of the pathogenesis of pregnancy loss associated with ascending placentitis in mares." *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.10.017.
- Fields, J. K., S. Gunther, and E. J. Sundberg. 2019. "Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling." *Front Immunol* 10:1412. doi: 10.3389/fimmu.2019.01412.
- Flores-Herrera, H., G. Garcia-Lopez, N. F. Diaz, A. Molina-Hernandez, M. Osorio-Caballero, D. Soriano-Becerril, and V. Zaga-Clavellina. 2012. "An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha) and proMMP-9 in human fetal membranes." *Placenta* 33 (4):271-7. doi: 10.1016/j.placenta.2012.01.007.
- Forhead, A. J., F. Broughton Pipkin, P. M. Taylor, K. Baker, V. Balouzet, D. A. Giussani, and A. L. Fowden. 2000. "Developmental changes in blood pressure and the renin-angiotensin

- system in pony fetuses during the second half of gestation." *J Reprod Fertil Suppl* (56):693-703.
- Fowden, A. L., D. A. Giussani, and A. J. Forhead. 2020. "Physiological development of the equine fetus during late gestation." *Equine Vet J* 52 (2):165-173. doi: 10.1111/evj.13206.
- Fowden, A. L., L. Mundy, J. C. Ousey, A. McGladdery, and M. Silver. 1991. "Tissue glycogen and glucose 6-phosphatase levels in fetal and newborn foals." *J Reprod Fertil Suppl* 44:537-42.
- Fujiwara, H., M. Ono, Y. Sato, K. Imakawa, T. Iizuka, K. Kagami, T. Fujiwara, A. Horie, H. Tani, A. Hattori, T. Daikoku, and Y. Araki. 2020. "Promoting Roles of Embryonic Signals in Embryo Implantation and Placentation in Cooperation with Endocrine and Immune Systems." *Int J Mol Sci* 21 (5). doi: 10.3390/ijms21051885.
- Gabay, C., C. Lamacchia, and G. Palmer. 2010. "IL-1 pathways in inflammation and human diseases." *Nat Rev Rheumatol* 6 (4):232-41. doi: 10.1038/nrrheum.2010.4.
- Garlanda, C., H. J. Anders, and A. Mantovani. 2009. "TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization." *Trends Immunol* 30 (9):439-46. doi: 10.1016/j.it.2009.06.001.
- Giguere, S., and A. C. Polkes. 2005. "Immunologic disorders in neonatal foals." *Vet Clin North Am Equine Pract* 21 (2):241-72, v. doi: 10.1016/j.cveq.2005.04.004.
- Goldman, S., and E. Shalev. 2007. "Progesterone receptor isoforms profile, modulate matrix metalloproteinase 2 expression in the decidua." *Am J Obstet Gynecol* 197 (6):604 e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2007.04.011.
- Gomez-Lopez, N., R. Romero, Y. Xu, Y. Leng, V. Garcia-Flores, D. Miller, S. M. Jacques, S. S. Hassan, J. Faro, A. Alsamsam, A. Alhousseini, H. Gomez-Roberts, B. Panaitescu, L. Yeo, and E. Maymon. 2017. "Are amniotic fluid neutrophils in women with intraamniotic infection and/or inflammation of fetal or maternal origin?" *Am J Obstet Gynecol* 217 (6):693 e1-693 e16. doi: 10.1016/j.ajog.2017.09.013.
- Gomez-Lopez, N., D. StLouis, M. A. Lehr, E. N. Sanchez-Rodriguez, and M. Arenas-Hernandez. 2014. "Immune cells in term and preterm labor." *Cell Mol Immunol* 11 (6):571-81. doi: 10.1038/cmi.2014.46.
- Hadley, E. E., L. S. Richardson, M. R. Torloni, and R. Menon. 2018. "Gestational tissue inflammatory biomarkers at term labor: A systematic review of literature." *Am J Reprod Immunol* 79 (2). doi: 10.1111/aji.12776.
- Hatzidaki, E., D. Gourgiotis, A. Manoura, E. Korakaki, A. Bossios, E. Galanakis, and C. Giannakopoulou. 2005. "Interleukin-6 in preterm premature rupture of membranes as an indicator of neonatal outcome." *Acta Obstet Gynecol Scand* 84 (7):632-8. doi: 10.1111/j.0001-6349.2005.00747.x.
- Heerema-McKenney, A. 2018. "Defense and infection of the human placenta." *APMIS* 126 (7):570-588. doi: 10.1111/apm.12847.
- Hong, C. B., J. M. Donahue, R. C. Giles, Jr., M. B. Petrites-Murphy, K. B. Poonacha, A. W. Roberts, B. J. Smith, R. R. Tramontin, P. A. Tuttle, and T. W. Swerczek. 1993. "Etiology and pathology of equine placentitis." *J Vet Diagn Invest* 5 (1):56-63. doi: 10.1177/104063879300500113.
- Itoh, Y. 2015. "Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations." *Matrix Biol* 44-46:207-23. doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.004.
- Jacobsen, S., M. H. Thomsen, and S. Nanni. 2006. "Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease." *Am J Vet Res* 67 (10):1738-42. doi: 10.2460/ajvr.67.10.1738.
- Jacques, C., M. Gosset, F. Berenbaum, and C. Gabay. 2006. "The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation." *Vitam Horm* 74:371-403. doi: 10.1016/S0083-6729(06)74016-X.

- Janciauskiene, S., S. Wrenger, S. Immenschuh, B. Olejnicka, T. Greulich, T. Welte, and J. Chorostowska-Wynimko. 2018. "The Multifaceted Effects of Alpha1-Antitrypsin on Neutrophil Functions." *Front Pharmacol* 9:341. doi: 10.3389/fphar.2018.00341.
- Jaworska, J., and T. Janowski. 2019. "Expression of proinflammatory cytokines IL-1beta, IL-6 and TNFalpha in the retained placenta of mares." *Theriogenology* 126:1-7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.11.029.
- Kan, B., H. R. Razzaghi, and P. M. Lavoie. 2016. "An Immunological Perspective on Neonatal Sepsis." *Trends Mol Med* 22 (4):290-302. doi: 10.1016/j.molmed.2016.02.001.
- Kaneko, N., M. Kurata, T. Yamamoto, S. Morikawa, and J. Masumoto. 2019. "The role of interleukin-1 in general pathology." *Inflamm Regen* 39:12. doi: 10.1186/s41232-019-0101-5.
- Keelan, J. A. 2018. "Intrauterine inflammatory activation, functional progesterone withdrawal, and the timing of term and preterm birth." *J Reprod Immunol* 125:89-99. doi: 10.1016/j.jri.2017.12.004.
- Kim, C. J., R. Romero, P. Chaemsaitong, and J. S. Kim. 2015. "Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance." *Am J Obstet Gynecol* 213 (4 Suppl):S53-69. doi: 10.1016/j.ajog.2015.08.041.
- Klein, T., and R. Bischoff. 2011. "Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases." *Amino Acids* 41 (2):271-90. doi: 10.1007/s00726-010-0689-x.
- Krumm, B., Y. Xiang, and J. Deng. 2014. "Structural biology of the IL-1 superfamily: key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses." *Protein Sci* 23 (5):526-38. doi: 10.1002/pro.2441.
- Lafage, M., N. Maroc, P. Dubreuil, R. de Waal Malefijt, M. J. Pebusque, Y. Carcassonne, and P. Mannoni. 1989. "The human interleukin-1 alpha gene is located on the long arm of chromosome 2 at band q13." *Blood* 73 (1):104-7.
- Laronha, H., and J. Caldeira. 2020. "Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases." *Cells* 9 (5). doi: 10.3390/cells9051076.
- LeBlanc, M. M. 2010. "Ascending placentitis in the mare: an update." *Reprod Domest Anim* 45 Suppl 2:28-34. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01633.x.
- LeBlanc, M. M., S. Giguere, G. D. Lester, K. Brauer, and D. L. Paccamonti. 2012. "Relationship between infection, inflammation and premature parturition in mares with experimentally induced placentitis." *Equine Vet J Suppl* (41):8-14. doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00502.x.
- LeCuyer, T. E., A. Rink, D. S. Bradway, J. F. Evermann, A. V. Nicola, T. Baszler, and G. J. Haldorson. 2015. "Abortion in a Mediterranean miniature donkey (*Equus asinus*) associated with a gammaherpesvirus similar to Equid herpesvirus 7." *J Vet Diagn Invest* 27 (6):749-53. doi: 10.1177/1040638715611444.
- Lester, G. D. 2005. "Maturity of the neonatal foal." *Vet Clin North Am Equine Pract* 21 (2):333-55. doi: 10.1016/j.cveq.2005.04.001.
- Li, K., F. R. Tay, and C. K. Y. Yiu. 2019. "The past, present and future perspectives of matrix metalloproteinase inhibitors." *Pharmacol Ther*:107465. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107465.
- Li, T., B. Liu, H. Guan, W. Mao, L. Wang, C. Zhang, L. Hai, K. Liu, and J. Cao. 2019. "PGE2 increases inflammatory damage in *Escherichia coli*-infected bovine endometrial tissue in vitro via the EP4-PKA signaling pathway." *Biol Reprod* 100 (1):175-186. doi: 10.1093/biolre/i0y162.
- Loux, S. C., and B. A. Ball. 2018. "The proteome of fetal fluids in mares with experimentally-induced placentitis." *Placenta* 64:71-78. doi: 10.1016/j.placenta.2018.03.004.
- Lyle, S. K. 2014. "Immunology of infective preterm delivery in the mare." *Equine Vet J* 46 (6):661-8. doi: 10.1111/evj.12243.

- Macpherson, M. L. 2006. "Diagnosis and treatment of equine placentitis." *Vet Clin North Am Equine Pract* 22 (3):763-76. doi: 10.1016/j.cveq.2006.08.005.
- Macpherson, M. L., and C. S. Bailey. 2008. "A clinical approach to managing the mare with placentitis." *Theriogenology* 70 (3):435-40. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.022.
- Marinello, W., L. Feng, and T. K. Allen. 2020. "Progestins Inhibit Interleukin-1beta-Induced Matrix Metalloproteinase 1 and Interleukin 8 Expression via the Glucocorticoid Receptor in Primary Human Amnion Mesenchymal Cells." *Front Physiol* 11:900. doi: 10.3389/fphys.2020.00900.
- McAfoos, J. L., R. E. Ellerbrock, and I. F. Canisso. 2019. "Fetal Death Associated With Premature Mammary Gland Development and Lactation in a Mare Treated With Weekly Injections of Long-Acting Progesterone." *J Equine Vet Sci* 81:102783. doi: 10.1016/j.jevs.2019.07.004.
- McGlothlin, J. A., G. D. Lester, P. J. Hansen, M. Thomas, L. Pablo, D. L. Hawkins, and M. M. LeBlanc. 2004. "Alteration in uterine contractility in mares with experimentally induced placentitis." *Reproduction* 127 (1):57-66. doi: 10.1530/rep.1.00021.
- Mir, I. N., L. F. Chalak, J. Liao, S. Johnson-Welch, L. S. Brown, C. Longoria, R. C. Savani, and C. R. Rosenfeld. 2018. "Fetal-placental crosstalk occurs through fetal cytokine synthesis and placental clearance." *Placenta* 69:1-8. doi: 10.1016/j.placenta.2018.07.006.
- Mulla, A., and J. C. Buckingham. 1999. "Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by cytokines." *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 13 (4):503-21. doi: 10.1053/beem.1999.0041.
- Negrini, S., V. G. Gorgoulis, and T. D. Halazonetis. 2010. "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (3):220-8. doi: 10.1038/nrm2858.
- Nissinen, L., and V. M. Kahari. 2014. "Matrix metalloproteinases in inflammation." *Biochim Biophys Acta* 1840 (8):2571-80. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.03.007.
- Okuda, D. T., and H. Vrenken. 2013. "Metabolite changes in radiologically isolated syndrome: more pathology than meets the eye?" *Neurology* 80 (23):2084-5. doi: 10.1212/WNL.0b013e318295d7b2.
- Olmos-Ortiz, A., P. Flores-Espinosa, I. Mancilla-Herrera, R. Vega-Sanchez, L. Diaz, and V. Zaga-Clavellina. 2019. "Innate Immune Cells and Toll-like Receptor-Dependent Responses at the Maternal-Fetal Interface." *Int J Mol Sci* 20 (15). doi: 10.3390/ijms20153654.
- Ousey, J. C. 2004. "Periparturient endocrinology in the mare and foetus." *Reprod Domest Anim* 39 (4):222-31. doi: 10.1111/j.1439-0531.2004.00507.x.
- Ousey, J. C., E. Houghton, L. Grainger, P. D. Rosedale, and A. L. Fowden. 2005. "Progesterone profiles during the last trimester of gestation in Thoroughbred mares with normal or compromised pregnancies." *Theriogenology* 63 (7):1844-56. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.010.
- Ousey, J. C., P. D. Rosedale, L. Palmer, L. Grainger, and E. Houghton. 2000. "Effects of maternally administered depot ACTH(1-24) on fetal maturation and the timing of parturition in the mare." *Equine Vet J* 32 (6):489-96. doi: 10.2746/04251640077584622.
- Parks, W. C., C. L. Wilson, and Y. S. Lopez-Boado. 2004. "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nat Rev Immunol* 4 (8):617-29. doi: 10.1038/nri1418.
- Pattle, R. E., P. D. Rosedale, C. Schock, and J. M. Creasey. 1975. "The development of the lung and its surfactant in the foal and in other species." *J Reprod Fertil Suppl* (23):651-7.
- Peltier, M. R. 2003. "Immunology of term and preterm labor." *Reprod Biol Endocrinol* 1:122. doi: 10.1186/1477-7827-1-122.
- Peric, A., J. Weiss, N. Vulliamoz, D. Baud, and M. Stojanov. 2019. "Bacterial Colonization of the Female Upper Genital Tract." *Int J Mol Sci* 20 (14). doi: 10.3390/ijms20143405.

- Peters, V. A., J. J. Joesting, and G. G. Freund. 2013. "IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation." *Brain Behav Immun* 32:1-8. doi: 10.1016/j.bbi.2012.11.006.
- Pusterla, N., P. A. Conrad, A. E. Packham, S. M. Mapes, C. J. Finno, I. A. Gardner, B. C. Barr, G. L. Ferraro, and W. D. Wilson. 2011. "Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses." *J Parasitol* 97 (2):281-5. doi: 10.1645/GE-2657.1.
- Ra, H. J., and W. C. Parks. 2007. "Control of matrix metalloproteinase catalytic activity." *Matrix Biol* 26 (8):587-96. doi: 10.1016/j.matbio.2007.07.001.
- Reinl, E. L., and S. K. England. 2015. "Fetal-to-maternal signaling to initiate parturition." *J Clin Invest* 125 (7):2569-71. doi: 10.1172/JCI82576.
- Robertson, S. A., P. Y. Chin, J. G. Femia, and H. M. Brown. 2018. "Embryotoxic cytokines -Potential roles in embryo loss and fetal programming." *J Reprod Immunol* 125:80-88. doi: 10.1016/j.jri.2017.12.003.
- Rossi, H. S., N. M. Koho, M. Ilves, M. M. Rajamaki, and A. K. Mykkanen. 2017. "Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase-2 and -9 in horses with chronic airway inflammation." *Am J Vet Res* 78 (11):1329-1337. doi: 10.2460/ajvr.78.11.1329.
- Ryu, H. Y., J. Lee, S. Yang, H. Park, S. Choi, K. C. Jung, S. T. Lee, J. K. Seong, I. O. Han, and E. S. Oh. 2009. "Syndecan-2 functions as a docking receptor for pro-matrix metalloproteinase-7 in human colon cancer cells." *J Biol Chem* 284 (51):35692-701. doi: 10.1074/jbc.M109.054254.
- Sabic, D., and J. M. Koenig. 2020. "A perfect storm: fetal inflammation and the developing immune system." *Pediatr Res* 87 (2):319-326. doi: 10.1038/s41390-019-0582-6.
- Samuel, C. A., W. R. Allen, and D. H. Steven. 1974. "Studies on the equine placenta. I. Development of the microcotyledons." *J Reprod Fertil* 41 (2):441-5. doi: 10.1530/jrf.0.0410441.
- Scott, L. M., A. H. Bryant, A. Rees, B. Down, R. H. Jones, and C. A. Thornton. 2017. "Production and regulation of interleukin-1 family cytokines at the materno-fetal interface." *Cytokine* 99:194-202. doi: 10.1016/j.cyto.2017.07.005.
- Shynlova, O., Y. H. Lee, K. Srihajan, and S. J. Lye. 2013. "Physiologic uterine inflammation and labor onset: integration of endocrine and mechanical signals." *Reprod Sci* 20 (2):154-67. doi: 10.1177/1933719112446084.
- Silver, M. 1990. "Prenatal maturation, the timing of birth and how it may be regulated in domestic animals." *Exp Physiol* 75 (3):285-307. doi: 10.1113/expphysiol.1990.sp003405.
- Silver, M., A. L. Fowden, J. Knox, J. Ousey, R. Cash, and P. D. Rossdale. 1991. "Relationship between circulating tri-iodothyronine and cortisol in the perinatal period in the foal." *J Reprod Fertil Suppl* 44:619-26.
- Sivarajasingam, S. P., N. Imami, and M. R. Johnson. 2016. "Myometrial cytokines and their role in the onset of labour." *J Endocrinol* 231 (3):R101-R119. doi: 10.1530/JOE-16-0157.
- Skarzynski, D. J., A. Z. Szostek-Mioduchowska, M. R. Rebordao, B. M. Jalali, K. K. Piotrowska-Tomala, N. Leciejewska, M. Lazarczyk, and G. M. Ferreira-Dias. 2020. "Neutrophils, monocytes and other immune components in the equine endometrium: Friends or foes?" *Theriogenology* 150:150-157. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.018.
- Somerville, R. P., S. A. Oblander, and S. S. Apte. 2003. "Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks." *Genome Biol* 4 (6):216. doi: 10.1186/gb-2003-4-6-216.
- Steiner, D. A., E. W. Uhl, and M. B. Brown. 1993. "In utero transmission of *Mycoplasma pulmonis* in experimentally infected Sprague-Dawley rats." *Infect Immun* 61 (7):2985-90. doi: 10.1128/iai.61.7.2985-2990.1993.
- Tasci, Y., B. Dilbaz, B. Uzmez Onal, E. Caliskan, S. Dilbaz, L. Doganci, and U. Han. 2006. "The value of cord blood interleukin-6 levels for predicting chorioamnionitis, funisitis and neonatal

- infection in term premature rupture of membranes." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 128 (1-2):34-9. doi: 10.1016/j.ejogrb.2005.11.049.
- Tchirikov, M., N. Schlabritz-Loutsevitch, J. Maher, J. Buchmann, Y. Naberezhnev, A. S. Winarno, and G. Seliger. 2018. "Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome." *J Perinat Med* 46 (5):465-488. doi: 10.1515/jpm-2017-0027.
- Tomlinson, M. L., C. Garcia-Morales, M. Abu-Elmagd, and G. N. Wheeler. 2008. "Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development." *Mech Dev* 125 (11-12):1059-70. doi: 10.1016/j.mod.2008.07.005.
- Visse, R., and H. Nagase. 2003. "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." *Circ Res* 92 (8):827-39. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
- Wilsher, S., and W. R. Allen. 2012. "Factors influencing placental development and function in the mare." *Equine Vet J Suppl* (41):113-9. doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00452.x.
- Witkowska-Pilaszewicz, O. D., M. Zmigrodzka, A. Winnicka, A. Miskiewicz, K. Strzelec, and A. Cywinska. 2019. "Serum amyloid A in equine health and disease." *Equine Vet J* 51 (3):293-298. doi: 10.1111/evj.13062.
- Wolfs, T. G., R. K. Jellema, G. Turrisi, E. Becucci, G. Buonocore, and B. W. Kramer. 2012. "Inflammation-induced immune suppression of the fetus: a potential link between chorioamnionitis and postnatal early onset sepsis." *J Matern Fetal Neonatal Med* 25 Suppl 1:8-11. doi: 10.3109/14767058.2012.664447.
- Wooding, F. B., and A. L. Fowden. 2006. "Nutrient transfer across the equine placenta: correlation of structure and function." *Equine Vet J* 38 (2):175-83. doi: 10.2746/042516406776563341.
- Wynn, M. A. A., B. A. Ball, J. May, A. Esteller-Vico, I. Canisso, E. Squires, and M. Troedsson. 2018. "Changes in maternal pregnane concentrations in mares with experimentally-induced, ascending placentitis." *Theriogenology* 122:130-136. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.001.
- Xu, P., N. Alfaidy, and J. R. Challis. 2002. "Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor." *J Clin Endocrinol Metab* 87 (3):1353-61. doi: 10.1210/jcem.87.3.8320.
- Yoon, B. H., R. Romero, J. Y. Shim, S. S. Shim, C. J. Kim, and J. K. Jun. 2003. "C-reactive protein in umbilical cord blood: a simple and widely available clinical method to assess the risk of amniotic fluid infection and funisitis." *J Matern Fetal Neonatal Med* 14 (2):85-90. doi: 10.1080/jmf.14.2.85.90.
- Yu, Q., and I. Stamenkovic. 2000. "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis." *Genes Dev* 14 (2):163-76.
- Zakiyanov, O., M. Kalousova, T. Zima, and V. Tesar. 2019. "Matrix Metalloproteinases in Renal Diseases: A Critical Appraisal." *Kidney Blood Press Res* 44 (3):298-330. doi: 10.1159/000499876.
- Zhang, C., L. Wang, T. Li, W. Mao, B. Liu, and J. Cao. 2019. "EP2/4 receptors promotes the synthesis of PGE2 increasing tissue damage in bovine endometrial explants induced by Escherichia coli." *J Pharmacol Exp Ther*. doi: 10.1124/jpet.119.262444.

11.0 ANEXOS.

11.1 Preparación de las soluciones para la cuantificación de eIL-1 β .

A) Fosfato salino (PBS). El cuadro 5 indica los reactivos para la preparación de 500mL de una la solución amortiguadora de PBS. Aforar a 500mL con agua destilada y ajustar a un pH de 7.0.

Reactivo	Concentración	Peso/volumen	No de catálogo
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	0.02 M	1.2 g	J.T Baker® 381801
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	0.02 M	1.42 g	Sigma® S-7907
Cloruro de sodio (NaCl)	0.15 M	4.35 g	J.T Baker® 362401

Cuadro 5. Composición de la solución amortiguadora de fosfatos.

B) Solución de lavado. Agregar 2.5mL (0.5%) de Tween 20 (Sigma de México® 9005-64-5) a 500mL de solución de PBS.

C) Solución de bloqueo. Agregar 100mg (1%) de albúmina sérica bovina (BSA, Euro Clon, Albumin Fraction V, EMR086050) a 10mL de PBS.

D) Sustrato TMB. El sustrato está compuesto por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y tetrametilbencidina (TMB). Realizar 10mL de una solución H₂O₂:TMB en una proporción 1:1 (R&D Systems DY999).

E) Solución ácido sulfúrico para detener la reacción enzimática. Se requieren 10mL de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) (R&D Systems DY994).

La cuantificación de la eIL-1 β (DY3340; R&D Systems) contiene los siguientes viales: anticuerpo de captura (1 vial, Goat Anti-Equine IL-1 β), anticuerpo de detección (1 vial Biotinylated Goat Anti-Equine IL-1 β Detection Antibody), curva estándar (3 viales), y estreptavidina-HRP (1 vial).

El procedimiento se realizó durante dos días, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y como ha sido descrito previamente por nuestro grupo de investigación. (Alvarez-Cabrera et al. 2018, Flores-Herrera et al. 2012)

11.2 Protocolo del ELISA para la cuantificación de eIL-1 β .

DÍA UNO.

1. Preparación de la placa (96 pozos).

El vial del anticuerpo de captura presenta una concentración de 144 μ g. Este vial se reconstituye con 1mL de PBS (**Ver Cuadro 5**).

La concentración de trabajo del Ab de captura recomendada por el fabricante es de 800ng/mL.

Se requieren 100 μ L por pozo, sin embargo, se calcula a 100 pozos en vez de 96 para tener un volumen residual. Entonces: 100 μ L X 100 pozos = 10,000 μ L o 10mL.

Lo anterior significa que necesitamos: 800ng/mL (concentración de trabajo) por 10mL = 8,000 ng u 8 μ g. Por lo tanto, requerimos del vial del anticuerpo de captura:

$$144\mu\text{g} - 1000\mu\text{L} (1\text{mL})$$

$$8\mu\text{g} - X$$

X = 55.55 \approx 56 μ L del vial reconstituido del anticuerpo de captura.

Finalmente, nuestra dilución final es de 56 μ L del vial reconstituido del anticuerpo de captura y cuanto baste para 10mL de PBS (9,944 μ L o 9.944 mL de PBS).

Una vez depositados los 100 μ L de anticuerpo de captura en cada pozo, la placa se cubre con una membrana adhesiva para evitar evaporación (SealPlate, Excel Scientific; CA, USA) y finalmente, se deja incubar toda la noche a temperatura ambiente.

DÍA 2

2. Lavar la placa.

Al término de la incubación, a la placa se le retira el anticuerpo de captura y los pozos son lavados 3 veces con la solución de Tween-PBS (**Ver apartado B de la sección 11.1**).

3. Bloquear la placa.

Colocar a cada pozo 100 μL de la solución de bloqueo (**Ver apartado C de la sección 11.1**). Sellar la placa con la membrana adhesiva e incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, la placa se lava tres veces (**Ver paso 2**).

4. Preparación de la curva estándar

EL vial contiene una concentración de 45ng. La curva estándar recomendada tiene 7 puntos con un rango de 125-8000pg. El vial del estándar se diluye en 500 μL de solución de bloqueo (**Ver apartado C de la sección 11.1**), por lo que la concentración final es de 45ng/500 μL . Además, se recomienda utilizar un volumen final de 1000 μL en la dilución menor para que a partir de ella se realicen diluciones dobles seriadas.

El primer punto de la curva inicia en 8000 pg/mL (8ng) y nuestro vial original está a 45ng/mL. Por lo tanto requerimos:

45ng – 500 μL

8ng - X

X= 88.88 μL \approx 89 μL del vial reconstituido del estándar.

Finalmente, nuestra dilución final para el primer punto de la curva de 8000ng/mL es de 89 μL del vial reconstituido del estándar y cuanto baste para 1000 μL de solución de bloqueo (911 μL de solución de bloqueo).

Los siguientes 6 puntos de la curva se forman a través de diluciones dobles seriadas como se muestra en la **Figura 25**.

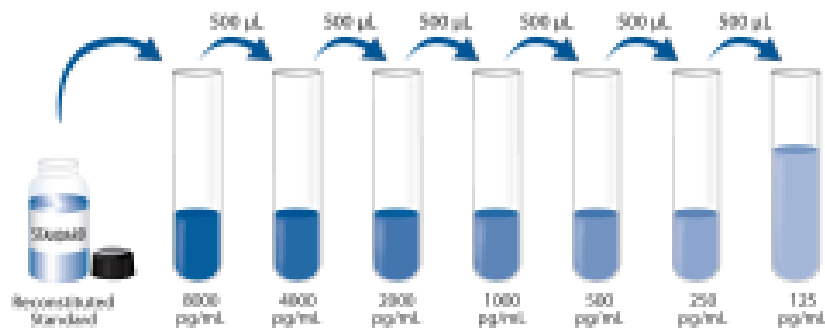


Figura 25. Procedimiento para ejecutar las diluciones dobles seriadas de la curva estándar, según inserto del Kit.

5. Agregar curva estándar y muestras a la placa.

Colocar 100µL de cada punto de la curva y de las muestras de suero por duplicado (Cuadro 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	Y1 240	Y1 240	Y5 240	Y5 240	Y9 240	Y9 240	Y13 240	Y13 240	UNE	UNE
B	ST2	ST2	Y1 320	Y1 320	Y5 320	Y5 320	Y9 320	Y9 320	Y13 320	Y13 320		
C	ST3	ST3	Y2 240	Y2 240	Y6 240	Y6 240	Y10 240	Y10 240	Y14 240	Y14 240		
D	ST4	ST4	Y2 320	Y2 320	Y6 320	Y6 320	Y10 320	Y10 320	Y14 320	Y14 320		
E	ST5	ST5	Y3 240	Y3 240	Y7 240	Y7 240	Y11 240	Y11 240	Y15 240	Y15 240		
F	ST6	ST6	Y3 320	Y3 320	Y7 320	Y7 320	Y11 320	Y11 320	Y15 320	Y15 320		
G	ST7	ST7	Y4 240	Y4 240	Y8 240	Y8 240	Y12 240	Y12 240	Y16 240	Y16 240		
H			Y4 320	Y4 320	Y8 320	Y8 320	Y12 320	Y12 320	Y16 320	Y16 320		

Cuadro 6. Diseño final de la placa. ST: Estándar Y: Yegua, Y1-Y6: Yeguas sanas, Y7-Y16: Yeguas problema, 240 y 320 son los días de gestación. Las casillas sombreadas son los duplicados. UNE: unión no específica (en estos pozos no se coloca anticuerpo de captura)

Una vez depositados los 100µL de cada estándar y de las muestras, cubrir la placa con una membrana adhesiva y dejar incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

Después del tiempo de incubación, lavar la placa como se indicó en el paso número 2.

6. Reacción de detección.

El anticuerpo de detección tiene una concentración de 27µg. Este vial se reconstituye con 1mL de solución de bloqueo (**Ver apartado C de la sección 11.1**), por lo que la concentración final del vial es de 27 µg/mL.

La concentración de trabajo del Ab de detección recomendada por el fabricante es de 150ng/mL.

Se requieren 100µL por pozo, sin embargo, se calcula a 100 pozos en vez de 96 para tener un volumen residual. Entonces: 100µL X 100 pozos = 10,000µL o 10mL.

Lo anterior significa que necesitamos: 150ng/mL (concentración de trabajo) por 10mL= 1,500 ng u 1.5 µg. Por lo tanto, requerimos del vial del anticuerpo de captura:

$$27\mu\text{g} - 1000\mu\text{L} (1\text{mL})$$

$$1.5\mu\text{g} - X$$

$$X = 55.55 \approx 56 \mu\text{L} \text{ del vial reconstituido del anticuerpo de detección.}$$

Finalmente, nuestra dilución final es de 56 µL del vial reconstituido del anticuerpo de detección y cuanto baste para 10mL de solución de bloqueo (9,944µL o 9.944 mL de BSA1% diluido en PBS).

Una vez depositados los 100µL de anticuerpo de detección a la concentración adecuada en cada pozo, la placa se cubre con una membrana adhesiva y finalmente, se deja incubar 2 horas a temperatura ambiente.

Después del tiempo de incubación, lavar la placa como se describió en el paso 2.

7. Agregar HRP con estreptavidina.

El vial contiene 1mL de estreptavidina conjugada con HRP (peróxidasa de rábano). El fabricante recomienda diluir 200 veces con solución de bloqueo (**Ver apartado C de la sección 11.1**), por lo que al final obtendremos 200mL de solución estreptavidina-HRP.

Se requieren 100µL por pozo, sin embargo, se calcula a 100 pozos en vez de 96 para tener un volumen residual. Entonces: $100\mu\text{L} \times 100 \text{ pozos} = 10,000\mu\text{L}$ o 10mL de solución estreptavidina-HRP.

Una vez depositados los 100µL de solución estreptavidina-HRP en cada pozo, la placa se cubre con una membrana adhesiva y se deja incubar 20 minutos a temperatura ambiente y cubriéndola de la luz.

Después del tiempo de incubación, lavar la placa como se describió en el paso 2.

8. Agregar el sustrato TMB.

Se requieren 100µL por pozo, sin embargo, se calcula a 100 pozos en vez de 96 para tener un volumen residual. Entonces requerimos: $100\mu\text{L} \times 100 \text{ pozos} = 10,000\mu\text{L}$ o 10mL de la solución (**Ver apartado D de la sección 11.1**).

Incubar la placa por 20 minutos a temperatura ambiente y cubriéndola de la luz.

9. Solución para detener la reacción enzimática.

Colocar 100µL de ácido sulfúrico 2N (**Ver apartado E de la sección 11.1**) en cada pozo y leer en el espectrómetro a 450nm.

11.3 Preparación de las soluciones y equipo requerido para la realización de la Zimografía.

1. Equipo.

En el día uno del procedimiento se requiere limpiar los vidrios del equipo con una gasa y alcohol para eliminar todos los rastros de huellas digitales o aceites.

El vidrio tiene una ceja esmerilada de 0.75mm. Sobre estas cejas colocar el segundo vidrio sin esmerilado.

Una vez empalmados, los vidrios deben colocarse en la siguiente estructura sin olvidar posicionar la base plástica por debajo (**Figura 26**):

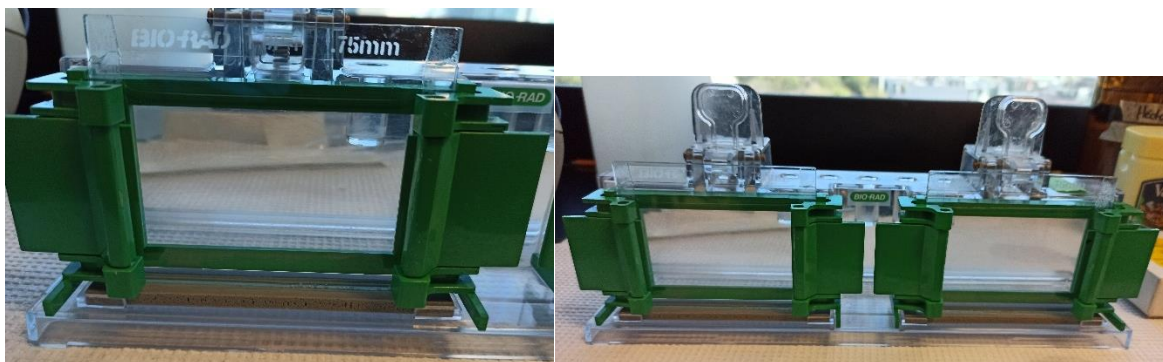


Figura 26. Estructura final para polimerizar geles durante la zimografía.

Llenar con agua destilada en el espacio entre los dos vidrios, esto servirá para verificar si hay fugas. Una vez que hemos verificado la ausencia de fugas, retirar el agua destilada.

2. Soluciones para los geles superior e inferior.

A) Solución de duodecil sulfato (SDS) 10%. Agregar 10g de SDS (Sigma® L3-771) en 100mL de PBS (**Ver apartado A de la sección 11.1**).

B) Buffer Tris Base para gel superior. El **cuadro 7** muestra los reactivos requeridos para realizar 100mL de buffer Tris base para el gel superior. Aforar a 100 mL con agua destilada y ajustar el pH a 6.8

Buffers Tris Base	Reactivo	Peso/volumen
Buffer superior	Tris Base 0.5M	6.05g
	SDS 0.4%	4.0mL de solución al 10% (Apartado 2A sección 11.3)

Cuadro 7. Composición del buffer para la solución del gel superior.

C) Buffer Tris Base para gel inferior. El **cuadro 8** muestra los reactivos requeridos para realizar 100mL de buffer Tris base para el gel inferior. Aforar a 100mL con agua destilada y ajustar el pH a 8.8

Buffers Tris Base	Reactivo	Peso/volumen
Buffer inferior	Tris Base 1.5M (Sigma® T1-503)	18.17 g
	0.4% SDS	4.0mL de solución al 10% (Apartado 2A sección 11.3)

Cuadro 8. Composición de buffer para la solución del gel inferior.

- D) Solución de gelatina:** Agregar 250mg de gelatina (Sigma® 04055) en 50mL de agua destilada.
- E) Persulfato de amonio:** Agregar 10mg de persulfato de amonio (BIO RAD® 161-0144) en 100µL de agua destilada.
- F) Solución de cargado para las muestras.** El **cuadro 9** muestra los reactivos para la preparación de 10mL de solución.

Reactivo	Volumen	No de catálogo
Buffer superior	1.75 mL	Ver apartado 2B de la sección 11.3
Glicerol	1.0 mL	Sigma® G5516
SDS 10%	1.0 mL	Ver apartado 2A de la sección 11.3
Azul de bromofenol	10 mg	Sigma® B5525
Agua destilada	5.75 mL	

Cuadro 9. Composición de la solución de cargado para las muestras.

- G) Buffer de la cámara.** El **cuadro 10** muestra los reactivos para la preparación de 1L de buffer de la cámara. Aforar a 1000mL.

Reactivo	Peso/volumen	No de catálogo
Tris Base	3.0 g	Sigma® T1-503
Glicina	14.4 g	Sigma® G-4392
SDS 10%	10 mL	Ver apartado 2A de la sección 11.3

Cuadro 10. Composición de la solución del buffer de la cámara.

- H) Solución de lavado Tritón 2.5%.** Agregar 12.5mL de Triton (Sigma de México® 9005-64-5) a 500mL de agua destilada. Aforar a 500mL.
- I) Solución de incubación.** El **cuadro 11** muestra la composición de la solución de incubación. Aforar a 100mL con agua destilada y ajustar el pH a 7.4.

Reactivo	Peso/volumen	No de catalogo
Tris Base	6.07g (50mM)	Sigma® T1-503
CaCl ₂	4.41 g (0.1M)	Sigma® C4901
NaCl	8.76 g (0.15M)	J.T Baker® 362401
NaN ₃ acida de amonio	0.2g	Sigma® 609374

Cuadro 11. Composición de la solución de incubación.

J) El **cuadro 12** muestra la composición de la solución de tinción. Aforar a 1000mL (1L) con agua destilada.

Reactivo	Proporción	Volumen/peso	No de catálogo
Metanol	10%	100 mL	Merck® 106018
Ácido acético	10%	100 mL	Merck® 100063
Glicerol	10%	100 mL	Sigma® G5516
Azul de coomasie	10%	1 g	Sigma® B-0149

Cuadro 12. Composición de la solución de tinción.

K) El **cuadro 13** muestra la composición de la solución desteñidora. Aforar a 1000mL (1L) con agua destilada.

Reactivo	Proporción	Volumen	No de catálogo
Metanol	10%	100 mL	Ver apartado 2J sección 11.3
Ácido acético	10%	100 mL	
Glicerol	10%	100 mL	

Cuadro 13. Composición de la solución desteñidora.

11.4 Protocolo para la Zimografía.

El procedimiento se realizó durante dos días como ha sido descrito previamente por nuestro grupo de investigación (Alvarez-Cabrera et al. 2018, Flores-Herrera et al. 2012).

Día 1. Formación de los geles superior e inferior.

Este paso se realiza en hielo (**Figura 27**).

En dos tubos cónicos tipo Falcon marcados con la letra I para inferior y S para superior, realizar las soluciones para los geles como se indica en la **Cuadro 14**.

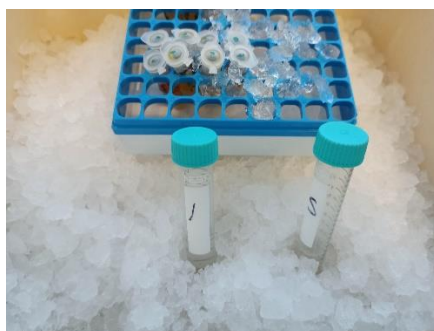


Figura 27. La ejecución de las soluciones para polimerizar los geles se realiza en hielo.

	INFERIOR	SUPERIOR	No de catálogo
Agua destilada	3.4 mL	3.1 mL	
Buffers Tris-Base (la que corresponda)	2.5 mL	1.25 mL	Ver apartado 2B y 2C de la sección 11.3
Acilamida 40%	2.0 mL	0.5 mL	BIO RAD® 161-0144
Gelatina	2.0 mL		Ver apartado 2D de la sección 11.3
TEMED	10.0 µL	10.0 µL	Sigma® T9281
Persulfato	50.0 µL	50.0 µL	Ver apartado 2E de la sección 11.3

Cuadro 14. Composición de las soluciones para los geles superior e inferior.

El TEMED y persulfato son los que catalizarán la polimerización del gel, debido a ello, primero preparar en su totalidad el gel inferior, llenar la cámara hasta el borde

color verde (**Figura 28**) y esperar a que polimerice. Ver el residual de la solución en el tubo cónico como referencia.

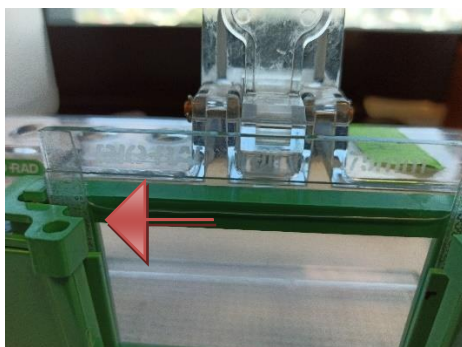


Figura 28. Límite de llenado para el gel inferior (Flecha roja).

Una vez que haya polimerizado, realizar el gel para la parte superior, llenar lo que resta del espacio entre los vidrios y colocar el peine (**Figura 29**).



Figura 29. Colocación del peine una vez que el gel inferior ha polimerizado y se ha llenado el espacio restante con la solución del gel superior.

Dejar polimerizar el gel superior. Usar como referencia de la polimerización la solución restante en el tubo cónico.

Una vez que ambos geles hayan polimerizado quitar el peine.

3. Preparación de las muestras.

En tubos tipo eppendorf prepararemos las muestras y el marcador específico para *proMMP-2* y *proMMP-9* U937 como se indica en la **Cuadro 15**.

Solución de cargado (loading) (Ver apartado 2F de la sección 11.3)	5.0 μL
PBS (Ver apartado A de la sección 11.1)	9.0 μL
Muestra (Suero)	1 μL
Volumen final	15μL

Cuadro 15. Composición de la solución final para las muestras séricas.

Una vez preparada las muestras se van a cargar en los pozos formados cuando quitamos el cepillo del gel superior.

Para ello, los geles se deben colocar en la siguiente estructura con el vidrio más corto hacia el centro **(Figura 30)**:

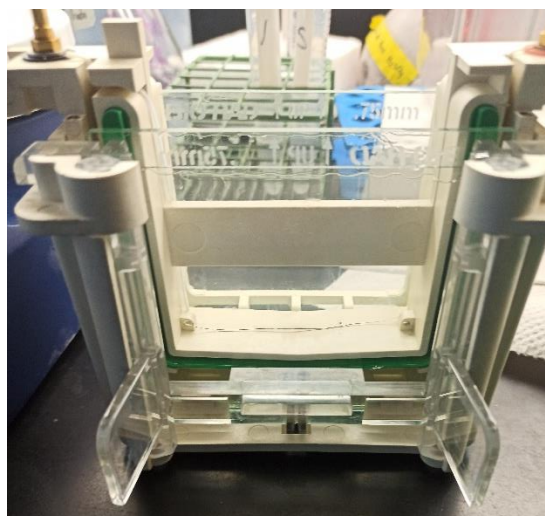


Figura 30. Estructura para montar los geles polimerizados previo a la electroforesis.

4. Cargar muestras

El equipo tiene espacio para dos geles y cada gel tiene un total de 10 pozos, por lo que, para este proyecto, en cada zimografía a realizar se utilizaron 4 muestras de yeguas día 240 de Gestación y 4 del día 320 de Gestación.

En el primer pozo colocaremos el marcador U937, y en los siguientes pozos se utilizó el siguiente orden:

Gel 1

Pozo 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
U937	Vacío	1: 240	1: 320	2: 240	2: 320	3: 240	3: 320	4: 240	4: 320

Gel 2

U937	Vacío	5: 240	5: 320	6: 240	6: 320	7: 240	7: 320	8: 240	8: 320
------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

yegua: día de Gestación

5. Electroforesis

Una vez colocadas las distintas muestras en los pozos, colocar los geles en la cámara de electroforesis y llenar con buffer de la cámara (**Ver sección 2G del apartado 11.3**) por encima de los seguros de acrílico (**Figura 31**).

También llenamos con buffer de cámara el espacio entre los dos geles.

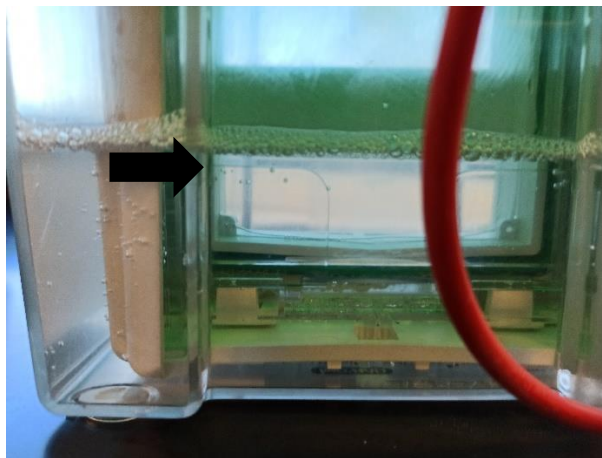


Figura 31. Límite de llenado con la solución buffer de la cámara (Flecha negra).

Luego colocamos la tapa y la conectamos a la fuente de energía. Asegurese que los colores de los cables coincidan entre las conexiones de la tapa de la cámara y en la fuente de energía (**Figura 32**).

La energía requerida es de 24mA constante por 90 minutos.

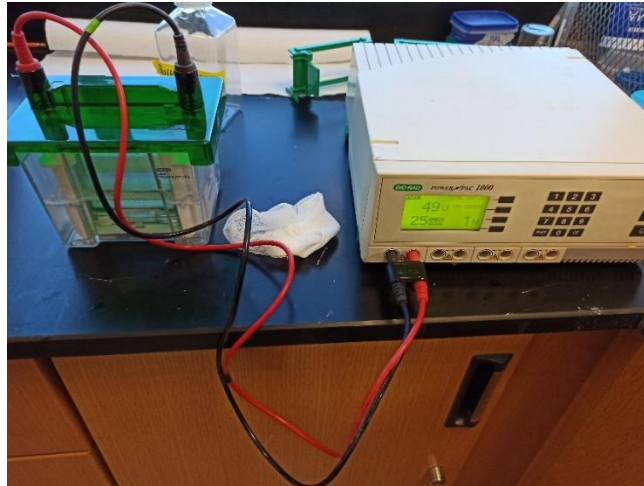


Figura 32. Conexión entre la cámara y la fuente de energía para iniciar la electroforesis. Los colores de los cables deben coincidir con los colores de las conexiones.

La caja debe estar en hielo para evitar desnaturalización de proteínas por calentamiento (**Figura 33**).



Figura 33. Durante la electroforesis, la cámara debe situarse en hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas.

6. Desmontar geles

Una vez pasado el tiempo de electroforesis se demontan los geles.

Con ayuda de una cuña separamos los vidrios y cortamos el gel superior (**Figura 34**).

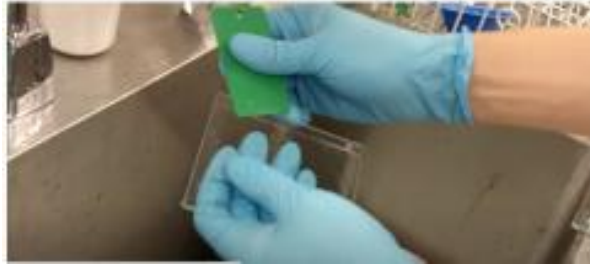


Figura 34. Separación de los vidrios con la ayuda de una cuña para tener acceso al gel.

El gel lo vamos a colocar en recipientes previamente etiquetados (**Figura 35**) y le colocaremos una solución de lavado Triton 2.5% (esto es para remover el SDS. **Ver apartado 2H de la sección 11.3**) que dejaremos en agitación por 10 minutos. Luego, decantar la solución y colocar una vez más solución de lavado por 10 minutos en agitación.



Figura 35. Recipientes donde se depositarán los geles.

Después de los dos lavados, decantar el Triton 2.5% y colocar solución de incubación (**Ver apartado 2I sección 11.3**). Dejar incubar a 25°C durante toda la noche.

DÍA 2

7. Tinción de geles

Al día siguiente decantar la solución de incubación y colocar tinción sin lavado previo (**Ver apartado 2J sección 11.3**). Agitar por 30 minutos.

Decantar la solución teñidora y colocar la solución desteñidora (**Ver apartado 2K sección 11.3**). Agitar por 30 minutos.

Hacer un segundo lavado con solución desteñidora por 30 minutos.

Decantar solución desteñidora y colocar agua destilada.