



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

DETERMINACIÓN DE PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE MUCUS EN  
ENDOMETRIO DE YEGUAS CON CAMBIOS HISTOLÓGICOS

TESIS  
PARA OPTAR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
LINDSAY JAZBETH VIZCAYA LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. ANA MYRIAM BOETA ACOSTA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COMITÉ TUTOR:  
DRA. ANA MYRIAM BOETA ACOSTA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DRA. ELIZABETH MORALES SALINAS  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DR. LUIS LOSINNO  
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO ARGENTINA



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.

**Determinación de presencia y distribución de  
mucus en endometrio de yeguas con  
cambios histológicos**

# Agradecimientos

A mis padres por siempre Olga Patricia López C y Armando Vargas A.

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

A mi tutora la Dra. Myriam Boeta Acosta, quien me apoyo en este proyecto y es para mí un gran ejemplo como persona, profesional y mujer.

A la Dra. Elizabeth Morales por participar en este trabajo con gratitud.

Al doctor Luis Losinno con reconocimiento por su apoyo y tiempo dedicado

.

Al Dr. Irwin Liu con admiración por su carrera y ayuda.

A los miembros del Jurado Ma. del Carmen Espejel, Lucia Angélica García, Ana María Rosales y en especial al doctor Jaime Campuzano, gracias por su apoyo y dedicación.

Al doctor Luis Zarco Quintero por participar y apoyarme en el estadístico de este trabajo

A la doctora Laura Romero Romero por ayudarme y apoyarme desde que me conoció.

A mi familia que siempre tiene buenos comentarios para mí y por su apoyo incondicional.

## **Dedicatorias**

A mis padres a quienes los quiero con todo mi corazón y son los dos grandes pilares de mi vida Olga Patricia López Cosío y Armando Vargas Andrade gracias los amo.

A mi familia quien siempre está ahí en las buenas y en las malas sobre todo a mi hermana Cynthia y Jenefier Vizcaya López las quiero y espero estén orgullosas de mí.

A mis amigos gracias por escucharme y apoyarme en especial a Erika Miguel, y a mi pareja Israel Hernández Enríquez

<b>Índice</b>	<b>Pág.</b>
1. Resumen.....	10
2. Abstract.....	11
3. Introducción.....	12
4. Justificación.....	15
5. Objetivo.....	16
5.1. Objetivo general.....	16
5.2. Objetivos específicos.....	16
6. Hipótesis.....	17
7. Revisión bibliográfica.....	18
7.1. Descripción anatómica e histológica del útero.....	19
7.1.1. Características histológicas del endometrio en fase anovulatoria.....	19
7.1.2. Características histológicas del endometrio durante el ciclo estral.....	20
7.2. Características generales del moco.....	20
7.2.1. Propiedades físico químicas.....	21
7.2.2. Función general de las mucinas.....	21
7.2.3. Función de mucinas en el tracto reproductor.....	23
7.2.4. Estructura.....	26
7.2.5. Clasificación.....	28
7.2.6. Glicosilación.....	31
7.3. Producción de moco asociado a daño en epitelios.....	34
7.4. Sobre producción de moco asociado daño a endometrial en yeguas.....	36
7.4.1. Endometritis.....	36

7.4.2. Endometrosis.....	38
7.5. Alternativas terapéuticas.....	41
7.5.1. Mucolíticos.....	42
7.5.2. Antiinflamatorios.....	44
7.6. Técnicas diagnósticas para mucinas.....	44
7.6.1. Tinciones especiales.....	46
8. Materiales y métodos.....	49
8.1. Animales.....	49
8.2. Biopsias.....	50
8.3. Procesamiento de tejidos.....	51
8.4. Evaluación.....	52
8.5. Análisis estadístico.....	55
9. Resultados.....	55
9.1. Distribución de mucinas ácidas en base a la clasificación <i>Kenney-Doig (1986)</i> modificada por <i>Schoon (1992)</i> .....	56
9.2. Distribución de mucinas neutras en base a la clasificación <i>Kenney-Doig (1986)</i> modificada por <i>Schoo(1992)</i> .....	60
9.3. Distribución de mucinas ácidas en el ciclo estral y fase anovulatoria.....	63
9.4. Distribución de mucinas neutras en el ciclo estral y fase anovulatoria.....	67
10. Discusión.....	70
11. Conclusión.....	79
12. Bibliografía.....	80

<b>Índice de figuras</b>	<b>Pág.</b>
1. Capas histológicas que componen el útero equino.....	19
2. Esquema de proteína MUC.....	27
3. Dominios de las mucinas secretoras y de membrana.....	30
4. N-glicosilación.....	33
5. O-glicosilación.....	33
6. Tinción de azul Alcán en corte histológico.....	48
7. Tinción de PAS en corte histológico.....	49
8. Ubicación anatómica de la obtención de biopsia endometrial.....	51
9. Escala de tinción de mucinas teñidas con AA y PAS en biopsias endometriales.....	53
10. Secreción de mucina ácida en biopsias con cambios histopatológicos.....	59
11. Secreción de mucina neutra en biopsias con cambios histopatológicos .....	63
12. Secreción de mucina ácida en biopsias de yeguas en estro, diestro y anovulatorias..	66
13. Secreción de mucina neutra en biopsias de yeguas en estro, diestro, anovulatorias..	69



## Índice de cuadros

Pág.

1. Evaluación de Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992).....	54
2. Yeguas en estro, diestro y época anovulatoria y su relación en base a Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992).....	55
3. Porcentaje de hembras que presentan mucinas ácidas en base a Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992).....	57
4. Porcentaje de hembras que presentan mucinas neutras en base a Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992).....	61
5. Porcentaje de hembras en estro, diestro y anovulatorias que presentan mucinas endometriales ácidas.....	64
6. Porcentaje de hembras en estro, diestro y anovulatorias que presentan mucinas endometriales neutras.....	68

## **Lista de abreviaturas**

A A	azul alciano,
Asn	aspargina
Cys	cisteína
DMSO	dimetilsulfóxido
Gal	galactosa
EGF	factor de crecimiento epidérmico
Fuc	fucosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
IgA	inmunoglobulina A
kDA	kilo dalton
Man	manosa
NAC	N-acetilcisteína
PAS	ácido peryodico de Schiff
pH	potencial de hidrógeno
SEA	módulo de esperma, enteroquinasas y agrinas

## 1. Resumen

La superficie endometrial está cubierta por una delgada capa de moco, su principal componente son las mucinas que forman parte del mecanismo de defensa innato del organismo. En yeguas el sistema de clasificación de Kenney Doig (1986) modificado por Schoon (1992) describe los cambios histopatológicos endometriales en cuatro categorías (I, IIA, IIB y III), en base a su distribución y severidad. El objetivo general de este trabajo fue determinar la distribución y tipos de mucinas secretadas en el endometrio de yeguas en base al sistema de clasificación de Kenney Doig (1986) y modificado por Schoon (1992) y durante el ciclo estral y en fase anovulatoria. Se evaluaron 143 biopsias uterinas de yeguas no gestantes mayores a 3 años de edad. Las biopsias se tiñeron con ácido peryódico de Schiff y azul Alcían. Los resultados en este estudio demuestran que la secreción de mucinas (neutras y ácidas) incrementó en hembras que presentaron inflamación y daño degenerativo endometrial en las células del epitelio luminal y en las glándulas que están marcadamente dilatadas y tortuosas ( $p < 0.05$ ). También se encontraron diferencias significativas en los tipos de mucinas secretadas de acuerdo a la época reproductiva ( $p < 0.05$ ). La secreción de mucina ácida fue abundante durante el estro en las células del epitelio luminal y las glándulas superficiales. En diestro la secreción de mucina neutra fue mayor en

las glándulas superficiales y profundas. En fase anovulatoria la secreción de mucinas fue escasa en ambos epitelios.

**PALABRAS CLAVE:** Mucinas, azul Alcian, ácido peryódico de Schiff, Epitelio luminal, Glándulas endometriales.

## **2. Abstrac**

Endometrial surface is covered by a thin layer of mucus, its main component are the mucins which form part of innate defense mechanism of the organism. In mares the classification according to Kenney Doig (1986) modified by Schoon (1992) described the histopathological changes endometrial according to the distribution and severity into four categories (I, IIA, IIB and III). The overall objective of this work was to determine the distribution and types of mucins secreted in the endometrium of mares based on the classification according to Kenney Doig (1986) and modified by Schoon (1992) and during the estrous cycle and anovulatory season. 143 nonpregnant uterine biopsies in mares over 3 years were evaluated. Biopsies were stained with periodic acid Schiff and Alcian blue. The results in this study demonstrate that mucin secretion (neutral and acid) is more abundant in females with endometrial inflammation and degenerative damage, in endometrial luminal epithelial cells and glands that are markedly dilated and tortuous ( $p < 0.05$ ). Furthermore significant differences in the types of mucins secreted according to the reproductive season ( $p < 0.05$ ). Acidic mucin secretion was abundant during estrus in the luminal epithelial cell and surface glands. In diestrus neutral mucins they were abundant in the superficial and deep

glands In anovulatory season the secretion of acidic and neutral mucins was low in both epithelia.

**KEYWORDS:** Mucins, Alcian blue, periodic acid Schiff, Luminal epithelium, Endometrial glands.

### 3. Introducción

En la actualidad existen numerosos factores que disminuyen la capacidad reproductiva de las yeguas ocasionando pérdidas económicas en la industria equina (LeBlanc y Causey, 2009). Los problemas reproductivos más frecuentes son los que afectan directamente la integridad anatómica y funcional del aparato reproductor, principalmente del útero, lugar en donde se lleva a cabo el reconocimiento y mantenimiento de la gestación (Freeman *et al.*, 1990).

El endometrio del equino está compuesto por poblaciones celulares que se renuevan constantemente, especialmente en el epitelio luminal y glandular (Gerstenberg *et al.*, 1999). Los cambios morfológicos, fisiológicos y de proliferación celular del endometrio están controlados por hormonas esteroides ováricas como el estradiol, la progesterona y algunos factores de crecimiento (Lehmann *et al.*, 2011; Alameda *et al.*, 2007)

La superficie de la mucosa uterina, al igual que otras membranas mucosas como la del tracto respiratorio y digestivo, está cubierta por una delgada capa de moco que es importante para la limpieza, protección y contribuye al sistema de defensa innato del organismo (Causey *et al.*, 2000; Callahan, 2007). En el tracto reproductor, el moco contribuye en el mantenimiento y viabilidad de los

espermatozoides así como en el crecimiento de los embriones antes del desarrollo de las estructuras placentarias (Allison *et al.*, 2001; Freeman, 1990).

Las células productoras de moco al igual que cualquier otra célula, tienen la capacidad de responder ante estímulos fisiológicos o patológicos, desarrollando diversas adaptaciones celulares fisiológicas y morfológicas, lo que a su vez conlleva a presentar cambios en la composición, secreción y propiedades del moco. Algunas de estas adaptaciones celulares implican cambios en el crecimiento, tamaño y diferenciación como: hipertrofia, hiperplasia y atrofia (Callaghan y Voynow, 2006).

La endometritis y endometriosis son dos de las patologías reproductivas más frecuentes en yeguas (LeBlanc *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2011). La endometriosis es una condición degenerativa crónica que cursa principalmente como un proceso de fibrosis que se desarrolla alrededor de las glándulas endometriales y/o al estroma (Kenney, 1978). Esta patología es el resultado de endometritis crónicas y/o por la edad de las yeguas, como resultado de la atrofia y el envejecimiento del epitelio y las glándulas endometriales (Kenney, 1978). Actualmente se sabe que la endometritis y la endometriosis provocan alteraciones en el microambiente uterino, ocasionando desequilibrios cualitativos y cuantitativos en las secreciones endometriales, principalmente en las del moco (Causey, 2007).

La sobreproducción y acumulación de moco en yeguas ha sido asociada clínicamente con subfertilidad, ya que se cree el moco puede alterar diferentes

procesos, como son la migración del espermatozoide hacia el oviducto, el movimiento del aparato mucociliar, la fijación del embrión y predispone a la adherencia de colonias bacterianas (Causey, 2007). Es por eso que en la actualidad existen protocolos clínicos en donde se utilizan diversos mucolíticos para hipotéticamente incrementar los índices de fertilidad. Sin embargo su uso y eficacia aún no ha sido comprobada y continúa siendo objeto de controversias y debate, sobre todo cuando se utilizan como adyuvantes en el tratamiento de endometritis crónicas en yeguas subfértiles (Liu y Troedsson, 2008)

#### **4. Justificación**

En la actualidad en las yeguas existe poca evidencia publicada acerca de la secreción de moco bajo condiciones patológicas y su papel en la defensa uterina, principalmente en hembras que cursan con endometritis crónica y endometrosis que son las principales patologías reproductivas que provocan disminución en la fertilidad. Es por eso que el propósito de este trabajo es determinar si existen cambios en la expresión y distribución de mucinas secretadas en endometrios de yeguas con cambios histológicos endometriales y durante el ciclo estral y fase anovulatoria.



## **5. Objetivo**

### **5.1. Objetivo General**

Determinar la presencia, tipo y distribución de mucina endometrial en yeguas con diferentes cambios histológicos en base a la clasificación Kenney Doig 1986 modificada por Schoon 1992.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Describir la presencia y distribución de mucinas endometriales en las diferentes etapas del ciclo estral, determinando el tipo de mucina secretada.
- Describir la presencia y distribución de mucinas endometriales en fase anovulatoria, determinando el tipo de mucina secretadas.

## **6. Hipótesis**

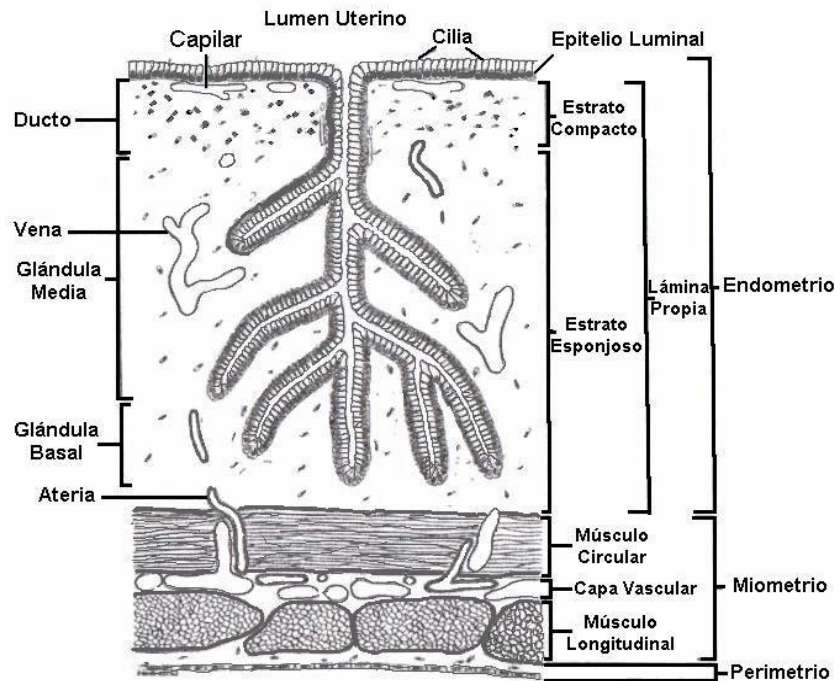
La producción y secreción de mucinas incrementará conforme aumenten los cambios degenerativos e inflamatorios endometriales y dependerá también de la etapa del ciclo estral y/o fase anovulatoria en la que se encuentre la yegua.

## **7. Revisión bibliográfica**

### **7.1. Descripción anatómica e histológica del útero**

El útero es un órgano túbulo muscular compuesto por un cuerpo y dos cuernos que poseen tres capas: una capa serosa externa o perimetrio, una capa muscular o miometrio y una mucosa o endometrio, organizado macroscópicamente en pliegues endometriales (Sisson y Grossman, 1998).

Histológicamente, el endometrio está constituido por dos capas. La primera capa es el epitelio luminal formado por células cuboidales asentadas en una membrana basal. La segunda es la lámina propia que posee dos estratos, compacto y esponjoso. El estrato compacto, está compuesto por glándulas endometriales y fibroblastos (Figura 1). El estrato esponjoso, posee un gran número de glándulas endometriales de epitelio secretor cuboidal con 2 ó 3 ramas primarias y aproximadamente 10 ramas secundarias. Además, junto a las glándulas es posible ubicar fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos (Kenney, 1978).



**Figura 1.** Esquema de las capas histológicas que componen el útero equino (Kenney, 1978).

### 7.1.1. Características histológicas del endometrio en fase anovulatoria

El endometrio de las yeguas sigue una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que están controlados cíclicamente por hormonas ováricas como el estradiol, progesterona y algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico y fibroblástico (EGF y TGF) (Alameda *et al.*, 2007). Durante la época anovulatoria el endometrio sufre algún grado de atrofia por la baja concentración de estas hormonas, lo que provoca que las glándulas se observen poco ramificadas con un calibre más delgado y en algunas ocasiones

formen agrupaciones glandulares en forma de nidos, las células del epitelio luminal son cuboidales y/o escamosas (Kenney, 1978; Kenney y Doig, 1986).

### **7.1.2. Características histológicas del endometrio durante el ciclo estral**

Durante la época ovulatoria, las yeguas en estro exhiben un epitelio luminal que se torna pseudoestratificado con abundante citoplasma. En la lámina propia hay edema que es fácilmente apreciable, lo que resta densidad a las glándulas (Kenney y Doig, 1986). En el diestro, las células del lumen son cuboidales y están reunidas en una sola capa, rara vez en dos, la densidad aparente de las glándulas aumenta alcanzando mayor ramificación y altura (Kenney, 1978).

## **7.2. Características generales del moco**

### **7.2.1. Propiedades físico químicas**

Históricamente, el término "mucina" (MUC) fue acuñado en referencia a los miembros de una familia de grandes glicoproteínas que representan los principales componentes estructurales del moco (Andrianifahanana, 2006).

La superficie de algunos epitelios como el del aparato reproductor, respiratorio y digestivo están cubiertas por una delgada capa de moco que forma parte del mecanismo de defensa innato del organismo. El moco está compuesto por mucinas, IgA secretora, iones, restos celulares y trasudado (Gray *et al.*, 2001). También contiene una variedad de componentes bacteriostáticos como las lisozimas lactoferrinas, defensinas y factores de crecimiento (Bansil y Turner, 2006; Freeman *et al.*, 1990).

El principal componente del moco son las mucinas que se encuentran entremezcladas con agua, iones, proteínas y lípidos que le confieren propiedades reológicas (flujo) como viscosidad, gelificación, adhesión y solubilidad (Voynow, 2006). Las principales propiedades reológicas del moco están determinadas por las glicoproteínas. Existen tres tipos de glicoproteínas que son:

- Sulfomucinas: son muy ácidas, ricas en grupos sulfato
- Sialomucinas: son ligeramente ácidas, ricas en grupos carboxilo
- Fucomucinas: son neutras, ricas en grupos metilo

Estas moléculas se agregan y entrecruzan para formar una matriz tridimensional mediante diversas fuerzas que son: puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y enlaces covalentes. Los puentes de hidrógeno (débiles) determinan las propiedades viscosas. Los enlaces iónicos y covalentes (más fuertes) determinan la elasticidad y viscosidad. Cuanto más ácida es la secreción mayor es su viscoelasticidad (Lagow *et al.*, 1999; Callaghan y Voynow, 2006).

### **7.2.2. Función general de las mucinas**

Las mucinas son proteínas glicosiladas producidas en las células epiteliales, se clasifican en: mucinas secretoras y de membrana celular. La composición estructural y bioquímica de las mucinas secretoras, facilita la limpieza, lubricación e hidratación de la mucosa, previniendo la adhesión de partículas o bacterias a los epitelios (Linden *et al.*, 2008).

La principal característica de las mucinas secretoras es su capacidad para formar geles, los cuales tienen la capacidad de regular el flujo de moléculas específicas. El moco también tiene la capacidad de alojar ciertas moléculas que participan en la protección y reparación de los epitelios como por ejemplo la IgA y el factor de trébol (TFF). Otras partículas que se encuentran en el moco son las citocinas, factores de crecimiento y diferenciación (Hollingsworth y Swanson, 2004).

Las mucinas asociadas a membrana están involucradas en la traducción de señales en respuesta a alteraciones con el ambiente externo local. Estas señales se dan a través de la activación de los dominios de membrana que poseen únicamente estas mucinas. La mayoría de las mucinas de membrana tienen un dominio homólogo con la familia del factor de crecimiento epidérmico. Esto le permite a las mucinas interactuar y regular procesos relacionados con el crecimiento y proliferación celular (Hollingsworth y Swanson 2004).

Se ha demostrado que las células tumorales al igual que las células y tejidos normales, usan las propiedades protectoras del moco para controlar el microambiente local durante la invasión, el crecimiento y la metástasis, permitiendo este modo, sobrevivir y proliferar en condiciones que de otro modo serían inhóspitas (Linden *et al.*, 2008).

En procesos neoplásicos como el cáncer de mamá se ha visto que la mucina de membrana MUC1 puede estimular la vía de señalización del receptor de superficie celular de la familia del factor de crecimiento epidérmico (ErbB1), lo que facilita su internalización y reciclaje a la membrana plasmática, perpetuando la

respuesta al ligandoy de esta manera promueve la proliferación, diferenciación y sobre vida celular. De igual manera, se ha reportado que el dominio homologo (EGF), de las mucinas de membrana, interactúa con moléculas como las integrinas y caderinas que están relacionadas con la adhesión celular (Hollingsworth y Swanson, 2004).

### **7.2.3. Función de mucinas en el tracto reproductor**

El epitelio endometrial está cubierto por una capa de moco, secretado por las células del epitelio de la superficie y glándulas endometriales. En el aparato reproductivo de las hembras incluyendo a la mujer se expresan mucinas secretadas y unidas a la membrana, ambas mucinas desempeñan un papel importante tanto en la defensa y protección de los epitelios como en implantación del embrión (Gipson *et al.*, 1997; Carson *et al.*, 1998).

La producción de las mucinas cambia dinámicamente entre especies, durante el ciclo estral y en los diferentes sitios anatómicos del tracto reproductor (Lagow *et al.*, 1999). Las hormonas esteroides como la progesterona y los estrógenos influyen directamente en la regulación de la expresión de los genes que codifican para estas proteínas (Carson *et al.*, 1998). En la actualidad se sabe que los cambios cíclicos hormonales influyen en las propiedades físico-químicas del moco, como por ejemplo en el contenido de agua, glicosilación y pH de las mucinas (Lagow *et al.*, 1999).



En mujeres se ha demostrado aumento de moco cervical en cantidad e hidratación, provocando disminución en la viscosidad y elasticidad justo antes de la ovulación. Estos cambios se revierten después de la ovulación ayudando al transporte, mantenimiento, viabilidad y capacitación de los gametos masculinos, favoreciendo la fertilización (Curlin y Bursac, 2013).

La regulación de los genes de mucina por las hormonas esteroides en las células del endometrio no se ha evaluado plenamente, sin embargo el mayor número de datos que existen están relacionados con la regulación de mucinas asociadas a la membrana celular, específicamente MUC1 y MUC4. En roedores, MUC1 contribuye significativamente como proteína anti adhesiva en las células epiteliales del endometrio, el estradiol, estimula su expresión y durante el periodo de implantación es inhibida por la progesterona, permitiendo interacciones ligando receptor en la superficie celular, esencial para la unión e implantación del embrión (Maischberger *et al.*, 2013).

En rumiantes el moco funciona como barrera protectora impidiendo la entrada de patógenos en el útero, también sirve en la protección del epitelio cervical y vaginal. Las características del moco cervical son importantes en la fertilidad en esta especie, porque sirven para recibir, almacenar, liberar y transportar a los espermatozoides en el tracto reproductor (Rutllant *et al.*, 2005). Otras funciones de las mucinas como la MUC8 es evitar la adhesión de los espermatozoides durante el viaje a través del aparato reproductor masculino y femenino, particularmente en el canal cervical en mujeres. En conejos y ratas MUC1 y MUC4 y MUC16, han sido implicados en el proceso de unión e implantación embrionaria,

proporcionando adhesión entre las células del trofoblasto al epitelio uterino (Lagow *et al.*, 1999).

En yeguas, poco se ha descrito acerca de la función y expresión de las mucinas. La principal información publicada sobre este tema, se basa en mucinas del tracto respiratorio. Actualmente estudios realizados por Maischberger *et al.* (2013), identificaron en 18 yeguas, 14 genes MUC que codifican para mucinas endometriales, en donde 9 participan como proteínas superficiales asociadas a la membrana celular (MUC1, MUC3B, MUC4, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC18, MUC20) y 5 como proteínas de secreción (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, y MUC7). De acuerdo al autor, los patrones de expresión para estas mucinas reflejan funciones comunes las cuales son sutilmente diferentes, de acuerdo a la etapa del ciclo estral, siendo mayor su expresión durante el estro para proteínas MUC superficiales y secretoras. Aunque se desconoce el papel que desempeñan en la reproducción del equino, se sugiere que las mucinas podrían participar de manera similar que en otras especies, actuando como proteínas de adhesión, señalización, protección.

En investigaciones realizadas en yeguas los 90s, se describió la secreción de mucina endometrial, mediante tinciones especiales como Mucicarmín, azul Alcian y ácido peryódico de Schiff, en cortes histológicos obtenidos de biopsias endometriales. Los resultados de acuerdo a por Freeman *et al* (1990), describen la presencia de dos tipos de mucinas secretoras de acuerdo a su pH. Las mucinas neutras y glucógeno que se secretan durante todo el ciclo estral y las mucinas acidas, únicamente secretadas durante el estro. Aunado a la variación en la

expresión de mucinas durante el ciclo estral, se encuentran factores como la edad, número de partos o daño endometrial que también podrían influir, ya que las yeguas con endometritis presentaron cambios en la secreción de mucinas. Lo que sugiere que estas podrían ser estimuladas también bajo procesos inflamatorios e irritativos, actuando como factor de protección al igual que en otros órganos.

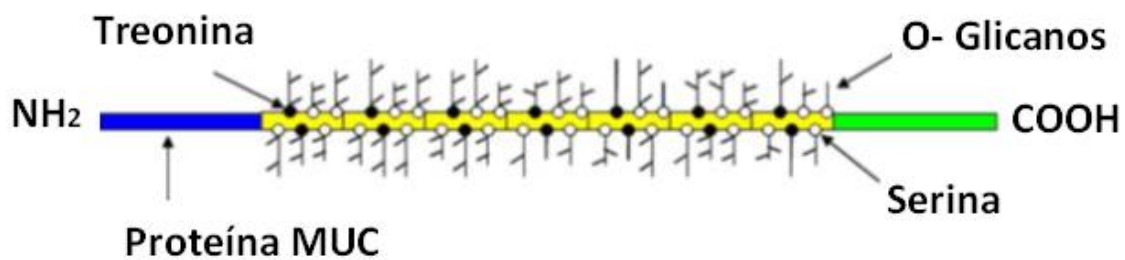
#### **7.2.4. Estructura**

Las mucinas pertenecen a un grupo heterogéneo de moléculas glicoproteicas, filamentosas de alto peso molecular (50 a 240 kDa). Estas glicoproteínas están formadas por una sola cadena polipeptídica formando un heterodímero con dominios centrales altamente O-glicosilados y terminales no glicosilados. Una característica funcional que es única en estas moléculas reside en su glicosilación. Esta especialización provee a las glicoproteínas de una flexibilidad estructural que les permite ejercer la doble función de proteger y mediar interacciones específicas como de proliferación y comunicación celular (Callaghan y Voynow, 2006; Linden *et al.*, 2008).

Las mucinas están constituidas en un 80% por carbohidratos como: galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-Acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc), ácido siálico y sulfato. Las cadenas oligosacáridas están compuestas por 5 a 15 monómeros que exhiben moderada ramificación, y están adheridas a un centro proteico denominado apomucina. Las apomucinas componen el restante 20 % del peso molecular y están compuestas por dos regiones claramente identificables: 1) Una región central glicosilada, compuesta por un gran número de repeticiones en tándem (VNTR) ricas en serina, treonina y prolina, que componen

casi el 60% del total de los aminoácidos; 2) ubicado en el extremo amino y carboxilo y a veces intercalado entre las repeticiones en tándem, se encuentran repeticiones ricas en cisteínas, con relativamente pocos sitios de N y O glicosilación que en algunos tipos de mucinas pueden estar involucrados en procesos de dimerización a través de puentes disulfuro (Figura 2) (Callaghan y Voynow, 2006; Carson *et al.*, 1998).

La serina y treonina son necesarias para la O-glicosilación y por lo tanto son más abundantes y la prolina asegura la adecuada disposición de la cadena peptídica, permitiendo el acceso de las enzimas responsables de la O-glicosilación. Las secuencias específicas y el número de repeticiones en tándem es altamente variable entre las distintas mucinas y entre mucinas de diferente especie (Voynow *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Esquema que representa la forma de la proteína MUC y sus O-glicanos. Conformada por una sola cadena con un dominio NH<sub>2</sub>-terminal (azul), uno o más dominios centrales (s) con un alto número de repetición en tándem (TR) (amarillo) y un dominio COOH-terminal (verde). Numerosos O-glicanos se encuentran unidos a treonina (●) o serina (○) los cuales están presentes en dominios que se repiten en tándem denominados regiones VNTR (Adaptado de Callaghan *et al.*, 2006).

### 7.2.5. Clasificación

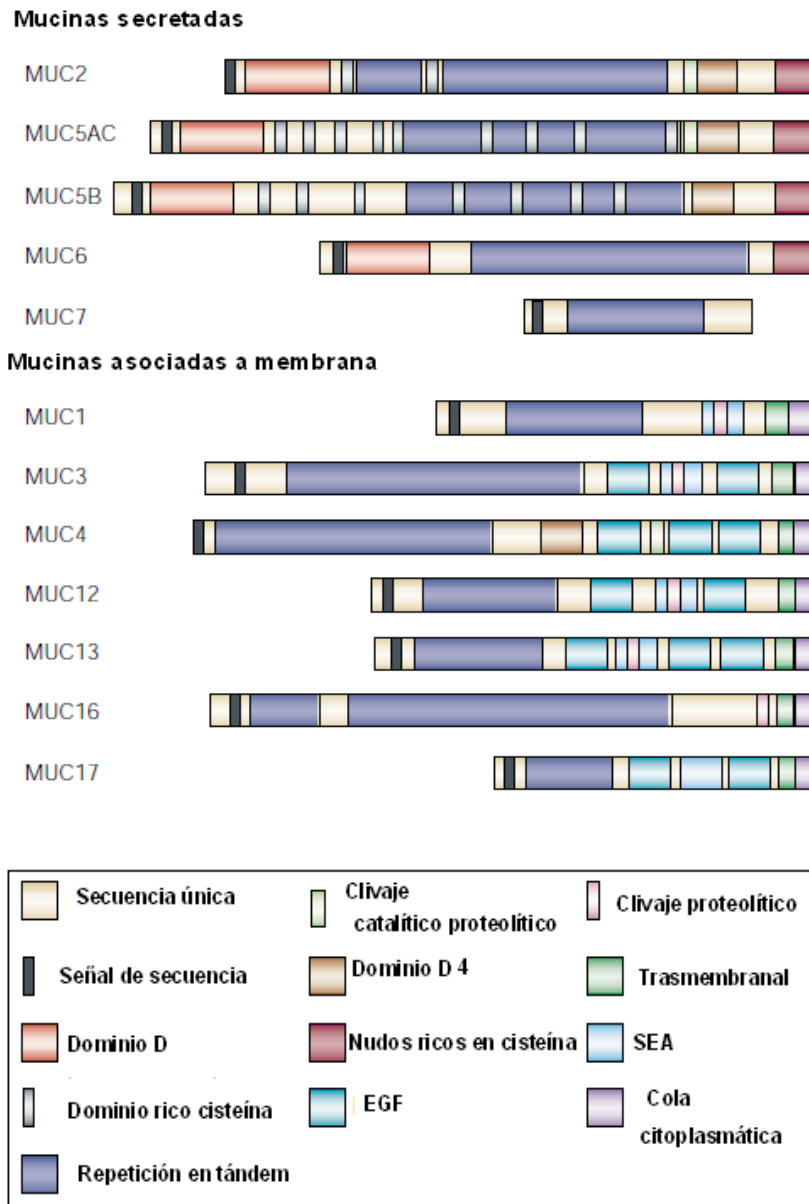
Hasta ahora, se han identificado 20 genes en humanos y murinos que codifican para mucinas o glicoproteínas tipo mucinas, dentro de esta familia, se han identificado dos grupos principales que se dividen según su origen ontogénico:

- 1) Mucinas secretadas (formadoras, o no de gel) que constituyen el componente principal de las mucosidades de los epitelios, tienen una función protectora y producen en su mayoría geles viscoelásticos que cubren las superficies epiteliales de los ojos, tracto respiratorio, gastrointestinal, urinario, y reproductivo. La capacidad para formar gel, se da gracias a su gran capacidad de formar oligómeros a través de puentes disulfuro establecidos entre regiones ricas en cisteína (Cys) localizadas entre las regiones N- y C-terminales. Las secuencias que se hallan entre estas regiones son homologas a dominios D y CK del pro factor de von Willebrand, una proteína que interviene en la coagulación sanguínea y que tiene la capacidad de oligomerizar (Andrianifahanana *et al.*, 2006). La oligomerización inicia en el retículo endoplasmático, posteriormente estas moléculas glicosiladas son almacenadas en grandes vesículas conocidas como gránulos de mucina que ocupan la mayor parte del citoplasma de las células y las secretan a través de exocitosis (Voynow *et al.*, 2006). La secreción regulada de mucinas se activa a través de canales iónicos, pH, citocinas, quimiocinas, neurotransmisores y/o proteasas. Las mucinas no formadoras de gel no tienen la capacidad de formar multímeros (Andrianifahanana *et al.*, 2006).

2) Mucinas asociadas a membrana, están unidas a las células y funcionan como un ligando gracias a su dominio transmembranal de un solo paso. Estas mucinas también tienen una cola citoplasmática corta que está asociada a elementos del citoesqueleto a través de proteínas adaptadoras del citosol, participando de este modo en la traducción de señales celulares. Las mucinas de membrana además cuentan con un dominio extracelular o ectodominio. El ectodominio está organizado en módulos que albergan al menos cuatro tipos de dominios funcionales, como son: la proteína del esperma de enteroquinasa, dominio homólogo del factor de crecimiento epidérmico (EGF), dominio rico en cisteína, y transmembranal, que se encuentra en todas las mucinas de membrana.

Gracias a la presencia de estos dominios, se cree que las mucinas podrían actuar como sensores y receptores celulares y conducir a señales en respuesta a estímulos externos que lleven a respuestas celulares coordinadas (Hollingsworth y Swanson, 2004).

El dominio (EGF) se denomina así debido a la similitud con el factor de crecimiento epidérmico. Las funciones de estos dominios no son totalmente entendidas pero se sugiere que pueden contribuir a interacciones ligando-receptor entre mucinas y receptores celulares de tipo EGF-ERB-B2 que son clave para el crecimiento y división celular. Así mismo, se han detectado otros dominios similares de tipo, nidogen (NIDO) que están asociadas con la adhesión celular (Hollingsworth y Swanson, 2004).



**Figura 3.** Esquema que ilustra las diferencias entre los dominios de mucinas asociadas a membrana y secretoras (Hollingsworth y Swanson, 2004).

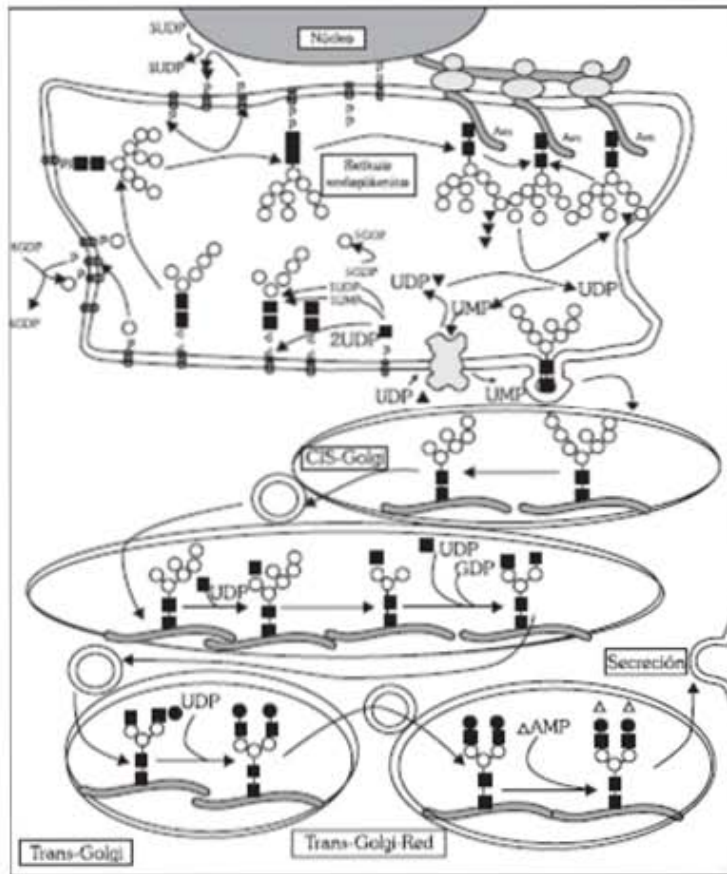
### 7. 2. 6. Glicosilación

La glicosilación es un proceso enzimático postraduccional llevado a cabo en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi que consta de la adición y/o eliminación de carbohidratos en residuos aminoacídicos. Cumple con funciones importantes como: control sobre el plegado proteico, interacción celular, protección ante proteínas de degradación enzimática, traducción de señales. También controlan la antigenicidad, las interacciones con el ambiente y con el sistema inmune. Dependiendo de las estructuras de las cadenas de los O- glicanos, las mucinas pueden estar involucradas en la adhesión celular o pueden poseer propiedades anti adhesivas (Jiménez *et al.*, 2002).

Los tipos de glicosilación en glicoproteínas son los principales modos de unión de los carbohidratos al esqueleto peptídico, los cuales se dividen en enlaces N- y O- glicosídicos. Estos tipos de glicanos pueden coexistir en una misma proteína. Así los términos O- glicoproteína y N- glicoproteína reflejan los tipos de cadenas de carbohidratos predominantes pero no exclusivos. La glicosilación puede dividirse en dos grandes tipos N- y O-. En la N-glicosilación, una molécula de N-acetilglucosamina (GlcNAc) se adiciona al grupo amida de un residuo de asparagina (Asn) en una secuencia aminoacídica Asn-X- Serina/Treonina, donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina. Todos los aminoácidos ensamblados a partir de una N-glicosilación contienen manosa (Man) y N-acetilglucosamina (GlcNAc), y por lo general están compuestos por varias ramas de oligosacáridos cada uno pudiendo terminar en ácido sálico negativamente cargado (Figura 4).



La O-glicosilación comienza con la adición de un monosacárido N-acetilgalactosamina (GalNAc), transfiriendo desde la UDP- GalNAc al grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina (formando un O-glicosídico), en reacción catalizada por las UDP- GalNAc polipeptidil-trasferasas (Figura 5) (Linden *et al.*, 2008).



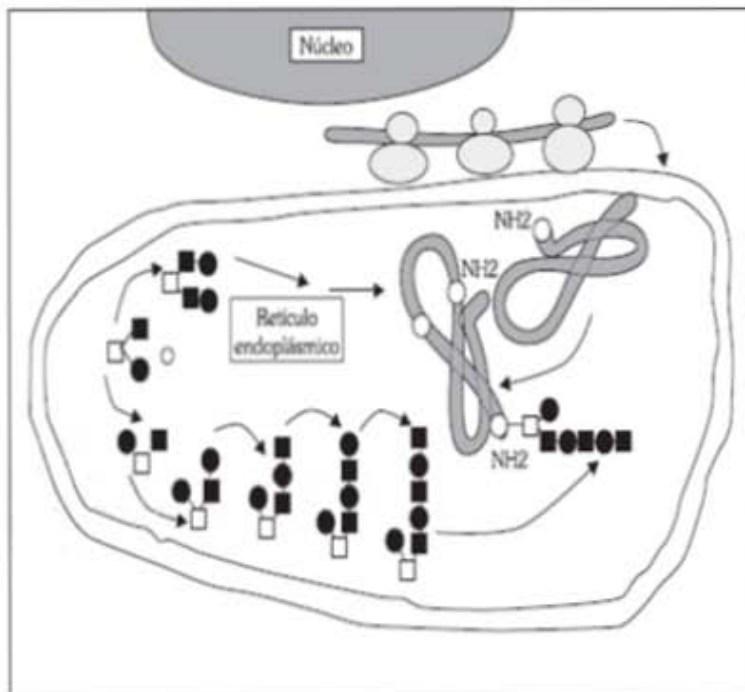
**Figura 4.** N-glicosilación.

Inicia con la adición de un oligosacárido en el grupo amino de la Asn de la proteína en RE, a partir de precursores (dolicolifosfato) sintetizados en el citoplasma. Los azúcares (UDP-azúcar) son transportados del citosol hacia el lumen del RE. Finalmente, el complejo N-glicosilado (dolicolifosfato-GlcNAc-Man) es transportado hacia la cadena peptídica de los ribosomas dejando al dolicolifosfato remanente en la cara citosólica del RE. La proteína N-glicosilada es transportada al aparato de Golgi, donde sufre cambios en sus ramificaciones de azúcares y adquiere GalNAc, Gal y NeuAc, para ser secretada de la célula.

RE: Retículo endoplásmico; Man: Manosa; Glc: Glucosa; Gal: Galactosa; GlcNAc: N-acetilglucosamín; GalNAc: N-acetilgalactosamina; NeuAc: Ácido neuroamínico; Asn: Aparagina.

■ GlcNAc ▲ Glc ● Gal ○ Man △ NeuAc

(Jiménez et al., 2002)



**Figura 5.** O-glicosilación.

En la síntesis de la O-glicano el evento inicial es la adición del monosacárido GalNAc, sobre los residuos de Ser/Thr de la cadena peptídica. En la mayoría de los O-glicanos, los siguientes eventos son la incorporación de una estructura compuesta por Gal y/o GlcNAc adicionadas subsecuentemente formando ramificaciones. Todas las reacciones ocurren en el lumen del RE y en el aparato de Golgi

Ser: Serina; Thr: Treonina; GalNAc: N acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; RE: Retículo endoplásmico.

■ GlcNAc ● Gal □ GalNAc ○ Proteína Serina o treonina

(Jiménez et al., 2002)

### **7.3. Producción de moco asociado a daño en epitelios**

Las mucinas presentes en las superficies mucosas varían de acuerdo al linaje celular, localización del tejido, etapa reproductiva y de desarrollo. Las mucinas se han caracterizado por poseer un patrón de expresión bien definido que puede ser interrumpido en respuesta a una variedad de factores, como las agresiones locales que afectan la integridad celular y que conducen a condiciones patológicas o bien por cambios intrínsecos (modificaciones epigenéticas) que pueden alterar la expresión génica o la tasa de secreción (Andrianifahanana *et al.*, 2006).

Los cambios en la producción y expresión de mucinas han sido reportados en tejidos con daño, especialmente en epitelios que cursan con alteraciones patológicas crónicas, en donde las células productoras de moco exhiben cambios como hiperplasia, displasia y metaplasia. El claro ejemplo se encuentra en enfermedades inflamatorias en las vías respiratorias, donde las células poseen cambios morfológicos de hiperplasia evidentes que conllevan a un aumento y cambio en la secreción de moco. La sobre producción de moco requiere del aumento en la biosíntesis y glicosilación de las mucinas, así como de una regulación positiva para la expresión de los genes MUC (Corfield, 2015).

Algunos mediadores de la inflamación como el interferón gama (IFN $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), activan la hipersecreción de mucina mediante una cascada secretora que resulta en la liberación rápida y sostenida de gránulos secretorios que ocurre en cuestión de minutos. Los estímulos para MUC durante un proceso infeccioso son principalmente mediadores específicos de la

inflamación, que se expresan en respuesta a patógenos, aumentando la expresión o actividad de las glicosiltransferasas y sulfotransferasas, enzimas necesarias para la biosíntesis de mucinas (Andrianifahanana *et al.*, 2006).

Los factores como citocinas pro inflamatorias, prostaglandinas, lipopolisacáridos, elastasas de neutrófilos, oxidantes, proteasas y factores de crecimiento, activan las cascadas de señalización intracelular de las mucinas, resultando en la regulación selectiva y positiva para la expresión de genes MUC (Callaghan y Voynow, 2006).

Los estudios recientes han encontrado alteraciones en la glicosilación, en respuesta a la infección e inflamación de las mucosas. Esto se observa comúnmente en enfermedades como el asma, fibrosis quística o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en donde se ha reportado el incremento en los niveles de fucosa y sulfato y disminución de ácido siálico. Tales acontecimientos conllevan a cambios en el pH, y por lo tanto en las propiedades reológicas del moco, actuando desfavorablemente en la defensa del huésped, lo que repercute de manera negativa en la protección a los epitelios y agrava la enfermedad (Callaghan y Voynow, 2006).

Por otro lado, en algunos tipos de cáncer, se ha demostrado que las células presentan una diferente expresión de mucinas, debido a una falla en la regulación de la expresión de proteínas y modificación de las enzimas. La expresión de distintas estructuras oligosacáridas, aunado a un proceso de glicosilación diferencial, le confiere a las células tumorales un amplio rango de ligandos para la

interacción con otros receptores a nivel de la superficie celular (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). De esta manera, las mucinas secretadas por células cancerígenas pueden contribuir biológicamente en el control del ambiente local y regular regular la proliferación, diferenciación, invasión y metástasis (Hollingsworth y Swanson, 2004).

#### **7.4. Sobre producción de moco asociado a daño endometrial en yeguas**

##### **7.4.1. Endometritis**

Las endometritis crónicas inducen cambios tanto en la morfología como en la funcionalidad del útero, repercutiendo en la fertilidad de los animales (Watson *et al.*, 1992).

La limpieza física del útero juega un papel protagónico en la defensa contra infecciones uterinas, sobre todo después del apareamiento o del parto. Algunas yeguas tienen dificultad para limpiar y eliminar los desechos uterinos debido a defectos anatómicos y/o degenerativos como por ejemplo, disminución en las contracciones uterinas y el movimiento mucociliar, los cuales interfieren con el drenaje y limpieza uterina (LeBlanc, 2010).

En los últimos 40 años se han realizado múltiples investigaciones acerca de la capacidad que tienen las yeguas para eliminar fluidos del útero dentro en un cierto período de tiempo. De acuerdo a esto, han sido clasificadas como “resistentes o susceptibles” ya que el fracaso de la limpieza uterina, conlleva a presentar mayor susceptibilidad a desencadenar endometritis (LeBlanc, 2008).

Evans *et al.* (1987), Allen y Pycocock (1988), LeBlanc *et al.* (1989) y Troedsson y Liu (1991) son sólo algunos de los investigadores que han demostrado las diferencias que existen entre yeguas “susceptibles y resistentes” a presentar endometritis recurrentes. Los resultados demostraron que las yeguas susceptibles acumulaban líquido intrauterino hasta por 5 días después de la ovulación y mantenían hasta por 96 horas microesferas intrauterinas que habían sido inoculadas. Por el contrario, las yeguas resistentes eliminaban el líquido dentro de las primeras 24 horas post ovulación y las microesferas dentro de las primeras 24 horas. Resultados similares se encontraron al inocular colonias bacterianas de estreptococos o coloides intrauterinos de carbón; las yeguas resistentes eliminaban estos productos en un periodo más corto comparado con las yeguas susceptibles (LeBlanc y Causey, 2009).

Los factores que contribuyen a una disminución en la limpieza uterina involucran fallas en los mecanismos de limpieza y remodelación que están dados principalmente por contracciones uterinas, fagocitosis, movimiento de los cilios y drenaje linfático (Snider, 2011). La falla en estos mecanismos contribuye de manera directa al acúmulo y estancamiento de líquido, favoreciendo de manera directa la sobre producción de moco debido al efecto irritativo del epitelio, así como por la presencia de mediadores químicos de la inflamación, haciendo de los constituyentes bioquímicos del moco más complejos cambiando sus propiedades y funciones (Causey, 2007).

La capacidad del moco endometrial para atrapar partículas se debe a su viscosidad y elasticidad, aunado al movimiento ciliar, otorga el mecanismo

necesario para limpiar la superficie epitelial. El exceso de líquido intrauterino puede causar su dispersión, debido a la solubilidad del moco en el agua, dejando al epitelio desprotegido, susceptible a radicales libres de oxígeno y patógenos (Causey, 2007). Contario a esto, un exceso en la viscosidad en el moco endometrial se cree podría influir de manera negativa en el movimiento de los espermatozoides durante su paso hacia el oviducto, así como en el movimiento ciliar, que predispone al acúmulo y estancamiento de éste por mayor tiempo. Lo anterior compromete funciones de fagocitosis, factores del complemento, lisozimas, entre otros, facilitando también, la adhesión y colonización de bacterias y hongos que pueden producir biofilms como mecanismo de defensa, lo que otorga resistencia a los antibióticos y evasión de la respuesta inmune, lo que resulta en infecciones persistentes, incluso después de prolongados tratamientos con antibióticos, promoviendo un círculo vicioso (Gores-Lindholm *et al.*, 2013; LeBlanc y Causey, 2009).

#### **7.4.2. Endometriosis**

La endometriosis es una enfermedad degenerativa crónica, la cual se asocia a factores como endometritis crónicas o a la edad en yeguas viejas. Los cambios más evidentes en esta patología son la fibrosis del estroma y de las glándulas uterinas, así como angiosclerosis, lagunas linfáticas y mala diferenciación endometrial. Este último término engloba cambios tanto en la expresión de los receptores de hormonas, como en la actividad celular proliferativa, donde se evalúan por inmunohistoquímica los filamentos intermedios de vimentina, desmina y

citoqueratina con el objetivo de identificar alteraciones morfológicas y fisiológicas durante el ciclo estral (Snider *et al.*, 2011).

Actualmente existe un sistema de clasificación histopatológico propuesto por Kenney Doig (1986) y modificado por Schoon (1992), que permite identificar el daño endometrial. Este sistema de clasificación consta de cuatro categorías (I, IIA, IIB y III). En cada categoría, se otorga un pronóstico porcentual acerca de la capacidad del útero para poder llevar una gestación a término (Schlafer, 2007). A continuación se describen los hallazgos histopatológicos en cada categoría.

Categoría I. El endometrio no presenta cambios patológicos, y si los tiene son muy leves y esporádicos. El porcentaje de parto esperado es 90 a 80.

Categoría IIA. Los cambios histopatológicos incluyen infiltrado inflamatorio ligero a moderado. El infiltrado es difuso en el estrato compacto o bien puede observarse focos dispersos en el epitelio luminal, estrato compacto y esponjoso. Los cambios fibróticos son aislados con grado variable de severidad (de 2 a 3 capas de células, alrededor de nidos glandulares). Se puede observar dos nidos glandulares por cada cuatro campos ópticos lineales. Los hallazgos inflamatorios, fibróticos, atrofia o cambios glandulares son aditivos, por ello si se presenta más de uno juntos, se agrupa en la categoría siguiente. El porcentaje de parto esperado es 80 a 50.



Categoría IIB. Los cambios inflamatorios son moderados a severos. La localización es difusa en el epitelio luminal, estrato compacto y esponjoso. La fibrosis es uniforme, usualmente con 4 a 10 capas celulares. Se puede observar un nido glandular por campo óptico lineal, en cuatro o más campos, así como dilatación quística glandular. El porcentaje de parto esperado es 50 a 10.

Categoría III. La inflamación es difusa y severa en el estrato compacto, esponjoso, también se puede observar alrededor de las glándulas y vasos sanguíneos. La fibrosis es difusa, con más de 10 capas celulares. Cinco o más nidos por campo óptico lineal y lagunas linfáticas. Ha atrofia endometrial. El porcentaje de parto esperado es menor a 10.

Aunado a los cambios estructurales que se observan en la endometriosis, se producen cambios en las secreciones que no dependen únicamente de la presencia de inflamación, si no del grado y extensión de las lesiones, sobre todo en las células encargadas de producir moco (Hoffmann *et al.*, 2009).

La patogénesis de la fibrosis se da por una intrincada red de interacciones celulares en las que participan componentes de la matriz extracelular, células inflamatorias, fibroblastos y citocinas pro inflamatorias como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Estas últimas, regulan el proceso de fibrosis a través de un efecto dual estimulando la proliferación de fibroblastos, colágeno y algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) (Voynow *et al.*, 2006). En yeguas con áreas de extensa fibrosis endometrial, se ha comprobado que existe una

marcada disminución en la expresión de diversas proteínas que intervienen en la implantación y sobrevivencia embrionaria, entre ellas se encuentran el glucógeno, uteroglobina, uterocalina, calbindina y uteroferrina. Adicionalmente, la disminución de receptores de estrógenos y progesterona provocan cambios asincrónicos y funcionales del endometrio (Hoffmann *et al.*, 2009).

Se ha descrito que el cambio en la expresión de proteínas y receptores puede influir de manera directa en la producción y secreción de moco, ya que las citocinas, los estrógenos y la progesterona influyen directamente en la regulación de la expresión de los genes que codifican para MUC (Mejía y Bursac, 2013; Andrianifahanana *et al.* 2006). Por otro lado, los cambios de hiperplasia displasia y metaplasia, en las células del epitelio luminal y glandular durante la endometrosis, podrían influir de manera directa con el aumento en la expresión de proteínas del gen MUC, ya que los factores de regulación requeridos en la secreción de moco durante la metaplasia, podría ser diferente en aquellos requeridos para regular positivamente la expresión de MUC en epitelios que no presentan daño (Voynow *et al.*, 2006).

### **7.5. Alternativas terapéuticas**

Las principales alternativas terapéuticas en yeguas que en la actualidad se proponen para regular la sobre producción de moco, están orientadas de acuerdo a la causa y fisiopatología de la enfermedad. El objetivo de la gran mayoría de las terapias clínicas se basa en apoyar los mecanismos de limpieza intrauterina, mediante el uso de fármacos específicos (Liu y Troedsson, 2008).

### 7.5.1. Mucolíticos

Los solventes y agentes mucolíticos, se utilizan frecuentemente en yeguas en infusiones intrauterinas, con el objetivo de disminuir el exudado, moco y biofilms bacterianos causantes de endometritis. Hipotéticamente el tratamiento con agentes mucolíticos podría contribuir a la limpieza de la mucosidad formada en el lumen del endometrio, favoreciendo el transporte de los espermatozoides hacia el oviducto, aumentando la eficacia y penetración de los antibióticos a través de la disminución de la viscosidad del moco. Los productos utilizados incluyen solventes como dimetilsulfóxido (DMSO) y queroseno mucolíticos como N-acetilcisteína (NAC) (LeBlanc, 2010).

La principal característica de los mucolíticos, como la (NAC) reside en su gran capacidad para irrumpir los enlaces disulfuro entre los polímeros de cualquier tipo de mucina, lo que conlleva a la reducción de la viscosidad del moco facilitando su eliminación (Gores-Lindholm *et al.*, 2013). Es de destacar que el tratamiento con (NAC), ha demostrado su eficacia en enfermedades inflamatorias crónicas del tracto respiratorio, como en neumonías y fibrosis quística en humanos y en el equino en casos de aspiración de meconio y bronconeumonías (LeBlanc, 2010).

La (NAC) ha sido utilizada por vía oral dos veces al día en dosis de 10 mg/kg de peso, o bien en infusiones intrauterinas en solución del 3 al 5% (LeBlanc, 2010; Gores-Lindholm *et al.*, 2013). Los estudios realizados por Witte *et al.* (2012) demostraron que el uso de NAC por vía oral, provocó el aumento de la viscosidad y producción de moco endometrial. El tratamiento con infusiones intrauterinas

demostró ser inocuo para la mucosa del endometrio, ya que no causa irritación ni efectos secundarios post administración. Sin embargo, la eficacia como mucolítico en casos de endometritis sigue siendo tema de debate ya que en diversos estudios publicados recientemente por Melkus *et al.* (2013) y Gores-Lindholm *et al.* (2013), han demostrado poca efectividad, en contraste con los resultados positivos comprobados en enfermedades crónicas de vías respiratorias en humanos. A pesar de estos resultados, el uso de (NAC) sigue siendo una alternativa actual en tratamientos de endometritis sobre todo en animales que presentan líquido y moco intrauterino ya que sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes han sido demostradas (Gores-Lindholm *et al.*, 2013).

El dimetilsulfóxido (DMSO), en solución al 30%, ha sido implementado en yeguas a través infusiones intrauterinas en solución al 30%, teniendo como resultado mejoras en la clasificación de grados de la escala de Kenney, en 18 de 27 yeguas tratadas, sin embargo su eficacia para disolver el moco aún no ha sido comprobada (LeBlanc, 2010).

El uso de queroseno a través de infusiones intrauterinas, ha demostrado provocar irritación local de la mucosa, causando endometritis moderada a difusa con edema. El efecto mucolítico de este producto se asocia principalmente a la destrucción y necrosis del epitelio pero no por la destrucción del moco (LeBlanc, 2010).

A pesar de la gran variedad de solventes y mucolíticos existentes en el mercado, su uso y eficacia continúa siendo objeto de controversias y debate, ya que la gran

mayoría de la evidencia científica no es concluyente y en algunas ocasiones es discrepante. Sobre todo cuando estos productos se utilizan como adyuvantes en el tratamiento de endometritis crónicas en yeguas subfértiles (Liu y Troedsson, 2008).

### **7.5.2. Antiinflamatorios**

Las citocinas son productos de las células inmunes y son fundamentales e importantes en diversos procesos fisiopatológicos, incluyendo la inflamación. Se ha demostrado que una gran cantidad de citocinas regulan la síntesis y secreción de mucinas en una variedad de tipos celulares.

Se reconocen dos tipos principales de respuesta inmune adaptativa que producen perfiles de citocinas característicos que se identifican como: tipo 1 (Th1) las cuales están principalmente asociadas al manejo de patógenos intracelulares como bacterias y virus y las tipo 2 (Th2) que favorecen predominante la respuesta inmune humoral. Las citocinas tipo 1 son la IL-12, IL-TNF y el IFN $\gamma$ , mientras que las tipo 2 incluyen a la IL-4, IL-5, IL-13. Se ha comprobado que las citocinas tipo 1 intervienen en la activación y expresión de los genes MUC de mucinas unidas a la membrana celular en diferentes tipos de células. También se ha comprobado que intervienen en la expresión aberrante de mucinas en cáncer de ovario y glándula mamaria en humanos. Las citocinas tipo 2 intervienen en la regulación y síntesis de mucinas secretadas, así como en los procesos de hiperplasia celular, sobre todo de células caliciformes (Andrianifahanana et al.2006). Se reconocen dos tipos principales de citocinas inflamatorias pueden ser identificados: (Th1) como tipo 1

que están asociadas con el desarrollo de la respuesta inmune celular y citocinas tipo 2 (Th2) que favorecen la respuesta inmune humoral. Ejemplos clásicos de estas son IL-2, IFN, IL-12, y TNF para tipo 1 y IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y para el tipo 2. Se ha comprobado que las citocinas tipo 1 intervienen en la activación y expresión de los genes MUC de mucinas unidas a la membrana celular en diferentes tipos de células. También se ha comprobado que intervienen en la expresión aberrante de mucinas en cáncer de ovario y glándula mamaria en humanos. Las citocinas tipo 2 intervienen en la regulación y síntesis de mucinas secretadas, así como en los procesos de hiperplasia celular, sobre todo de células caliciformes (Andrianifahanana *et al.*, 2006). Es importante destacar que el papel de las citocinas en la regulación de genes MUC no se limita a efectos individuales ya que las citocinas pueden también interactuar entre sí o con otros activos biológicos que a menudo conduce efectos sinérgicos para la expresión de MUC (Andrianifahanana *et al.*, 2006).

Es por eso que actualmente, el uso de antiinflamatorios es tema de investigación ya que la base de estos tratamientos está dirigida en restaurar los mecanismos homeostáticos inflamatorios locales a través de la reducción de citocinas pro inflamatoria y en la modulación de la respuesta adaptativa. Este mecanismo puede ser especialmente útil en algunas yeguas de edad avanzada, en donde se ha comprobado, tienen mayor susceptibilidad a presentar una respuesta inflamatoria asociado con la edad avanzada. Al igual que ocurre en los seres humanos, este fenómeno se caracteriza por el aumento en la producción de citocinas inflamatorias.

En equinos, se ha demostrado que los caballos viejos producen más citocinas inflamatorias que los jóvenes, mediante la estimulación de células mononucleares de sangre periférica. En yeguas de mayor edad, se ha comprobado mayor susceptibilidad a endometritis, debido a la falla en los mecanismos anatómicos y fisiológicos que contribuyen en la limpieza uterina (Liu y Troedsson, 2008). El uso de antiinflamatorios esteroidales, es una alternativa médica que suele implementarse en yeguas con endometritis por contaminación bacteriana o post monta. Su uso va acompañado en la mayoría de los casos de fármacos como la oxitocina y antibióticos, teniendo como resultado mejoras plausibles en la modulación de la inflamación (LeBlanc, 2010).

## **7.6. Técnicas diagnósticas para mucinas**

Actualmente existen una gran variedad de técnicas diagnósticas que ayudan a identificar y tipificar mucina en los tejidos. Su identificación está encaminada en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, así como para conocer el grado de malignidad de algunos tipos de cáncer (Linden *et al.*, 2008).

### **7.6.1. Tinciones especiales**

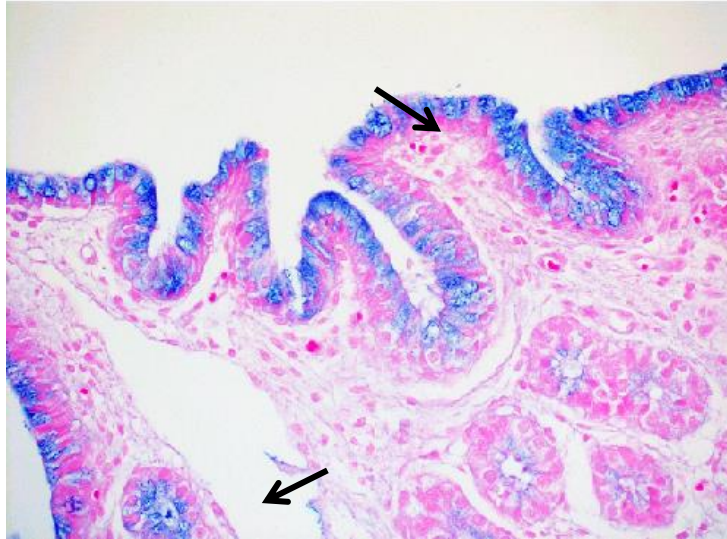
Las tinciones especiales son una herramienta diagnóstica rápida, económica y de fácil acceso que se realiza a través del uso de colorantes específicos en cortes histológicos de cualquier tejido para evidenciar componentes y secreciones celulares a nivel microscópico. Las tinciones más comunes para identificar

mucopolisacáridos son azul Alcían (AA), ácido periódico de Schiff (PAS), Mucicarmín y hierro coloidal.

Para entender la reacción de las tinciones especiales y evidenciar la presencia de mucopolisacáridos, es importante enfocar desde una perspectiva histoquímica, su estructura. En el caso de las mucinas se pueden clasificar en dos categorías generales (ácidas y neutras). Esta clasificación se basa en la composición de sus hidratos de carbono y pH. Las mucinas ácidas contienen carbohidratos cargados con grupos carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) o sulfato ( $\text{SO}_3$ ), los cuales están ionizados y tienen una carga negativa global en las moléculas. Las mucinas neutras, carecen de grupos ácidos y por lo tanto no tienen ninguna carga neta (Torres *et al.*, 2011).

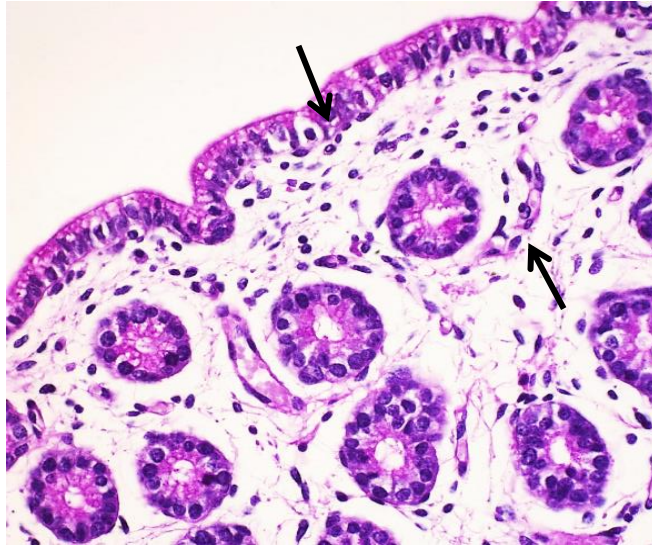
El fundamento para evidenciar mucinas ácidas, radica en que las tinciones contienen inmersas en el colorante, moléculas catiónicas (cargadas positivamente) a un pH específico, que se une a través de fuerzas electrostáticas a las cadenas de polisacáridos aniónicos, carboxilados o sulfatados de las moléculas de mucina. Un claro ejemplo de este tipo de tinción es la azul alciano, la cual se prepara normalmente en un pH ácido de 2.5 y se emplea para identificar gránulos de mucinas en color azul (Fig. 6) (Torres *et al.*, 2011).





**Figura 6.** Biopsia endometrial teñida con azul Alcian. En esta fotomicrografía las flechas señalan los gránulos de mucina teñidos de azul en las células epiteliales (40x).

La tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) es quizás la más versátil y ampliamente utilizada para demostrar glucógeno y mucopolisacáridos en las células. Esta tinción es particularmente sensible para la detección de mucinas neutras. A diferencia de la técnica descrita anteriormente, el fundamento de esta tinción consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido periódico ( $\text{HIO}_4$ ) para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehído o cetona) presentes en ellos, de forma que pueden ser demostrados posteriormente mediante el reactivo de Schiff que reacciona con dos grupos aldehídicos contiguos dando lugar a una tinción fucsia o púrpura característica (Figura. 7) (Torres *et al.*, 2011).



**Figura 7.** Biopsia endometrial teñida con ácido periódico de Schiff (PAS). En esta fotomicrografía las flechas señalan los gránulos de mucina teñidos purpura en las células epiteliales (40x).

Las tinciones de hierro coloidal y Muciarmín también detectan mucinas ácidas, sin embargo su uso es menor comparado con azul alcino. Otra técnica para el diagnóstico de mucinas es a través del inmunomarcaje de anticuerpos MUC.

## **8. Materiales y métodos**

### **8.1. Animales**

El trabajo de campo se realizó en dos etapas, la primera durante los meses de abril a julio y la segunda de diciembre a enero con la finalidad de obtener muestras representativas de yeguas en estro y diestro (abril a julio), y en época anovulatoria (diciembre y enero).

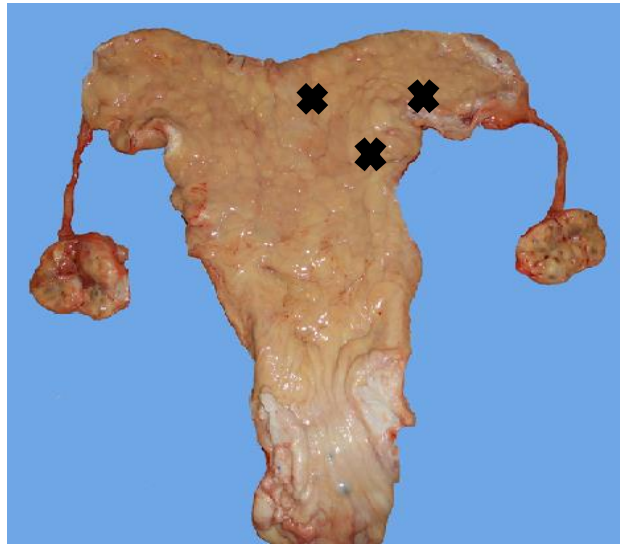
En un rastro municipal regido por la NOM-194-SSA1-2004 ubicado en Rio Frio, Estado de México, se colectaron 143 tractos reproductores de yeguas no gestantes mayores a 3 años (edad calculada de acuerdo cronometría dental), sin historia clínica previa. Posterior a la eutanasia de los animales; los tractos reproductores se colocaron individualmente en bolsas de plástico etiquetadas con el número y edad de cada yegua. Los úteros se transportaron en refrigeración a 4°C al laboratorio de reproducción de la UNAM en la FMVZ, situado a una 1 hora y media de distancia. En el laboratorio se realizó la disección de los úteros y se tomaron fotografías de cada uno para su registro. Se determinó la etapa del ciclo estral, acorde al número y diámetro de folículos y cuerpos lúteos presentes determinando el tamaño y ubicación (Ginther, 1992).

- Yeguas en estro: folículos > a 35mm de diámetro sin cuerpo lúteo presente.
- Yeguas en diestro: presencia de un cuerpo lúteo en cualquiera de los ovarios.
- Yeguas en fase anovulatoria: sin presencia de cuerpos lúteos en los ovarios y con folículos menores a 15 o 20 mm de diámetro.

## **8.2. Biopsias**

Para obtener el tejido endometrial se realizó un corte longitudinal continuo con un cuchillo liso de acero inoxidable a través de línea media del útero, iniciando por la parte dorsal del cérvix hasta la punta de cada cuerno uterino. Por cada animal se obtuvieron 3 muestras de endometrio con un diámetro de 3 cm<sup>3</sup>. La primera, se tomó 5 cm por debajo de la bifurcación y las restantes de cada cuerno uterino 3

cm a la derecha o izquierda a partir de la bifurcación respectivamente (Figura 9). Para la toma de muestras se utilizaron pinzas de biopsias uterinas marca Hauptner® alligator type de 70 cm de largo con canastilla de 20×4×3 mm.



**Figura 8.** Útero de yegua. Las cruces señalan la ubicación de donde se tomaron las biopsias endometriales

### 8.3. Procesamiento de tejidos

Las muestras se fijaron en formol al 10% por 24 horas y se procesaron por medio de las técnicas histológicas tradicionales de inclusión en parafina en el departamento de Anatomopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

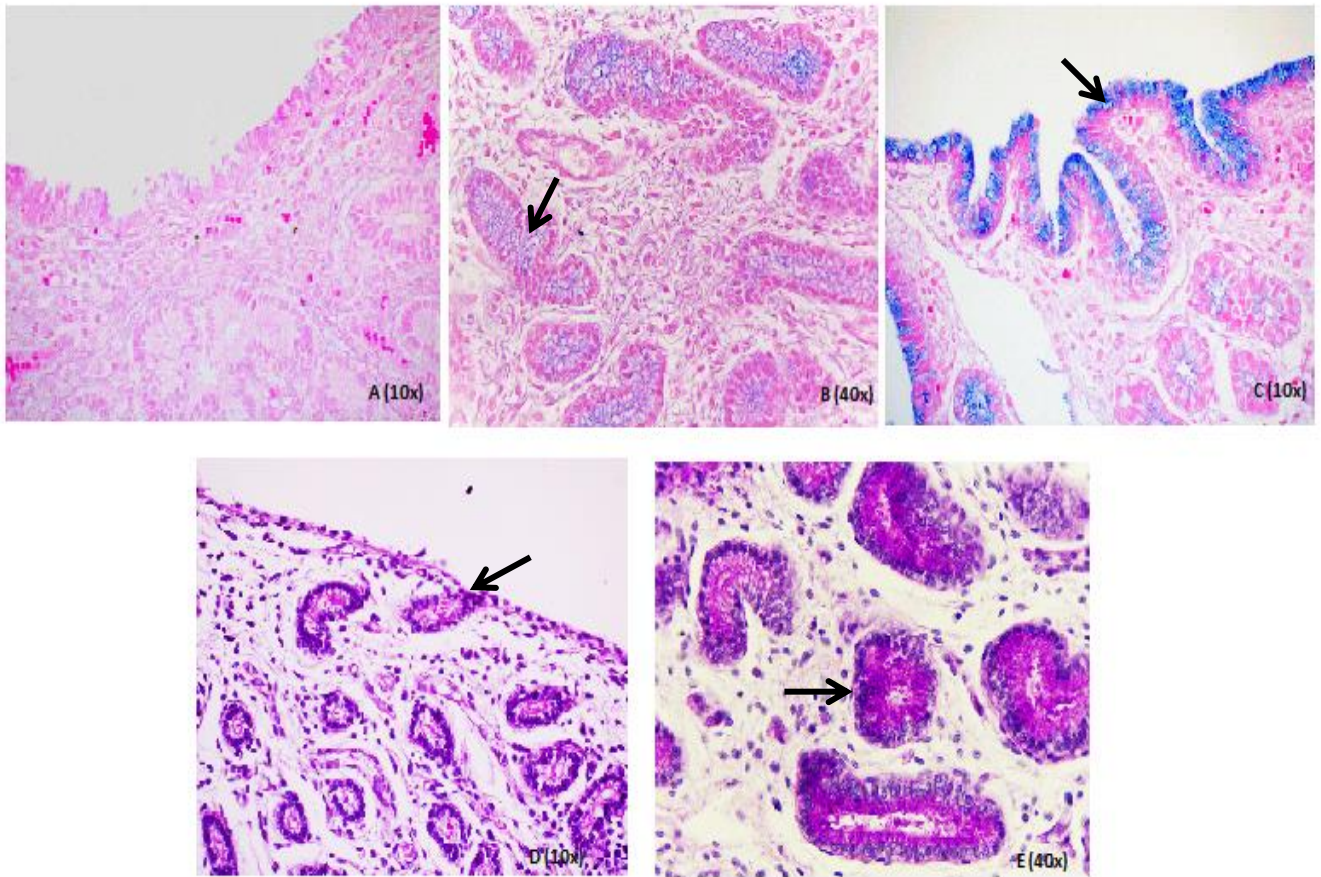
En una castilla de inclusión histológica se colocaron las 3 biopsias de cada yegua en el siguiente orden: cuerno izquierdo, bifurcación, cuerno derecho. Posteriormente los tejidos pasaron por un proceso de deshidrataron por 24 horas

en alcoholes en concentraciones crecientes al 70%, 80%, 96% y 100%, después por xilol y se lavaron con agua destilada y se incluyeron en parafina sólida. Después se realizaron 3 cortes transversales de 3  $\mu\text{m}$  de grosor con micrótopo de rotación Leica®. Cada corte se montó en una laminilla y se tiñó por separado.

- Laminilla 1: Se tiñó con Hematoxilina-Eosina (H y E)
- Laminilla 2: Se tiñó con azul Alcían (A A) con un pH de 2.5.
- Laminilla 3: Se tiñó con ácido periódico de Schiff (PAS)

#### **8.4. Evaluación**

La evaluación microscópica se realizó con aumento 4x y 10x y 40x en los 3 fragmentos del endometrio (cuernos y bifurcación) de cada animal (Anexo 1). Para clasificar la positividad de las tinciones (AA y PAS) en las glándulas endometriales y en el epitelio luminal. Se utilizó una escala del 0 al 2, propuesta por los miembros los académicos que realizaron y evaluaron este trabajo. Se tomó como 0= tinción ausente, 1= tinción escasa o débil y 2= tinción fuerte (Figura 9).



**Figura 9.** Biopsias endometriales teñidas de azul Alcian y ácido peryódico de Schiff  
Escala de tinción que se utilizó para evaluar los gránulos de mucina.  
0= Ausente (A 10x), 1=Débil (B y D 40x y 10x) 2= Fuerte (C y E 10x y 40x)

Una vez realizada la evaluación de la tinción para mucinas ácidas y neutras en los epitelios, los resultados se registraron en la una base de datos de EXCEL 2010®.

Posteriormente todas las muestras se asignaron en dos grupos de animales:

- Grupo 1: De acuerdo Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992) que consta de cuatro categorías (I, IIA, IIB y III). Los cortes histológicos se evaluaron de acuerdo al grado y extensión de las lesiones con la tinción (H y E) (Cuadro 1).
- El grupo 2: De acuerdo a la época (estro, diestro y anovulatorias) mediante la inspección macroscópica de los ovarios previamente realizada.

Todos los cortes histológicos fueron evaluados por dos operadores independientemente, con un microscopio óptico de 4 objetivos marca Olympus ®.

**Cuadro 1.** Evaluación en base a Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992)

<b>Categoría</b>	<b>Hallazgos histológicos</b>
<b>I</b>	Endometrio sin alteraciones histológicas
<b>II A</b>	Infiltrado inflamatorio difuso o multifocal en epitelio luminal, estrato compacto y esponjoso. Severidad moderada a grave. Fibrosis 2 o 3 capas celulares, 2 nidos glandulares en cuatro campos ópticos lineales. Severidad moderada a grave Dilatación glandular y linfática escasa
<b>III B</b>	Infiltrado inflamatorio difuso en epitelio luminal, estrato compacto y esponjoso. Severidad moderada a grave. Fibrosis 4 a 10 capas celulares. Un nido glandular por campo óptico lineal Dilatación glandular y linfática moderada.
<b>III</b>	Infiltrado inflamatorio difuso en estrato luminal, compacto y esponjoso. Severidad grave Fibrosis difusa con más de 10 capas. Cinco o más nidos por campo óptico lineal Dilatación glandular y linfática abundante

## **8.5. Análisis estadístico**

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa SAS/STAT® Software 2007. Las variables a evaluar fueron los grados de acuerdo a Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992) que fueron convertidos a puntuaciones numéricas: Grado I=1, Grado IIA =2, Grado IIB =3, Grado III=4 y la etapa reproductiva estro =1, diestro =2, anovulatorias =3. Las variables categóricas se compararon mediante pruebas de ji-cuadrada, con significancia estadística aceptada  $p < 0,05$ .

## **9. Resultados**

Se evaluaron en total 143 biopsia uterinas, las cuales se asignaron en 2 grupos, con el objetivo de evaluar la presencia y distribución de mucinas: Grupo 1: Clasificación de acuerdo a Kenney Doig (1986) modificada por Schoon. (1992). Grupo 2: Ciclo estral y anovulatorias.

El rango de edad de las hembras que obtuvieron la categoría I y IIA oscila entre 3 a 10 años con un promedio de 8.4 años, las hembras categoría IIB y III con 8 a 20 años con un promedio de 12.5 años.

Los primeros resultados, demuestran que la etapa del ciclo estral o fase anovulatoria en la que se encuentran las yeguas no tiene asociación alguna con los cambios degenerativos o inflamatorios endometriales y viceversa ( $p > 0.05$ ) (Cuadro 2).



**Cuadro 2.** Porcentaje de hembras en estro, diestro y época anovulatoria y su relación en base a la clasificación Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992)

Etapa reproductiva	<u>Clasificación</u>				Total
	I	IIA	IIB	III	
<b>Estro</b>	28.6%	35.7%	21.4%	14.3%	100.00
	12	15	9	6	42
<b>Diestro</b>	34.5%	20.7%	29.3%	15.5%	100%
	20	12	17	9	58
<b>Anovulatorias</b>	27.9%	23.3%	18.6%	30.2%	100%
	12	10	8	13	43
<b>Total</b>	30.8%	25.9%	23.8%	19.6%	100%
	44	37	34	28	143

No existen asociación entre la etapa del ciclo estral o anovulatoria con los hallazgos patológicos endometriales en cada categoría ( $p > 0.05$ ).y

### 9.1. Distribución de mucinas ácidas endometriales en base a la clasificación Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992)

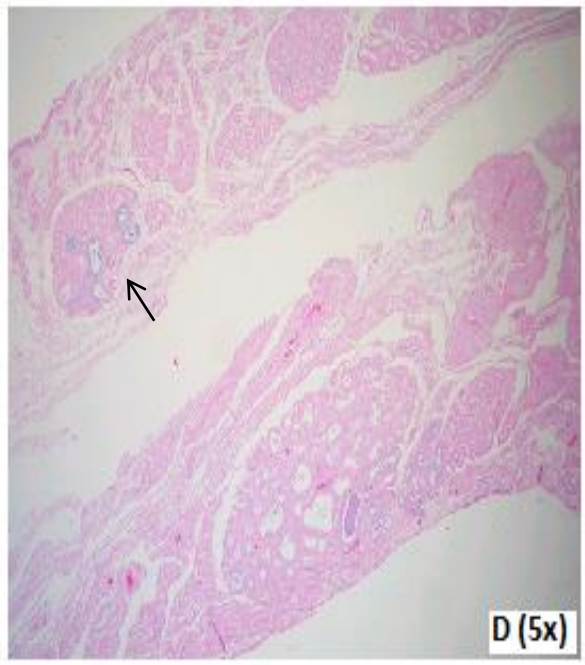
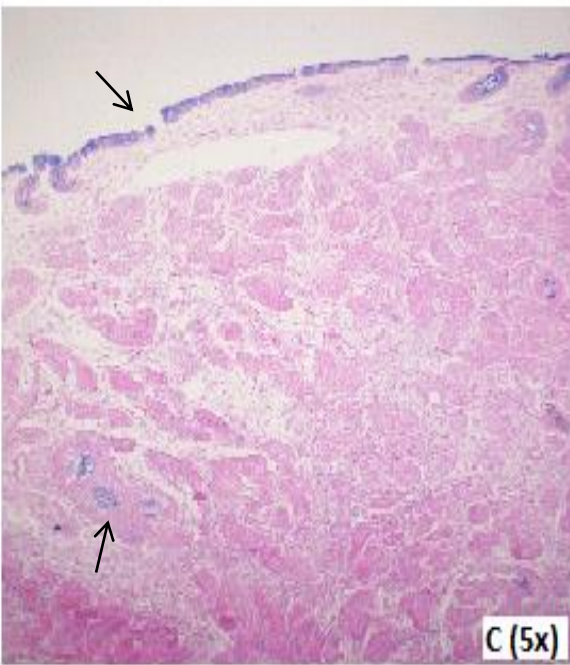
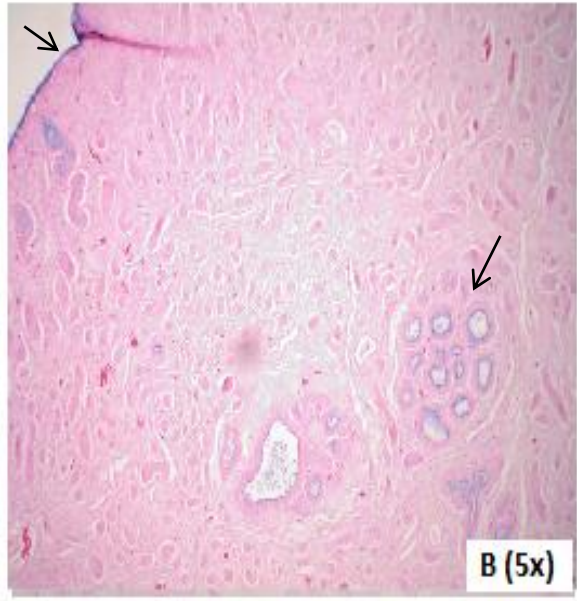
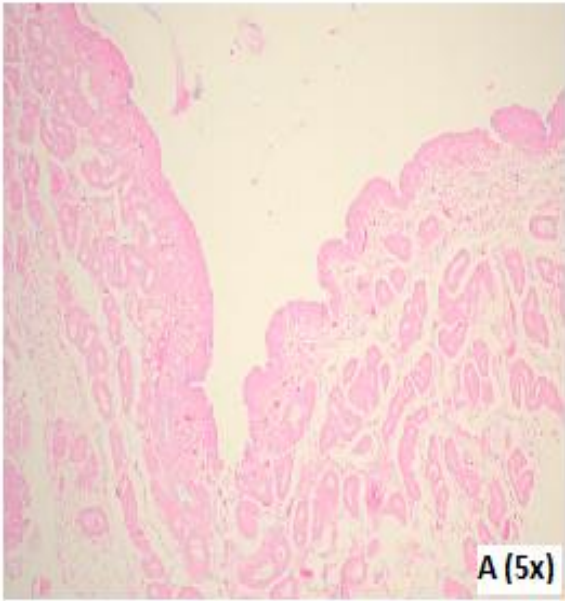
La distribución de mucinas ácidas en las células del epitelio luminal y en las glándulas endometriales, cambió significativamente con respecto a los cambios histológico endometriales asociados a endometritis y endometriosis. Estos cambios fueron más evidentes en las glándulas endometriales. El 100% de las yeguas clasificación III, presentaron gránulos de mucinas ácidas fuertemente teñidas, en la parte apical y en citoplasma celular, así como también en la luz de las glándulas; sobre todo en aquellas que estaban muy dilatadas y tortuosas rodeadas

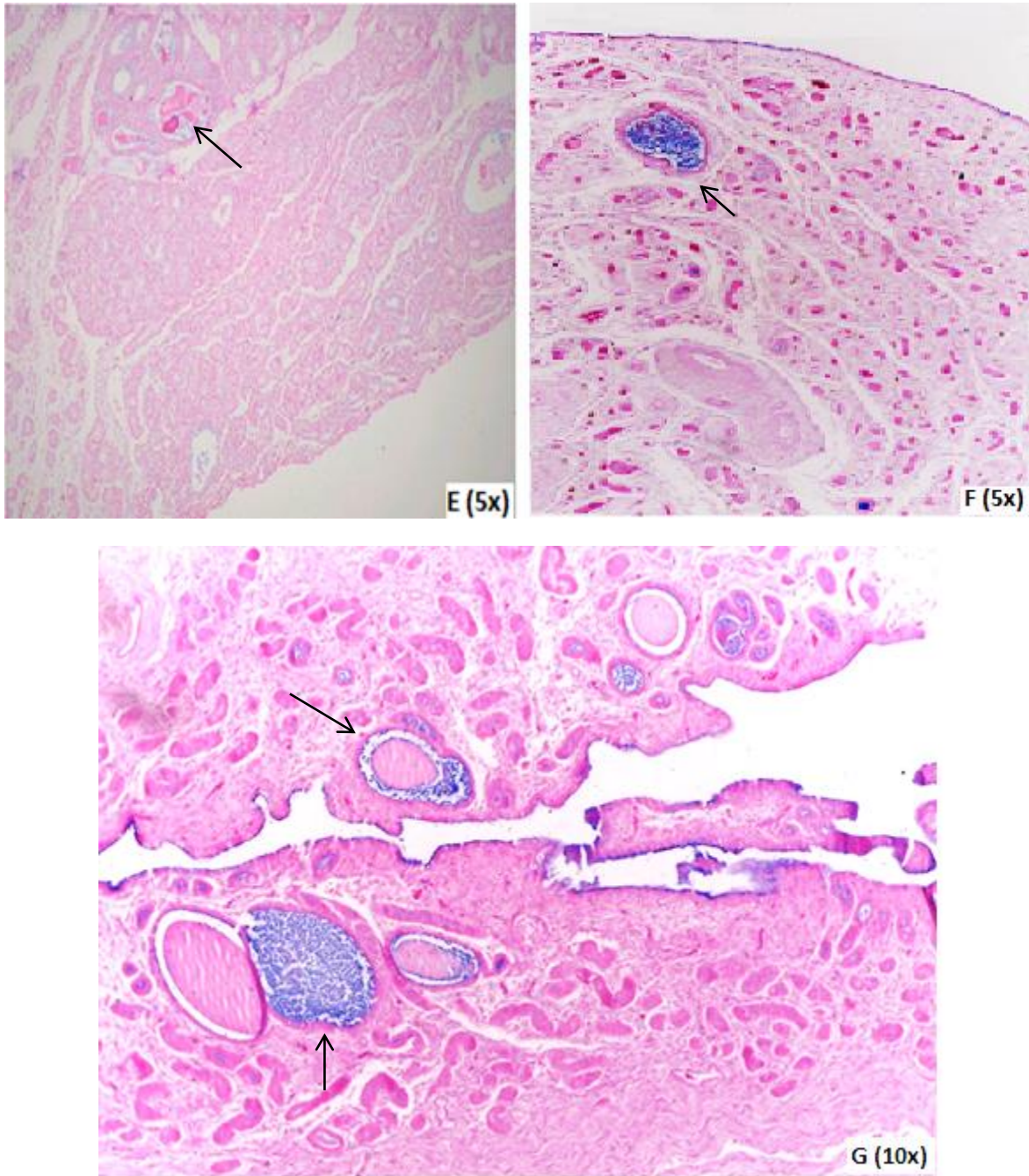
por tejido conectivo fibroso en forma de nidos (Figura 10). En el epitelio luminal el 85.7% de las yeguas, con clasificación III presentaron abundantes mucinas fuertemente teñidas en el citoplasma celular ( $p < 0.05$ ). De manera contraria, el 100% de yeguas clasificación I, no presentaron mucinas ácidas en las glándulas endometriales y tampoco el 81.8% en el epitelio luminal (Cuadro 3)

**Cuadro 3.** Porcentaje de hembras que presentan mucinas ácidas en base a la clasificación Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992).

Clasificación	<u>Epitelio luminal</u>				<u>Glándulas</u>			
	Ausente	Débil	Fuerte	Total	Ausente	Débil	Fuerte	Total
<b>I</b>	<b>81.8%</b>	9.1%	<b>9.1%</b>	100%	<b>100%</b>	0%	<b>0%</b>	100%
	36	4	4	44	44	0	0	44
<b>IIA</b>	59.5%	24.3%	16.2%	100%	81.1%	16.2%	2.7%	100%
	22	9	6	37	30	6	1	37
<b>IIB</b>	35.3%	23.5%	41.2%	100%	17.6%	0%	52.9%	100%
	12	8	14	34	6	10	18	34
<b>III</b>	<b>14.3%</b>	0%	<b>85.7%</b>	100%	<b>0%</b>	0%	<b>100%</b>	100%
	4	0	24	28	0	0	28	28
<b>Total</b>	51.70%	14.7%	33.6%	100%	55.9%	11.2%	32.9%	100%
	74	21	48	143	80	16	47	143

Existen diferencias significativas entre el grado de clasificación con respecto a la escala de tinción de mucinas ácidas, tanto para el epitelio luminal como las glándulas ( $p < 0.05$ ).





**Figura 10.** Biopsias endometriales. Las flechas señalan los gránulos de mucina ácida teñida de azul en las células epiteliales del lumen y de las glándulas endometriales. Mucinas ácidas teñidas débil e intensamente en el epitelio luminal y en glándulas endometriales que se encuentran dilatadas y rodeadas por tejido conectivo fibroso (B,C,D,E,F,G). Ausencia de mucinas ácidas en epitelio luminal y glandular (A)

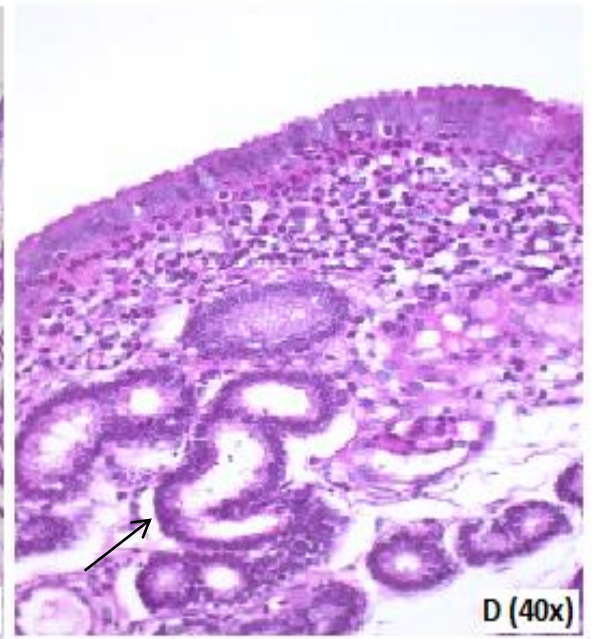
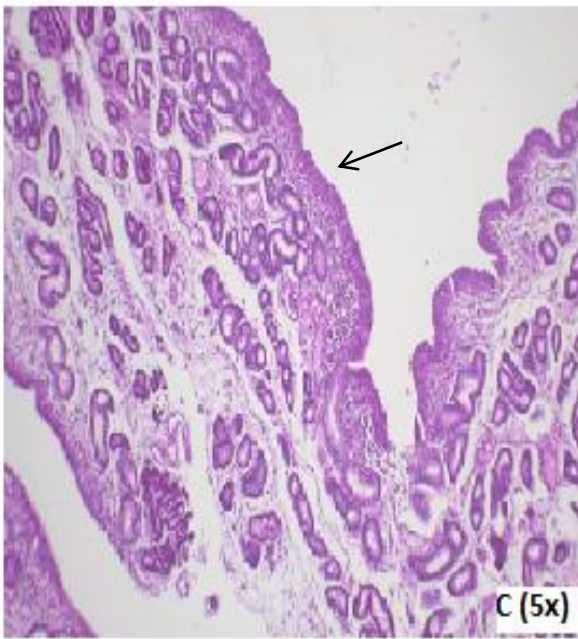
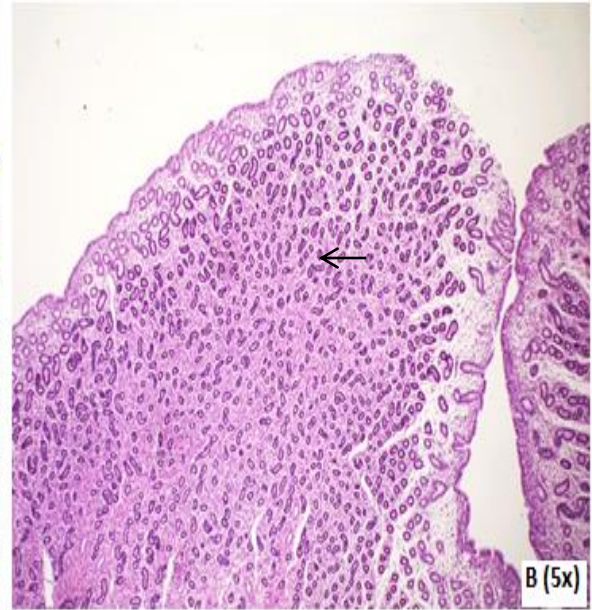
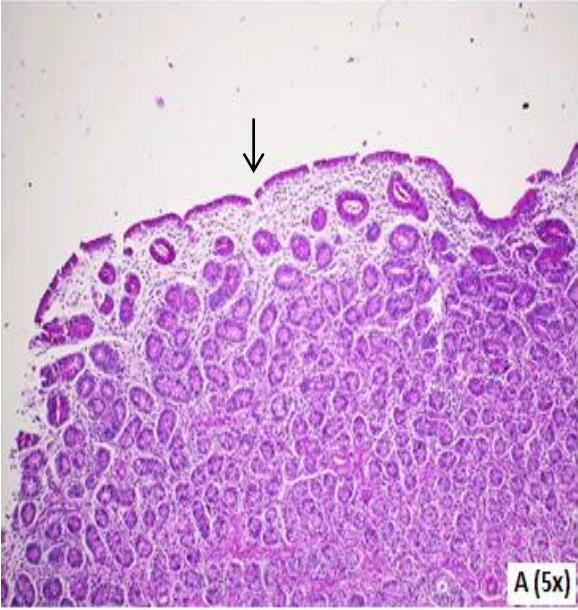
## **9.2. Distribución de mucinas neutras endometriales en base a la clasificación Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992)**

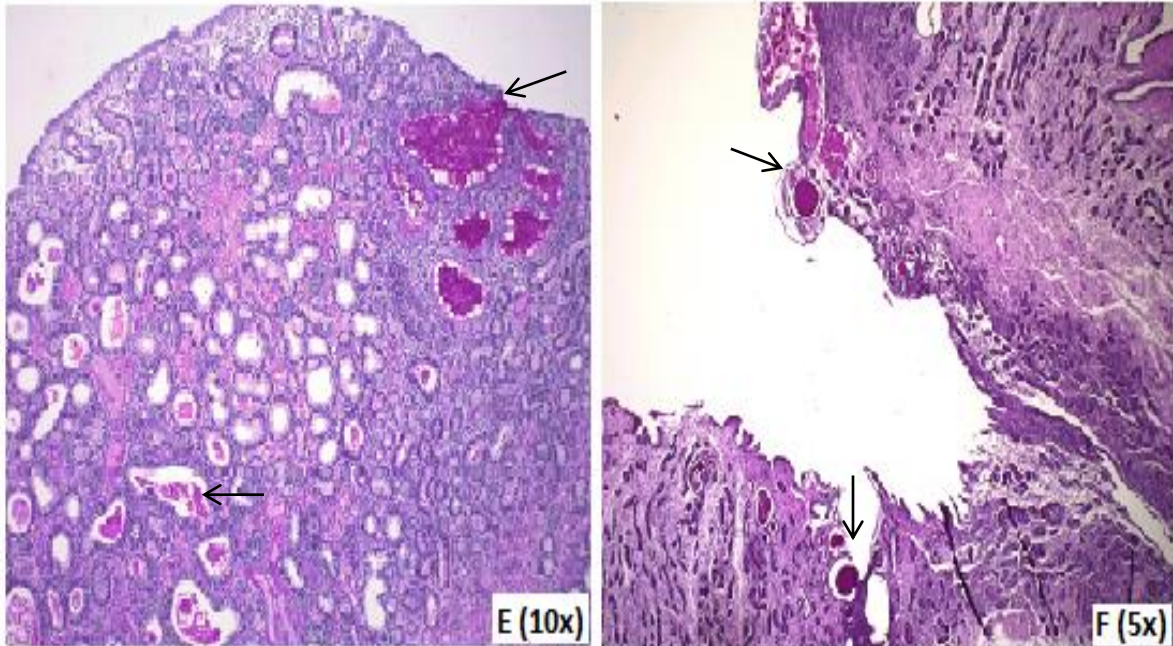
El incremento en la escala de tinción de las mucinas neutras se asocia positivamente con los cambios histológicos endometriales por endometritis y endometrosis descritos en la categoría Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992) (Figura 11). Las mucinas neutras estuvieron presentes en todas las células del epitelio luminal y glandular en el 100% de las hembras. Sin embargo la proporción de hembras que tiñeron gránulos débilmente en las células del epitelio luminal fue mayor en las yeguas con clasificación I, con un 72.2% que el resto de las hembras que obtuvieron clasificaciones IIA, IIB y III. Las hembras que obtuvieron categoría III, presentaron mucinas neutras teñidas fuertemente en el citoplasma de las células de las glándulas endometriales, así como en su luz, con un aumento notable en las glándulas que se encontraban marcadamente dilatadas ( $p < 0.05$ ). Las yeguas con menor daño degenerativo e inflamación (I y IIA) tuvieron en su mayoría, gránulos débilmente teñidos, únicamente en el citoplasma de las células de las glándulas (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Porcentaje de hembras que presentan mucinas neutras en base a la clasificación Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992).

Clasificación	<u>Epitelio luminal</u>				<u>Glándulas</u>			
	Ausente	Débil	Fuerte	Total	Ausente	Débil	Fuerte	Total
<b>I</b>	0%	<b>72.2%</b>	27.3%	100%	0%	<b>52.3%</b>	47.7%	100%
	0	32	12	44	0	23	21	44
<b>IIA</b>	0%	<b>83.8%</b>	16.2%	100%	0%	73%	27%	100%
	0	31	6	37	0	27	10	37
<b>IIB</b>	0%	38.2%	61.8%	100%	0%	11.8%	88.2%	100%
	0	13	21	34	0	4	30	34
<b>III</b>	0%	7.1%	<b>92.9%</b>	100%	0%	0%	<b>100%</b>	100%
	0	2	26	28	0	0	28	28
<b>Total</b>	0%	54.5%	45.5%	100%	0%	37.8%	62.2%	100%
	0	78	65	143	0	54	89	143

Existen diferencias significativas en la escala de tinción de las mucinas neutras con respecto al grado de clasificación obtenido, tanto para el epitelio luminal como las glándulas ( $p < 0.5$ ).





**Figura 11.** Biopsias endometriales. Las flechas señalan los gránulos de mucina neutras teñidas de púrpura en las células epiteliales del lumen y glándulas endometriales (A, B). Mucinas neutras en células del lumen y glándulas endometriales en corte histológico categoría I Kenney (C, D). Mucinas neutras en corte histológico con infiltrado inflamatorio en el estrato compacto (E, F). Abundantes mucinas neutras intensamente teñidas en la luz de glándulas dilatadas que se encuentran rodeadas por tejido conectivo fibroso.

### **9.3. Distribución de mucinas ácidas endometriales durante el ciclo estral y fase anovulatoria**

La presencia y distribución de mucinas ácidas en las células del epitelio luminal tiene efectos significativos de acuerdo a la época reproductiva ( $p < 0.05$ ). Durante el estro, las mucinas ácidas predominaron en las células del epitelio luminal, debido a que la mayor parte de las muestras obtenidas de hembras en ésta etapa

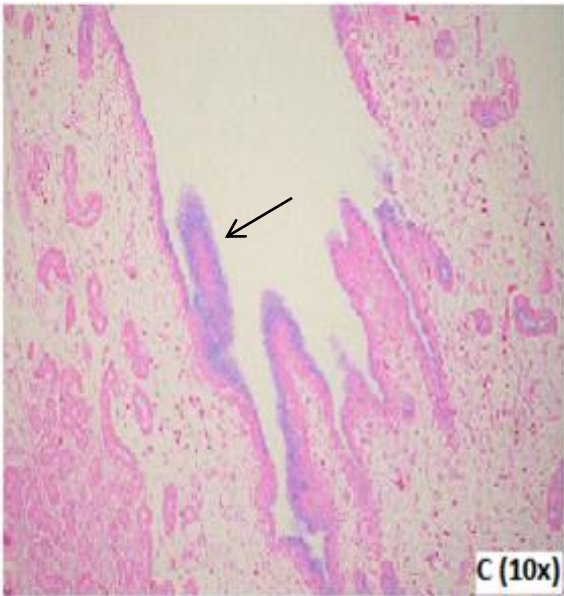
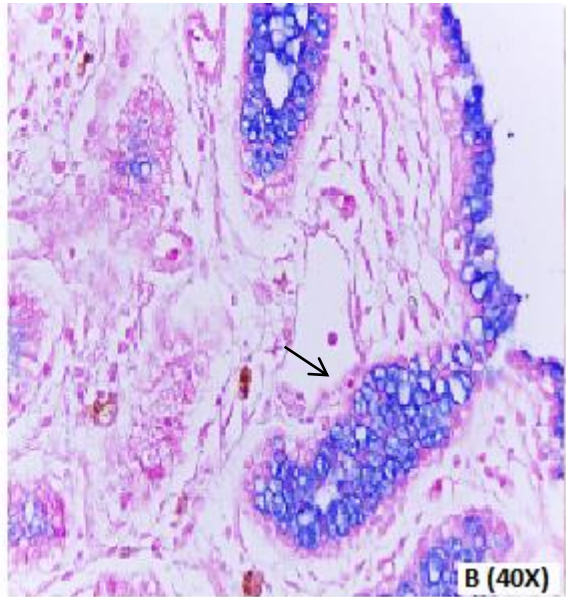
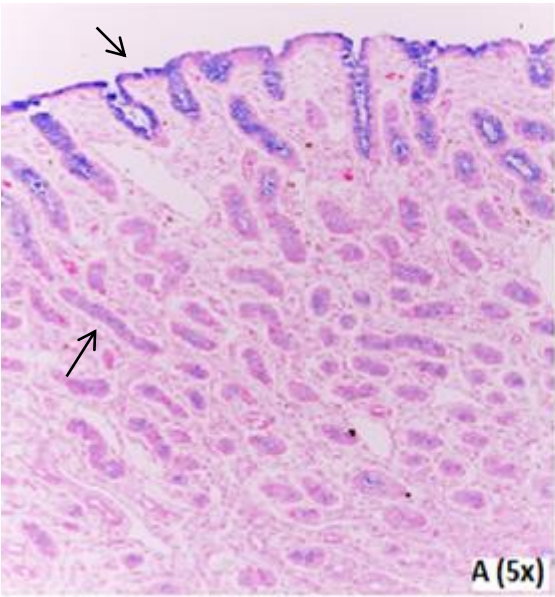


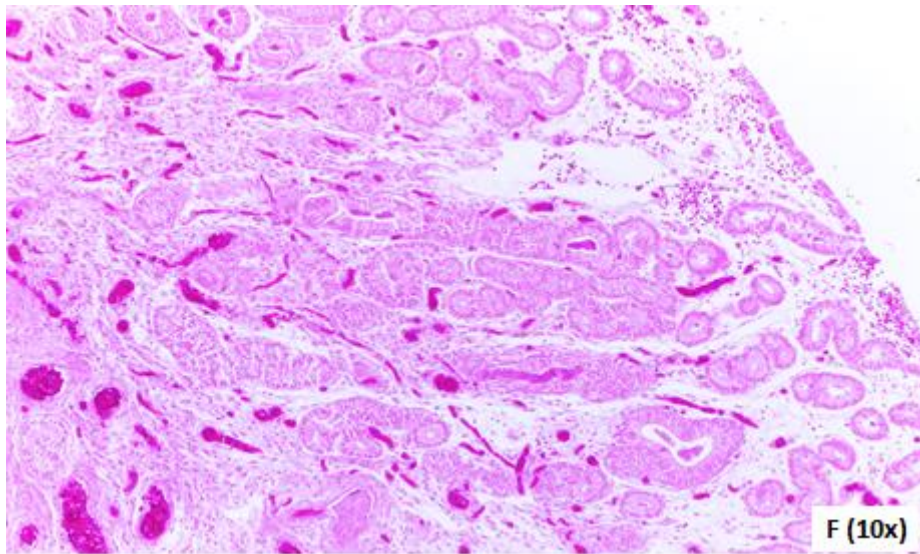
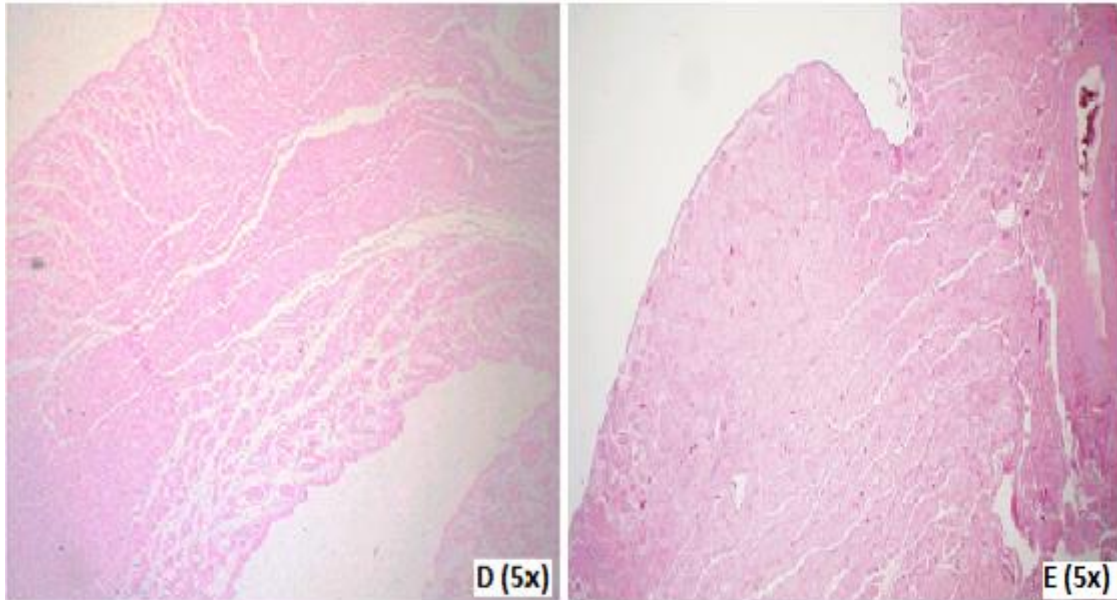
presentaron mucinas débil y fuertemente teñidas con un 35.7 y 45.2% (Cuadro 5). El 65.5 y 65.1% de yeguas en diestro y anovulatorias no presentaron mucinas ácidas en el epitelio luminal ( $p < 0.05$ ). La presencia de mucinas ácidas en las glándulas endometriales fue ausente en la mayoría de las yeguas. En los casos en que sí se observaron gránulos débil y fuertemente teñidos, fueron en las glándulas superficiales que se localizaban cerca del epitelio luminal en hembras que se encontraban en estro (Figura 12).

**Cuadro 5.** Porcentaje de hembras en estro, diestro y fase anovulatoria que presentan mucinas ácidas en el endometrio.

Etapa reproductiva	<u>Epitelio luminal</u>				<u>Glándulas</u>			
	Ausente	Débil	Fuerte	Total	Ausente	Débil	Fuerte	Total
<b>Estro</b>	19%	35.7%	<b>45.2%</b>	100%	<b>47.6%</b>	26.2%	<b>26.2%</b>	100%
	8	15	19	42	20	11	11	42
<b>Diestro</b>	<b>65.5%</b>	5.2%	29.3%	100%	56.9%	8.6%	34.5%	100%
	38	3	17	58	33	5	20	58
<b>Anovulatorias</b>	<b>65.1%</b>	7%	27.9%	100%	62.8%	0%	37.2%	100%
	28	3	12	43	27	0	16	43
<b>Total</b>	51.7%	14.7%	14.7%	100%	55.9%	11.2%	32.9%	100%
	74	21	48	143	80	16	47	143

Existen diferencias significativas entre la época reproductiva en la que se encuentran las hembras (estro, diestro y anovulatorias) y la escala de tinción de las mucinas en el epitelio luminal y las glándulas ( $p < 0.05$ ).





**Figura 12.** Biopsias endometriales. Las flechas señalan los gránulos de mucinas ácidas teñidas de azul en las células epiteliales del lumen y las glándulas endometriales (A, B, C). Mucinas neutras en epitelio luminal y las glándulas endometriales superficiales en cortes histológicos de yeguas en estro (D, E, F). Ausencia de mucinas ácidas en epitelio luminal y glándulas en cortes histológicos de yeguas en diestro y anovulatorias.

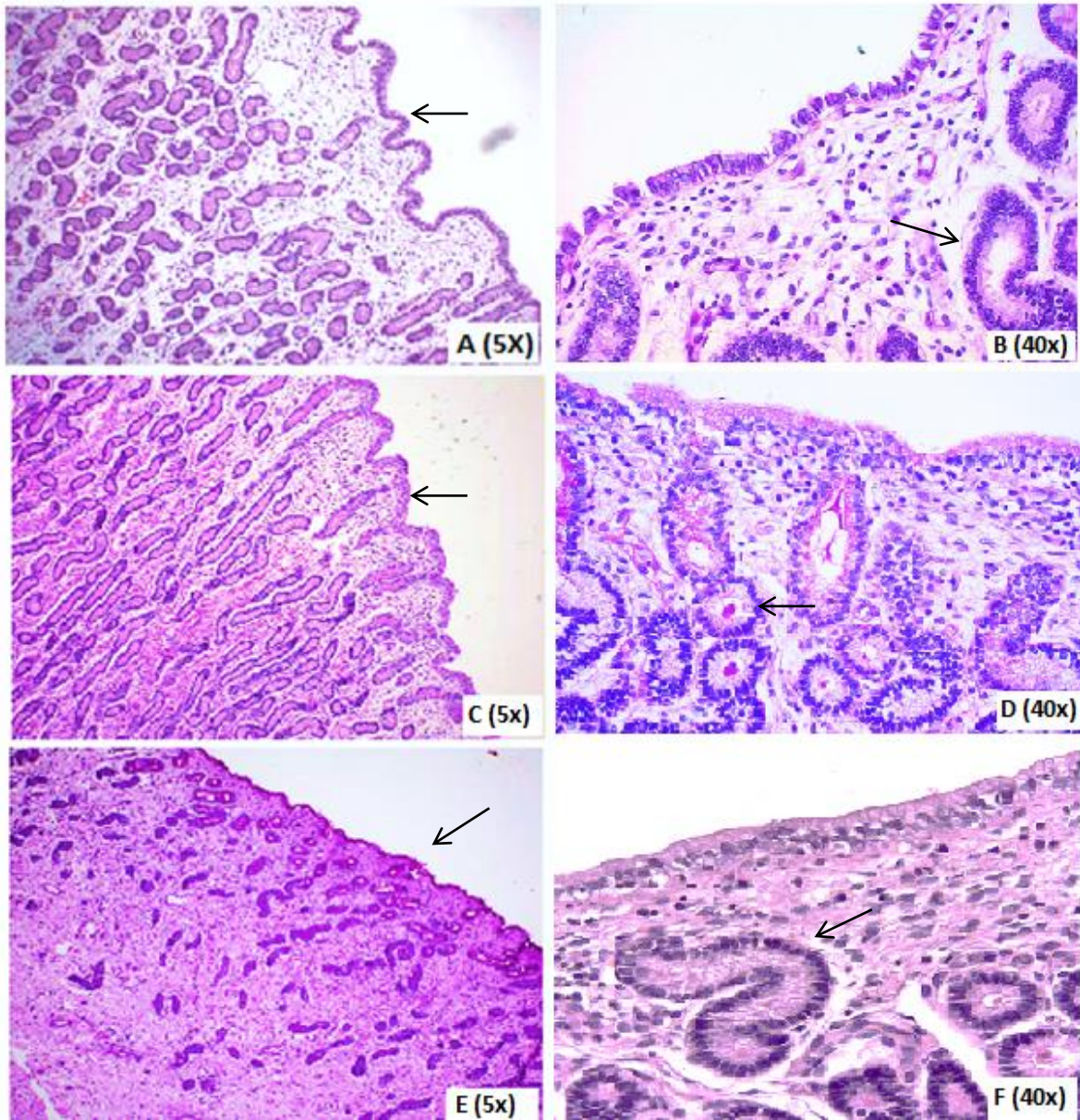
#### **9.4. Distribución de mucinas neutras durante el ciclo estral y fase anovulatoria**

El 100% de las hembras presentaron tanto en las células del epitelio luminal como en las glándulas endometriales gránulos de mucinas neutras teñidos con PAS (Cuadro 6). El 79.3% las hembras que se encontraban en fase anovulatoria exhibieron gránulos de mucina teñidos de mayor intensidad en las glándulas endometriales y células epiteliales; comparado con las hembras que estaban en estro y diestro. El 69.8% de las hembras en diestro también presentaron gránulos de mucinas fuertemente teñidos, sin embargo esto fue más evidente en las glándulas endometriales que se encontraban en la parte más profunda del estrato esponjoso. Las hembras en estro exhibieron gránulos de mucina débilmente teñidos tanto en las células del lumen como en las glándulas endometriales ( $p < 0.05$ ) (Figura 13).

**Cuadro 6.** Porcentaje de hembras en estro, diestro y fase anovulatoria que presentan mucinas neutras en el endometrio

Etapa reproductiva	Epitelio luminal				Glándulas			
	Ausente	Débil	Fuerte	Total	Ausente	Débil	Fuerte	Total
<b>Estro</b>	0%	66.7%	33.3%	100%	0%	69%	31%	100%
	0	28	14	42	0	29	13	42
<b>Diestro</b>	0%	63.8%	36.2%	100%	0%	20.7%	79.3%	100%
	0	37	21	58	0	12	46	58
<b>Anovulatorias</b>	0%	30.2%	69.8%	100%	0%	30.2%	69.8%	100%
	0	13	30	43	0	13	30	43
<b>Total</b>	0%	54.5%	45.5%	100%	0%	37.8%	62.2%	100%
	0	78	65	143	0	54	89	143

Existen diferencias significativas entre la época reproductiva en la que se encuentran las hembras (estro, diestro y anovulatorias) y la escala de tinción de las mucinas neutras en el epitelio luminal y las glándulas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 13.** Biopsias endometriales. Las flechas señalan los gránulos de mucina neutras teñidas de purpura en las células epiteliales del lumen y glándulas endometriales en hembras en estro (A y B), en diestro (C y D) y anovulatorias (E y F).

## 10. Discusión

La producción de moco en el endometrio del equino ha sido demostrada, utilizando tinciones como azul alción y ácido periódico de Schiff, en donde se aprecian los gránulos de mucinas, producidas por las células del epitelio y la glándulas endometriales (Causey *et al.*, 2000). Bajo condiciones fisiológicas normales, las mucinas exhiben un perfil bien definido de síntesis, expresión y secreción el cual está estrictamente regulado. Sin embargo este sistema puede verse comprometido por una variedad de factores que afectan la integridad celular y que conllevan a condiciones patológicas que pueden alterar la expresión génica y la tasa de secreción (Andrianifahanana *et al.*, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, las mucinas son producidas y secretadas constitutivamente en el epitelio luminal y glandular del endometrio de las yeguas. Sin embargo los animales que presentan cambios histológicos endometriales inflamatorios o degenerativos que obtienen la categoría IIA, IIB y III en base a Kenney Doig (1986) modificada por Schoon, exhiben cambios significativos tanto en la secreción como en el tipo de mucinas expresadas, comparado con yeguas que no presentan daños endometriales que se encuentran dentro de la categoría I.

Los hallazgos más significativos en cuanto al tipo de mucinas secretadas en yeguas con alteraciones endometriales, se observaron con la tinción de azul Alción, tanto en las células del epitelio luminal como en las glándulas endometriales. Las yeguas que obtuvieron la categoría III presentaron gránulos de mucinas ácidas en las glándulas y en el epitelio luminal. Comparado con las

yeguas que obtuvieron categoría I, que no presentaron gránulos de mucinas ácidas, ni en las glándulas, ni en el epitelio luminal respectivamente (Figura 12). Esto podría significar que a mayor daño endometrial, mayor es la presencia y tinción de mucinas ácidas, tanto en el epitelio luminal como en el glandular.

De acuerdo a estos resultados, se infiere que la secreción de mucinas ácidas en yeguas con daño endometrial, puede deberse a una expresión desregulada y/o al cambio en la glicosilación de las mucinas. La expresión desregulada de mucinas ha sido vista como una de las características más destacadas en numerosas condiciones patológicas como son procesos neoplásicos o inflamatorios crónicos (Andrianifahanana *et al.*, 2006).

De acuerdo a Freeman *et al.* (1990), la secreción de mucinas ácidas en el endometrio de yeguas puede ser estimulada por procesos inflamatorios e irritativos, actuando ésta de manera como un factor de protección, ya que él demostró que las mucinas ácidas fueron secretadas en endometrios de yeguas a las cuales se les indujo experimentalmente endometritis a través de un catéter e infusión de orina intrauterina.

Se ha reportado que las alteraciones o los cambios en la glicosilación de las mucinas se dan principalmente por dos factores, el primero es debido al aumento en la expresión y actividad de las glicotransfererasas (enzimas necesarias para la biosíntesis de mucina) y el segundo, debido al cambio de las glicotransfererasas, en respuesta a factores como mediadores de la inflamación o de respuesta inmune como las citocinas, proteasas, prostaglandinas entre otros (Andrianifahanana *et*



*al.*, 2006). El estímulo para MUC a través de la citocinas se debe a la unión de éstas con su receptor celular de tipo tirosina kinasa, el cual a través de proteínas JAK (quinasas janus) fosforilan y dimerizan proteínas STAT (Transductor de señales y activadoras de la transcripción) que posteriormente son traslocadas al núcleo para la activación y regulación positiva de genes MUC (Hollingsworth y Swanson, 2004).

En enfermedades crónicas en humanos se ha comprobado que el cambio en la glicosilación de las mucinas conduce a una disminución en la protección de las mucosas, debido al cambio estructural y de función en las propiedades del moco. Bajo estas condiciones, se ha observado que el moco se vuelve más viscoso, pierde solubilidad en el agua, así como sus propiedades bacteriostáticas, lo que dificulta su eliminación y predispone a la adhesión de agentes patógenos oportunistas agravando la enfermedad (Causey, 2007).

En humanos, los cambios en las propiedades reológicas del moco se han descrito en el síndrome de ojo seco, en donde se describen diferencias en la producción y glicosilación de mucinas, en colitis ulcerosa, haciendo hincapié en los procesos inflamatorios asociados a esta enfermedad, donde se ha detectado glicosilación aberrante durante la fase activa de la enfermedad que después vuelve a patrones normales durante la remisión y también en casos de fibrosis quística y bronquitis crónica, donde lo más evidente es el aumento de sulfatación, siliación y fucosilación de las mucinas, provocando en los pacientes mayor cantidad de esputo altamente viscoelástico que conduce a obstrucciones en vías respiratorias (Corfield, 2015).

Aunado a los resultados descritos anteriormente, en este trabajo también se encontró que las yeguas con cambios patológicos endometriales presentan alteraciones en el patrón de secreción de mucinas neutras. La cantidad, distribución y tonalidad de moco endometrial en yeguas categoría IIA, IIB y III, fue significativamente mayor en la luz de las glándulas endometriales que presentaban fibrosis y dilatación, en comparación con las hembras que obtuvieron clasificación I, en donde la secreción de mucinas fue homogénea tanto en el epitelio luminal como en el glandular.

Resultados similares fueron descritos por Amaral *et al.* (1999) y Causey *et al.* (2000), en yeguas viejas y con limpieza uterina retardada. Los cortes histológicos endometriales obtenidos de estas hembras, presentaban una capa de gránulos de mucinas fuertemente teñidas con ácido peryódico de Schiff por encima de las células del epitelio luminal y en la luz de las glándulas dilatadas.

De acuerdo a Hoffman *et al.* (2009), el epitelio glandular con fibrosis, exhibe patrones alterados en la expresión de receptores de hormonas esteroideas, de proliferación celular y de secreción de proteínas. En sus resultados el autor describe que existe alteración en la secreción de mucopolisacáridos en hembras con dilatación quística de las glándulas endometriales en áreas con fibrosis. De acuerdo a este autor, estos eventos pueden ocurrir debido a una estimulación paracrina alterada en las glándulas endometriales, debido a la fibrosis de las células estromales, y a fallas en el control hormonal y/o la destrucción del epitelio.

(Gerstenberg *et al.* (1999) reportó que las yeguas con endometriosis, presentan daño endometrial permanente; lo que implica de tal forma cambios en la secreción y expresión de mucinas que difícilmente se pueden restablecer, ya que las células productoras de moco presentan de la misma forma, daño permanente e irreversible que puede incrementar con el tiempo. Así mismo, las glándulas dilatadas, no son capaces de responder adecuadamente a los estímulos endocrinos normales, un fenómeno que puede estar relacionado con la expresión anormal de los receptores de hormonas debido a la sustitución o destrucción del epitelio. De acuerdo a esto, se infiere que las alteraciones cualitativas y cuantitativas en las secreciones endometriales, conllevan a una perturbación del microambiente uterino, que a su vez podría ser una de las razones de subfertilidad y de los prolongados y repetidos tratamientos que resultan en muchas ocasiones poco eficientes en yeguas con historia clínica de sobre producción y acumulación de moco uterino. Es un hecho que se requiere mayor investigación sobre la expresión y regulación de las mucinas en estados normales y patológicos, con el objetivo de formular y diseñar a futuro estrategias clínicas que ayuden a prevenir y rectificar cualquier alteración en la secreción del endometrio.

En hembras, particularmente en las yeguas en la que el trofoblasto no es invasivo, las secreciones endometriales desempeñan un papel importante en la concepción y mantenimiento del embrión. A lo largo de todo el ciclo estral, numerosas proteínas secretoras y carbohidratos están presentes en el endometrio equino, con una mayor acumulo en la fase lútea en comparación con otras especies de mamíferos examinados hasta ahora (Hoffman *et al.*, 2003 y 2009). Los resultados

obtenidos en este estudio concuerdan con lo mencionado anteriormente, ya que la mayor cantidad de mucinas neutras teñidas con PAS, se observó en las glándulas endometriales en hembras en diestro.

Causey *et al.* (2000), menciona que el aumento en la intensidad de la tinción en la secreción de mucinas neutras durante el diestro puede estar relacionado a una menor hidratación del moco, lo que provoca mayor espesor de las secreciones, sobre todo en las glándulas del estrato profundo.

En yeguas en fase anovulatoria, las mucinas teñidas con PAS también se observaron de mayor intensidad; sin embargo, la cantidad de mucinas secretadas comparada con las yeguas en diestro y estro fue menor, tanto para el epitelio luminal como en las glándulas. Lo cual se puede relacionar a que durante ésta fase, el endometrio pasa por algún grado de atrofia fisiológica, debido a la baja concentración de estrógenos y progesterona, provocando una disminución en la actividad secretora de las células e hidratación de las secreciones, provocando de esta manera que las mucinas se aprecien de mayor intensidad.

Estudios han demostrado marcadas diferencias en la actividad secretora entre las glándulas profundas en comparación con el epitelio luminal y las glándulas superficiales (Gerstenberg *et al.*, 1999). Esto está relacionado con la habilidad del endometrio para establecer un ambiente uterino receptivo para la implantación y sobrevivencia embrionaria, ya que en las yeguas el periodo de pre implantación es particularmente largo; es por eso que las secreciones glandulares son más

abundantes y notorias en diestro (Hoffmann *et al.*, 2003). Actualmente se sabe que las hormonas esteroideas como la progesterona y los estrógenos influyen también en la regulación de la expresión de los genes que codifican para mucinas, así como en el contenido de agua, glicosilación y pH (Lagow *et al.*, 1999).

En las yeguas, la época reproductiva parece tener efectos significativos en la expresión de mucinas secretadas, ya que durante el estro la producción de mucinas ácidas en las células del epitelio luminal y en las glándulas superficiales fue significativamente mayor que las hembras en diestro y en fase anovulatoria. De acuerdo a Amaral *et al.* (1999) la producción de mucinas ácidas durante el estro puede ser un factor importante en el transporte de espermatozoides viables a través del útero hacia la papila útero tubal, así como también, puede deberse a una posible respuesta al depósito de los residuos seminales en la cavidad uterina.

Al igual que en las yeguas, en mujeres se han detectado cambios en la secreción, composición y estructura del moco durante el ciclo menstrual y en el periodo de pre implantación. Por ejemplo durante el ciclo menstrual, encontraron que existen dos tipos de moco cervical, uno de alta viscosidad que funciona como barrera eficaz (A) y el otro con una baja viscosidad (B), el cual permite la entrada del espermatozoide. La producción de moco (B) se observó que es estimulado por los estrógenos y el (A) por la progesterona. Posteriormente, se descubrieron más tipos de moco relacionado con cambios en su viscosidad, cada uno de ellos correlacionado con diferentes niveles de estrógenos. Aunado a estos resultados, también se observaron cambios en la composición y estructura de los hidratos de carbono del moco cervical, particularmente en los residuos de azúcar, que

contienen grupos sulfato y residuos de ácido siálico. Las diferencias más notables se observaron en la glicosilación de las mucinas, ya que los O-glicanos eran prácticamente idénticos en las mucinas antes y después de la ovulación, pero sustancialmente diferentes en la ovulación, ya que durante la ovulación había oligosacáridos más neutrales que ácidos (sulfatados y siliados) (Curlin y Bursac, 2013).

Cambios en la expresión de genes MUC asociados a membrana también han sido reportados durante las etapas del ciclo estral en diferentes especies, tales como ratón, rata, conejo, humano y el perro. Estudios en rata, han demostrado que MUC4 se expresa en el epitelio luminal uterino, pero no el epitelio glandular y su expresión disminuye considerablemente durante la influencia de la progesterona. Esto sugiere que la expresión de MUC 4 en la superficie luminal del endometrio, varía durante el ciclo estral y que necesita estar en cantidades mínimas o ausentes antes de la implantación del blastocisto en esta especie. En mujeres MUC1 predomina durante la fase lútea, permitiendo interacciones ligando-receptor en la superficie celular que son esenciales para la fijación del e implantación del embrión (Maischberger *et al.*, 2013).

En yeguas existe escasa información sobre la influencia de las hormonas durante el ciclo estral en la expresión de genes MUC, así como de su función en la reproducción. Maischberger *et al.* (2013) describió la presencia de 14 genes MUC que codifican para mucinas endometriales en yeguas durante el estro y diestro. Este artículo menciona que existen diferencias notorias entre individuos en el marcaje de MUC, tanto para las células del epitelio luminal como las glándulas, así

mismo se cree que estas diferencias pueden estar asociadas a diferentes factores, entre ellos se encuentra la etapa exacta del ciclo estral, la edad, número de partos o patologías uterinas, que pueden ser los responsables de estas variaciones.

## **11. Conclusión**

La secreción de mucinas endometriales incrementa significativamente en hembras con inflamación crónica y daño degenerativo que se encuentran en la categoría IIA IIB y III en base a Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992),

La expresión de mucinas ácidas es mayor en hembras con endometritis y daño degenerativo en comparación con yeguas sin daño patológico endometrial.

En fase anovulatoria la secreción de mucinas es escasa, en estro predomina las mucinas ácidas en el epitelio luminal y en diestro las mucinas neutras son más abundantes en las glándulas endometriales.



## 12. Bibliografía

1. Alameda F, Mejías-Luque R, Garrido M, De Bolós C. Mucin genes (MUC2, MUC4, MUC5AC, and MUC6) detection in normal and pathological endometrial tissues. *International Journal of Gynecologic Pathology*. 2007; 26: 61–65.
2. Allen WE, Pycock JF. Cyclical accumulation of uterine fluid in mares with lowered resistance to endometritis. *Veterinary Record*. 1988; 122: 489–490.
3. Amaral D, Chiarini GH, Vale FV, Allen WR. Changes in the endometrium detected by morphometric and histochemical techniques in relation to age and estrous cycle in thoroughbred mares. *Revista Brasileira de Reproducao Animal*. 1999; 23 (3): 197-199.
4. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2006; 1765 (2): 89-222.
5. Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2006; 11 (2): 164-170.
6. Callaghan MR, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiological reviews*. 2006; 86: 245-278.
7. Carson DD, DeSouza MM, Kardon R, Zhou X, Lagow E, Julian J. Mucin expression and function in the female reproductive tract. *Human reproduction update*. 1998; 4 (5): 459-464.
8. Carson DD, Julian J, Lessey BA, Prakobphol A, Fisher SJ. MUC1 is a scaffold for selectin ligands in the human uterus. *Frontiers in Bioscience*. 2006; 11 (4): 2903-2908.
9. Causey RC. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. *The Veterinary Journal*. 2006; 172 (3): 405-421.
10. Causey RC. Mucus and the mare: how little we know. *Theriogenology*. 2007; 68 (3): 386-394.
11. Causey RC, Ginn P, Katz B, Hall B, Anderson KJ, LeBlanc MM. Mucus production by endometrium of reproductively healthy mares and mares with delayed uterine clearance. *Journal of Reproduction and Fertility*. 2000; 56: 333-339.

12. Corfield AP. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2015; 1850 (1): 236-252.
13. Cox JF, Zavala A, Saravia F, Rivas C, Gallardo P, Alfaro V. Differences in sperm migration through cervical mucus in vitro relates to sperm colonization of the oviduct and fertilizing ability in goats. *Theriogenology*. 2002; 58 (1): 9-18.
14. Curlin M, Bursac D. Cervical mucus: from biochemical structure to clinical implications. *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)*. 2013; 1 (5): 507-515.
15. Doig P A, McKnight J D, Miller R B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Canadian Veterinary Journal*. 1981; 22 (3):72-76.
16. Evans MJ, Hamer JM, Gason LM, Graham CS, Asbury AC, Irvine CH. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. *Theriogenology*. 1986; 26: 37–50.
17. Fiala SM, Esmeraldino A , Jobim MIM, Garbade P, Wolf CA, Richter G, Gregory RM, Mattos RC. Endometrial fibrotic changes: is one biopsy enough to diagnose degenerative changes?. *Animal Reproduction Science*. 2010; 121: 89-90.
18. Freeman KP, Roszel JF, Slusher SH, Castro M. Variation in glycogen and mucins in the equine uterus related to physiologic and pathologic conditions. *Theriogenology*. 1990; 33: 799-808.
19. Gerstenberg C., Allen WR, Stewart F. Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle." *Journal Reproduction Fertility*. 1999; 116:167-175.
20. Ginter OJ. Reproductive Biology of mare: basic and applied aspects. *Equiservices cross plains*. 1992. pp. 72-75.
21. Gipson IK. Mucins of the human endocervix. *Frontiers in Bioscience*. 2001; 1 (6): 1245-1255.
22. Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, Hill JIII. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biology of Reproduction*. 1997; 56 (4):999-1011.
23. Gores-Lindholm AR, LeBlanc MM, Causey RC., Hitchborn A, Fayrer-Hosken RA., Kruger M, Ahlschwede S. Relationships between intrauterine infusion of N-acetylcysteine, equine endometrial pathology, neutrophil function, post-breeding therapy, and reproductive performance. *Theriogenology*. 2013; 80 (3):218-227.

24. Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. Developmental biology of uterine glands. *Biology of Reproduction*. 2001; 65 (5): 1311-1323.
25. Hewetson A, Chilton BS. Molecular cloning and hormone-dependent expression of rabbit Muc1 in the cervix and uterus. *Biology of reproduction*. 1997; 57 (2): 468-477.
26. Hoffmann C, Bazer FW, Klug J, Allen WR, Aupperle H, Ellenberger C, Schoon HA. Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions - preliminary results. *Pferdeheilkunde*. 2003; 19(6): 666-669.
27. Hoffmann C, Bazer FW, Klug J, Aupperle H, Ellenberger C, Oezgen S, Schoon HA. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: reaction patterns in the cycling mare. *Pferdeheilkunde*. 2009; 25 (3): 212-219.
28. Hoffmann C, Bazer FW, Klug J, Aupperle H, Ellenberger C, Schoon HA. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology*. 2009; 71: 264-274.
29. Hoffman LH, Gary EO, Carson DD, Chilton BS. Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology*. 1998; 139 (1): 266-271.
30. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of cell surface. *Nature Reviews*. 2004; 4: 45-60.
31. Hurtgen J P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology*. 2006; 66: 560-566.
32. Jiménez MMC, Trejo MH, Herrera SA, Romero IJL, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E. Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Revista de Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*. 2002; 15 (1): 39-47.
33. Katila T. Uterine defense mechanisms in the mare. *Animal Reproduction Science*. 1996; 42: 197-204.
34. Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1978; 172: 241-262.

35. Kenney RM, Doig PA. Equine endometrial biopsy. In: Morrow DA. Current Therapy in Theriogenology. Saunders 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania. 1986. pp. 723–729.
36. Lagow E, De Souza, MM, Carson DD. Mammalian reproductive tract mucins. *Human Reproduction Update*. 1999; 5 (4):280-292.
37. Liu I K M, Troedsson M H T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. *Theriogenology*. 2008; 70: 415-420.
38. LeBlanc MM. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010; 45 (2):21-27.
39. LeBlanc MM. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology*. 2008; 70 (3):421-429.
40. LeBlanc MM, Asbury AC, Lyle SK. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. *American Journal of Veterinary Research*. 1989; 50: 864–867
41. LeBlanc MM, Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009; 44 (3): 10-22.
42. Lehmann J, Ellenberger C, Hoffmann C, Bazer F W, Klug J , Allen W R, Sieme H, Schoon H A. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology*. 2011; 76: 1326–1336.
43. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Nature*. 2008; 1(3): 183-193.
44. Maischberger E, Cummins CA , Fitzpatrick E, Gallagher ME, Worrall S, Rousseau K, Thornton DJ, Meijer WG, Caso Luengo RM, Duggan VE, Carrington S D, Irwin JA, Reid CJ. The expression of mucin genes and the presence of mucin gene products in the equine endometrium. *Research in Veterinary Science*. 2013; 95: 169–175.
45. Melkus E, Witte T, Walter I, Heuwieser W, Aurich C. Investigations on the endometrial response to intrauterine administration of N-Acetylcysteine in oestrous mares. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013; 48: 591–597.
46. Mukhopadhyay P , Chakraborty S, Ponnusamy MP, Lakshmanan I, Jain M, Batra SK. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1815: 224–240.

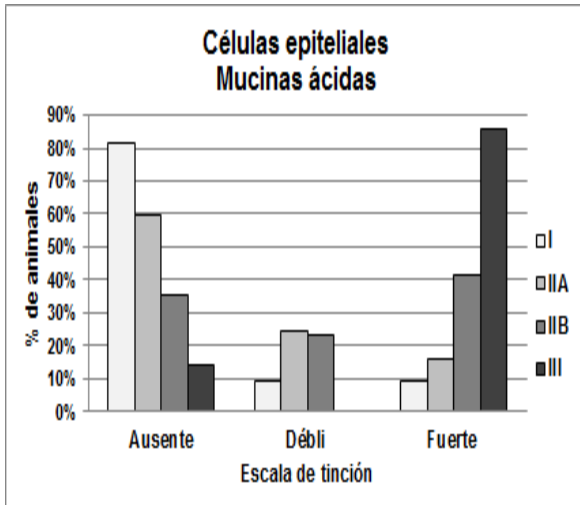
47. Nielsen JM. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*. 2005; 64: 510-8.
48. Overbeck W, Jäger K, Schoon HA, Witte T S. Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus an in vitro study. *Theriogenology*.2013; 79: 1262-1268.
49. Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*.2011; 75: 1311-8.
50. Rutllant J, López BM, López GF. Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluid and its relation to sperm motility and fertilization: a review. *Reproduction in Domestic Animals*. 2005; 40: 79–86.
51. Russo CL, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Pudney J, Anderson D, Gipson IK. Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. *Human Reproduction*. 2006; 21 (11):2783-2793.
52. Schlafer D H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques?. *Theriogenology*. 2007; 68: 413-22.
53. Schoon HA, Schoon D, Klug E. Uterusbiopsien als hilfsmittel für diagnose und prognose von fertilitätsstörungen der stute. *.Pferdeheilkunde*. 1992; 8: 355-62.
54. Sisson S, Grossman J. Sistema urogenital de los equinos. En: anatomía de los animales domésticos. Hachette Latinoamericana Tomo I 5nd ed. Ciudad de México. 1998. pp 609-610.
55. Snider TA, Sepoy C, Holyoak GR. Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*.2011; 75: 1567-1581.
56. Torres GFJ, Martínez MA, Fernández MP González RR. Metodología y técnicas de trabajo en el laboratorio de patología anatómica errores frecuentes y su solución. FESITESS Andalucía. 2011 pp 42-44.
57. Trigo FJ, Valero EG. Patología general veterinaria 4nd ed. FMVZ-UNAM México 2004. pp 325,326
58. Troedsson MHT, Liu IK, Ing M, Pascoe J, Thurmond M. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1993b; 99: 307–313.

59. Voynow JA, Gendler SJ, Rose MC. Regulation of mucin genes in chronic inflammatory airway diseases. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2006; 34: 661–665.
60. Waelchli RO, Winder NC. Distribution of histological lesions in the equine endometrium. *The Veterinary record*. 1989; 124 (11): 271-3.
61. Watson ED, Aubrey ES , Zanecosky H G, Sertich P L. Isolation and culture of glandular epithelial and stromal cells from the endometrium of mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1992; 95: 269-275.
62. Witte TS, Melkus E, Walter I, Senge B, Schwab S , Aurich C, Heuwieser W. Effects of oral treatment with N-acetylcysteine on the viscosity of intrauterine mucus and endometrial function in estrous mares. *Theriogenology*. 2012; 78: 1199-1208.
63. <http://www.leicabiosystems.com/es/tinciones-de-rutina-y-especiales/>

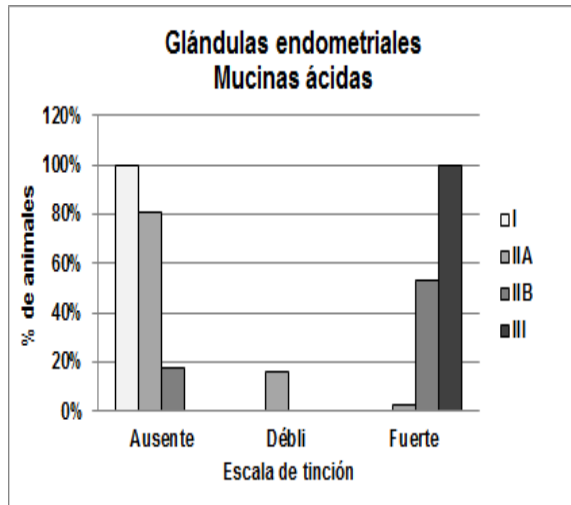
## Anexo 1.

Distribución de mucinas endometriales en base a la clasificación Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992).

**Gráfica 1.**

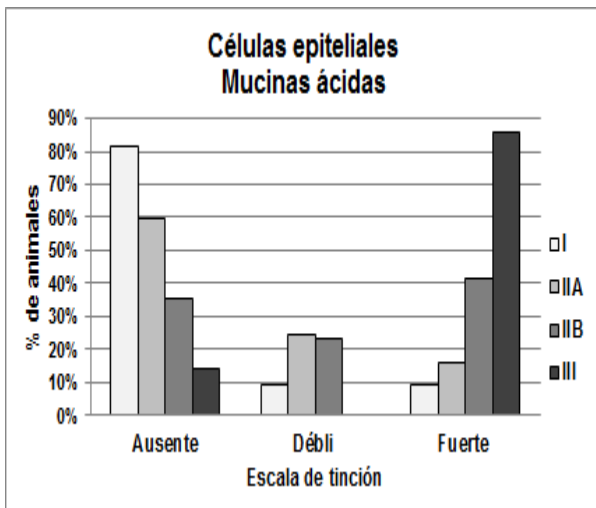


**Gráfica 2.**

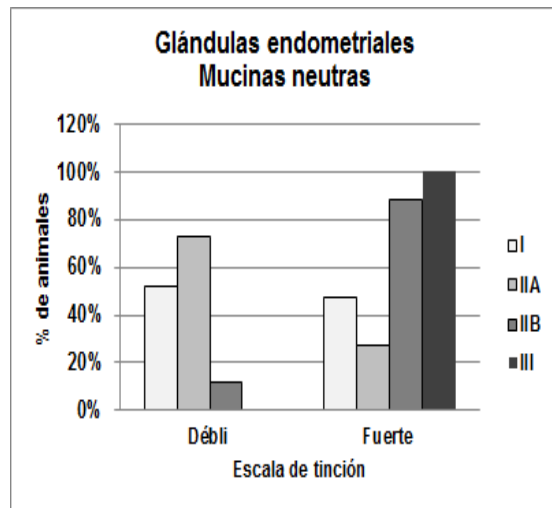


**Gráfica 1 y 2.** Porcentaje de yeguas que presentaron mucinas ácidas en el epitelio luminal y glandular en base a la clasificación de Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992) ( $p < 0.05$ ).

**Gráfica 3.**



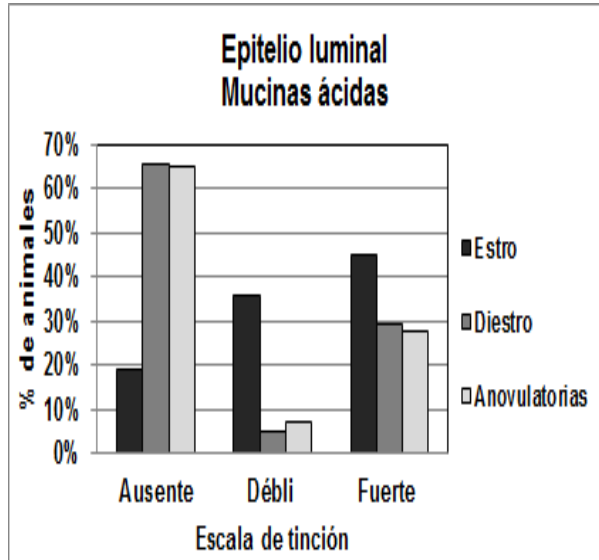
**Gráfica 4.**



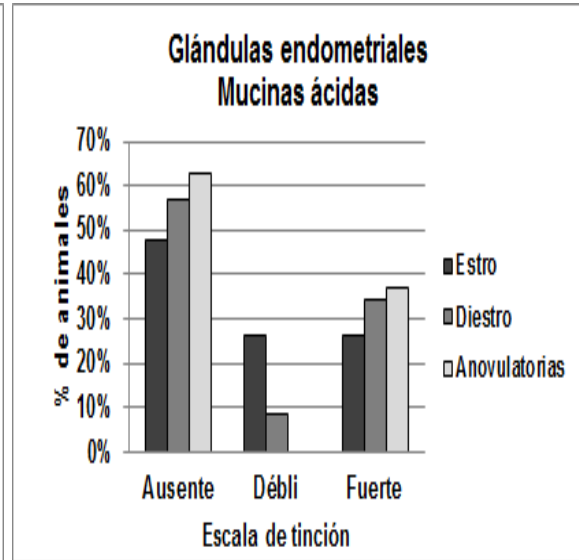
**Gráfica 3 y 4.** Porcentaje de yeguas que presentaron mucinas neutras en el epitelio luminal y glandular en base a la clasificación de Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992) ( $p < 0.05$ ).

Distribución de mucinas durante el ciclo estral y fase anovulatoria

**Gráfica 5.**

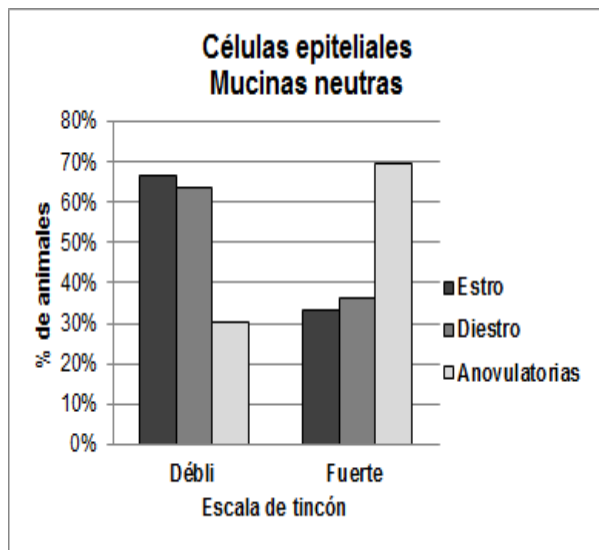


**Gráfica 6.**

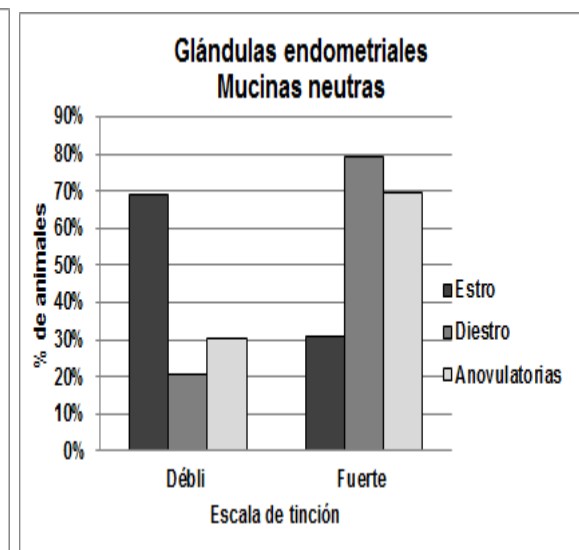


**Gráfica 5 y 6.** Porcentaje de hembras que presentaron mucinas ácidas en el epitelio luminal y glandular durante el estro, diestro y fase anovulatoria ( $p < 0.05$ )

**Gráfica 7.**



**Gráfica 8.**



**Figura 14.** Porcentaje de hembras que presentaron mucinas neutras en el epitelio luminal y glandular durante el estro, diestro y fase anovulatoria ( $p < 0.05$ )



## Anexo 2. Formato de tinciones

No de yegua: \_\_\_\_

Etapas: Estro \_\_\_\_ Diestro: \_\_\_\_ Anovulatoria: \_\_\_\_

Estrato luminal

AA	Cuerno izquierdo	Bifurcación	Cuerno derecho
Ausente			
Escasa o débil			
Fuerte			

PAS	Cuerno izquierdo	Bifurcación	Cuerno derecho
Ausente			
Escasa o débil			
Fuerte			

Estrato esponjoso

Azul Alcían	Cuerno izquierdo	Bifurcación	Cuerno derecho
Ausente			
Escasa o débil			
Fuerte			

Ácido peryódico de Schiff	Cuerno izquierdo	Bifurcación	Cuerno derecho
Ausente			
Escasa o débil			
Fuerte			

**Formato de evaluación clasificación Kenney Doig (1986) modificada por Schoon (1992)**

**No de yegua: \_\_\_\_**

**Diagnóstico clasificación Cuerno izquierdo: \_\_\_\_ Bifurcación: \_\_\_\_ Cuerno derecho: \_\_\_\_**

**Eta: Estro \_\_\_\_ Diestro: \_\_\_\_ Anovulatoria: \_\_\_\_**

**Estrato luminal**

	cuerno izquierdo	bifurcación	cuerno derecho
No de capas celulares			
Hiperplasia			
Metaplasia			
Eosinófilos			
Neutófilos			
Macrófagos			
Linfocitos			
Mastocitos			
Plasmocitos			

**Estrato compacto**

	cuerno izquierdo	bifurcación	cuerno derecho
Eosinófilos			
Neutófilos			
Macrófagos			
Linfocitos			
Mastocitos			
Plasmocitos			

**Estrato esponjoso**

	cuerno izquierdo	bifurcación	cuerno derecho
Eosinófilos			
Neutófilos			
Macrófagos			
Linfocitos			
Mastocitos			
Plasmocitos			

### Estrato compacto y esponjoso

	cuerno izquierdo	bifurcación	cuerno derecho
Edema			
Hemosiderosis			
Fibrosis			
Hemorragias			

### Vasos sanguíneos y linfáticos

	cuerno izquierdo	bifurcación	cuerno derecho
Fibrosis			
Angioesclerosis			
Vasculitis			
Perivasculitis			
Linfangiectasia			
Lagunas linfáticas			

### Glándulas

	cuerno izquierdo	bifurcación	cuerno der
Densidad			
Endometrosis			
Nidos			
Atrofia			

### Grados de severidad de las lesiones

Ausente	-
Leve	+
Moderado	++
Severo	+++

### Distribución de las lesiones

Focal	F
Multifocal	M
Difuso	D
Zonalmente extensivo	Ze

### Datos de hembras

No	edad	E ciclo	Clasificación	mucina	mucina	mucina	mucina
				glándulas	glándulas	epitelio	epitelio
				AA	PAS	AA	PAS
1	18	2	3	2	2	2	2
2	16	1	3	2	2	2	2
3	8	1	2a	1	1	1	1
4	6	1	2a	0	1	1	1
5	12	1	2b	1	2	1	2
6	12	1	2b	1	1	2	2
7	5	1	2a	0	1	1	1
8	8	2	2a	0	1	0	1
9	5	1	1	0	1	1	1
10	6	2	1	0	2	0	1
11	10	1	2b	2	2	2	2
12	15	2	2b	1	2	2	2
13	9	2	2b	1	2	1	1
14	4	2	1	0	2	0	1
15	5	2	1	0	2	0	1
16	17	2	3	2	2	2	2
17	10	2	2b	2	2	1	1
18	5	2	2a	0	1	0	1
19	10	2	2b	1	2	2	1
20	9	1	1	0	1	0	1
21	8	1	2a	0	1	1	1
22	18	1	3	2	2	2	1
23	7	1	2a	0	1	1	1
24	10	1	2b	1	2	2	2
25	5	1	1	0	1	1	1
26	6	1	2a	0	1	1	1
27	8	1	2a	1	1	1	1
28	13	2	3	2	2	2	2
29	3	1	1	0	1	0	1
30	3	2	1	0	1	0	1
31	6	2	2a	0	1	0	1
32	9	2	1	0	2	0	1
33	8	2	2a	0	1	0	1
34	5	2	1	0	2	0	1
35	7	2	1	0	1	0	1
36	10	2	2b	1	2	0	1
37	5	1	1	0	1	0	1

38	11	2	2b	2	2	0	1
39	15	2	3	2	2	2	2
40	15	2	2b	2	2	2	1
41	9	2	2b	2	2	0	2
42	8	2	2a	0	2	0	1
43	5	1	2a	1	1	2	1
44	9	1	2a	0	1	2	1
45	3	1	1	0	1	2	1
46	5	2	1	0	1	0	1
47	4	2	1	0	1	0	1
48	12	2	3	2	2	2	2
49	11	2	2b	2	2	2	2
50	9	2	2a	0	1	0	1
51	5	3	1	0	2	0	2
52	8	3	1	0	2	0	2
53	15	3	2b	0	2	1	2
54	18	3	3	2	2	0	2
55	9	3	2a	0	1	0	1
56	6	3	1	0	2	0	2
57	3	3	1	0	1	0	1
58	8	3	2a	0	1	0	1
59	15	3	3	2	2	2	2
60	9	3	1	0	2	0	2
61	10	3	2a	0	2	0	2
62	6	3	1	0	2	0	2
63	15	3	2b	2	2	0	2
64	10	3	2b	2	2	0	2
65	7	3	2a	0	2	0	2
66	3	3	1	0	2	0	2
67	3	3	1	0	2	0	2
68	18	3	3	2	2	2	2
69	18	3	3	2	2	2	2
70	15	3	3	2	2	2	2
71	12	3	2b	0	1	0	1
72	9	3	2a	0	1	0	1
73	8	3	2a	0	1	0	1
74	4	3	2a	0	2	0	1
75	9	3	2a	0	1	0	1
76	15	3	2b	0	2	2	2
77	12	1	2b	2	2	0	2
78	6	1	1	0	1	1	1

79	10	2	2a	0	2	0	1
80	8	2	2a	0	2	0	1
81	15	1	3	2	2	2	2
82	12	1	2b	1	1	0	1
83	8	1	2a	1	1	1	1
84	5	1	1	0	1	1	1
85	10	1	2a	1	1	1	2
86	7	2	1	0	2	0	1
87	11	1	2b	2	2	0	2
88	4	2	1	0	2	0	1
89	5	1	1	0	1	2	1
90	4	1	2a	2	1	2	1
91	17	2	2b	2	2	2	2
92	12	2	2b	2	2	0	1
93	18	2	2b	1	2	2	1
94	3	2	1	0	2	0	1
95	4	2	1	0	2	0	2
96	4	2	1	0	2	0	1
97	9	1	2a	0	1	0	1
98	8	2	1	0	1	0	1
99	3	2	1	0	2	0	1
100	9	2	2a	0	1	2	1
101	3	1	1	0	1	0	1
102	8	2	1	0	2	0	2
103	5	1	2a	0	1	2	1
104	5	2	1	0	2	0	2
105	9	2	2a	0	2	0	1
106	10	2	2a	0	2	0	2
107	12	2	2b	2	2	0	2
108	7	2	2a	0	2	0	1
109	18	2	3	2	2	2	2
110	9	1	2a	1	1	2	2
111	18	2	2b	2	2	2	2
112	3	1	1	0	1	2	1
113	5	1	1	0	1	2	1
114	4	2	1	0	2	0	1
115	5	2	1	0	1	0	2
116	12	2	2b	2	2	2	2
117	15	2	3	2	2	0	2
118	22	2	3	2	2	2	2
119	18	1	3	2	2	2	2

120	18	2	3	2	2	0	2
121	11	1	2b	2	2	2	2
122	10	2	2b	2	2	2	1
123	7	3	1	0	1	0	1
124	3	3	1	0	1	0	1
125	7	3	2a	0	1	0	2
126	3	3	1	0	1	0	2
127	10	3	2b	2	2	0	2
128	10	3	2a	0	2	0	1
129	18	3	3	2	2	2	2
130	10	3	3	2	2	2	2
131	3	3	1	0	1	0	1
132	12	2	2b	0	2	1	1
133	20	3	3	2	2	0	2
134	16	1	3	2	2	2	2
135	18	1	3	2	2	2	1
136	18	1	2b	1	2	1	2
137	18	3	3	2	2	2	2
138	18	3	2b	0	1	1	1
139	18	3	3	2	2	2	2
140	8	3	2b	0	2	1	2
141	8	3	3	2	2	2	2
142	8	3	3	2	2	2	2
143	14	3	3	2	2	2	2