



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

CUANTIFICACION DE ELASTINA POR INMUNOHISTOQUIMICA EN VASOS
SANGUINEOS DE OVIDUCTO DE YEGUAS FERTILES Y SUBFERTILES

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

MAYRA MOGUEL PAZ

TUTOR:

DRA. MARIA MASRI DABA

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARIA MASRI DABA

DRA. SOFIA YOLANDA DIAZ MIRANDA

DR. GILBERTO CHAVEZ GRIS

MEXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**Cuantificación de elastina por
Inmunohistoquímica en vasos
sanguíneos de oviducto de
yeguas fértiles y subfértiles**

Agradecimientos

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi tutora y amiga María Masri Daba. Eres un ejemplo a seguir.

A Gilberto Chávez Gris con respeto y gratitud.

A Sofía Yolanda Díaz Miranda con reconocimiento a su profesionalismo y calidad humana.

Al Dr. Irwin Liu con admiración por su carrera profesional gracias por su ayuda incondicional.

Al Dr. Juan José Vázquez gracias por ayudarme siempre, participo con gusto de tus éxitos profesionales.

A los miembros del Jurado Leopoldo Henry Paasch Martínez, María Masri Daba, Guadalupe Ivett Medina Aguirre, Héctor Vera Avila, Ana Myriam Boeta Acosta gracias por su apoyo y dedicación.

A Edith Maldonado Castro por su valiosa ayuda y asesoría con la técnica de Inmunohistoquímica.

A Ivett Medina gracias por todos tus valiosos comentarios.

A quienes me ayudaron en el Instituto Nacional de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México Elsa Nydia Hernández Ríos, Vicente Beltrán Campos, Irma Angélica González Luna, Azucena Ruth Aguilar Vázquez gracias.

A quienes me ayudaron en el Instituto Nacional de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM Miguel Angel Martínez, Luis Antonio Morales, Jaime Eugenio Córdoba gracias.

Con especial cariño a mi valioso equipo de trabajo Gris, Erika, Fernando, Sebastián, Julián, Javier y Jose.

Dedicatorias

A mis padres a quienes recuerdo todos los días con cariño y admiración.

A Federico mi esposo y compañero, gracias por comprenderme y ayudarme siempre.

A mis hijos Sebastián y Julián de quien me siento muy orgullosa.

Índice

1. Resumen	9
2. Abstract	9
3 Introducción	10
4 Hipótesis	11
5 Objetivo General	11
5.1 Objetivos Específicos	12
6 Revisión de literatura	12
6.1 Antecedentes	12
6.1.1 Oviducto	12
6.1.2 Fertilización	13
6.1.3 Mecanismos de defensa	15
6.1.4 Plasma seminal	16
6.1.5 Baja fertilidad	17
6.2 Características Histológicas del Sistema Vascular	19
6.2.1 Morfología de los vasos sanguíneos	19
6.2.1.1 Arterias	19
6.2.1.2 Venas	20
6.2.1.3 Micro circulación	21
6.2.1.4 Capilares linfáticos	21
6.3 Descripción Morfológica de las Fibras Elásticas	21
6.3.1 Características generales	21
6.3.2 Elastina	22
6.3.2.1 Síntesis de elastina	22
6.4 Patologías Vasculares con Degeneración de Fibras Elásticas	24
6.4.1 Envejecimiento	24
6.4.2 Inflamación	24

6.4.3 Degeneración de fibras elásticas en arterias	25
6.4.3.1 Arteriosclerosis	25
6.4.3.2 Ateroescclerosis	26
6.4.3.3 Mineralización	26
6.4.3.4 Arteriolesclerosis	26
6.4.4 Degeneración de fibras elásticas en venas y vasos Linfáticos	27
6.5 Patología Vascul ar Uterina en la Yegua	27
6.5.1 Esclerosis de la preñez	27
6.5.2 Disminución de la perfusión uterina	28
6.5.3 Quistes endometriales	28
6.5.4 Elastosis	29
6.5.5 Endometritis infecciosas	30
6.6 Angiogénesis	31
6.6.1 Cicatrización vascular	31
6.6.2 Metaloproteínasas	32
7 Material y Métodos	33
7.1 Animales y Muestreo	33
7.2 Detección de elastina por Inmunohistoquímica (IHQ)	34
7.2.1 Desparafinación	35
7.2.2 Recuperación antigénica	35
7.2.3 Inmunohistoquímica (IHQ)	35
7.3 Inmunotinción contra elastina	36
7.4 Análisis estadístico	38
8 Resultados	39
8.1 Inmunohistoquímica	39
8.2 Análisis morfométrico	40

8.2.1 Análisis morfométrico del área total de venas y arterias en yeguas fértiles y subfértiles.	40
8.2.2 Análisis morfométrico del área de la lámina elástica interna y luz del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles.	43
8.2.3 Análisis morfométrico del área de la capa media del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles.	44
8.2.4 Análisis densitométrico del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles	45
8.2.5 Análisis densitométrico de la lámina elástica interna y luz del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles	46
8.2.6 Análisis densitométrico de la porción media del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles	47
8.2.7 Análisis densitométrico de la lámina elástica interna en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles	48
9 Discusión	49
10 Literatura citada	53
11 Lista de pies de figuras	54

1. Resumen

Estudios en animales equinos hembras han demostrado un incremento en casos de infertilidad relacionada con la edad, número de partos o procesos inflamatorios secundarios a infecciones de tipo bacteriano. Estos factores contribuyen a las alteraciones vasculares y endometriales en el aparato reproductor de las yeguas. Los procesos inflamatorios alteran los vasos sanguíneos por acumulo de elementos formes provocando fibrosis, necrosis de células endoteliales, musculares lisas; provocado por una degeneración en la elastina. El efecto de estos procesos fisiopatológicos conlleva a la obstrucción del oviducto impidiendo o bloqueando el paso del cigoto durante su camino hacia la implantación en el útero. El objetivo de este estudio fue demostrar las diferencias en la densidad y distribución de la elastina de los vasos sanguíneos (venas y arterias) de animales subfebriles. Nuestros resultados muestran un incremento en el área; así como en la luz del vaso y en el grosor de las venas en los animales subfértiles comparadas con las venas de yeguas fértiles. La densidad de la elastina en la lámina elástica interna muestra un decremento significativo al categorizar los vasos sanguíneos en venas y arterias de los animales subfértiles. En la lámina media encontramos incremento significativo en la densidad de elastina en las venas de los animales subfértiles. Así podemos sugerir que las alteraciones en la densidad de la elastina de las venas es un factor que contribuye a la infertilidad de las yeguas clasificadas como subfértiles.

2. Abstract

Several studies in infertility of female horses had been demonstrated a relationship with aging, number of deliveries or inflammatory secondary process associated with bacterial infections. These are important factors to contribute vasculature and endometrial alterations in the reproductive female apparatus. The inflammatory process in turn affects the blood vessels in which different elements produces fibrosis, necrosis in endothelial and smooth muscular cells due to degeneration in elastin. All together the effects of those physiological events produce obstruction or block the entrance of the zygote through the oviduct and its uterus implantation. The objective of this study was demonstrated the distribution in blood vessels (veins and arteries) the elastin distribution and density in female fertile and infertile horses. The results in uterus veins of infertile female, indicated a significantly increases in thickness, area and lumen compared with female fertile horses. The elastin density localized in the deep elastic lamina showed a significant decrease in both veins and arteries in infertile females. In contrast, with the medial lamina there was a significant increase in density of elastin in veins of infertile females. These findings suggested significant alterations in density of elastin in veins which is an important factor to contribute to the infertility in female horses.

3. Introducción

Se requiere prolongar la vida fértil de ciertas yeguas debido a que su potencial genético se establece después de evaluar su desempeño atlético o el de su progenie y cuando esto sucede, sobrepasan los diez años de edad. Estudios en la materia mencionan que la fertilidad en yeguas disminuye conforme aumenta su edad [1-3]. Este suceso promueve el estudio de las alteraciones anatómicas, funcionales e histológicas del aparato reproductor de dichas yeguas con el fin de optimizar y comprender su fisiopatología empleando este conocimiento para incrementar su vida reproductiva y obtener el mayor número de crías de animales tan valiosos en el deporte [2].

El estudio de las patologías del oviducto es de gran importancia debido a la función relevante que juega durante el proceso de fertilización [4]. Existen pocas investigaciones al respecto, ya que el acceso al oviducto se ve limitado por sus características anatómicas.

Se ha mostrado que la calidad de los embriones se ve afectada durante su paso por el oviducto en yeguas multíparas o viejas, pero se desconocen las causas de este proceso. Los vasos sanguíneos uterinos de estas yeguas presentan degeneración de la lámina elástica, por lo que el objetivo del presente estudio es el de evaluar si esos cambios vasculares existen también en el oviducto de yeguas subfértiles ya que en caso de encontrar alteraciones en la distribución de fibras elásticas de los vasos sanguíneos del oviducto por disminución o desarreglo de la elastina a diferencia de las yeguas fértiles, serán necesarios nuevos estudios que prueben o no si la deficiente

calidad de los embriones que producen las yeguas subfértiles está relacionada con la disminución de elastina vascular de sus oviductos [5-8].

4. Hipótesis

4.1 Las yeguas subfértiles presentan menos elastina en los vasos sanguíneos del oviducto que las fértiles.

4.2 Existe una relación inversamente proporcional entre la subfertilidad y la cantidad de elastina de los vasos sanguíneos del oviducto de las yeguas.

5. Objetivo General

Determinar si hay diferencias cualitativas de la elastina y su distribución en los vasos sanguíneos del oviducto de yeguas fértiles y subfértiles, por densitometría y técnicas de inmunohistoquímica.

5.1 Objetivos específicos

- Implementar la técnica de inmunohistoquímica contra elastina en los oviductos de las yeguas fértiles y subfértiles.
- Determinar los criterios de inclusión para el análisis morfométrico sobre la inmunohistoquímica contra elastina en los vasos (venas y arterias) de oviductos en yeguas fértiles y subfértiles.
- Establecer si existen diferencias en la morfometría de los vasos sanguíneos del oviducto en yeguas fértiles y subfértiles.

6.1 Antecedentes

6.1.1. Oviducto

El oviducto es el órgano del aparato reproductor femenino donde se llevan a cabo funciones de gran importancia como la fertilización y transporte de gametos en la mayoría de los mamíferos. Sin embargo, las investigaciones de viabilidad embrionaria y su paso por el oviducto en yeguas, son limitadas por el difícil acceso a este órgano debido a que es largo, tortuoso y con denso tejido como se muestra en la figuras 1 [4-5, 7, 9].

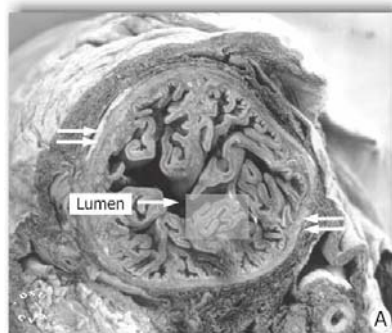


Figura 1. En este esquema se observa el denso tejido del oviducto en un corte transversal.¹

¹<http://instruction.cvhs.okstate.edu/histology/HistologyReference/imagesco/oviductsemcx1L.jpg>

6.1.2 Fertilización

Al momento de introducir semen en las yeguas ya sea por monta directa o inseminación artificial (Fig. 2), los espermatozoides que están acompañados de células endoteliales y bacterias contaminantes, ingresan al útero provocando una respuesta inflamatoria que normalmente es controlada por la yegua fértil mediante mecanismos locales de defensa [10]. Las contracciones uterinas, ayudan a un selecto grupo de espermatozoides a migrar rápidamente hacia el oviducto, llegando a la unión útero tubárica entre 30 minutos y 4 horas después de la inseminación. El plasma seminal (componente líquido del eyaculado secretado por las vesículas seminales, próstata y glándulas bulbo uretrales) funciona como vehículo para el transporte de los espermatozoides y favorece las contracciones peristálticas del miometrio por su contenido de estrógenos y prostaglandinas. Se ha descrito que solo 0.006- 0.007% de espermatozoides inseminados, se recuperan mediante lavados del oviducto en yeguas 18 horas después de la inseminación intrauterina. Lo que indica que el resto del eyaculado es eliminado [11-14].



Figura 2. En esta imagen se muestra la introducción de una pipeta vía vaginal para realizar una inseminación artificial.

Los espermatozoides que logran ingresar al oviducto son morfológicamente normales y permanecen en la unión útero tubárica la cual se edematiza formando una papila que se proyecta a través del cuerno uterino y funciona como reservorio para la protección y capacitación de estas células [12, 15]. Las células epiteliales del oviducto interactúan con las células espermáticas mediante un mecanismo de ligandos que involucra glicoconjugados como moléculas tipo lecitina y proteínas galactosa ligando, caracterizadas en equinos [16-17]. Este contacto íntimo favorece la maduración final del espermatozoide antes de interactuar con el óvulo y adicionalmente lo puede mantener en un estado de latencia hasta por lo menos 4 días [12, 18-22]. Esto explica porqué los espermatozoides de un eyaculado fresco, no son capaces de fertilizar al óvulo y requieren del aparato reproductor femenino, para adquirir esa capacidad [1, 23-25].

6.1.3 Mecanismos de defensa

La mayor parte de los agentes infecciosos no son capaces de penetrar la superficie corporal de los organismos, debido a la gran cantidad de barreras físicas y químicas con las que cuenta como mecanismos de defensa. El sistema de defensa del organismo se divide funcionalmente en sistema innato y de adaptación. El innato, actúa como primera línea de defensa contra agentes infecciosos, siendo los leucocitos las células principales que lo conforman y estimulan la activación del sistema de adaptación para la producción de anticuerpos específicos en caso de ser traspasado por el agente infeccioso [26].

La vagina, el cérvix y la vulva son barreras físicas que protegen el útero de la yegua contra infecciones (Figs. 3A y B). Los anticuerpos y polimorfonucleares actúan como el mecanismo de defensa de adaptación, mientras que la remoción física es dependiente de las contracciones uterinas. El drenaje cervical y linfático evita la acumulación de exudado inflamatorio y semen en el útero. Las contracciones musculares durante el estro, favorecen mecánicamente el drenaje cervical, mientras que el linfático ocurre a través del sistema venoso del endo y miometrio. Dichos mecanismos de defensa, evitan la infección uterina en yeguas fértiles [2, 8, 27].



Figura 3. A en esta fotografía se observa la pérdida de alineación entre vulva y esfínter anal en una yegua subfértil². B. En contraste esta fotografía muestra una correcta alineación entre vulva y esfínter anal en una yegua fértil.

² www.pycock.co.uk/images/SevAbnormalVulva2.jpg

6.1.4 Plasma seminal

El eyaculado se conforma de una fracción líquida llamada plasma seminal y de espermatozoides. El plasma seminal, es un modulador de la inflamación uterina provocada por los espermatozoides y juega un papel importante en la evacuación cervical de estos, aumentando las contracciones uterinas de una manera bidireccional, es decir, la mayor parte del semen es evacuado hacia la vagina mientras que algunos espermatozoides son transportados en sentido opuesto hacia el oviducto[12]. Troedson y cols en 2005 reportaron que algunas proteínas en el plasma seminal equino, aun no identificadas, pueden proteger a los espermatozoides viables de la acción de los polimorfo nucleares [27-28].

Asociado a lo anterior y de acuerdo con estudios realizados de inseminación artificial, utilizando semen congelado (sin plasma seminal), las endometritis son mucho más frecuentes y severas que en los otros casos donde se utiliza semen fresco o refrigerado. Lo anterior es debido a que el plasma seminal reduce la duración pero no la magnitud de la inflamación uterina, por lo que en su ausencia, la inflamación del endometrio se prolonga causando la degeneración gradual del endometrio y de sus vasos sanguíneos [1].

6.1.5 Baja Fertilidad.

La yegua subfértil o susceptible a endometritis, es incapaz de remover agentes contaminantes o espermatozoides que entran durante la inseminación artificial o monta natural en un lapso de 24 horas, lo que ocasiona una reacción inflamatoria. Este hecho fue demostrado por Troedsson y Liu en 1991, quienes al introducir microesferas con

marcadores radioactivos en yeguas con baja fertilidad, observaron que podían retenerlas hasta por 96 horas, de la misma forma que haría una yegua subfétil o de baja fertilidad con el fluido inflamatorio, este retraso en la limpieza uterina es antagónico a la viabilidad del óvulo fertilizado, ya que este permanece en el oviducto por cinco días antes de descender al útero. Durante esos cinco días el útero debe quedar libre de cualquier proceso inflamatorio para mantener la viabilidad del embrión (Fig. 4) [2, 29].

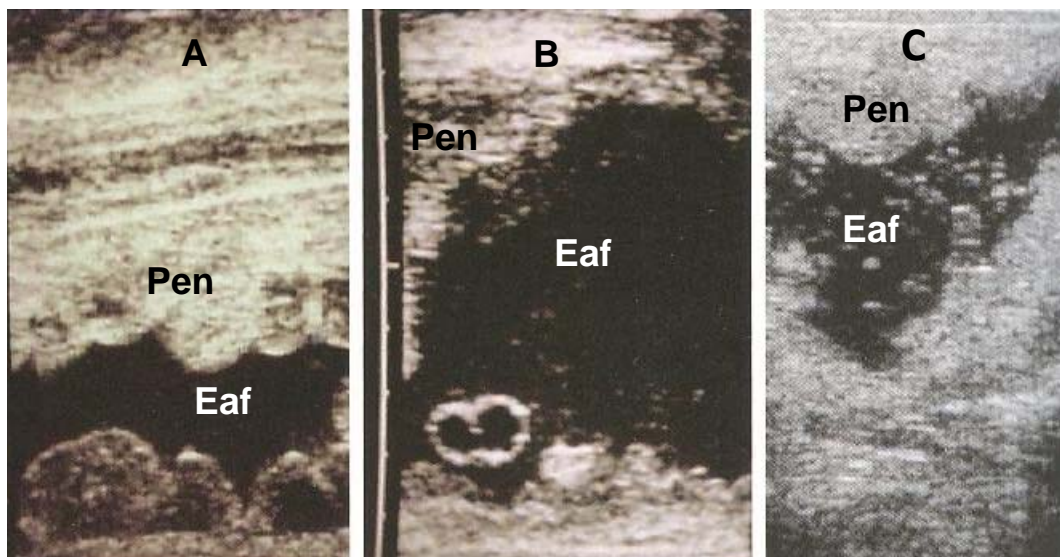


Figura 4. Imágenes mediante ultrasonido de la cavidad uterina en yeguas subfértils.

A) Imagen que muestra una endometritis moderada con edema y acumulación de fluido (Eaf), pared endometrial (Pen). B) Imagen que muestra una endometritis severa con edema y acumulación de fluido. C) Imagen de una endometritis purulenta (Modificado de Liu endometritis crónica recurrente en la yegua subfétil 2007).

Los estudios sobre subfertilidad en las yeguas, demuestran que su fertilidad disminuye después de los diez años de edad y aumenta con la edad o el número de partos. Como se ha mencionado, la infección uterina crónica y la limpieza uterina ineficiente, se asocian a problemas de fertilidad. La permanencia de bacterias, polimorfonucleares y semen en el útero por más tiempo de lo normal, producen una inflamación severa, con edema que no es drenado por los vasos linfáticos. En la endometritis se forman quistes linfáticos o glandulares y llega a ocurrir ulceración del epitelio y fibrosis de la lámina propia, lo que ocasiona que el semen genere inflamación crónica [1-3, 30].

6.2 Características Histológicas del Sistema Vascular

6.2.1 Morfología de los vasos sanguíneos

El sistema circulatorio se compone de arterias elásticas, arterias musculares, arteriolas, arteriolas precapilares, capilares, venas poscapilares y venas [31].

6.2.1.1 Arterias

La rama arterial del sistema circulatorio se divide en grandes arterias elásticas, pequeñas y medias arterias musculares y arteriolas. Histológicamente, están formadas por células musculares lisas (CML) y fibras elásticas. La elastina, que es el principal componente de estas fibras, además de su función elástica y tensil, regula la producción de CML [31-34]. Las arterias, presentan tres capas:

a) túnica íntima formada por células endoteliales, tejido conectivo subendotelial, colágeno, elastina, proteoglicanos, fibroblastos y células musculares lisas. Todo esto

rodeado de una lámina elástica interna, que separa a la íntima de la media. Su grosor disminuye conforme lo hace el calibre arterial y en pequeñas arteriolas mientras que, el tejido subendotelial y la lámina elástica interna pueden llegar a desaparecer b) túnica media, es la de mayor grosor y presenta capas concéntricas de células musculares lisas que predominan sobre las fibras elásticas. c) túnica adventicia, se compone de una lámina elástica externa que contiene colágeno, fibras elásticas y tejido conectivo figura 5 [31, 35].

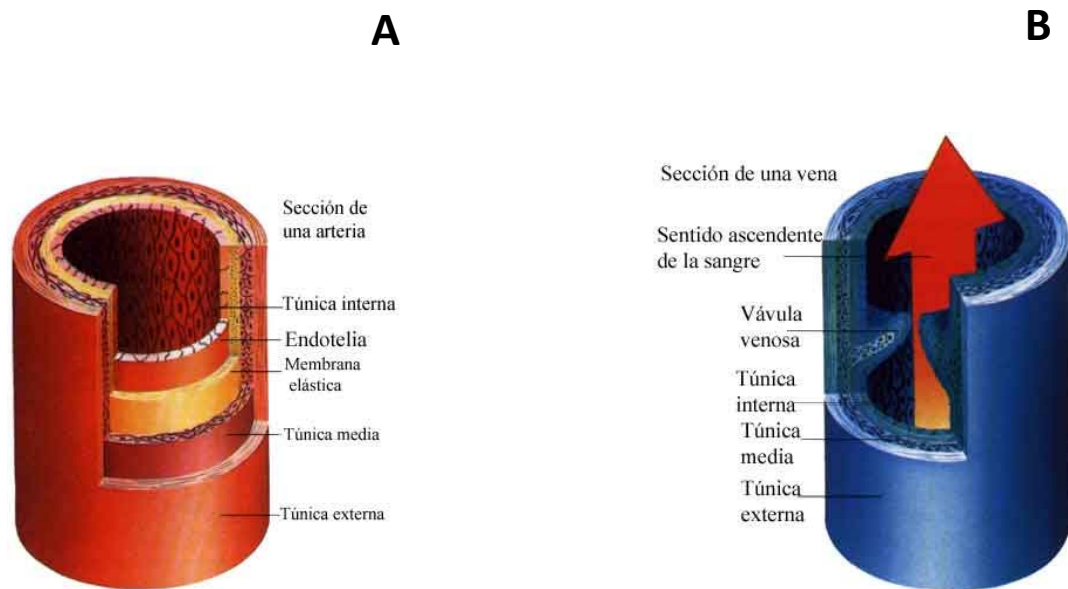


Figura 5. Dibujo que muestra la distribución de las capas arteriales A³ y B⁴ venosas.

³ html.rincondelvago.com/anatomía-y-fisiología

6.2.1.2 Venas

Se clasifican como pequeñas, medianas y grandes. Sus paredes son delgadas en relación a su lumen y por lo tanto, sus túnicas son difíciles de distinguir. La capa media y la lámina elástica interna, son mas aparentes que las grandes venas sin embargo, a diferencia de las arterias, su túnica adventicia es la de mayor grosor. En la figura 5 se muestra la distribución de las capas que conforman una vena [31].

1. Troedsson, M.H., et al., *Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen*. Anim Reprod Sci, 2001. **68**(3-4): p. 273-8.
2. Liu, I.K.M., *Endometritis crónica recurrente en la yegua subfétil*. Revisión Médica Equina 2007. **3**(1): p. 133-146.
3. LeBlanc, M.M., *Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment*. , in *Recent advances in equine reproduction.*, e. In: Ball BA, Editor. 2003, International Veterinary Information Service, Ithaca, NY.
4. Ball, B.A., et al., *Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares*. J Reprod Fertil, 1989. **85**(1): p. 187-94.
5. Liu, I., *Disorders of the oviduct*. 2009: Davis C.A.
6. Troedsson, M.H. and I.K. Liu, *Uterine clearance of non-antigenic markers (51Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections*. J Reprod Fertil Suppl, 1991. **44**: p. 283-8.
7. Hawkins, K.L., *Bilateral salpingitis, hydrosalpinx and oophoritis in a mare*. Cornell Vet, 1986. **76**(1): p. 38-48.
8. Brinsko, S.P., Varner, D.D., Blanchard, T.L. , *The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares*. Theriogenology, 1991. **35**: p.:1111-1117.
9. Saltiel, A., et al., *Pathologic findings in the oviducts of mares*. Am J Vet Res, 1986. **47**(3): p. 594-7.
10. Castillo, E. (2009) *Endometritis: Manejo reproductivo de la yegua problema*.
11. Rigby, S., Derczo, S., Brinsko, S.P., et al., *Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination*. In *Proceedings*. Am Assoc Equine Practitioners, 2000. **46**: p. 332-334.
12. Vanrner, D.D., Johnson, L., *From a Sperm's Eye View-Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell*, American Association of Equine Practitioners, Editor. 2007, International Veterinary

⁴ www.araucaria2000.cl/scirculatorio/vena.jpg

Information Service, Ithaca NY: Orlando, FL. . p. 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP,

13. Mann, T., C. Polge, and L.E. Rowson, *Participation of seminal plasma during the passage of spermatozoa in the female reproductive tract of the pig and horse*. J Endocrinol, 1956. **13**(2): p. 133-40.
14. Blanchard, e.a., *Manual of Equine Reproduction*. 2002.
15. Scott, M.A., Liu, I.K.M., Overstreet, J.W., *Sperm transport to oviducts: abnormalities and their clinical implications*. In *Proceedings*. Am Assoc Equine Practitioners, 1995. **41**: p. 1-2.
16. Gwathmey, T.M., et al., *Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct*. Biol Reprod, 2006. **75**(4): p. 501-7.
17. Sabeur, K. and B.A. Ball, *Characterization of galactose-binding proteins in equine testis and spermatozoa*. Anim Reprod Sci, 2007. **101**(1-2): p. 74-84.
18. Ellington, J.E., Ball, B.A., Blue, B.J., et al., *Capacitation-like membrane changes and prolonged viability in vitro of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells*. Am J Vet Res, 1993. **54**: p. 1505-1510.
19. Ellington, J.E., B.A. Ball, and X. Yang, *Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after coculture with oviductal epithelial cells*. J Reprod Fertil, 1993. **98**(1): p. 203-8.
20. Smith, T.T. and R. Yanagimachi, *Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct*. J Reprod Fertil, 1991. **91**(2): p. 567-73.
21. Smith, T.T. and W.B. Nothnick, *Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability*. Biol Reprod, 1997. **56**(1): p. 83-9.
22. Thomas, P.G., et al., *Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells*. Am J Vet Res, 1995. **56**(12): p. 1657-62.
23. Austin, C.R., *Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg*. Aust J Sci Res B, 1951. **4**(4): p. 581-96.
24. Chang, M.C., *Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes*. Nature, 1951. **168**(4277): p. 697-8.
25. Parker, W.G., J.J. Sullivan, and N.L. First, *Sperm transport and distribution in the mare*. J Reprod Fertil Suppl, 1975(23): p. 63-6.
26. London, I.M., Roitt, J.B., Male, D.K., ed. *Immunology*. 2 ed. 1990, Gower Medical Publishing: London. 350.
27. Troedsson, M.H., *Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare*. Theriogenology, 1999. **52**(3): p. 461-71.
28. Troedsson, M.H., et al., *Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination*. Anim Reprod Sci, 2005. **89**(1-4): p. 171-86.
29. Ferreira, J.C., E.L. Gastal, and O.J. Ginther, *Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age*. Reproduction, 2008. **135**(4): p. 541-50.
30. Ball, B.A., *La histoscopia en la yegua: ablación de los quistes endometriales y aplicaciones diagnósticas*. Revisión Médica Equina 2007. **2**(1): p.: 63-68.
31. Barrios, G., et al. , *Cardiología del adulto*. Revisión de temas Colegio Panamericano del Endotelio, 2002. **4**: p. 324-334.
32. Pascual, G., et al., *TGF-beta1 upregulation in the aging varicose vein*. J Vasc Res, 2007. **44**(3): p. 192-201.
33. Greenwald, S.E., *Ageing of the conduit arteries*. J Pathol, 2007. **211**(2): p. 157-72.
34. Ahmad, P.J., L.R. Osborne, and M.P. Bendeck, *Bouncing back from elastin deficiency*. Circ Res, 2007. **101**(5): p. 439-40.

35. Barrios, G., et al *La Intima*. Cardiología del adulto, 2002. **10**((2)): p. 73-90.

6.2.1.3 Microcirculación

Es la encargada del intercambio de gases, nutrientes y otros residuos entre la sangre y el tejido extravascular. Estos pequeños vasos sanguíneos no exceden de 100µm de diámetro y comprenden a las arteriolas, arteriolas terminales, capilares, postcapilares venosos y vénulas. Los capilares están compuestos por células endoteliales rodeadas de una lámina basal [1].

6.2.1.4 Capilares linfáticos

Se originan en el tejido conectivo, sus paredes son muy permeables y presentan células endoteliales y una lámina basal discontinua. Los de mayor grosor tienen válvulas, su lámina basal es continua y con dificultad se distinguen las 3 tunicas sin lámina elástica interna [1-2].

6.3 Descripción Morfológica de las Fibras Elásticas

6.3.1 Características generales

En los vertebrados en general, las fibras elásticas se pueden encontrar de manera predominante en los sitios en donde el tejido sufre repetidos ciclos de extensión-relajación. Como ejemplo: las arterias, ligamentos, pulmones y piel. Dichas fibras presentan sorprendentes cualidades elásticas, quizá la más admirable sea su alta resistencia a la fatiga como ejemplo tenemos las fibras elásticas de las arterias humanas (especialmente del arco aórtico) que sobreviven más de 60 años, soportando miles de millones de ciclos de extensión-relajación [3].

Las fibras elásticas, son delgadas, largas y ramificadas, se agrupan formando haces. El principal componente de éstas, es la elastina, que se une a la microfibrilina formando una especie de andamio y a diferencia del colágeno posee muy poca hidroxiprolina y nada de hidroxilisina. La gran elasticidad que presentan se debe a que poseen aminoácidos poco comunes como desmosina e isodesmosina, los cuales forman enlaces cruzados, otorgándole un alto grado de elasticidad, pudiendo estirarse hasta el 150% antes de romperse [3-4].

6.3.2 Elastina

La elastina es el principal polipéptido estructural de las fibras elásticas y forma parte de la matriz extracelular. Se compone de alrededor de 800 aminoácidos y tiene un peso molecular de 72,000 daltons, es rica en glicina (G), valina (A), prolina (P) y alanina (A). Aproximadamente el 90% de sus aminoácidos son de resto lateral apolar y existen ciertas secuencias que se encuentran repetidas como las VPG, VPGG, GVGVP, IPGVG, VAPGVG. La más común es la secuencia GVGVP, la cual aparece en fragmentos que contienen hasta 11 pentapéptidos consecutivos (VPGVG). Basados en las secuencias que se encuentran repetidas en la elastina natural, se forman los polímeros tipo-elastina (ELP), de los cuales el de mayor renombre es el poli (VPGVG) [3-5].

6.3.2.1 Síntesis de Elastina

Las células musculares lisas y los fibroblastos secretan elastina como un monómero soluble llamado tropoelastina. En el espacio extracelular, sus residuos de lisina son modificados para formar puentes entre sus cadenas con la ayuda de la enzima lysil-

oxidasa (LOX), que cataliza la deaminación oxidativa de los grupos lisil. Se asume que las microfibrilinas poseen un andamio que ayuda a su unión con la elastina alineándose con las lisinas. Estas enzimas son cobre dependientes y confieren propiedades de elasticidad a la elastina. La deficiencia de cobre o inhibidores de LOX reducen los puentes de elastina entre un 40 y 53% en útero de ratones pos parto [6-7].

Las fibras elásticas están formadas por elastina que se encuentra como material amorfo y rodeado de una red de microfibrilina. Las microfibrilinas están compuestas por glicoproteínas y sirven de andamio para la organización de la elastina. Dentro de las proteínas de este complejo, las más grandes, son las fibrilinas 1 y 2 que contienen un tipo Factor de Crecimiento Epidermal [8].

La “Elastin Microfibriline Interphase Protein” (EMILIN), es una glicoproteína de la matriz extracelular, que sirve de enlace entre la Elastina y Microfibrilina, lo cual se ha mostrado *in vitro* que juega un papel importante en la secreción de elastina [9].

Otra glicoproteína extracelular llamada Fibulina S interviene de manera importante en el andamiaje microfibrilar, deposición de tropoelastina soluble, mantenimiento de las propiedades mecánicas, señales de transducción y control de la función celular, regulando los tejidos elásticos. La síntesis de Fibulina S es estimulada por el Factor de transformación beta (TGF) mediante la vía de señalización de las proteínas Smads que son fosforiladas con intervención de la Fosfoinositol 3 cinasa para trasladarse al núcleo como factores de transcripción. El TGF en su forma activa actúa en la reparación de fibras elásticas dañadas promoviendo la síntesis de fibulinas, elastinas y otros componentes elastogénicos [10].

6.4 Patologías Vasculares con Degeneración de Fibras Elásticas

6.4.1 Envejecimiento

Con el paso de los años, los vasos sanguíneos del organismo se degeneran lenta y gradualmente. Su apariencia se vuelve tortuosa debido a la proliferación de células musculares lisas hacia la túnica íntima provocando su engrosamiento. Aunado a esto, las fibras elásticas y las células musculares de la capa media se deterioran dando lugar a la acumulación de tejido fibroso [2].

6.4.2 Inflamación

Se caracteriza por la acumulación de células inflamatorias (leucocitos, neutrófilos y macrófagos) alrededor de los vasos sanguíneos causando en sus paredes, fibrosis, degeneración de fibras elásticas y necrosis tanto de células musculares lisas como endoteliales. Las vasculitis pueden ser causadas por tóxicos, enfermedades infecciosas, inmunomediadas o metabólicas. Las arterias, venas, vasos linfáticos y capilares pueden estar afectados simultáneamente y el proceso inflamatorio dificulta la diferenciación de las capas de los vasos involucrados y por lo tanto su clasificación. Es común la presencia de material fibrinoide (fibrina y eosinófilos) acompañado de inmunoglobulinas, complemento y plaquetas. También, a menudo se activa la cascada de coagulación dando lugar a la formación de trombos. La vasculitis puede desarrollarse por daño directo sobre las células del endotelio causada por agentes infecciosos especialmente por toxinas de bacterias Gram negativas [2, 11].

En humanos, las infecciones vaginales suelen ascender hacia el útero y llegar al líquido amniótico provocando placentitis. Las principales bacterias que lo ocasionan

son Gram negativas como *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* y *Fusobacterium nucleatum*, que contienen lipopolisacáridos secretores de citocinas proinflamatorias y catepsina S. Estas citocinas actúan degradando la elastina de las células musculares lisas del cérvix humano, esto favorece la relajación cervical y el aborto [12-13].

6.4.3 Degeneración de fibras elásticas en arterias.

6.4.3.1 Arteriosclerosis

Se define como el endurecimiento de las arterias debido a lesiones crónicas, pérdida de elasticidad y reducción del lumen vascular por cambios proliferativos y degenerativos de las capas media e íntima. Las enfermedades proliferativas vasculares, se asocian con deficiencias en la modulación, proliferación y migración de células musculares lisas hacia el lumen de la arteria con la formación de la neointima. Esta respuesta fibrocelular, se atribuye a la liberación de múltiples citocinas y factores de crecimiento por células inflamatorias. La pérdida de organización de la elastina en la matriz extracelular, provoca defectos en la morfogénesis celular. La elastina es un potente regulador autócrino de la actividad de las células musculares lisas, que ayuda a prevenir la patología fibrocelular, induciendo la organización de las fibras de actina e inhibiendo la proliferación y migración de CML por la vía de señalización de las proteínas G [13].

La lesión inicia cuando microtrombos de plaquetas son depositados en el endotelio vascular. Las plaquetas secretan Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Epidermal y otros mitógenos que estimulan la proliferación y migración de células musculares lisas hacia la íntima. De forma diversa

las lesiones ocasionadas directamente sobre el endotelio, aumentan la secreción de mitógenos [2, 14]. Gruninger, Schoon y Schoon en 1998 encontraron fibrosis perivascular y de la túnica íntima en los vasos sanguíneos (arterias y venas) del endometrio de yeguas multíparas, concluyendo que este tipo de angiosis es común en especies multíparas [15].

6.4.3.2 Ateroesclerosis

Es de poca importancia en animales domésticos. Afecta grandes arterias y se caracteriza por la formación de placas de origen lipídico que se inducen al tejido subendotelial [2].

6.4.3.3 Mineralización

Es la calcificación de tejido arterial en áreas de inflamación, degeneración y trombosis. También puede presentarse en casos de hipercalcemia o hiperfosfatemia. Estos minerales son depositados adyacentes a las fibras elásticas formando anillos y causando rigidez arterial [2].

6.4.3.4 Arterioloesclerosis

Es descrita como un grupo de lesiones arteriolares que pueden ser hialinas o hiperplásicas. Su principal causa es hipertensión. El daño endotelial, incrementa la permeabilidad vascular y con esto la secreción de componentes del plasma como fibrina [2].

6.4.4 Degeneración de fibras elásticas en venas y vasos linfáticos

La importancia clínica de la degeneración o inflamación de las venas y los capilares linfáticos se basa en la formación de trombos y en la congestión pasiva por obstrucción del retorno venoso y linfático del área afectada con la subsecuente acumulación de linfa en el tejido intersticial [16-17].

6.5 Patología Vascular Uterina en la Yegua

6.5.1 Esclerosis de la preñez

Después del parto, las arterias uterinas suelen presentar cambios llamados esclerosis de la preñez. Las principales alteraciones vasculares observadas son inflamación (en especial perivascular) y degeneración. La pared de las arterias muestran elastosis de la íntima, adventicia o ambas. Esta elastosis se manifiesta como la degeneración de fibras elásticas preexistentes así como el incremento de glicosaminoglicanos [12, 18-20].

La patogénesis de la angiosis endometrial en yeguas es controversial, por ejemplo Oikawa en 1993 y Nambo en 1994 reportan mencionan que la esclerosis vascular se produce de manera compensatoria por su baja resistencia al estrés mecánico debido a la atrofia de la media que suelen tener las yeguas viejas. Los cambios vasculares del endometrio en yeguas jóvenes, puede resolverse después de un periodo no reproductivo de varios años, pero en animales mayores de 18 años, esa capacidad regenerativa es reducida e influenciada directamente por el número de partos. Es decir a mayor número de partos, menor capacidad regenerativa de los vasos del endometrio [12, 15, 19].

6.5.2 Disminución de la perfusión uterina

Se han realizado estudios con ultrasonografía doppler en diferentes mamíferos, incluyendo yeguas y humanos, en los que se demuestra que una disminución del flujo sanguíneo y perfusión uterina están relacionados con baja fertilidad. A pesar de que son necesarios más estudios acerca de esta patología, parece haber una relación directa entre la perfusión sanguínea y la contracción muscular. Mediante electromiografía, se midieron las contracciones uterinas en yeguas susceptibles a endometritis con deficiente irrigación sanguínea por degeneración vascular, encontrando que después de un desafío bacteriano, muestran un significativo deterioro de la actividad miometrial retrasando entre 4 y 5 horas el inicio de las contracciones musculares uterinas comparado con las yeguas resistentes [12, 21-23].

6.5.3 Quistes Endometriales

La endometritis crónica provoca fibrosis periglandular y obstrucción de canales linfáticos en la yegua provocando la formación de estructuras llenas de líquido llamadas quistes. La etiopatogénesis de los quistes uterinos es incierta, pero existe evidencia de que una irrigación anormal uterina contribuye a su formación, debido a un drenaje inadecuado generado por el retorno venoso ineficiente y angiosis de las arteriolas en el endometrio y de la red vascular localizada por debajo del estrato esponjoso del mismo y entre las capas musculares del miometrio. Silva y Ginther en 2006, mediante ultrasonografía transrectal a color doppler mostraron que las yeguas con quistes uterinos que abarcan una zona amplia del endometrio presentan una perfusión vascular reducida [22-24].

6.5.4 Elastosis

El termino elastosis se refiere a un proceso degenerativo de las fibras elásticas, ya sea por aumento o desarreglo de las mismas, lo que provoca una pérdida de sus capacidades de extensión y tensión figura 6 [5].

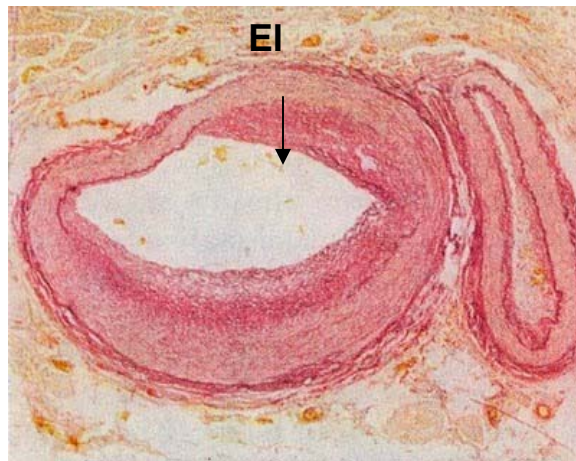


Figura 6. En esta imagen se puede observar el aumento de fibras elásticas en la lámina elástica de un vaso con elastosis EI¹.

Existe una red vascular importante que se localiza por debajo del estrato esponjoso del endometrio, entre las capas de los músculos circulares y longitudinales del miometrio. Se cree que esos vasos sanguíneos juegan un papel substancial en el proceso de contracción del miometrio, el cual se encuentra reducido en yeguas viejas, múltiparas con historia de infecciones uterinas crónicas y deficiente limpieza uterina a

¹ high-fat-nutrition.blogspot.com/2010/02/arter

través de biopsias uterinas, observó una extensa elastosis, tanto perivascularmente como en las paredes de los vasos sanguíneos de esa región [21].

La degradación de elastina en los vasos sanguíneos del endometrio y miometrio, alteran las contracciones uterinas debido a la pérdida de la “relajación-extensión” ocasionando un insuficiente flujo sanguíneo y drenaje linfático que alteran la perfusión uterina y retrasan la limpieza uterina teniendo como resultado una yegua subfértil. Si la matriz extracelular de los vasos arteriales esta degenerada, la cantidad de exudado que se secreta en el útero durante el estro es mayor debido a la hipertensión arterial y al aumento de flujo sanguíneo y permeabilidad capilar, lo que causa que el drenaje linfático sea insuficiente provocando una inflamación severa durante un periodo prolongado [14, 21, 25-27].

6.5.5 Endometritis infecciosas

Es frecuente la contaminación bacteriana o por hongos durante las endometritis debido a la fácil entrada de bacterias contaminantes durante la monta natural o la inseminación artificial. La deficiente conformación de la vulva en yeguas multíparas o viejas, favorece también la entrada de estos gérmenes [28].

Con respecto a los equinos, **Hong, C.B. y col** entre 1988 y 1989, examinaron 954 placentas abortadas o provenientes de potros prematuros, encontrando placentitis en el 24.7% [28]. El 68.6% de estos casos se asoció a infecciones por hongos y bacterias como *Leptospira spp.*, *Nocardia ssp.*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aureuginosa*, *Streptococcus equisimilis*, *Enterobacter agglomerans* y *Klebsiella pneumoniae*. Muchas de las bacterias antes mencionadas

son Gram (-) y contienen lipopolisacáridos que producen citocinas que degradan las fibras elásticas de la matriz extracelular de los vasos sanguíneos del endometrio, otras bacterias Gram (-) estimulan la llegada de macrófagos que penetran la pared del vaso sanguíneo hasta la capa adventicia desencadenando el proceso de degeneración de la matriz extracelular y la formación de la neointima por inflamación crónica que provoca la migración de las células musculares lisas. Por otra parte los macrófagos secretan elastasas que degeneran las fibras elásticas [1, 13, 16-18, 28].

6.6 Angiogénesis

6.6.1 Cicatrización Vascular

Los eventos iniciales en el proceso de cicatrización son: vasoconstricción, adhesión de células y coagulación. Al romperse los vasos sanguíneos, se agregan plaquetas y se activa la cascada de coagulación. Este proceso se da mediante la participación de citocinas como Interleucina 1 (IL1), Factor de Necrosis Tumoral (FNT) y factores de crecimiento derivados de plaquetas y del endotelio vascular [2, 11].

La matriz del coagulo de fibrina es quimiotáctico para la migración de neutrófilos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Otras sustancias quimiotácticas liberadas por aumento en la permeabilidad vascular son complemento, IL1, FNT y TGF [2, 11].

El factor plaquetario IV y las bacterias contaminantes, atraen células granulocíticas que se adhieren al endotelio vascular secretando proteasas dentro de las cuales se encuentra la elastasa que se encarga de degradar la matriz extracelular (MEC) favoreciendo la migración de células musculares lisas hacia el sitio de la lesión. Este proceso de reparación y migración celular es estimulado por factores de

crecimiento como Factor de Crecimiento Ba (FCBa), Factor de Crecimiento Bb (FCBb), TGF, FNT, IL8, Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y ácido láctico [5, 29].

6.6.2 Metaloproteínasas

Las metaloproteínasas de la matriz extracelular MMPs son una familia de enzimas producidas por diferentes tejidos incluyendo el vascular que degradan diferentes componentes de la MEC. Dentro de ellas se encuentran las colagenasas, gelatinasas, stromelisin, matrilisinas y tipo metaloproteínasas de membrana de matriz [30-31]. Las MMPs tienen efecto directo o indirecto sobre los canales iónicos del endotelio y las células musculares lisas (CML) de los vasos sanguíneos. También parecen actuar sobre otros mecanismos vasculares que controlan la contracción-relajación sin embargo es necesario realizar más estudios al respecto [32].

Existen inhibidores (TIMPs) de las MMPs que reducen la excesiva degradación de la MEC. El balance entre estos dos, juega un importante papel en la angiogénesis y regeneración vascular. Un desbalance entre MMPs y TIMPs provoca la formación de aneurismas, venas varicosas, hipertensión y preclamsia [33].

La metaloelastasa MMP12 digiere a la elastina y actúa como factor quimiotáctico de macrófagos, mismos que son responsables de su producción. La activación de las MMPs es estimulada por diferentes MMP, aumentos de temperatura, bajo PH o de la acción de otras proteinasas [34].

Los factores de crecimiento que intervienen en la angiogénesis son secretados por las células endoteliales mediante un mecanismo autócrino o parácrino estimulando

la expresión de metaloproteínas que remodelan las membranas basales y degradan la matriz extracelular. La excesiva actividad de las metaloproteínas en procesos inflamatorios tumorales o degenerativos provoca una remodelación vascular inadecuada y la formación de la neointima. Aunque también pueden provocar aneurismas por la degradación de la lámina elástica [2, 30, 32].

7. Material y métodos

7.1 Animales y Muestreo

Liu y cols en el Departamento de Salud Pública y Reproducción de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de California, Davis, CA 95616 United States tomaron muestras transversales de 0.5 cm del oviducto de 18 yeguas a la necropsia, según las normas establecidas de manejo de animales de los institutos de Salud Animal. Las fijaron inmediatamente después de su recolección en una solución amortiguada de fosfatos de sodio y paraformaldehído al 4%. Ahí permanecieron hasta antes de incluirlas en bloques de parafina que fueron enviados al Departamento de Patología, de la Unidad de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) del CEIEPAA (Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal) de Tequisquiapan, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para realizar el presente estudio y evaluar el grado de elastosis de los vasos sanguíneos del oviducto de esas yeguas. Dichos bloques de parafina fueron tomados de la necropsia de estas yeguas con historias clínicas y reproductivas completas, las cuales fueron colectadas de diferentes poblaciones de los Estados Unidos, razas y edades, no menores de 3 años de edad con condiciones de salud y estado corporal óptimos para la reproducción.

Con objeto de evaluar la relación entre condición reproductiva y grado de elastosis de los vasos sanguíneos del oviducto, se clasificaron las yeguas en 2 grupos de 9 animales cada uno: 1) Fértiles: fueron aquellas yeguas mayores de 3 años de edad cuya historia reproductiva mostró que fueron fecundadas en un máximo de tres

calores, entre los meses de abril a agosto y sin evidencia ultrasonográfica de acumulación de exudado durante el servicio; 2) Subfértils fueron consideradas las yeguas que no se fertilizaron por lo menos el año anterior a su estudio bajo supervisión médico veterinaria y con evidencia ultrasonográfica de acumulación de exudado durante la inseminación.

7.2 Detección de elastina por Inmunohistoquímica (IHQ)

En el Departamento de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Ciudad Universitaria de la UNAM, a partir de los bloques de parafina, se obtuvieron cortes transversales de oviducto a 3 μ m de grosor y se montaron en laminillas inmunocargadas. En la misma facultad de la USEDICO del CEIEPAA de Tequisquiapan de la UNAM, estas laminillas fueron sometidas a su desparafinación, recuperación antigénica y técnica de IHQ.

7.2.1 Desparafinación

La desparafinación consistió en quitar la parafina a través de un horno calentado a 60° C por 20 minutos. Después, las laminillas se hidrataron en alcoholes graduales descendentes desde Xilol100%, Xilol-Alcohol absoluto 50%, Alcohol absoluto, Alcohol 96%, Amortiguador de fosfatos de sodio (TBS) pH 7, durante periodos de 3 minutos en cada paso.

7.2.2 Recuperación antigénica

Para recuperar los antígenos se utilizó como medio de recuperación antigénica, DIVA 10x Deckloaker (Biocare Medical, Concord, C.A, EUA) en una dilución 1x. Se

sumergieron las laminillas en este medio y se calentaron a 125° C en una cámara de recuperación antigénica (Biocare Medical, Concord, C.A, EUA) por 20 min.

7.2.3 Inmunohistoquímica (IHQ)

Se realizó la IHQ en una cámara húmeda usando el Kit 4 Plus HRP-DAB (Biocare Medical, Concord, C.A, EUA) enjuagando con TBS entre cada paso. Se adicionaron 4 gotas de Peroxidasa del kit por 5 min. Para eliminar el peróxido de hidrógeno endógeno. Posteriormente, para realizar la digestión enzimática, se agregaron 2 gotas de Carezyme II del kit por 10 min a 25° C. Después, se bloquearon las proteínas inespecíficas con 4 gotas de “Blackground eraser” del Kit por 5 min. Se incubó el tejido con 4 gotas del anticuerpo primario 1:50 por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se aplicaron 4 gotas del anticuerpo secundario o Link del Kit durante 10 min. Se lavaron con TBS durante 2 min y después de quitar el excedente, se agregaron 4 gotas de Horse Radish Peroxidasa del kit por 10 minutos. Nuevamente se lavaron las laminillas con TBS durante 2 minutos. La IHQ se reveló con el cromógeno a base de diaminobenzidina del kit utilizando 4 gotas por 5 minutos por laminilla. En algunas muestras se usó como colorante de contraste hematoxilina por 2 minutos.

Se enjuagaron las laminillas con TBS y se deshidrató el tejido en el tren de tinción por 5 segundos 3 veces con alcohol absoluto y tres veces con Xilol. Se colocó el cubreobjetos usando un medio de montaje soluble en alcohol (Clarium Surgipath, Ontario Canadá).

7.3 Inmunotinción contra elastina

Se tomaron fotografías en blanco y negro de las preparaciones del oviducto de yeguas fértiles y subfértiles inmunoteñidas sin colorante de contraste (hematoxilina) para evaluar la localización e intensidad de la Inmunotinción de elastina. Estas imágenes fueron capturadas y digitalizadas en el Laboratorio de Microscopia del Instituto de Neurobiología de la UNAM con un microscopio óptico Nikon Eclipse E-600 y usando un objetivo de 40x Planfluor con una apertura numérica 0.75 y una escala de 50 μ m. El análisis de las imágenes se realizó con el programa "Image J" mismo que utiliza como referencia la escala de grises universal para fotografía de Kodak. Una vez obtenida la estandarización del programa, se realizó el análisis densitométrico de la elastina en el vaso, en la lámina elástica interna, en las capas medias y adventicias de arterias y venas a las cuales se les eliminó la marca de fondo tomando una muestra de densidad de la luz del vaso (área sin marca de elastina). El análisis densitométrico es una forma indirecta de evaluar la cantidad de elastina.

Se capturaron imágenes de vasos sanguíneos completos, en ellos se midió el área y la intensidad de los grises en el total del vaso y por separado de la lámina elástica interna, se calculó la diferencia entre la intensidad de grises del vaso y de la lámina elástica con el objeto de obtener la densidad de la capa media. En todos los casos, para el análisis morfométrico y densitométrico de los vasos sanguíneos se sub agruparon en arterias y venas considerando la misma cantidad para cada una de ellas (45 venas y 45 arterias completas elegidas al azar siempre y cuando en la imagen pueda observarse el vaso completo de yeguas fértiles y el mismo número de yeguas subfértiles). En el caso de la figura 9 D sólo se consideró necesario el análisis densitométrico.

En la figuras 9 A, B, C y D se muestran las zonas consideradas para cada tipo de medición, se señala con un círculo rojo en el lumen del vaso el área que se utilizó para eliminar la marca de fondo.

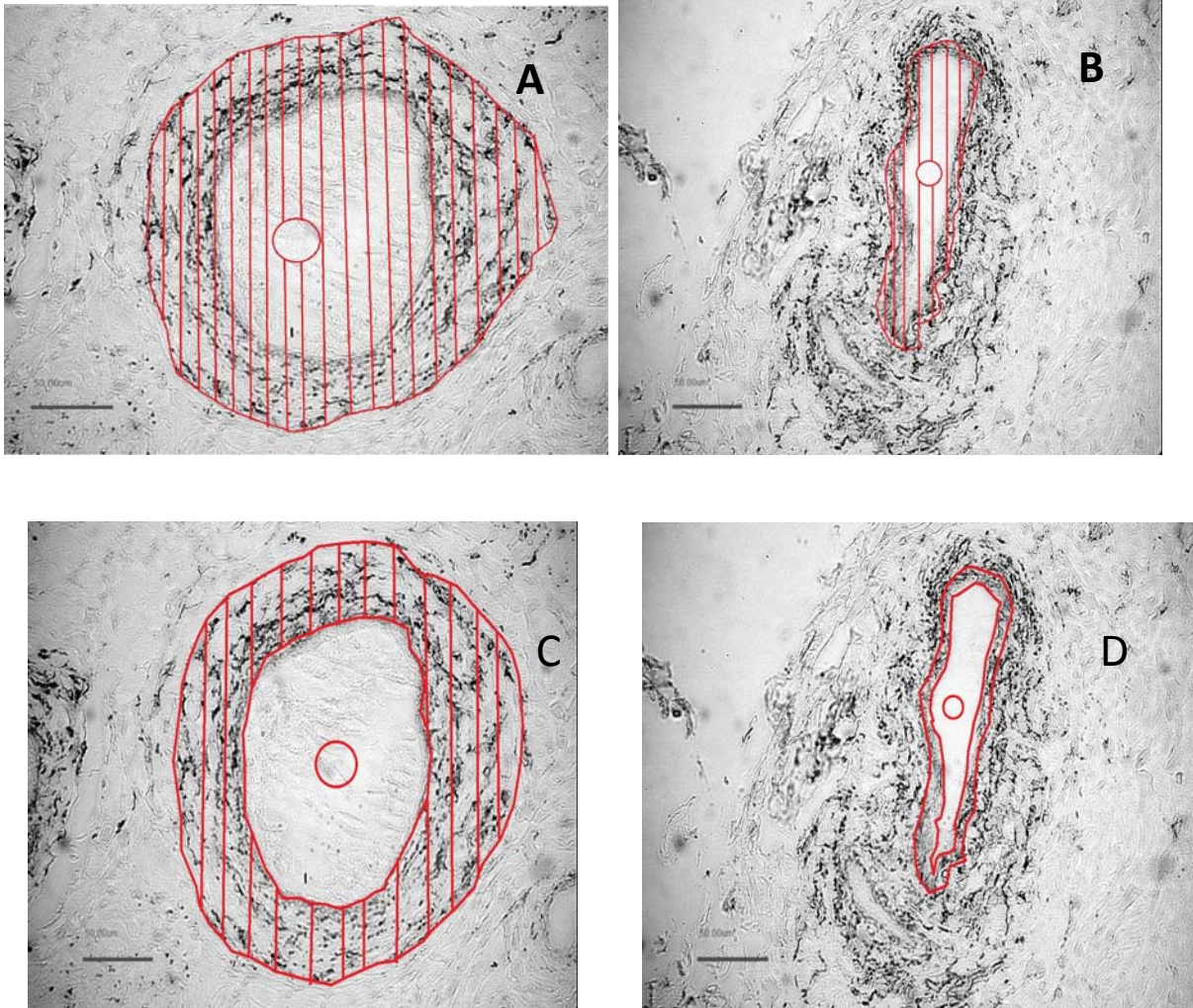


Figura 7. Se muestran ejemplos del método de medición de arterias y venas utilizando un objetivo 40X A, corresponde al área del vaso medida., B, es un ejemplo de la lámina elástica y luz del vaso., C, se señala el área correspondiente a la capa media y D, es el área donde se realizó el análisis densitométrico de la lámina elástica.

7.4 Análisis Estadístico

Se organizaron los datos del área y la intensidad de grises en las diferentes capas de los vasos sanguíneos en Excel utilizando como variable dependiente el área y la densidad e independiente la condición reproductiva y el tipo de vaso y se hicieron cuadros de salida en cada una de las mediciones de los diferentes grupos de estudio que se procesaron con el programa estadístico de Stat-view, con el que se obtuvieron los promedios, los errores estándar y el valor de un nivel de significancia se tomó en $\alpha \leq 0.05$. Las comparaciones entre los grupos fértiles y subfértiles de arterias y venas se realizaron con el ANOVA y la post hoc de Fisher.

8. Resultados

8.1 Inmunohistoquímica

Se obtuvieron 36 preparaciones inmunoteñidas contra elastina de los vasos de las yeguas de ambos grupos, 18 de ellas con hematoxilina como colorante de contraste (9 de yeguas fértiles y 9 de yeguas subfértiles) (Fig. 8 A y B) y 18 sin colorante de contraste (9 de yeguas fértiles y 9 de yeguas subfértiles) para su análisis morfométrico. En la figura 9 A, B, C y D se muestran arterias y venas de este estudio con y sin elastosis.

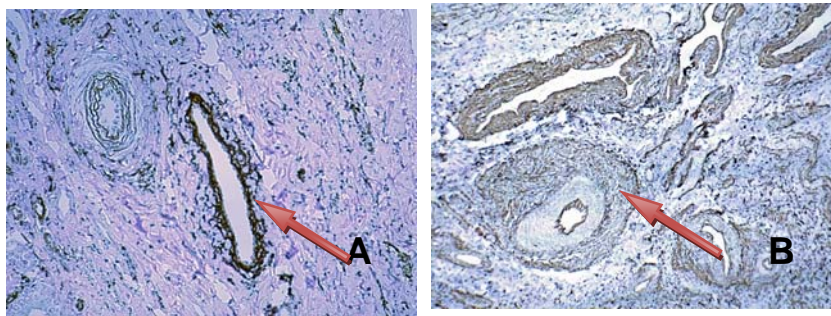
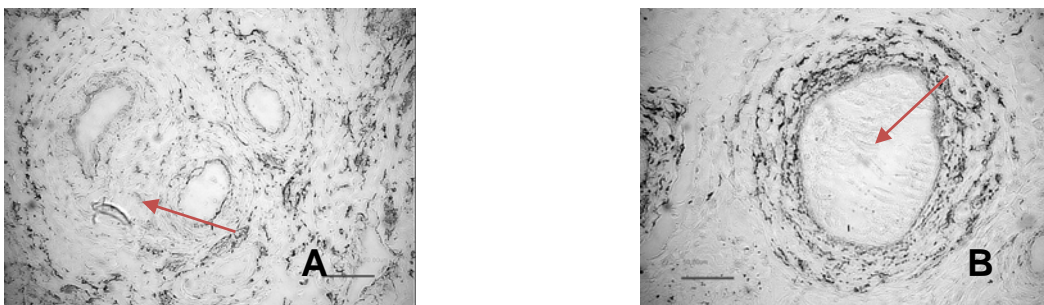


Figura 8. Muestra preparaciones inmunoteñidas utilizando hematoxilina como colorante de contraste y la elastina en color ocre indicadas por la flecha. A se señala una vena y B una arteria.



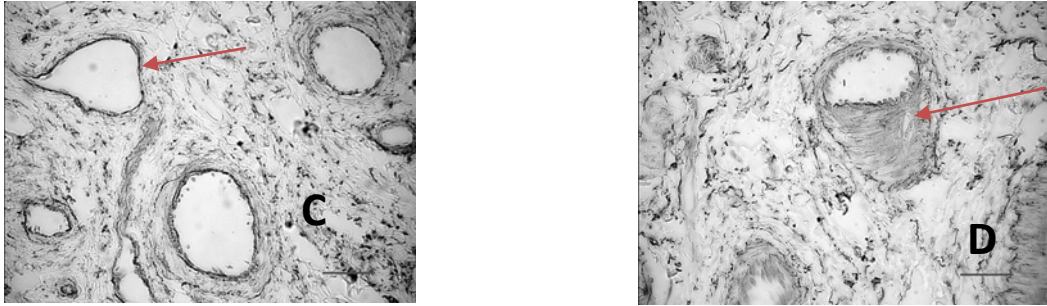


Figura 9. Se muestran preparaciones sin colorante de contraste. En la figura A podemos observar una arteria sin elastosis. En la B una vena con elastosis. En la C una vena sin elastosis y en la D una arteria con elastosis, todas indicadas con la flecha.

8.2 Análisis morfométrico

8.2.1 Análisis morfométrico del área total de venas y arterias en yeguas fértiles y subfértiles.

En la figura 10A y B se muestran las **áreas totales** de los vasos, medidas en micrómetros cuadrados de 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas fértiles, más 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas subfértiles (n=180). El ANOVA en cada grupo indicó diferencias significativas ($F_{1,88} F= 12.33$ y $P=0.0007$) en las **venas**, que mostraron un área mayor en las yeguas subfértiles comparado con las fértiles, lo cual se expresa con diferencias significativas ($P<0.0007$) en la *post hoc* de Fisher. El ANOVA de las **arterias** ($\alpha\leq 0.05$) no mostró diferencias significativas ($F_{1,88} = 0.039$ y $P=0.843$) por lo cual, el área total de las arterias medidas fue similar en yeguas fértiles y subfértiles (Fig. 10A y B).

1. Barrios, G., et al. , *Cardiología del adulto*. Revisión de temas Colegio Panamericano del Endotelio, 2002. **4**: p. 324-334.
2. Slauson, D.O., Cooper, B. J.,; ed. *Mechanisms of Disease*. 4 ed. 2004, Mosby St. Louis 445.
3. Weiss A, a.M.S., *Enlace Advances in protein chemistry*. Science direct, 2005. **70**: p. 437-461.
4. Berry, G.C., Matyjaszewski, K., *Progress in Polymer Science*. Science Direct 2004. **35**(6): p. 687-836.
5. Jeffrey, M.D., *Elastin Structure and Biology*. Conective Tissue Disease Molecular Pathology of the Extracelullar Matrix, 1986. **12**: p. 29-54.
6. Maki, J.M., et al., *Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues*. Am J Pathol, 2005. **167**(4): p. 927-36.
7. Kozel, B.A., et al., *Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18491-8.
8. Shipley, J.M., et al., *Developmental expression of latent transforming growth factor beta binding protein 2 and its requirement early in mouse development*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4879-87.
9. Doliana, R., et al., *Structure, chromosomal localization, and promoter analysis of the human elastin microfibril interfase located proteIN (EMILIN) gene*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 785-92.
10. Kuang, P.P., et al., *Fibulin-5 gene expression in human lung fibroblasts is regulated by TGF-beta and phosphatidylinositol 3-kinase activity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1412-21.
11. London, I.M., Roitt, J.B., Male, D.K.,; ed. *Immunology*. 2 ed. 1990, Gower Medical Publishing: London. 350.
12. Dickey, R., *Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy*. Human Reproduction, 1997. **3**, (5): p. 467-503.
13. Watari, M., et al., *Lipopolysaccharide induces expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and the elastin-degrading enzyme, cathepsin S, in human cervical smooth-muscle cells*. J Soc Gynecol Investig, 2000. **7**(3): p. 190-8.
14. Laurent, S., P. Boutouyrie, and P. Lacolley, *Structural and genetic bases of arterial stiffness*. Hypertension, 2005. **45**(6): p. 1050-5.
15. Gruninger, B., et al., *Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity*. J Comp Pathol, 1998. **119**(3): p. 293-309.
16. Pascual, G., et al., *TGF-beta1 upregulation in the aging varicose vein*. J Vasc Res, 2007. **44**(3): p. 192-201.
17. Greenwald, S.E., *Ageing of the conduit arteries*. J Pathol, 2007. **211**(2): p. 157-72.
18. Furber, J.D., *Extracellular glycation crosslinks: prospects for removal*. Rejuvenation Res, 2006. **9**(2): p. 274-8.
19. Oikawa, M., et al., *Microscopical characteristics of uterine wall arteries in barren aged mares*. J Comp Pathol, 1993. **108**(4): p. 411-5.
20. Nambo, Y., Oikawa, M., Yoshihara, T., Katayama, T., Kuwano, A., *Age-Related morphometric changes in uterine wall arteries in mares*. Biology of Reproduction, 1994. **50**(1): p. 420.
21. Liu, I.K.M., *Endometritis crónica recurrente en la yegua subfétil*. Revisión Médica Equina 2007. **3**(1): p. 133-146.
22. Ferreira, J.C., E.L. Gastal, and O.J. Ginther, *Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age*. Reproduction, 2008. **135**(4): p. 541-50.

23. Troedsson, M.H. and I.K. Liu, *Uterine clearance of non-antigenic markers (51Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections*. J Reprod Fertil Suppl, 1991. **44**: p. 283-8.
24. Silva, L.A., Ginther, O J., *An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares*. Biology of reproduction, 2006. **74**(2): p. 337-43.
25. LeBlanc, M.M., *Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment*. , in *Recent advances in equine reproduction.*, e. In: Ball BA, Editor. 2003, International Veterinary Information Service,: Ithaca, NY.
26. Troedsson, M.H., et al., *Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen*. Anim Reprod Sci, 2001. **68**(3-4): p. 273-8.
27. Liu, I., *Disorders of the oviduct*. 2009: Davis C.A.
28. Hong, C.B., et al., *Etiology and pathology of equine placentitis*. J Vet Diagn Invest, 1993. **5**(1): p. 56-63.
29. Karnik, S.K., et al., *A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease*. Development, 2003. **130**(2): p. 411-23.
30. Fernandez, C.A., et al., *Structural and functional uncoupling of the enzymatic and angiogenic inhibitory activities of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): loop 6 is a novel angiogenesis inhibitor*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40989-95.
31. Bjorklund, M., P. Heikkila, and E. Koivunen, *Peptide inhibition of catalytic and noncatalytic activities of matrix metalloproteinase-9 blocks tumor cell migration and invasion*. J Biol Chem, 2004. **279**(28): p. 29589-97.
32. Tjwa, M., P. Carmeliet, and L. Moons, *Novel transgenic rabbit model sheds light on the puzzling role of matrix metalloproteinase-12 in atherosclerosis*. Circulation, 2006. **113**(16): p. 1929-32.
33. Collen, A., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1810-7.
34. Koolwijk, P., et al., *Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3123-31.

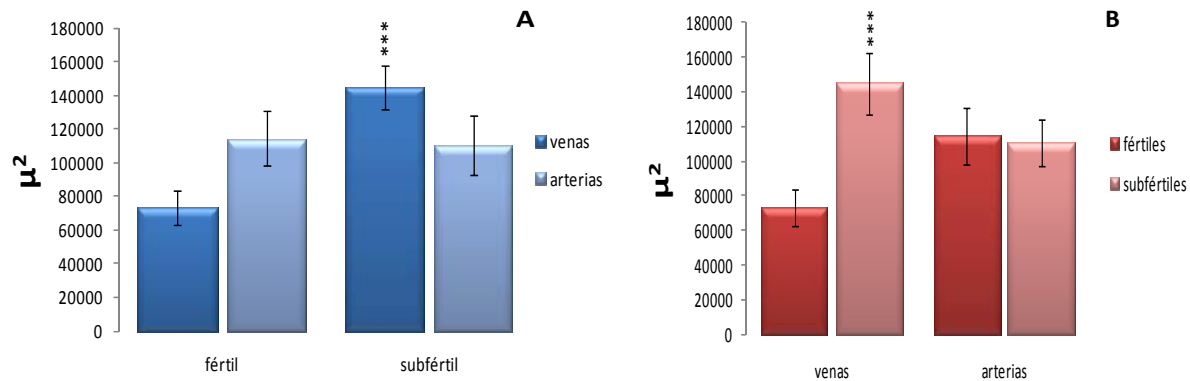


Figura 10A. Área total del vaso en yeguas fértiles y subfértiles indicando diferencias significativas de *** $P < 0.0007$. En la **figura 10B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.

8.2.2 Análisis morfométrico del área de la lámina elástica interna y luz del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles.

En la figura 11A y B se muestran las **áreas de la lámina elástica interna y luz del vaso** medidas en micrómetros cuadrados de 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas fértiles, más 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas subfértiles (n=180). El ANOVA en cada grupo indicó diferencias significativas ($F_{1,88} F = 5.644, P < 0.0197$), en las **venas**, que mostraron un área mayor de la lámina elástica interna y la luz del vaso en el grupo de las subfértiles comparado con el grupo de las fértiles, lo cual se expresa con diferencias significativas ($P < 0.0197$) en la *post hoc* de Fisher. (Fig. 11A y B) El

ANOVA de las **arterias** ($\alpha \leq 0.05$) no mostró diferencias significativas ($F_{1,88} = 0.057$ y $P=0.8121$), por lo cual, el área de la lámina elástica interna y la luz del vaso de las arterias medidas fue similar en yeguas fértiles y subfértiles (Fig. 11A y B).

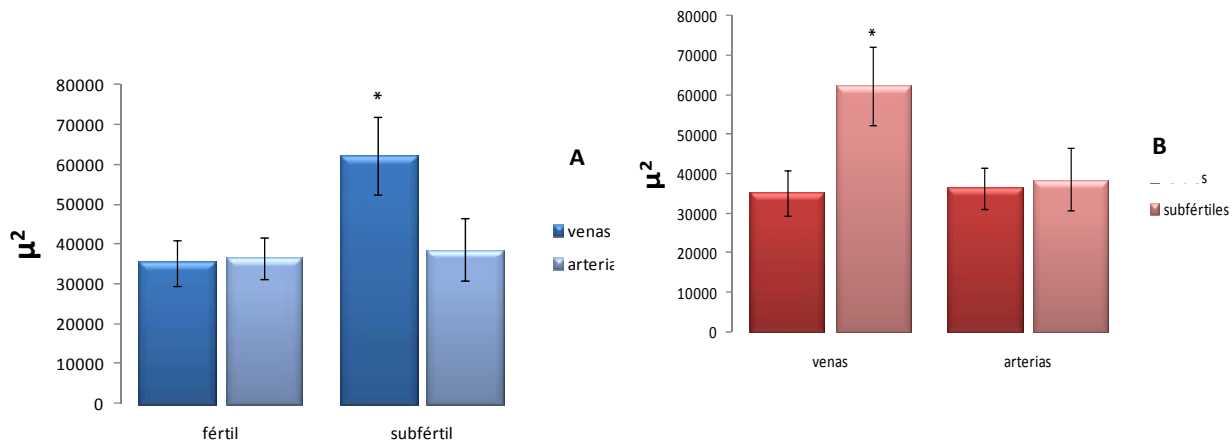


Figura 11A. Área de la lámina elástica y luz del vaso en yeguas fértiles y subfértiles indicando diferencias significativas de $*P < 0.0197$. En la **figura 11B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.

8.2.3 Análisis morfométrico del área de la capa media del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles.

En la figura 12A y B se muestran las áreas de la **capa media del vaso**, medidas en micrómetros cuadrados de 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas fértiles, más 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas subfértiles ($n=180$). EL ANOVA en cada grupo indicó diferencias significativas ($F_{1,88} F= 16.335$, $P < 0.0001$), en las **venas**, que mostraron un área mayor de la capa media del vaso en el grupo de las subfértiles comparado con el grupo de las fértiles, lo cual se expresa con diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la *post hoc* de Fisher. (Fig. 12A y B) El ANOVA de las **arterias** ($\alpha \leq 0.05$)

no mostró diferencias significativas ($F_{1,88} = 0.6899$ $P=0.160$), por lo cual, el área de la capa media del vaso de las arterias medidas, fue similar en yeguas fértiles y subfértiles como se indica en la figura 12A y B.

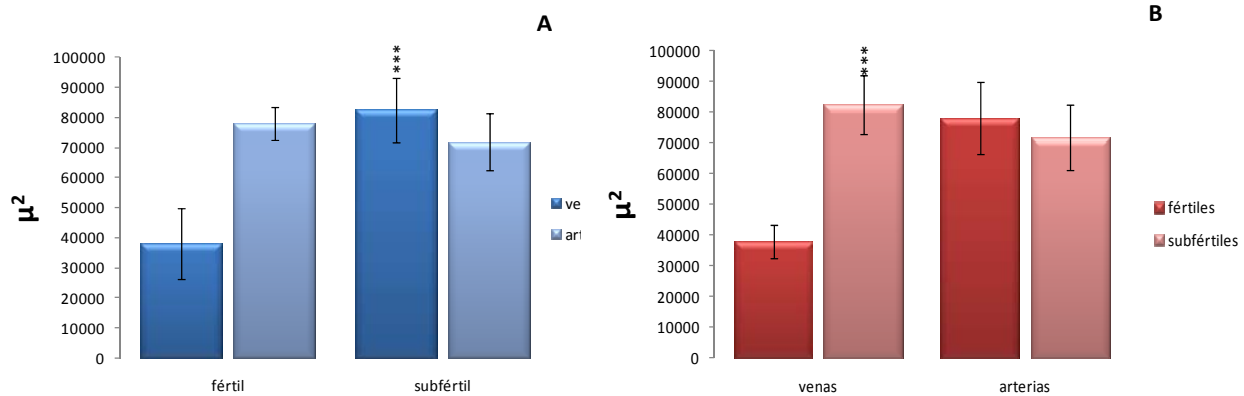


Figura 12A. Área de la capa media del vaso entre ambos grupos indicando diferencias significativas de $***P<0.0001$. En la **figura 12B**, se muestran las diferencias entre venas y arterias.

8.2.4 Análisis densitométrico del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles.

La **densidad del vaso** fue medida en unidades arbitrarias de densitometría en 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas fértiles, mas 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas subfértiles ($n=180$). El ANOVA en cada grupo indicó que no hay diferencias significativas ($F_{1,88} F= .388$, $P<0.5348$), en las **venas**, (Fig. 13A y B) y El ANOVA de las **arterias** ($\alpha\leq 0.05$) no mostró diferencias significativas ($F_{1,88} = 0.227$, $P=0.6346$), por lo cual la densidad total del vaso fue similar entre las venas y arterias de los grupos fértil y subfértil como se indica en la figura 13A y B.

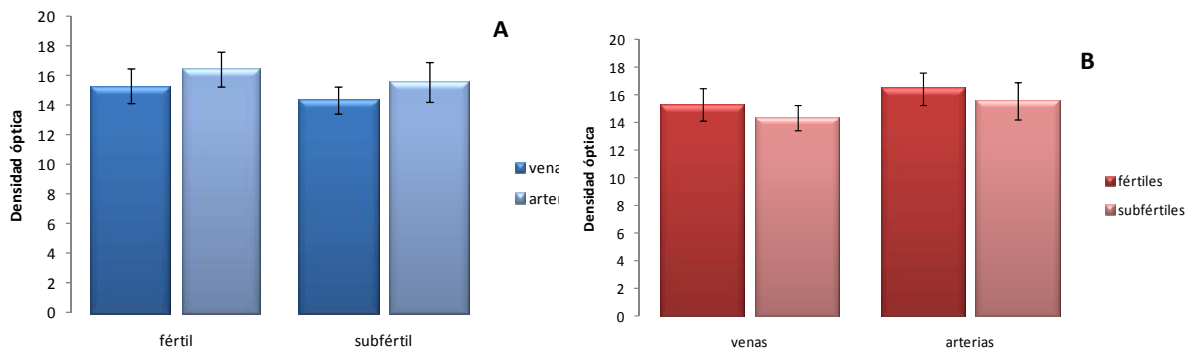


Figura 13A. Comparación de la densidad del vaso entre los grupos fértil y subfértil. Se indica que no hay diferencias significativas. En la **figura 13B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.

8.2.5 Análisis densitométrico de la lámina elástica interna y luz del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles.

La densidad de la **lámina elástica interna y luz del vaso** fue medida en unidades arbitrarias de densitometría en 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas fértiles, mas 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas subfértiles (n=180). El ANOVA en cada grupo indicó que existen diferencias significativas ($F_{1,88} F= 5.862, P<0.0175$), en las **venas** y en las **arterias** ($\alpha \leq 0.05$), que también mostraron diferencias significativas ($F_{1,88} = 4.230$ y $P=0.0427$), como se indica en la figura 14A y B. Esto expresa que ambas, **arterias** y **venas**, tuvieron una menor densidad en la lámina elástica en el grupo de las yeguas subfértiles, comparado con el grupo de las fértiles, lo cual se expresa con diferencias significativas ($P<0.0001$) en la *post hoc* de Fisher (Fig. 14A y B).

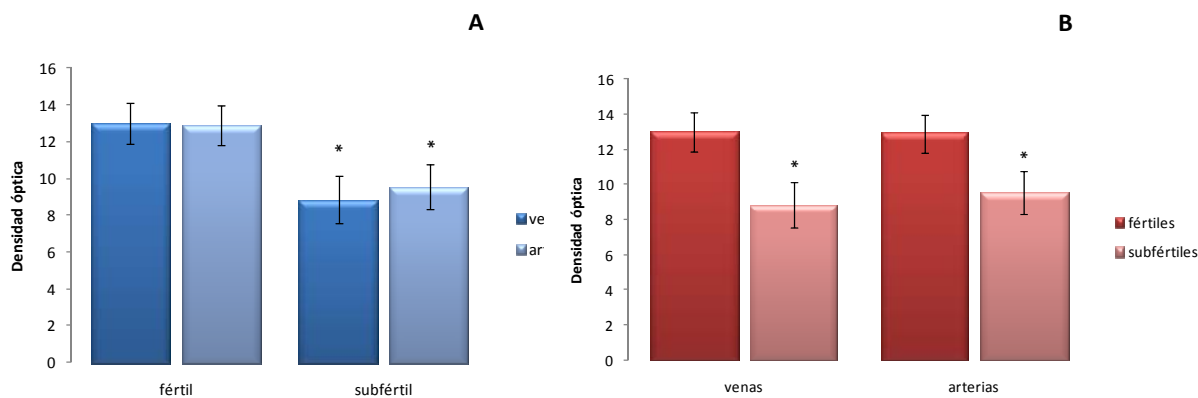


Figura 14A. Comparación de la densidad de la lámina elástica y luz del vaso en los grupos fértil y subfértil mostrando diferencias significativas de $*P < 0.0175$ para las venas y $*P = 0.0427$ para las arterias. En la **figura 14B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.

8.2.6 Análisis densitométrico de la porción media del vaso en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles.

La densidad de la **capa media del vaso** fue medida en unidades arbitrarias de densitometría de 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas fértiles, más 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas subfértiles ($n=180$). EL ANOVA en cada grupo indicó diferencias significativas ($F_{1,88} F = 8.262, P < 0.0051$), en las **venas**, que mostraron una mayor densidad de la capa media del vaso en el grupo de las subfértiles comparado con el grupo de las fértiles, lo cual se expresa con diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la *post hoc* de Fisher. (Fig. 15A y B) y El ANOVA de las **arterias** ($\alpha \leq 0.05$) no mostró diferencias significativas ($F_{1,88} = 1.624$ y $P = 0.2059$), por lo cual la densidad de la capa media de las arterias fue similar entre los grupos fértil y subfértil como se indica en la figura 15A y B.

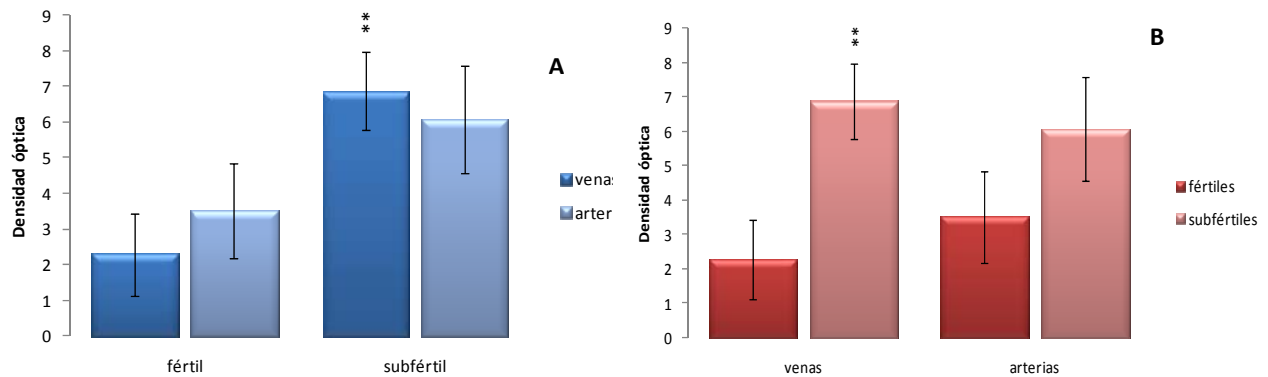


Figura 15A. Densidad de la capa media de yeguas fértiles y subfértiles. Se indican diferencias significativas de $**P<0.0051$. En la **figura 15B**, la comparación entre venas y arterias de ambos grupos.

8.2.7 Análisis densitométrico de la lámina elástica interna en venas y arterias de yeguas fértiles y subfértiles.

En la figura 16A y B se muestran las densidades de la lámina elástica interna del vaso medidas en unidades arbitrarias de densitometría de 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas fértiles, más 45 venas y 45 arterias del grupo de las yeguas subfértiles (n=180). EL ANOVA en cada grupo indicó diferencias significativas ($F_{1,88} F=6.634$, $P<0.017$), en las **venas**, que mostraron una densidad menor de la lámina elástica interna del vaso en el grupo de las subfértiles comparado con el grupo de las fértiles, lo cual se expresa con diferencias significativas ($P<0.017$) en la *post hoc* de Fisher. (Fig. 16A y B) El ANOVA de las **arterias** ($\alpha\leq 0.05$) no mostró diferencias significativas ($F_{1,88} =$

0.180 y $P=0.672$), por lo cual, la densidad de la lámina elástica interna de las arterias medidas fue similar en yeguas fértiles y subfértiles. (Fig. 16A y B).

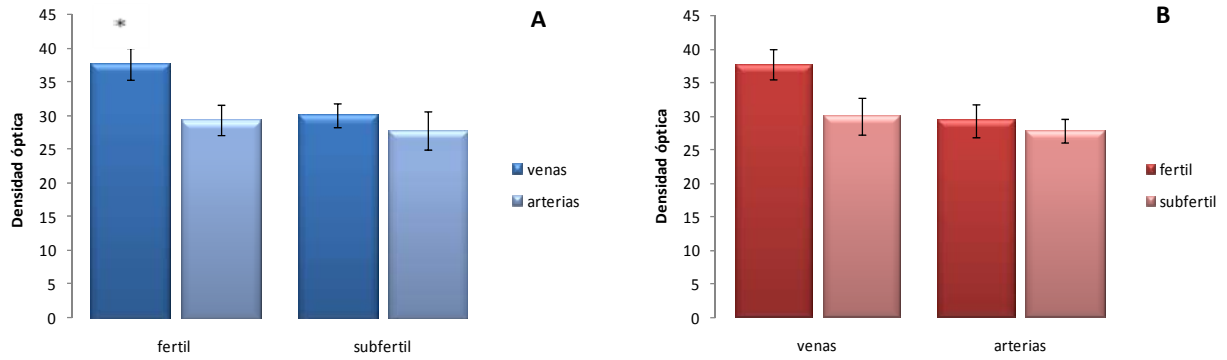


Figura 16A. Comparación de la densidad de la lámina elástica del vaso en los grupos fértil y subfértil mostrando diferencias significativas de $*P < 0.0175$ para las venas. En la **figura 16B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.

9. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio mostraron dispersión y alteraciones en la distribución de la elastina que es el componente esencial de las fibras elásticas, en la lámina elástica interna, principalmente en las venas del oviducto de las yeguas subfértiles, comparadas con las fértiles. Un aumento de grosor y dispersión de fibras elásticas, han sido reportados por Gruninger y cols en 1998 y por Oikawa y cols en 1993 en venas y arterias del útero de yeguas multíparas y seniles, mediante la observación de biopsias de útero de yeguas subfértiles teñidas con la técnica de Verhoeff-Van Gieson para fibras elásticas [1].

La angiosis endometrial es debida a la atrofia de la capa media de los vasos, como un efecto compensatorio para disminuir la resistencia al estrés mecánico de la presión sanguínea [2]. Se han realizado estudios con ultrasonografía doppler en diferentes mamíferos, yeguas y humanos, que demuestran que una disminución del flujo sanguíneo y la perfusión uterina se relacionan con baja fertilidad. A pesar de que son necesarios más estudios acerca de esta patología, parece haber una relación directa entre la perfusión sanguínea y la contracción muscular [3]. La dispersión de la elastina en las capas de los vasos sanguíneos en las yeguas subfértiles en nuestras preparaciones, son compatibles con procesos de angiosis.

Es importante mencionar que existen otras causas de elastosis endometrial, como la acumulación de células inflamatorias (e.i., leucocitos, neutrófilos y macrófagos) o infecciosas (e.i. bacterias o hongos), alrededor de los vasos sanguíneos del útero, que son la causa eventual de fibrosis, degeneración de fibras elásticas, necrosis y migración tanto de células musculares lisas como endoteliales, debido a la

pérdida de la matriz extracelular entre ellas [3-6]. Además, es conocido, que los macrófagos secretan elastasas y degeneran las fibras elásticas pudiendo contribuir a la dispersión de la elastina [7-12]. Son necesarios nuevos estudios acerca de la incidencia de los procesos inflamatorios e infecciosos en el oviducto de las yeguas.

En los resultados analizados en este trabajo, se observó que la densidad total medida en los vasos no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de fértiles y subfértiles. Sin embargo, el análisis de densidad en la capa media para venas y arterias si mostró diferencias significativas, es decir encontramos que tanto en venas como en arterias, hubo una mayor cantidad de elastina pero solo en la capa media de las yeguas subfértiles, mientras que en las fértiles se mantuvo concentrada en la lámina elástica de ambas venas y arterias. La patología manifestada por de la disminución de la elastina como causa única de la subfertilidad se rechaza a la luz de estos resultados ya que es la distribución de la elastina lo que se altera en venas y arterias del oviducto de yeguas subfértiles. El diseño propuesto de morfometría permitió encontrar solo estas diferencias y por lo tanto se requería otro diseño en el cual se abundará en la patología de la elastina o de las fibras elásticas en venas y arterias del oviducto de las yeguas subfértiles.

Por otra parte y dada las características de plasticidad de las arterias, la luz de las mismas responde y soporta los cambio de presión arterial. En el caso de las venas, sus capas están menos definidas, en especial la capa muscular que tiende necesariamente a expandirse con cambios de presión de la sangre. En yeguas subfértiles y debido a la dispersión de la elastina, las venas disminuyen sus propiedades de relajación-extensión, deformándose y perdiendo su capacidad de

drenaje con lo cual el edema se torna excesivo [4, 13-16]. En nuestra valoración morfométrica, este efecto se observó con las diferencias significativas encontradas en mayor área y el lumen de las venas. En la grafica de las figuras 10 y 11 se puede observar que el área es similar en las arterias de las fértiles y subfértiles así como las venas de las fértiles, pero en las venas de las subfértiles se incrementa el área de manera significativa debido probablemente a los procesos paralelos alterados de la hemodinámica y de la inflamación [4, 10-11, 13].

Este efecto se corrobora en las medidas de la densidad de la lámina elástica, que mediante el método empleado de densitometría, mostró una disminución significativa de la elastina en las arterias y en las venas. La disminución de la densidad de la elastina observada en las venas fue mas evidente cuando se midió la lámina interna sin considerar la luz del vaso (ver la figura 16). Es objeto de futuras investigaciones, el determinar la procedencia de la elastina dispersa, que pudiera degenerarse a partir de las fibras elásticas de la lámina elástica interna, situación que explicaría la disminución de elastina en esta lámina en yeguas subfértiles de acuerdo a nuestros resultados.

Lo previamente descrito en los resultados de este trabajo de investigación, muestra que la patología de la elastina de los vasos del oviducto de yeguas subfértiles, se manifiesta en términos de distribución y no de cantidad. Al no percibirse diferencias en cantidad de elastina entre los grupos experimentales y con objeto de conocer más acerca de su metabolismo y función como elemento esencial de las fibras elásticas, se requiere de nuevos estudios que permitan la valoración de anclajes funcionales de elastina-microfibrilinas en las fibras elásticas en las diferentes capas del vaso, a través

de la medición de proteínas de anclaje como son Fibulina S y EMILIN que permitan o no a los vasos sanguíneos del oviducto, conservar sus propiedades de tensión relajación y con esto una adecuada perfusión [17-18].

10. Literatura citada

1. dictionary.babylon.com. *Tinción de van Gieson*. 2007.
2. Slauson, D.O., Cooper, B. J., ed. *Mechanisms of Disease*. 4 ed. 2004, Mosby St. Louis 445.
3. Dickey, R., *Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy*. Human Reproduction, 1997. **3**, (5): p. 467-503.
4. Liu, I.K.M., *Endometritis crónica recurrente en la yegua subfétil*. Revisión Médica Equina 2007. **3**(1): p. 133-146.
5. Ferreira, J.C., E.L. Gastal, and O.J. Ginther, *Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age*. Reproduction, 2008. **135**(4): p. 541-50.
6. Troedsson, M.H. and I.K. Liu, *Uterine clearance of non-antigenic markers (51Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections*. J Reprod Fertil Suppl, 1991. **44**: p. 283-8.
7. Watari, M., et al., *Lipopolysaccharide induces expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and the elastin-degrading enzyme, cathepsin S, in human cervical smooth-muscle cells*. J Soc Gynecol Investig, 2000. **7**(3): p. 190-8.
8. Hong, C.B., et al., *Etiology and pathology of equine placentitis*. J Vet Diagn Invest, 1993. **5**(1): p. 56-63.
9. Barrios, G., et al. , *Cardiología del adulto*. Revisión de temas Colegio Panamericano del Endotelio, 2002. **4**: p. 324-334.
10. Pascual, G., et al., *TGF-beta1 upregulation in the aging varicose vein*. J Vasc Res, 2007. **44**(3): p. 192-201.
11. Greenwald, S.E., *Ageing of the conduit arteries*. J Pathol, 2007. **211**(2): p. 157-72.
12. Furber, J.D., *Extracellular glycation crosslinks: prospects for removal*. Rejuvenation Res, 2006. **9**(2): p. 274-8.
13. LeBlanc, M.M., *Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment*. , in *Recent advances in equine reproduction.*, e. In: Ball BA, Editor. 2003, International Veterinary Information Service, Ithaca, NY.
14. Troedsson, M.H., et al., *Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen*. Anim Reprod Sci, 2001. **68**(3-4): p. 273-8.
15. Liu, I., *Disorders of the oviduct*. 2009: Davis C.A.
16. Laurent, S., P. Boutouyrie, and P. Lacolley, *Structural and genetic bases of arterial stiffness*. Hypertension, 2005. **45**(6): p. 1050-5.
17. Doliana, R., et al., *Structure, chromosomal localization, and promoter analysis of the human elastin microfibril interfase located proteIN (EMILIN) gene*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 785-92.
18. Kuang, P.P., et al., *Fibulin-5 gene expression in human lung fibroblasts is regulated by TGF-beta and phosphatidylinositol 3-kinase activity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1412-21.

11. Lista de Pies de Figuras

Figura 1. En este esquema se observa el denso tejido del oviducto en un corte transversal.

Figura 2. En esta imagen se muestra la introducción de una pipeta vía vaginal para realizar una inseminación artificial.

Figura 3. A en esta fotografía se observa la pérdida de alineación entre vulva y esfínter anal en una yegua subfétil. **B.** En contraste esta fotografía muestra una correcta alineación entre vulva y esfínter anal en una yegua fértil.

Figura 4. Imágenes mediante ultrasonido de la cavidad uterina en yeguas subfértiles. A) Imagen que muestra una endometritis moderada con edema y acumulación de fluido (Eaf), pared endometrial (Pen). B) Imagen que muestra una endometritis severa con edema y acumulación de fluido. C) Imagen de una endometritis purulenta (Modificado de Liu endometritis crónica recurrente en la yegua subfétil 2007).

Figura 5. Dibujo que muestra la distribución de las capas arteriales A y B venosas.

Figura 6. En esta imagen se puede observar el aumento de fibras elásticas en la lámina elástica de un vaso con elastosis El.

Figura 7. Se muestran ejemplos del método de medición de arterias y venas utilizando un objetivo 40X A, corresponde al área del vaso medida., B, es un ejemplo de la lámina elástica y luz del vaso., C, se señala el área correspondiente a la capa media y D, es el área donde se realizó el análisis densitométrico de la lámina elástica.

Figura 8. Muestra preparaciones inmunoteñidas utilizando hematoxilina como colorante de contraste y la elastina en color ocre indicadas por la flecha. A se señala una vena y B una arteria.

Figura 9. Se muestran preparaciones sin colorante de contraste. En la figura A podemos observar una arteria sin elastosis. En la B una vena con elastosis. En la C una vena sin elastosis y en la D una arteria con elastosis, todas indicadas con la flecha.

Figura 10A. Área total del vaso en yeguas fértiles y subfértiles indicando diferencias significativas de $***P < 0.0007$. En la **figura 10B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.

Figura 11A. Área de la lámina elástica y luz del vaso en yeguas fértiles y subfértiles indicando diferencias significativas de $*P < 0.0197$. En la **figura 11B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.

Figura 12A. Área de la capa media del vaso entre ambos grupos indicando diferencias significativas de $***P < 0.0001$. En la **figura 12B**, se muestran las diferencias entre venas y arterias.

Figura 13A. Comparación de la densidad del vaso entre los grupos fértil y subfértil. Se indica que no hay diferencias significativas. En la **figura 13B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.

Figura 14A. Comparación de la densidad de la lámina elástica y luz del vaso en los grupos fértil y subfértil mostrando diferencias significativas de $*P < 0.0175$ para las venas y $*P = 0.0427$ para las arterias. En la **figura 14B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.

Figura 15A. Densidad de la capa media de yeguas fértiles y subfértiles. Se indican diferencias significativas de $**P < 0.0051$. En la **figura 15B**, la comparación entre venas y arterias de ambos grupos.

Figura 16A. Comparación de la densidad de la lámina elástica del vaso en los grupos fértil y subfértil mostrando diferencias significativas de $*P < 0.0175$ para las venas. En la **figura 16B**, se muestra la comparación entre venas y arterias.