



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud
Animal**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Nivel de la alfa-fetoproteína y expresión de los mRNAs-21 y -374 en yeguas con gestaciones normales y placentitis

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS**

PRESENTA

EUROPA MEZA SERRANO

Ana Myriam Boeta Acosta (Departamento de reproducción animal, FMVZ-UNAM)

Héctor Flores Herrera (Departamento de inmunobioquímica, INPER)

Rogelio Alonso Morales (Laboratorio de genética molecular, FMVZ-UNAM)

Ciudad de México, Junio, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A papá y mamá

Papá extraño tu voz y consejos, puedes estar tranquilo de que me voy a convertir en la persona que a tí te hubiera gustado que me convirtiera. No se vuelve más fácil, pero me voy a acostumbrar, porque te llevo en el corazón y en mis pensamientos.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Departamento de Reproducción, el Laboratorio de Genética Molecular, el Laboratorio de Posgrado y el Departamento de Patología de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como por el Departamento de Inmunoquímica del Instituto Nacional de Perinatología. Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT IN-226816.

A Amanda Gayosso y Pablo Pintor Ríos (Departamento de Genética Molecular FMVZ-UNAM), por el apoyo teórico y práctico brindado en el laboratorio para realizar este trabajo de investigación. Al Dr. Luis Zarco por la ayuda con el análisis estadístico de los datos presentados.

Le agradezco la Dra. Myriam Boeta y al Dr. Sergio Hayen por los conocimientos y apoyo que siempre me han brindado durante mi formación como médico veterinario. A mis amigos y compañeros de mi querida facultad que durante este tiempo me dieron consejos, risas y regaños.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar si la α -feto proteína equina (eqAFP) y los miRNAs-21 y -374 pueden ser referidos como marcadores diagnósticos de placentitis en yeguas. La placentitis es la principal patología placentaria inducida por infección y/o daño tisular. Su origen multifactorial implica una red compleja de moléculas mediadoras pro y anti-inflamatorias, que incluyen a los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes que regulan vías de señalización para controlar, prevenir o aumentar las respuestas inflamatorias. El miR-21 se ha estudiado en la mayoría de los tejidos, donde modula la expresión de citocinas como IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-10 con el fin de regular la respuesta inflamatoria. El miR-374 se ha estudiado en procesos inflamatorios en los que se ha identificado como regulador de IL17A, CCL2, STEAP2 y EN1. Recientemente se han descrito funciones adicionales para ambos miRNAs en enfermedades cardiovasculares, inmunológicas y del desarrollo en humanos, así como en condiciones que cursan con hipoxia. Sin embargo, se desconoce si estos miRNAs están involucrados en la placentitis. Por otra parte, un marcador común de patologías gestacionales en mujeres es la α -feto proteína, la cual ha sido poco estudiada en gestaciones equinas. En el presente trabajo se utilizaron yeguas Pura Sangre Ingles, multíparas, de 6 a 18 años de edad. La edad gestacional se determinó utilizando el día de la ovulación como día 0. Se recolectaron muestras de sangre a los 8 y 10 meses de gestación para medir por ELISA la concentración de eqAFP y por PCR en tiempo real (qPCR) la expresión de los miRNAs. Inmediatamente después del parto se recolectaron muestras de la membrana corioalantoidea. Los casos se clasificaron como normales o positivos a placentitis según la evaluación microscópica y macroscópica de las placentas, el seguimiento de la gestación y el parto. La expresión de los miRNAs en tejido también se midió mediante qPCR. Los resultados permiten concluir que 1) Los niveles de la eqAFP aumentaron de forma significativa por lo menos 60 días antes de que se muestren signos de placentitis ($P < 0.05$). 2) El miRNA-374 se reguló significativamente

hacia abajo en la membrana corioalantoidea de muestras positivas para placentitis en comparación con tejido sano ($P < 0.05$). 3) Ambos miRNAs estaban presentes en sangre, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre yeguas sanas y yeguas positivas a placentitis.

Se concluye que una alta concentración de alfa-fetoproteína y la regulación a la baja de miR-374 pueden ser biomarcadores importantes del establecimiento de un proceso de placentitis en yeguas que afecte la viabilidad de los potros. Sin embargo, es necesario un análisis puntual del comportamiento de ambos marcadores durante la gestación para comprender completamente su papel durante la placentitis.

Palabras clave: miRNA, α -feto proteína, qPCR, membrana corioalantoidea, placentitis.

CONTENIDO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

1.INTRODUCCIÓN.....	9
1.1JUSTIFICACIÓN.....	11
1.2 HIPÓTESIS.....	11
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	11
1.4 OBJETIVOS PARTICULARES.....	12
2. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 GESTACIÓN EQUINA.....	12
2.1.1 PLACENTA.....	13
2.2 PATOLOGIAS PLACENTARIAS	
2.2.1 PLACENTITIS.....	15
2.2.1 INFLAMACIÓN.....	17
3. BIOMARCADORES.....	21
3.1 ALFA FETO PROTEÍNA (AFP).....	21
3.1.1 IMPORTANCIA DE AFP EN EL BIENESTAR FETAL.....	23
3.1.2 ALFA FETO PROTEÍNA EQUINA (eqAFP).....	24
3.2 ÁCIDOS NUCLEICOS.....	26
3.2.1 ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA).....	26
3.2.2 microRNAs (miRNAs).....	27
3.2.3 microRNAs Y LA GESTACIÓN.....	29
3.2.4 miRNA-21.....	31
3.2.5 miRNA-374.....	32
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1 ANIMALES.....	33
4.2 SEGUIMIENTO DE LA GESTACIÓN (240 DÍAS-PARTO).....	34

4.3 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE Y PLACENTA.....	34
4.4 HISTOPATOLOGÍA DE LA PLACENTA.....	35
4.5 CUANTIFICACIÓN DE eqAFP CON ELISA.....	36
4.6 EXPRESIÓN DE LOS miRNAs (qPCR).....	37
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
5. RESULTADOS	
5.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS YEGUAS Y DE LOS POTROS DE ESTUDIO...40	40
5.2 EVALUACIÓN DE LA PLACENTA.....	41
5.3 CONCENTRACIÓN DE eqAFP.....	44
5.4 EXPRESIÓN DEL miRNA-21 EN PLASMA.....	45
5.5 EXPRESIÓN DEL miRNA-374 EN PLASMA.....	46
5.6 EXPRESIÓN DE LOS miRNAs EN PLACENTA.....	46
5.6.1 miRNA-21.....	47
5.6.2 miRNA-374.....	48
5.7 EXPRESIÓN DE LOS miRNAs EN PLACENTA Y LA VIABILIDAD DEL POTRO.....	49
5.8.1 miRNA-21.....	44
5.8.2 miRNA-374.....	45
6. DISCUSIÓN.....	46
7.CONCLUSIÓN.....	50
8.REFERENCIAS.....	50

INDICE DE IMAGENES

Imagen 1. Fisiopatología de la placentitis.....	17
Imagen 2. Eventos vasculares y celulares involucrados en el proceso inflamatorio.....	20
Imagen 3. Ácidos nucleicos.....	27
Imagen 4. Biogénesis de los miRNAs.....	29
Imagen 5. Posible mecanismo inflamatorio mediado por miRNAs en células del trofoblasto.....	30
Imagen 6. Regulación celular por microRNAs en el proceso infamatorio.....	28

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia específica de los primers para la reacción de retro-transcripción (RT).....	38
Cuadro 2. Secuencia específica de los primers para la reacción de qPCR y genes normalizadores ACTB y GAPDH.....	38
Cuadro 3. Características de la población de estudio.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografías representativas de cambios macroscópicos observados en la placenta de yeguas sanas y yeguas con placentitis.....	42
Figura 2. Concentración de alfa-feto proteína a los 240 y 320 días de gestación en yeguas con y sin placentitis.....	44
Figura 3. Relación entre la viabilidad del potro al parto y la concentración de alfa-feto proteína a los 240 y 320 días de gestación en yeguas con y sin placentitis.....	45
Figura 4. Perfil de expresión del miRNA-21 en plasma de yeguas control y en las yeguas con placentitis.....	45
Figura 5. Perfil de expresión del miRNA-374 en plasma de yeguas con y sin placentitis.....	46
Figura 6. Histopatología del tejido sano y con lesión de las placentas de yeguas control y placentitis.....	47
Figura 7. Perfil de expresión del miR-21 de los tejidos al parto en los grupos de yeguas control y placentitis.....	48
Figura 8. Perfil de expresión del miR-374 en los tejidos al parto de los grupos de yeguas control y placentitis.....	49
Figura 9. Histopatología de la placenta. Imágenes representativas de tejido sano o con lesión de la placenta de yeguas con placentitis que tuvieron potros sanos o sépticos vivos o muertos.....	50
Figura 10. Perfil de expresión del miR-21 en áreas de tejido placentario sano o con lesión de yeguas con placentitis que parieron potros sanos vivos, sépticos vivos o muertos.....	51
Figura 11. Perfil de expresión del miR-374 en los tejidos Fig. 5A-F de yeguas con placentitis que parieron potros sanos vivos, sépticos vivos o muertos.....	52

1.INTRODUCCIÓN

La placentitis es la principal patología placentaria en yeguas, causando del 9.8 al 33.5% de los abortos, muertes fetales y neonatales, así como pérdidas económicas a la producción equina.(Carrick, 2010; Coutinho da Silva, Canisso, MacPherson, Johnson, & Divers, 2013; Cummins, Carrington, Fitzpatrick, & Duggan, 2008; Lyle, 2014). En México se reporta una incidencia de entre 5 y 10%. Esta condición es causada principalmente por infecciones bacterianas, incluyendo a *Streptococcus equi sub. Zooepidemicus* (53%), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Leptospira spp.*, y *Nocardiformes* (*Crossiella equi*, *Amycolatopsis spp.*) (Hong et al., 1993; Lyle, 2014).Las yeguas con placentitis desarrollan en forma prematura la ubre (antes de los 10 meses de gestación), tienen descargas vaginales, y son propensas a sufrir aborto recurrente y parto prolongado, con el nacimiento sin vida del neonato.

A pesar de la alta prevalencia y severidad de la placentitis, su diagnóstico es limitado. La prueba más comúnmente utilizada es la medición del grosor combinado útero-placentario (CGUTP), sin embargo, la sensibilidad y especificidad de la técnica se reducen a la evaluación del área cervical (Morris et al., 2007). También se han descrito los niveles de relaxina y de metabolitos placentarios de hormonas esteroides, que han demostrado ser útiles para la detección de yeguas con gestación de alto riesgo (Ryan et al., 2009). Sin embargo, la falta de un ensayo sensible y disponible comercialmente para su uso en equinos limita su utilidad (Morris et al., 2007; Ousey, Houghton, Grainger, Rossdale, & Fowden, 2005; Shikichi et al., 2017).

Los microRNA (miRNAs) son moléculas pequeñas de RNA que recientemente han cobrado importancia como reguladores clave de los receptores del sistema inmune tipo Toll (TLRs), que son los encargados de detectar y señalar la presencia de patógenos o daño tisular para desencadenar una respuesta inflamatoria. Además, los miRNAs regulan la diferenciación y activación de moléculas mediadores pro y anti-inflamatorias, principalmente en macrófagos, células cebadas, neutrófilos y citocinas (Kim, Han, & Siomi, 2009; Luke A. O'Neill, Sheedy, & McCoy, 2011; Tahamtan,

Teymoori-Rad, Nakstad, & Salimi, 2018). En mujeres gestantes se han identificado miRNAs que se expresan diferencialmente durante complicaciones relacionadas con el embarazo; entre los que se encuentran el miR-21 y el miR-374. Entre las condiciones más importantes que se han relacionado con la expresión de estos miRNAs se puede mencionar la corioamnionitis, la pérdida recurrente del embarazo, la restricción del crecimiento intrauterino, la asfixia perinatal y la encefalopatía hipóxica-isquémica (HIE), lo que indicaría su posible papel en la patogénesis de estas condiciones (Cai, Kolluru, & Ahmed, 2017; Kamity, Sharma, & Hanna, 2019; Looney et al., 2015; Mouillet, Ouyang, Coyne, & Sadovsky, 2015). Sin embargo, se desconoce si los miRNA 21 y 374 están involucrados en la placentitis.

Por otra parte, la alfa fetoproteína (AFP) es una glicoproteína producida en el saco vitelino, intestino e hígado fetal, que puede ser detectada en la circulación fetal y materna (Mizejewski, 2004). Durante el desarrollo embrionario y fetal, la AFP es capaz de modular, restringir o regular varios estadios diferentes de inflamación y crecimiento no deseado durante la histogénesis y organogénesis. Por lo tanto, se ha reportado como una proteína de fase aguda positiva y negativa, dependiendo del periodo ontogénico en el que se exprese. En el segundo trimestre del embarazo en mujeres, la combinación de niveles elevados de AFP y de la Molécula de Adhesión Intracelular-1 (ICAM-1), un marcador conocido de inflamación aguda, se correlacionó con el retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), prematuridad, condiciones como hemorragia fetal-materna, vilitis crónica, isquemia, trombosis de intervalosidades y corioamnionitis (Mizejewski, 2015).

En 2015, Canisso y Vincze demostraron la presencia de la α -fetoproteína equina (eqAFP) en yeguas con placentitis, en las que se observó un aumento significativo; refiriendo que esta proteína producida por el feto puede ser detectada en la circulación materna y en los fluidos fetales, por lo que podría ser un potencial marcador de referencia de bienestar en la gestación.

A pesar de la probable alteración de los niveles de miRNAs y α -feto proteína equina durante la placentitis, muy pocos estudios han analizado su expresión o función en yeguas gestantes (Canisso et al., 2015; Loux et al., 2019; Loux et al., 2017; Vincze et al., 2018). Por lo que el objetivo del presente es evaluar la expresión de los miRNAs-21 y -374 en placentas normales y con placentitis, así como evaluar el efecto de la placentitis en los niveles de estos miRNAs y de alfa-feto proteína equina.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Existe la necesidad de comprender mejor la fisiopatología de los problemas placentarios que ocurren en el último tercio de la gestación en yeguas debido a que en algunos países llega a haber hasta un 30% de mortalidad fetal y neonatal en la temporada reproductiva, así como grandes pérdidas económicas por el tratamiento de potros sépticos y por la baja en su rendimiento deportivo.

Por esta razón, este estudio propone identificar marcadores moleculares de bienestar fetal y de procesos inflamatorios, que además puedan detectarse de manera poco invasiva y temprana para contribuir a la identificación de gestaciones en riesgo e implementar terapias preventivas de la muerte fetal o neonatal.

1.2 HIPÓTESIS

La placentitis se asocia con alteraciones en la concentración de eqAFP, y expresión de los miRNAs-21 y -374 en la sangre materna durante el último tercio de la gestación equina, así como con alteraciones en la expresión de miRNA-21 y 374 en las placentas al parto. Este tipo de alteraciones podrán ser usadas como marcadores para evaluar el riesgo durante la gestación equina o complementar diagnósticos clínicos de patologías placentarias.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las posibles relaciones entre la presencia de placentitis durante la gestación y las concentraciones de eqAFP, miRNA-21 y miRNA-374 en sangre materna, así

como en relación a la expresión de miRNA-21 y miRNA-374 en la placenta recién expulsada al parto. Adicionalmente, evaluar si existe relación entre estas variables y la viabilidad del potro neonato.

1.4 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Identificar gestaciones en riesgo en una población de yeguas con historia reproductiva conocida.
- b) Determinar en suero, la concentración de eqAFP de las yeguas con signos de placentitis y yeguas con gestaciones normales.
- c) Determinar en plasma y placenta, la expresión de los miRNAs-21,-374, en yeguas gestantes con signos de placentitis y yeguas que presenten gestaciones normales.
- d) Evaluar la posible relación entre las variables descritas en los incisos anteriores y la viabilidad de los potros las primeras 24hrs de nacidos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GESTACIÓN EQUINA

La gestación en las yeguas tiene una duración promedio de 335 ± 15 días. Durante el primer tercio las estructuras encargadas de mantener el bienestar del feto son los cuerpos lúteos (CL's) y las copas endometriales, que ayudan a la manutención de concentraciones elevadas de progesterona (P₄). (Boeta, 2018).

Las copas endometriales son estructuras especializadas de origen embrionario que se forman a partir de células coriónicas que invaden el endometrio materno. Su función consiste en secretar la gonadotropina coriónica equina (eCG), hormona que contribuye a la ovulación o luteinización de los folículos que se desarrollan después de los 35 días de gestación, favoreciendo la formación de CL's suplementarios para mantener la secreción de P₄ hasta los 120 a 150 días de gestación. (Antczak, de Mestre, Wilsher, & Allen, 2013). A partir de ese momento la placenta es capaz de

producir suficientes metabolitos de P₄ y pregnenolona (P₅) para el mantenimiento de la gestación y el desarrollo fetal hasta el día de parto.(Boeta, 2018; Ousey et al., 2005).

2.1.1 PLACENTA

La placenta es el órgano multifuncional que sirve como intermediario entre la madre y el feto para el intercambio de nutrientes, gases y desechos. También actúa como barrera física contra agentes patógenos y para evitar el rechazo del feto por el sistema inmune de la madre (Roa, Smok, & Prieto, 2012). Es además un órgano endocrino que, en diferentes especies, sintetiza una amplia variedad de hormonas, incluyendo hormonas glicoproteicas, como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la gonadotropina coriónica equina (eCG); esteroides como la progesterona (P₄), metabolitos de pregnenolona (P₅) y metabolitos de progesterona (5 α -pregnanos); hormonas proteicas como la relaxina (RLN) y los lactógenos placentarios. En la placenta también se producen sustancias mediadoras del sistema inmune, como citocinas, factor de necrosis tumoral (TNF α), interferones (INT γ), interleucinas (IL-6, IL-12), así como factores de crecimiento (epidermal, de los hepatocitos, parecido a la insulina tipo II (IGF-II). En conjunto, las hormonas producidas en la placenta son esenciales para el desarrollo embrionario y fetal, así como para el desarrollo de un parto normal. (Conley, 2016).

La placenta equina se clasifica como epiteliocorial difusa y microcotiledonaria. Los microcotiledones se encargan del intercambio histotrófico, hemotrófico y de desechos. Estas estructuras están formadas por interdigitaciones de tejido fetal, conocidas como microvellosidades, que se distribuyen de manera uniforme en la superficie corioalantoidea. Las microvellosidades se adhieren al tejido endometrial y conforme avanza la gestación van aumentando su superficie y profundidad a partir de los 40 días de la gestación, llegando a ocupar toda la superficie uterina aproximadamente en el día 80 de la gestación, excepto en las áreas donde se desarrollan las copas endometriales que se distribuyen alrededor del cinturón coriónico del feto desde su formación alrededor del día 40 hasta su desaparición entre el día 120 y 150 de la gestación .

Las interdigitaciones continúan desarrollándose y aumentando sus ramificaciones y profundidad, formando las estructuras, llamadas microcotiledones, que constituyen las unidades funcionales de la membrana corioalantoidea (Wilsher, 2005). La placenta equina es de tipo epitelio-corial, por lo que se conservan intactas las tres capas de tejido materno (vasos sanguíneos, tejido conjuntivo, epitelio endometrial) y las tres de los tejidos fetales (epitelio coriónico, tejido conjuntivo, vasos sanguíneos). Como en todas las placentas, la sangre materna y la fetal nunca se mezclan, pero hay transferencia de gases, agua y algunas sustancias de una circulación a la otra. Las placentas epitelio-coriales son las más impermeables, y no permiten intercambio de sustancias grandes como las inmunoglobulinas y otras proteínas entre la circulación materna y la fetal. (Medrano, 2018).

Cada microcotiledón es irrigado por una arteriola en el lado materno y una arteriola en el lado fetal, para maximizar el intercambio hemotrófico. Además, las glándulas endometriales permanecen funcionales durante toda la gestación, liberando sus secreciones exocrinas ricas en proteínas hacia espacios bien definidos entre los microcotiledones denominados "areolas". Las células trofoblásticas que recubren las aberturas de las glándulas se vuelven pseudoestratificadas y parecen estar especialmente adaptados para absorber el histotrofo secretado por las glándulas endometriales (Wilsher, 2005)

La integridad y el desarrollo normal de la placenta es vital para el bienestar del feto. Se ha reportado que el peso del potro está relacionado con la superficie corioalantoides y con el peso de la placenta, el cual no debe ser menor al 11% en relación al peso fetal (Morresey, 2005). Al respecto, se han realizado estudios sobre la proporción de la superficie coriónica con desarrollo de microcotiledones, encontrándose que las yeguas primíparas de seis años o menos de edad y las yeguas viejas de 16 años o más presentan menos superficie con desarrollo de microcotiledones que las yeguas multíparas de entre 5 y 15 años de edad (Allen, Wilsher, Stewart, Ousey, & Fowden, 2002).

2.2 PATOLOGÍAS PLACENTARIAS

2.2.1 PLACENTITIS

La principal causa de placentitis (90% de los casos) en la yegua es una infección ascendente que ingresa al útero a través del cérvix. Esta es también la causa más común de pérdidas fetales en el último tercio de gestación. Los patógenos más comúnmente aislados de infecciones placentarias son: *Streptococcus zooepidemicus* y *Escherichia coli* (Macpherson & Bailey, 2008). Muchas yeguas con placentitis solo presentan signos clínicos una vez que la patología ha avanzado y se encuentra bien establecida. Muchos casos de placentitis responden al tratamiento, sin embargo, no siempre es posible un tratamiento efectivo debido a la inhabilidad para diagnosticar la condición tempranamente. Típicamente las yeguas que sufren placentitis son mayores de 12 años y tienen una mala conformación perineal (Macpherson & Bailey, 2008).(Imagen 1.).

Los signos clínicos de placentitis incluyen la descarga vulvar, desarrollo de la glándula mamaria, lactación prematura y relajación cervical. Aquellas yeguas que presentan signos clínicos en gestaciones avanzadas deben ser sometidas a un examen clínico completo, que incluya el examen de la glándula mamaria y la evaluación de la vagina y el cérvix mediante un vaginoscopio. También debe realizarse una ultrasonografía transrectal y transabdominal para evaluar el grosor combinado útero-placentario (GCUP). Adicionalmente se debe evaluar la actividad fetal, la frecuencia cardiaca del feto, las características del fluido fetal y realizar mediciones de la órbita fetal (Cummins et al., 2008).

La vaginoscopia de las yeguas con descarga vaginal purulenta a menudo revela que el exudado se origina en el cérvix; esto también permite hacer un hisopado de esta área para determinar el o los agentes etiológicos presentes, así como su patrón de sensibilidad. Entre las pruebas adicionales que pueden realizarse está medir las concentraciones de estrógenos y progestinas para evaluar la función de la unidad feto placentaria, y medir los electrolitos en la secreción de la glándula mamaria para predecir la cercanía al parto (Pasquel & Daba, 2011; Shikichi et al., 2017).

Una vez que se ha establecido la infección en la placenta, la intensidad de la respuesta inflamatoria es crítica para su desarrollo. Se produce una activación de la cascada inflamatoria en la placenta, principalmente a través de macrófagos residentes, con síntesis de una variedad de citocinas y prostaglandinas. Estos mediadores inflamatorios afectan el metabolismo fetal, dando como resultado un estrés fetal significativo, la inducción de un síndrome de respuesta inflamatoria fetal y la estimulación de mayor contractilidad del miometrio. La infección placentaria puede controlarse mediante el uso de antibióticos; sin embargo, el feto con frecuencia permanece gravemente comprometido debido a la respuesta inflamatoria. Por esta razón es muy importante identificar oportunamente el problema y monitorearlo adecuadamente para permitir una intervención temprana en yeguas con gestaciones de alto riesgo.(Macpherson & Bailey, 2008).

Sin embargo, existen diversas limitantes para realizar un diagnóstico oportuno y adecuado de una patología placentaria, ya que no todas las yeguas presentan signos clínicos que evidencien un proceso patológico. La ultrasonografía para evaluar tanto al feto como el CGUP es una técnica que lleva tiempo y requiere de paciencia, experiencia y conocimiento de los parámetros normales, siendo necesario realizar repetidas evaluaciones. Por otra parte, no existen kits comerciales disponibles con la sensibilidad y especificidad adecuadas para determinar las concentraciones de las progestinas y estrógenos característicos de la gestación en las yeguas (Coutinho da Silva et al., 2013; Ousey, 2006).

La placentitis es la principal causa de sepsis y del síndrome de asfixia perinatal (PAS) en potros neonatos. Representa la mayor causa de morbilidad y mortalidad en el neonato equino. Otras causas de PAS que pueden contribuir a que los potros neonatos no sobrevivan incluyen la distocia, la separación prematura de la placenta y la cesárea. El PAS se ha reconocido durante muchos años en como una afección de los potros neonatos, con una incidencia estimada del 2%. A esta condición también se le conoce con otros nombres, entre los que se incluyen: Encefalopatía hipóxica-isquémica (HIE), encefalopatía neonatal, síndrome de inadaptación neonatal y síndrome multisistémico neonatal. El PAS puede afectar también a órganos que no

forman parte del sistema nervioso, lo que da como resultado alteraciones de la función cardiopulmonar, endocrina, gastrointestinal y renal, así como alteraciones del comportamiento.(Gold, Chaffin, Burgess, & Morley, 2016).

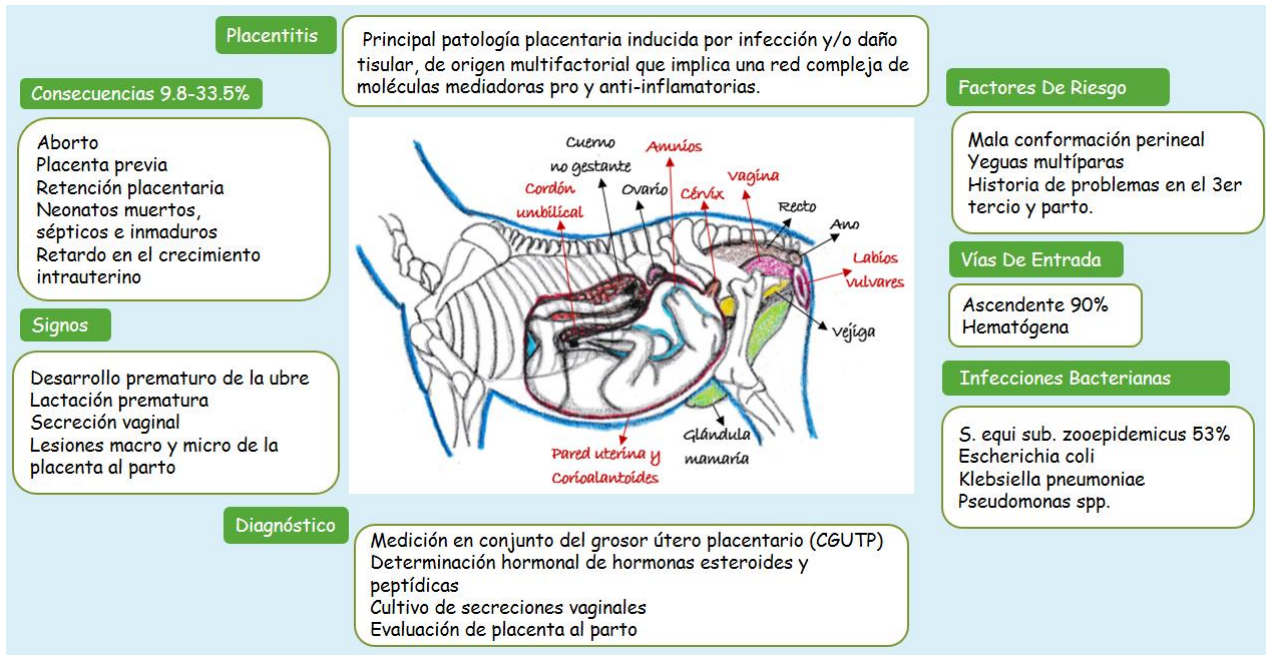


Imagen 1. Adaptado de “Equine pregnancy: physical interaction between the uterus and conceptus. Ghinter,1998”. Fisiopatología de la placentitis. La placentitis en las yeguas es causada comúnmente por bacterias oportunistas que ingresan a través de la vagina. La infección bacteriana prolifera a lo largo de la membrana corioalantoidea después de penetrar a través del cérvix, desencadenando principalmente un proceso inflamatorio que resulta en la producción de prostaglandinas (PgF2 α y PE2), hormonas que estimulan la separación entre el corion y la pared uterina, así también un aumento de la contractibilidad del miometrio, lo que resulta en un parto prematuro. Adicionalmente, la placentitis puede afectar al feto a través del cordón umbilical, lo que resulta en neonatos sépticos, inmaduros o con retardo del crecimiento intrauterino. (Canisso Igor, Barry A. Ball, Erdal Erol, Edward L. Squires, & Mats H.T. Troedsson, 2015; Macpherson & Bailey, 2008).

2.2.2 INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta adaptativa que se desencadena por estímulos y condiciones nocivas, como infecciones y lesiones. Generalmente se piensa que una respuesta inflamatoria controlada es beneficiosa, ya que aporta el reconocimiento, protección y resolución contra la causa del daño al tejido, pero una respuesta excesiva puede resultar perjudicial (Medzhitov, 2008). La respuesta inflamatoria de los vasos sanguíneos y las células endoteliales que los delimitan, desencadena una complicada

cascada biológica y fisiopatológica durante el desarrollo de diversas enfermedades. Esta respuesta puede ser aguda, principalmente cuando hay lesión física de los tejidos debido a la presencia de infecciones causadas por bacterias, virus o parásitos, y crónica, que se relaciona principalmente con enfermedades degenerativas, autoinmunes y cáncer. Los factores pro y anti-inflamatorios afectan el desarrollo y la progresión de la enfermedad (Parslow, Stites, Terr, & Imboden, 2002). Aunque la inflamación y la infección a menudo están correlacionadas, son eventos separados, de tal forma que la inflamación puede ocurrir en condiciones en las que no hay infección. Los principales signos de inflamación son dolor, enrojecimiento, hinchazón, calor y pérdida de función y movilidad (Medzhitov, 2008).

Los cambios que tienen lugar en los vasos sanguíneos inflamados son esenciales para la atracción de células del sistema inmune hacia el tejido agredido. Este proceso se ha descrito detalladamente en infecciones bacterianas, en las que receptores celulares de tipo Toll (TLRs), detectan y señalan la presencia de patógenos o de daño tisular para desencadenar una respuesta inflamatoria. El reconocimiento inicial del agente patógeno está mediado por macrófagos y células cebadas residentes (Medzhitov, 2008; Parslow et al., 2002). Los macrófagos se activan por el contacto directo de receptores en su superficie con ciertos microorganismos o partículas inertes, con el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o con productos de desecho tisular del huésped. Entre otros, los macrófagos expresan un receptor de manosa específico para LPS llamado CD14. Sin embargo, el complejo LPS/CD14 no es capaz de enviar por sí solo la señal de reconocimiento del patógeno.

Recientemente se ha descrito que los receptores tipo Toll son relevantes en la activación de los macrófagos. En humanos se conocen al menos 10 TLR diferentes, entre los cuales se encuentra el TLR-4, que se expresa de manera selectiva en macrófagos y sirve como un compañero de transducción de señal de CD14. El complejo LPS/CD14 primero debe unirse con un dominio extracelular de TLR-4, cuyo dominio citoplásmico posteriormente transmite las señales que activan al macrófago. La importancia de esta señalización se evidencia mediante el dato de que ratones que

congénitamente carecen de TLR-4 muestran una mayor susceptibilidad a padecer infecciones fatales causadas por microorganismos Gram (-) (Luke A. O'Neill et al., 2011; Parslow et al., 2002).

Durante la inflamación, los cambios en el diámetro y permeabilidad de los vasos sanguíneos locales y en las moléculas de superficie expresadas por las células endoteliales, llevan a la producción de una variedad de mediadores inflamatorios que incluyen quimiocinas, citocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de cascadas proteolíticas. El efecto principal e inmediato de estos mediadores es la producción de un exudado inflamatorio local. En este proceso, algunas proteínas plasmáticas y leucocitos (principalmente neutrófilos) que normalmente están restringidos a los vasos sanguíneos, ahora tienen acceso, a través de la pared de los capilares, a los tejidos extravasculares en el sitio de infección o lesión (Medzhitov, 2008). Esta permeabilidad de la superficie endotelial es mediada por selectinas, integrinas y receptores de quimiocinas en los leucocitos, lo que resulta en acumulación de exudado en los espacios extravasculares. Cuando los neutrófilos alcanzan el sitio del tejido afectado se activan, ya sea por contacto directo con los patógenos o por las acciones de las citocinas secretadas por las células residentes en los tejidos afectados (Imagen 2).

Una vez activados, los neutrófilos liberan el contenido tóxico de sus gránulos, que incluye especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno, proteínasa 3, catepsina G y elastasa. Estos efectores altamente potentes no discriminan entre objetivos microbianos y del huésped, por lo que el daño colateral a los tejidos del huésped es inevitable.

Una respuesta inflamatoria aguda exitosa resulta en la eliminación de los agentes infecciosos, seguida por una fase de resolución y reparación de los tejidos dañados mediada principalmente por macrófagos reclutados por los tejidos. El cambio en la producción de mediadores lipídicos, de prostaglandinas pro inflamatorias a lipoxinas, es crucial para la transición de la inflamación a la resolución. Las lipoxinas inhiben el reclutamiento de neutrófilos y promueven el reclutamiento de monocitos, que eliminan

a las células muertas e inician la remodelación de los tejidos. Las resolinas y las protecninas, que constituyen otra clase de mediadores lipídicos, así como el factor de crecimiento transformante β y los factores de crecimiento producidos por los macrófagos, también tienen un papel crucial en la resolución de la inflamación, incluido el inicio de la reparación del tejido.

Si el proceso inflamatorio agudo persiste, el infiltrado de neutrófilos se reemplaza con macrófagos en el sitio del daño, casi siempre acompañados por linfocitos, lo que lleva a un patrón de inflamación crónica que puede ser el resultado de otras causas de daño tisular, como las respuestas autoinmunes (debido a la persistencia de antígenos propios) o la presencia de cuerpos extraños no degradables.

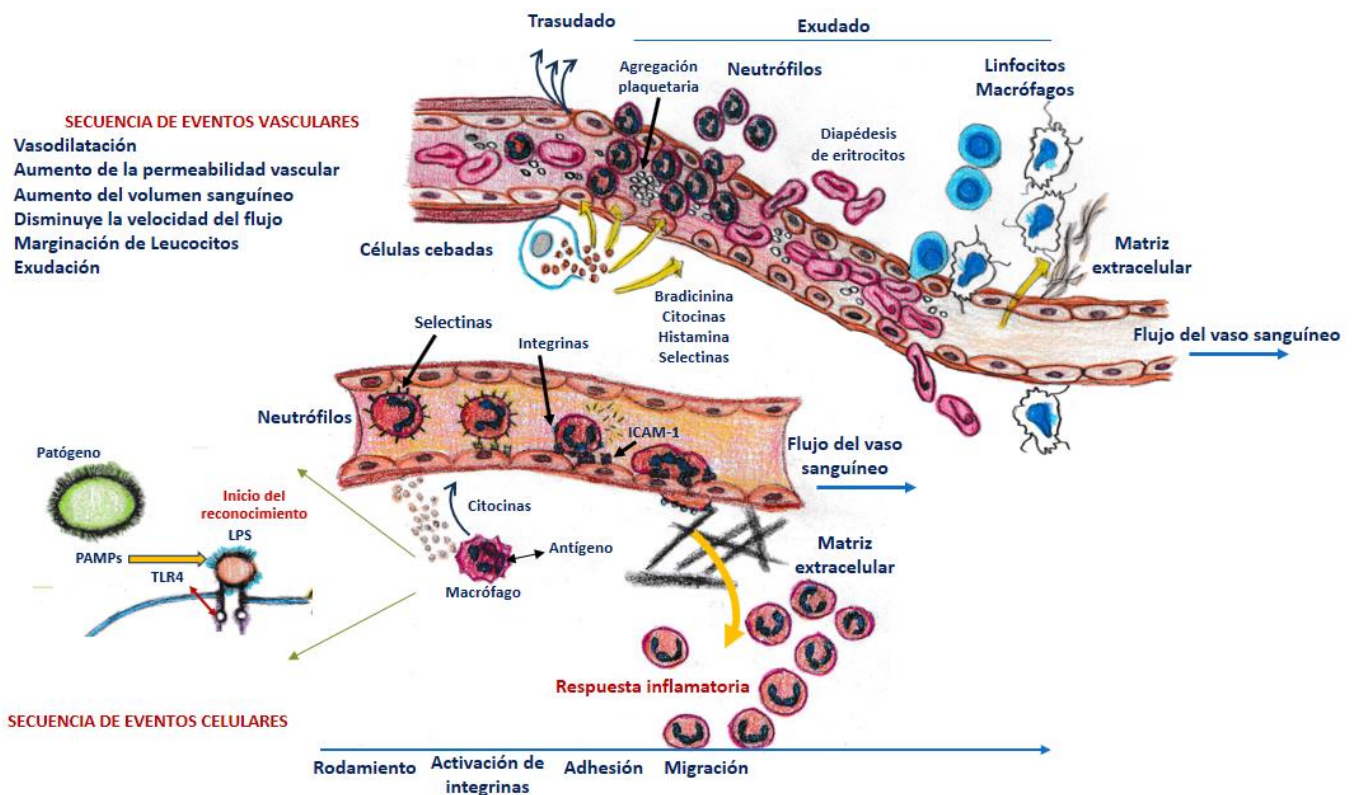


Imagen 2. Eventos vasculares y celulares involucrados en el proceso inflamatorio. Adaptado de “<https://es.slideshare.net/DraMarusa/inflamacin-23957041>”.

3. Biomarcadores

Uno de los mayores retos de la medicina actual es intentar predecir o estimar el riesgo de sufrir un evento patológico en un paciente sano, o realizar un diagnóstico preciso en un paciente en el que se presenta actualmente la enfermedad. De ahí el interés creciente en el papel de los biomarcadores diagnósticos y pronósticos que puedan ser identificados en sangre (Torres Courchoud & Perez Calvo, 2016).

En 1998, el Grupo de Trabajo de Definiciones de Biomarcadores de los Institutos Nacionales de la Salud definió como biomarcador a "una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica". Así también, el Programa Internacional sobre Seguridad Química, dirigido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en coordinación con las Naciones Unidas y la Organización Internacional del Trabajo, ha definido como biomarcador a "cualquier sustancia, estructura o proceso que puede medirse en el cuerpo o sus productos e influir o predecir la incidencia de resultados o enfermedades (Strimbu & Tavel, 2010).

Existen diferentes tipos de biomarcadores: diagnósticos, pronósticos, o terapéuticos. El biomarcador ideal debe ser específico, sensible, predictivo, rápido, económico, estable in vivo e in vitro, no invasivo, y debe tener suficiente relevancia preclínica y clínica como para modificar las decisiones relativas al proceso patológico en que se aplica (Torres Courchoud & Perez Calvo, 2016).

3.1 Alfa-fetoproteína (AFP)

La AFP es una glicoproteína que forma parte de la familia albuminoide, junto con la proteína de unión a la vitamina D, la alfa-albumina y la afamina. Tiene un peso molecular de 68-70 kDa y está formada por una sola cadena polipeptídica de 590 residuos de aminoácidos, con 3 a 5% de carbohidratos. Esta glicoproteína se puede encontrar en la circulación fetal y materna durante la gestación (Mizejewski, 2004).

Durante el desarrollo de la gestación es expresada y sintetizada secuencialmente por las células del saco vitelino, el hígado fetal y el tracto gastrointestinal del feto.

La AFP ha atraído durante mucho tiempo el interés de los investigadores por su papel secundario en la embriogénesis, tumorigénesis, regeneración de tejidos y la respuesta inmune (Potapovich et al., 2009). La AFP juega un papel determinante en la diferenciación sexual del hipotálamo debido a su alta afinidad por los estrógenos, pero no por la testosterona. Los fetos de sexo femenino producen estrógenos que son secuestrados por la AFP, lo que impide su entrada a las neuronas del SNC. En cambio, los fetos machos producen testosterona, que no se une a la AFP, lo que permite su libre entrada a las neuronas, donde se aromatiza a estrógenos que masculinizan y defeminizan las áreas sexualmente dimórficas del SNC (Zarco, 2018).

Después del nacimiento, el gen AFP es silenciado por procesos de metilación, y solamente se vuelve a expresar en casos de daño y regeneración hepática, en tumores sólidos, como hepatomas y en cáncer de células germinales. En el adulto, solo las células ovaladas hepáticas que rodean los conductos biliares secretan AFP mientras que sus células parenquimatosas hepáticas secretan poca o ninguna AFP.

Se ha determinado que la vida media de AFP en la circulación es de 3 a 4 días en poblaciones neonatales y pediátricas. A partir de entonces, las AFP "envejecidas" que aún circulan se eliminan del torrente sanguíneo mediante receptores de superficie celular de asialoglicoproteína presentes en las células de Kupffer hepáticas y se degradan proteolíticamente en el hígado (Mizejewski, 2015). Por no circular o hacerlo solo en concentraciones basales después de la vida neonatal o infancia temprana, en el adulto la AFP es considerada como marcador tumoral, ya que aparece en la circulación en individuos con determinados tipos de cáncer (Mizejewski, 2007), principalmente, en el hepatocarcinoma, en cáncer testicular y en los tumores de células germinales no seminomatosos, que son poco frecuentes (glándula pineal y cerebro).

La razón fundamental para el uso de marcadores tumorales es para medir el grado de éxito de un tratamiento. La vida media de la alfa-fetoproteína es de 5 a 7 días, lo que quiere decir que los niveles deben caer a la mitad cada semana, y regresar a niveles

normales alrededor de un mes después de suprimir la causa de la elevación. Las concentraciones hasta ahora reportadas en hombres y mujeres no gestantes sanos son de 0 a 4ng/ml. En mujeres gestantes se elevan a 10-150ng/ml (semana 15-18 de la gestación), disminuyendo sus niveles hacia el final de la gestación. En cambio, en adultos con cáncer hepático las concentraciones de AFP son mayores a 200ng/ml. (Mercado, Morales, & Galindo, 2015; Vincze et al., 2015).

La AFP también se ha reportado como una proteína de fase aguda positiva (APP) y negativa, este tipo de proteínas sufren alteraciones durante un proceso inflamatorio, ya que son secretadas por el hígado en respuesta a una lesión tisular aguda. Por otra parte, las células inflamatorias infiltrantes locales (granulocitos) secretan una serie de citocinas, que incluyen a las interleucinas (IL), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y otras proteínas relacionadas. Las APP, pueden cumplir otras funciones. Por ejemplo, durante una respuesta inmunitaria innata, la proteína C reactiva, la proteína de unión a manosa y la ferritina ayudan a inhibir el crecimiento y la propagación de patógenos. Algunas APP estimulan el proceso de coagulación, ya que la captura de patógenos en coágulos sanguíneos locales también puede servir para limitar los procesos de infección. Además, los factores de coagulación en el sistema inmunológico innato aumentan la permeabilidad vascular en las áreas de inflamación local y sirven como agentes quimiotácticos para las células fagocíticas. (Mizejewski, 2015)

3.1.1 IMPORTANCIA DE AFP EN EL BIENESTAR FETAL

El hígado fetal es la principal fuente de AFP después de que el saco vitelino se degenera. La concentración inicial de esta proteína en el suero del feto humano es de 1-10 mg/ml, y durante el segundo trimestre del embarazo es en promedio de 30 mg/ml. Esta proteína tiene afinidad por el oxígeno y juega un papel importante en su transporte, complementando la función de la hemoglobina fetal. Durante las semanas 14 y 16 del embarazo humano, la AFP puede ser localizada en el líquido amniótico en concentraciones de entre 7 y 20 μ g/ml. Después del nacimiento la síntesis de AFP declina gradualmente y desaparece de la circulación entre 6 y 12 meses después del nacimiento, cuando se inicia una mayor síntesis de albúmina sérica (Mercado et al.,

2015). La AFP ha sido identificada en bovinos, cerdos, roedores y caballos, sin embargo, su papel biológico en mamíferos domésticos aún es controvertido y no se han descrito sus niveles durante la gestación con tanto detalle como se ha hecho en humanos (Vincze et al., 2015). En mujeres, la medición de AFP ha demostrado ser de utilidad como prueba complementaria, en conjunto con la determinación de niveles de hCG y estrógenos, sirviendo como indicador de factores de riesgo en el diagnóstico de problemas del tubo neural, como espina bífida, aneuploidías como Síndrome de Down y trastornos hematológicos que involucran a la placenta (Mizejewski, 2007). En algunas patologías específicas de la gestación humana, como la insuficiencia placentaria y la restricción del crecimiento intrauterino, se ha identificado un aumento en la concentración de AFP en la circulación materna, que está asociado con sangrados feto- maternos por la separación del corion de la decidua placentaria (por lesión inflamatoria), vilitis crónica, o lesiones vasculares placentarias a término, tales como trombosis o infartos. Además, su incremento en la circulación materna también se ha asociado con la presencia de lesiones en la vasculatura uterina que comprometen el suministro de sangre a la circulación placentaria, lo que conduce a daño crónico de las vellosidades. (Mizejewski, 2015).

3.1.2 ALFA-FETOPROTEÍNA EQUINA (eqAFP)

En el equino gestante es posible determinar las concentraciones de eqAFP en la circulación materna. Sorensen et al. (1990) desarrollaron un enzimoimmunoensayo específico para eqAFP con el que identificaron valores de referencia para gestaciones normales en diferentes etapas de la gestación. Adicionalmente, realizaron determinaciones de las concentraciones de eqAFP en yeguas con gestaciones gemelares, yeguas que sufrieron pérdidas embrionarias y abortos, así como en yeguas con placentitis, y compararon sus valores con los de gestaciones normales de edades gestacionales comparables. Los resultados de las gestaciones anormales no fueron reportados en unidades internacionales, sino como una “relación de desviación estándar”, que determina la desviación en las concentraciones presentes en el caso a evaluar con respecto a la media de las yeguas normales con la misma edad gestacional. Encontraron que tanto las yeguas con gestaciones gemelares como las

yeguas con placentitis y aquellas que posteriormente sufrieron pérdida embrionaria tuvieron concentraciones significativamente más altas que aquellas con gestaciones normales en la misma etapa de la gestación.

En 2015 Canisso et al. demostraron que la eqAFP podía identificarse tanto en fluidos fetales como en la circulación materna, y que las concentraciones de AFP se mantuvieron elevadas en yeguas que desarrollaron placentitis inducida experimentalmente con *S. zooepidemicus* entre los 260 y 280 días de gestación. La presencia de AFP en fluidos fetales fue identificada, mediante técnicas de electroforesis y Western Blot, como una banda de 68KDa. La concentración de la eqAFP en la circulación materna se determinó por quimioluminiscencia, observando un aumento 7 días antes de que ocurriera el aborto (en promedio abortaron a los 9 ± 1.4 días post-inoculación). En ese trabajo concluyeron que en la placentitis experimental las concentraciones circulantes de AFP se elevaron cuando la enfermedad estaba muy avanzada, por lo que su uso como marcador temprano de placentitis resulta limitado en casos de placentitis aguda y severa, pero podría tener utilidad clínica después del establecimiento de un proceso de placentitis subaguda o crónica.

Canisso et al, (2015) y como Vincze et al., (2015) encontraron concentraciones de AFP de 0.4 a 0.6 ng/ml en sangre materna de yeguas con gestaciones normales avanzadas, mientras que en yeguas con placentitis inducida de forma experimental que abortaron las concentraciones variaron entre 0.6 y 1.5 ng/ml. Vincze y col. en 2018, reportaron que, en yeguas con gestaciones normales, las concentraciones de AFP aumentaron durante el último mes de gestación y disminuyeron durante los últimos 10 días anteriores al parto tanto en sangre materna como en la sangre fetal, el cordón umbilical y los fluidos fetales, como ocurre en mujeres.

3.2 ÁCIDOS NUCLEICOS

Existen dos tipos de ácidos nucleicos, el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA). Ambos se encuentran en organismos procariotas y eucariotas. Los virus contienen sólo DNA o sólo RNA. Los ácidos nucleicos actúan como portadores de la información genética y tienen un papel clave en diversos procesos biológicos dentro de las células. (Szabat & Kierzek, 2017).

3.2.1 ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA)

El RNA es material genético monocatenario o bicatenario involucrado en la regulación de la expresión génica y en la síntesis de proteínas. El RNA mensajero (mRNA) es el ácido ribonucleico monocatenario que transfiere el código genético desde el DNA del núcleo celular a un ribosoma en el citoplasma, donde es traducido para sintetizar una proteína. Es decir, en el mRNA está codificado el orden en que se unirán los aminoácidos durante la síntesis de una proteína (Thieman & Palladino, 2010).

Los RNAs no codificantes (que no se traduce en proteínas) forman del 95 al 98% del RNA total presente en una célula. Este tipo de RNA se pueden clasificar de acuerdo con su longitud, localización y función, como RNAs no codificantes pequeños (ncRNAs), RNAs no codificantes largos (lncRNAs), microRNAs (miRNAs), pequeños RNAs interferentes (siRNAs), y RNAs que interactúan con PIWI (piRNAs); maduración de RNA, como pequeños RNA nucleolares (snoRNAs) y pequeños RNA nucleares (snRNA); y RNAs involucrados en la síntesis de proteínas, como el RNA ribosomal (rRNA) y el RNA de transferencia (tRNA). (Cai et al., 2017). Todos ellos tienen en común que sus funciones están relacionadas, directa o indirectamente, con la expresión génica; la maduración postranscripcional y la traducción del mRNA (Acuña, Floeter-Winter, & Muxel, 2020) (Imagen 3).

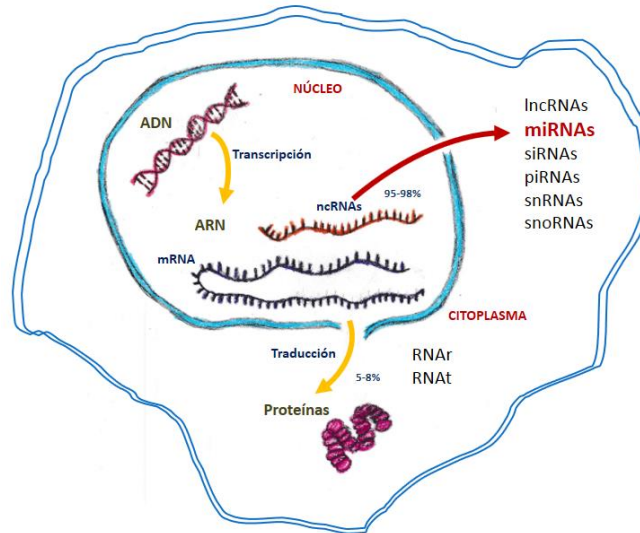


Imagen 3. Adaptado de Introducción a la biotecnología (Thieman & Palladino, 2010). Ácidos nucleicos. El DNA contiene toda la información genética de los seres vivos. Para que pueda transmitirse esta información, primero se transcribe desde la molécula de DNA a una molécula de RNA mensajero (mRNA). Posteriormente el mRNA es leído por los ribosomas, que sintetizan polipéptidos con las secuencias de aminoácidos especificados en el mRNA. Otras formas de RNA también participan en la síntesis de proteínas, como el RNA ribosómico (RNAr) y el RNA de transferencia (RNAt). Mediante la traducción y a través de las proteínas es como los genes controlan las propiedades o rasgos metabólicos y físicos de un organismo (Thieman & Palladino, 2010). El RNA restante no participa directamente en la síntesis de proteínas, pero los RNA no codificantes forman una gran familia encargada de regular la expresión génica. (Cai et al., 2017).

3.2.2 microRNAs (miRNAs)

Son moléculas pequeñas de RNA no codificante formadas por secuencias de 21 a 25 nucleótidos. Estas moléculas son monocatenarias en su forma madura y bicatenarias en su forma precursora (Thieman & Palladino, 2010) y son parcialmente complementarias a una o más moléculas de mRNA. Su función principal es regular la expresión génica a través del bloqueo de la traducción de un mRNA, su escisión y su deadenilación. (Ahn, Kwak, Lee, & Lee, 2018) (Imagen 4).

Los miRNAs se producen en todo el organismo. Cada tejido tiende a tener un perfil de expresión específico y muchos de estos miRNAs son secretados hacia la circulación, donde se pueden encontrar libres o contenidos dentro de microvesículas y exosomas. Los miRNAs circulantes pueden ser biomarcadores valiosos para el diagnóstico de la presencia o severidad de una enfermedad, lo que permitiría minimizar las pruebas invasivas. (Loux et al., 2017).

Se estima que uno solo miRNA puede regular alrededor de 200 diferentes mRNAs, los que pueden funcionar en diferentes vías de la célula: Por otra parte, un mismo mRNA puede ser regulado por múltiples miRNAs. (Pabón-Martínez, 2011).

Los primeros miRNA que se descubrieron, denominados como lin-4 y let-7, regulan genes que controlan el momento de la diferenciación celular y la proliferación durante el desarrollo del gusano *Caenorhabditis elegans*. Sin embargo, la observación de que let-7 está conservado en múltiples organismos sugirió que los miRNA tienen un papel biológico más amplio (Hollis & Starkey, 2018). Las funciones biológicas de los miRNAs no están restringidas a las células dentro de las que se sintetizan, ya que pueden mediar diversos tipos de señalización de célula a célula.

En mamíferos, los miRNAs se encuentran en altas concentraciones en varios fluidos, como la sangre, la saliva y la orina, donde pueden estar asociados a proteínas de unión a RNA "protectoras", o estar encapsulados (unidos a la membrana) en vesículas extracelulares que son liberado por las células (Kamity et al., 2019). Dado su papel fundamental en la coordinación de eventos biológicos clave, la expresión aberrante de miRNAs se asocia con múltiples enfermedades. El papel preciso desempeñado por los miRNAs en la patogenia es probable que dependa de la enfermedad (Pabón-Martínez, 2011).

La evaluación de los cambios en la expresión de los miRNAs bajo diferentes condiciones fisiológicas es una forma común de estudiar la dinámica de estas moléculas. La Reacción en Cadena de Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR) se utiliza ampliamente para evaluar los cambios en la expresión de los miRNAs. La precisión de este método es fácilmente influenciada por la cantidad inicial de miRNAs, la calidad del cDNA, la integridad del RNA y la eficiencia del PCR.

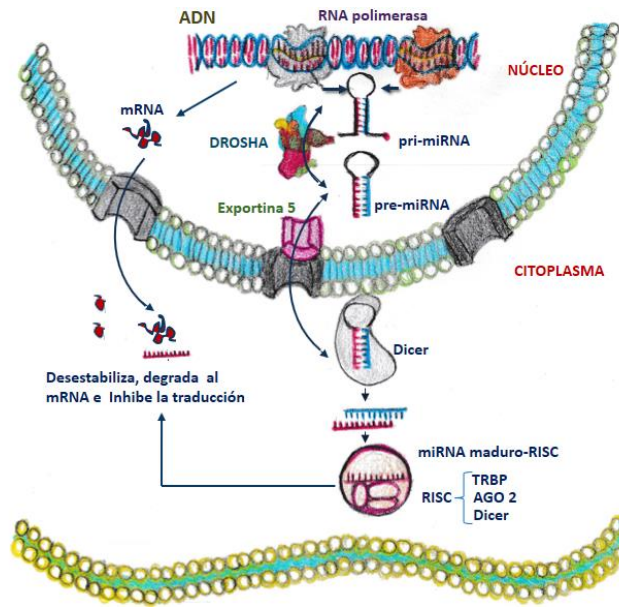


Imagen 4. Reproducido de “Anti-inflammatory microRNAs and their potential for inflammatory disease treatment”. Tahamtan et al., (2018). Biogénesis de los miRNAs. Los miRNAs se transcriben en el núcleo a partir de genes miRNA mediante la RNA polimerasa II o III, formando una molécula llamada pri-miRNA (1500nt). Cuando la célula reconoce esta estructura se procesa por un complejo de proteínas que contienen a la ribonucleasa Drosha y a la proteína de unión a una doble cadena de RNA (DGCR8) para formar la molécula precursora pre-miRNA (70-80nt). Los pre-miRNAs se exportan al citoplasma mediante la proteína Exportina 5 utilizando el complejo Ran-GTP (proteína nuclear relacionada con ras). La estructura del pre-miRNA se divide por la RNAsa III (Dicer) para formar un RNA maduro de doble cadena (dsRNA) de 19–25 nucleótidos. Finalmente, el dsRNA se divide en dos RNA de una sola hebra (ssRNA) con la ayuda de una helicasa. Se integran posteriormente al complejo de silenciamiento (RISC), incluyendo a Dicer, a las proteínas de unión a RNA en respuesta a la transactivación (TRBP) y Argonauta 2 (Ago 2). Funcionalmente, el complejo miRNA-RISC regula a la baja la expresión de los mRNA blanco, uniéndose a su región no traducida (3' UTR), lo que lleva a la inestabilidad del ARNm, lo que reprime la traducción y promueve su degradación. (Cai et al., 2017; Pabón-Martínez, 2011; Tahamtan et al., 2018).

3.2.3 miRNAs Y LA GESTACIÓN

Durante la gestación se lleva a cabo el desarrollo embrionario y fetal de un individuo. Cada una de estas etapas de desarrollo es regulada por la intervención de múltiples procesos biológicos que involucran una estrecha interacción entre los tejidos maternos y los tejidos del producto, cuyo éxito es esencial para la reproducción y la supervivencia de las especies (Boeta, 2018). La pérdida del equilibrio entre múltiples factores fisiológicos, tales como la concentración de oxígeno y la inflamación, causan trastornos o complicaciones diversas (Mouillet et al., 2015) (Imagen 5-6).

La placenta es el tejido de comunicación feto-materna más importante. Las alteraciones en el flujo sanguíneo de la placenta conducen a una reducción en la disponibilidad de nutrientes para soportar el crecimiento y desarrollo del feto, lo que deteriora su salud a corto, mediano y largo plazo (Mouillet et al., 2015). Las consecuencias inmediatas incluyen la pérdida de la gestación y el aborto. Las consecuencias a mediano y largo plazo son la restricción del crecimiento intrauterino, el bajo peso al nacer y la hipertensión. Por ejemplo, la condición de hipoxia crónica en la placenta daña al endotelio de los vasos sanguíneos de la placenta y el feto, conduciendo a disfunciones miocárdicas y microvasculares, lo que puede ser un evento iniciador de la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR). (Wang, Liu, Shao, Wang, & Zhang, 2018).

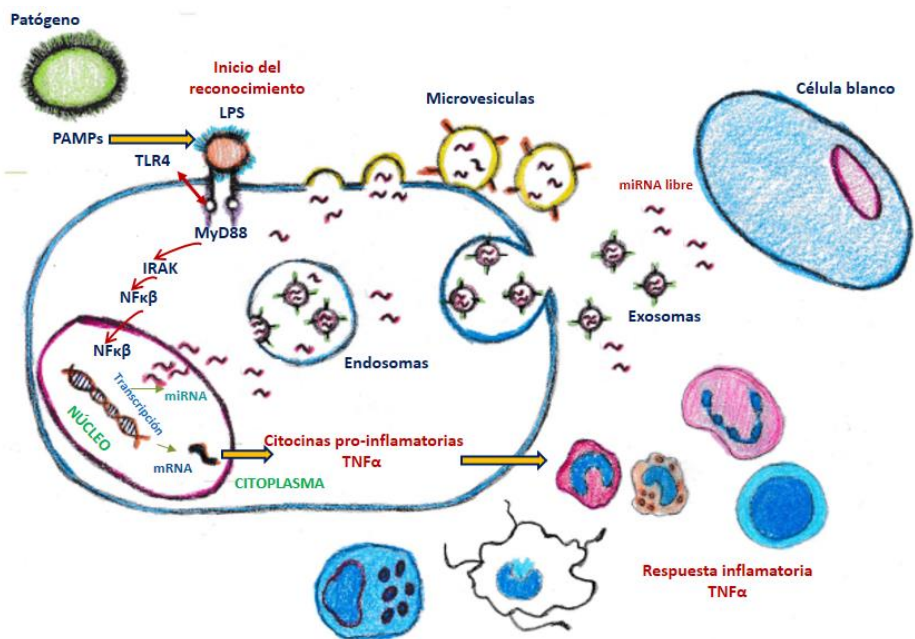


Imagen 5. Adaptado de “MicroRNA-mediated control of inflammation and tolerance pregnancy”. Kamity et al., (2019). Posible mecanismo inflamatorio mediado por miRNAs en células del trofoblasto. La presencia de la endotoxina LPS estimula al receptor TLR4 en el trofoblasto placentario para provocar la respuesta inflamatoria inicial, mientras que también regula la transcripción de miRNAs. Los miRNAs pueden ser encontrados en forma libre en el citoplasma o fuera de las células, o ser empaquetado selectivamente en vesículas extracelulares o exosomas por varios mecanismos. Los exosomas se forman intraluminalmente en el sistema endosómico dentro de cuerpos multivesiculares (MVB), mientras que las microvesículas son secretadas por la formación de vesículas derivadas de la membrana. En las microvesículas la célula empaqueta selectivamente ácidos nucleicos (DNA, mRNA, miRNA), proteínas, lípidos y carbohidratos específicos de la célula de origen y para el objetivo previsto. Las vesículas y los miRNAs libres son transportados a la célula diana a través del espacio extracelular.

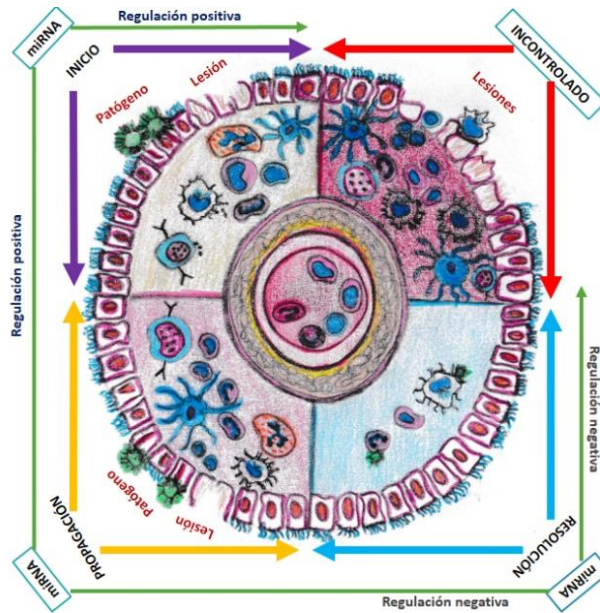


Imagen 6. Reproducido de “Anti-inflammatory microRNAs and their potential for inflammatory disease treatment”. Tahamtan et al., (2018). Biogénesis de los miRNAs. Regulación celular por microRNAs en el proceso inflamatorio. La inflamación es una respuesta biológica y fisiopatológica a estímulos nocivos; como infecciones y daño tisular. Los pasos de iniciación, propagación y resolución de la inflamación están sujetos a efectos tanto positivos como negativos. Muchos de estos eventos son regulados a través de miRNAs para lograr una respuesta inmune óptima (flecha verde). La regulación positiva se activa para iniciar una cascada de eventos moleculares que conducen a combatir patógenos microbianos invasores y a reparar con éxito el daño tisular. La regulación negativa solo se activa durante la inflamación severa y puede ser vital para prevenir una inflamación excesiva y parcialmente peligrosa. La falta de una iniciación y propagación adecuadas que impide la respuesta inmune innata y la falta de una resolución correcta puede conducir a una afección y enfermedad incontrolada (flecha roja). Así, las redes moleculares basadas en miRNAs que regulan la iniciación, propagación y resolución de la inflamación deben ajustarse adecuadamente para optimizar la respuesta inmune innata (Tahamtan et al., 2018).

3.2.4 miRNA-21

El miRNA-21 está involucrado en una gran cantidad de funciones biológicas, incluyendo el desarrollo embrionario, fetal y placentario. También en la regulación de procesos inflamatorios y de enfermedades cardiovasculares. EL miRNA-21 es ampliamente conocido como un “oncomir” (promotor tumoral), que se ha reportado en varios tipos de cáncer (mama, estómago, pulmón, próstata y cervical), (Kumarswamy, Volkmann, & Thum, 2011). En la placenta controla la función de las células trofoblásticas a través de la regulación de la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) y la proteína 4 de muerte celular programada (PDCD4), ambas implicadas en la proliferación, migración, invasión y apoptosis

celular (Tahamtan et al., 2018). PTEN tiene un papel esencial en el desarrollo embrionario e invasión del trofoblasto durante la placentación (Chaiwangyen et al., 2015).

Dado que la placenta es relativamente hipóxica cuando se presenta una patología placentaria, los miRNAs asociados a condiciones hipóxicas responden a este desafío. En placentas expuestas al humo de cigarro, los miR-16, miR-21, y miR-146 fueron significativamente regulados a la baja (Cai et al., 2017). En pacientes con neonatos pequeños (SGA) se ha informado que el miR-16 y el miR-21 disminuyeron notablemente, encontrándose una relación con las alteraciones angiogénicas placentarias, lo que sugiere un efecto aditivo en SGA (Cai et al., 2017). Por lo tanto, los cambios en la expresión y en las funciones fundamentales de mir-21 en la placenta humana insinúan que su desregulación puede estar asociada a patologías de la gestación.

3.2.5 miRNA-374

Recientemente se ha identificado que los miembros de la familia del miRNA-374 están altamente conservados y que participan en la regulación de diversas funciones biológicas, incluyendo el desarrollo embrionario, fetal y placentario, así como en procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares, cáncer y procesos de hipoxia (Bian et al., 2019). Se ha demostrado una importante regulación a la baja de la expresión del miR-374 en la circulación del cordón umbilical en niños lactantes con asfixia perinatal y con lesiones por encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) posterior, sin conocerse aún el mecanismo involucrado (Looney et al., 2015).

En un estudio realizado con células cancerígenas de próstata (PC-3) bajo un proceso de hipoxia (Sohn, Won, Lee, Lee, & Kim, 2015). El miRNA-374 fue significativamente regulado hacia arriba, atenuando los niveles del mRNA de los genes relacionados con la angiogénesis, tales como las dos subunidades del factor inducido por la hipoxia (HIF-1 alfa, HIF-2 alfa) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células PC-3 bajo hipoxia.

En un estudio realizado para identificar miRNA específicos de la gestación en yeguas, se tomaron muestras seriadas de sangre completa a los 8, 9 y 10 meses de la gestación y en el posparto, así como de yeguas no gestantes (diestro). En total, utilizando qPCR se evaluó un panel de 178 miRNAs, identificando finalmente cinco miRNAs de interés. El miR-374b fue regulado diferencialmente a lo largo de la gestación tardía, mientras que otros cuatro (miR-454, miR-133b, miR-486-5p y miR-204b) fueron regulados diferencialmente entre yeguas gestantes y no gestantes. Mediante programas de predicción computacionales se encontró que los procesos regulados por los miRNAs expresados diferencialmente durante la gestación estarían involucrados en las vías de señalización STAT3, PI3 / AKT, GnRH, prolactina, insulina y relaxina de importancia en la reproducción. (Loux et al., 2017).

El objetivo del presente estudio fue determinar el perfil de expresión de los miRNAs-21 y -374 en placentas equinas obtenidas inmediatamente después del parto, así como determinar las concentraciones de dichos miRNAs y de α -feto proteína equina (eqAFP) en sangre materna a los 240 y 320 días de gestación, evaluando la asociación de cada una de estas variables con la viabilidad del potro neonato en yeguas con y sin placentitis.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

En la imagen 7, se describe de forma general el diseño del estudio.

4.1 ANIMALES

Se trabajó con 15 yeguas de raza Pura Sangre Ingles, con pesos de 500 a 600 kg, que se mantuvieron durante la gestación y el parto en pradera con agua a libre acceso y con un área de comederos donde se les suplementó con grano dos veces al día, así como heno de alfalfa y avena una vez al día.

Los partos ocurrieron entre los meses de enero a mayo, tiempo durante el cual se realizó una supervisión constante y se realizó una evaluación clínica antes, durante y después del parto tanto en las yeguas como en las crías. Las praderas se riegan con agua tratada durante los meses de octubre a mayo, por lo que el criadero tiene

históricamente un problema de patologías placentarias y mortalidad neonatal del 10 a 15% por temporada reproductiva.

4.2 SEGUIMIENTO DE LA GESTACIÓN DE LOS 240 DÍAS HASTA EL PARTO

Las yeguas fueron observadas diariamente en las praderas donde se encuentran, con énfasis en la revisión de signos clínicos de placentitis, como el desarrollo prematuro de la ubre, la presencia de secreciones vaginales, así como evidencias de abortos espontáneos o partos prematuros. Una vez al mes se realizó ultrasonografía transrectal a partir de los 240 y hasta los 320 días de la gestación, para identificar cambios en el grosor de la unión útero-placentaria, tomando como referencia los datos reportados por Renaudin et al., (1997). Para ello se utilizó un equipo CHISON Eco 2, con transductor lineal de 5-7Mhz.

4.3 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE Y PLACENTA

MUESTRAS SANGUÍNEAS

De cada yegua se tomaron dos muestras de sangre en cada uno de los días 240 y 320 de gestación. Una muestra fue para determinar las concentraciones de alfa feto proteína (eqAFP). Esa muestra se tomó con tubo Vacutainer de tapón rojo (sin aditivo), y una hora después se centrifugo a 3,000rpm durante 20 min para separar el suero. La segunda muestra fue para determinar los microRNAs (miRNAs), esa muestra fue obtenida en un tubo Vacutainer adicionado con EDTA. Las muestras con EDTA se centrifugaron 1 h después de su obtención a 1,500rpm/10 min para separar el plasma. En un vial se colocaron 500µL de plasma al que se le adicionaron 500µL de Trizol. Todas las muestras se transportaron a -4°C durante una hora aproximadamente, hasta llegar al laboratorio, donde las muestras de suero se almacenaron a -20°C y las de plasma con Trizol a -70°C hasta que se realizaron las determinaciones de eqAFP o la extracción de RNA respectivamente.

MUESTRAS DE PLACENTA

4.4 HISTOPATOLOGÍA DE LA PLACENTA

El monitoreo del parto de cada yegua se llevó a cabo varias veces al día desde 20 días antes de la fecha probable de parto, tomando como día 0 el momento de la ovulación. Las yeguas parieron en praderas, por lo que se revisaron por lo menos 5 veces durante el día, y por la noche se hicieron guardias que cambiaban cada 3 horas.

Cuando se identificaba alguna yegua con signos de parto inminente se realizó un seguimiento más estrecho. Una vez identificada la ruptura de la membrana corioalantoidea se esperó la expulsión completa del potro y en caso necesario se asistió el parto.

Al ser expulsada la placenta se tomó con guantes para colocarla en forma de "F" y se revisó que estuviera completa. Se hizo una evaluación macroscópica del estado de la placenta y se anotó su peso y coloración, además de hacerse una descripción de lesiones evidentes, la determinación de zonas con atrofia de vellosidades y la identificación de la presencia de secreciones. Posteriormente se tomaron muestras para histopatología, para lo que se obtuvieron secciones de 2 x 2 cm de tejido corioalantoideo sano y de áreas lesionadas de todas las placentas. Las muestras se fijaron con formalina acuosa al 10% hasta su procesamiento. La tinción que se usó para la evaluación fue Hematoxilina-eosina (H.E). (Hong et al., 1993, Pazinato et al.2016)

La toma de muestras corioalantoideas para la determinación de la expresión de miRNAs se llevó a cabo de la misma manera que para la histopatología, solo que dichas las muestras destinadas a este fin se almacenaron con 1ml del TRIzol Reagent (Invitrogen), después de lo cual se transportaron a -4°C aproximadamente durante una hora para después congelarlas a -70°C hasta su procesamiento.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Con la información obtenida de cada individuo, las gestaciones se clasificaron en dos grupos: 1) grupo control, (n=5) conformado por yeguas clínicamente sanas con

gestaciones normales y potros sanos, y 2) grupo de yeguas que desarrollaron placentitis (n=10). La clasificación de las yeguas con placentitis se realizó por los signos clínicos que se observaron durante la gestación, como fueron el aborto, el desarrollo prematuro de la ubre, la secreción vaginal purulenta. Las yeguas con placentitis al momento del parto, presentaron cambios evidentes en la evaluación macro e histopatología de la membrana corioalantoidea, como fueron, congestión de un grado leve a severo, lesiones localizadas con o sin secreción, atrofia de vellosidades, aumento en el grosor, y con un peso mayor al 11% con respecto al peso del potro, así también se clasificaron dentro de este grupo a las yeguas que parieron potros sépticos. El grupo de yeguas con placentitis fue a su vez subclasificado de acuerdo al estado de sus potros: yeguas con potros sanos (n=3), yeguas con potros sépticos vivos (n=3) y yeguas con potros sépticos muertos (n=4). Los potros que se clasificaron como sépticos, fueron aquellos que en las primeras 24 horas de vida presentaron alteraciones en su comportamiento normal, como incomodidad al dormir, dejar de mamar y diarrea. Así también alteraciones en su examen físico general, tomando como rangos normales, la frecuencia cardiaca de 80-110lpm, frecuencia respiratoria 25-30rpm, temperatura 38-39°C, densidad urinaria 1.010-1.015, mucosas rosas, tiempo de llenado capilar: 1 segundo. Los potros sépticos muertos fueron aquellos que presentaron las alteraciones antes descritas durante las primeras 24 horas de nacido, estuvieron en tratamiento y murieron, así también dentro de este grupo se clasifico al feto que fue abortado y al potro que nació por placenta previa, vivo, pero débil y en su examen físico general sus frecuencias disminuidas, por lo que se debió eutanasiar.

4.5 CUANTIFICACIÓN DE eqAFP CON ELISA

La alfa feto proteína equina (eqAFP) se cuantificó utilizando el Kit comercial de ELISA Equine Alpha-Fetoprotein (MyBioSource, MBS457462, disponible en www.mybiosource.com). Los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora antes de comenzar el ensayo de acuerdo con lo señalado en el manual de instrucciones. El ensayo tiene una sensibilidad de 0.312 ng/ml, con un

rango útil desde 0.312 ng/ml hasta 20 ng/ml. Se realizó una dilución del punto más bajo de la curva para tener una sensibilidad de 0.15 ng/ml.

4.6 EXPRESIÓN DE LOS miRNAs (qPCR)

El RNA total de cada muestra se extrajo por el método Trizol-cloroformo. Se trabajaron cuatro muestras por yegua; dos muestras de plasma, una obtenida a los 240 días y la otra a los 320 días de gestación, así como dos muestras de tejido placentario, una con lesión y la otra de tejido sano. A partir de 500 μ L de plasma se adicionó el mismo volumen de TRizol Reagent (Invitrogen). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Enseguida, a cada muestra se le añadieron 200 μ L de cloroformo y la mezcla se agitó durante 15 segundos. Al término, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos; la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 1 μ L de glucógeno, se mezcló vigorosamente y se agregó un volumen de isopropanol. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y al pellet se le agregó 500 μ L de etanol al 75%, mezclando el tubo para lavar el pellet. De nuevo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. El procedimiento se repitió dos veces más a partir de decantar el sobrenadante. El ARN precipitado en el fondo del tubo se dejó secar por 20 minutos a 56°C, para posteriormente hidratarlo con 30 μ L de dietilpirocarbonato.

Las muestras de tejido fueron homogenizadas en mortero con ayuda de nitrógeno líquido, se agregó 500 μ L de solución de lisis para ayudar a separar el tejido y se agregó 1mL del reactivo Trizol (Invitrogen) para la extracción del ARN total, hecho lo cual se siguió el mismo procedimiento descrito para las muestras de plasma a partir de la adicción de cloroformo.

La síntesis del DNA complementario (cDNA) se realizó con iniciadores específicos (cuadro 1) en ciclos de 72°C/5 minutos, 4°C/5 minutos seguido por 42°C/60 minutos, finalmente a 4°C/10 minutos.

Cuadro 1. Secuencias específicas de los primers para la reacción de retro-transcripción (RT)

miRNA	Secuencia de primer 5' a 3'
eca-miR-21	5' gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatcgcactcaaca3'
eca-miR-374	5' gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatcgcactcactta3'

La reacción de PCR en tiempo real (qPCR) que se utilizó fue el Super mix PCR 2x PCR en un solo tubo para qPCR Evagreen (BioTecMol) con los iniciadores específicos (cuadro 2). Las condiciones de la reacción; desnaturalización a 94°C/5 min., seguido por 45 ciclos, alineación a 44°C/30 seg., amplificación 72°C por 30 seg., un último ciclo a 72°C por 5min. Como genes normalizadores para la reacción se ocuparon β -actina (ACTB) y gliceraldehido 3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), en la etapa de alineación de los genes normalizadores se ocupó la temperatura de 56°C.

Cuadro 2. Secuencia específica de los primers para la reacción de qPCR y genes normalizadores ACTB y GAPDH.

miRNA	Secuencia de primer 5'3'	Producto PCR
eca-miR-21-5p	Cggccgtagcttatcagactga	72pb
eca-miR-374-5p	cggccgataatacaacctgc	72pb
Universal	tggagcctgggacgtg	
ACTIUni F	tccatcatgaagtgtgaygt	180pb
ACTIUni R	acagagtacttgcgctcagg	
GAPDH F	agaaggagaaaggccctcag	87pb
GAPDH R	ggaaactgtggaggtcagga	

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó análisis de varianza de un factor (yeguas con o sin placentitis) para comparar la edad de la yegua, la duración de la gestación, el grosor de la unión feto-placentaria, el peso del potro, y la relación entre el peso del potro y el peso de la placenta de las yeguas que desarrollaron o no placentitis.

Se utilizó análisis de varianza de dos factores para comparar los efectos de la edad gestacional (240 o 320 días) y del tipo de gestación (normal o con placentitis) sobre las concentraciones de eqAFP y sobre las concentraciones circulantes de cada uno de los miRNAs. Se usó el mismo tipo de análisis para comparar las concentraciones de eqAFP en la sangre de yeguas que posteriormente parieron potros sanos, potros sépticos vivos o potros sépticos muertos.

La expresión de cada uno de los miRNAs en tejido corioalantoideo sano o lesionado de yeguas con o sin placentitis fueron también comparadas mediante análisis de varianza de dos factores (tejido sano o lesionado; gestaciones con o sin placentitis). Se usó el mismo tipo de análisis para comparar la expresión de cada miRNA en tejido corioalantoideo sano o lesionado de gestaciones que terminaron con el parto de un potro sano, un potro séptico vivo o un potro séptico muerto.

En el caso de los análisis de varianza de acuerdo al tipo de potro se utilizó la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

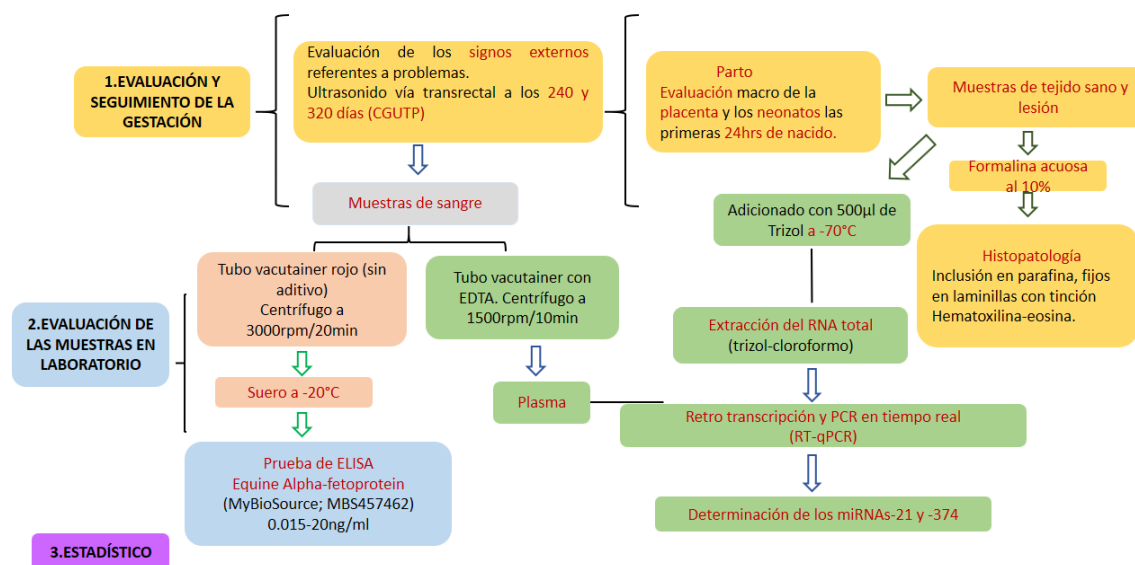


Imagen 7. Esquema general del diseño del estudio.

5.RESULTADOS

5.1 Características de las yeguas y de los potros participantes en el estudio

En el cuadro 3 se clasifican las gestaciones de acuerdo a si fueron sanas o cursaron con placentitis, subclasificando a estas últimas de acuerdo al estado del potro al nacer y a otras observaciones. Las 5 gestaciones de yeguas sanas (que no desarrollaron placentitis) terminaron con el nacimiento de un potro sano y que no presentó signos de enfermedad durante las primeras 24 horas de vida. En cambio, las yeguas con placentitis parieron tres potros vivos sanos, tres potros sépticos vivos, y cuatro potros sépticos muertos. De las yeguas con potro séptico muerto, dos presentaron desprendimiento prematuro de la placenta (placenta previa), lo que llevó a una a de ellas a abortar en el día 308 de la gestación (aborto) y la otra a parir a los 327 días de gestación. Otra yegua presentó durante la gestación signos externos de placentitis (desarrollo prematuro de la ubre y descarga vaginal). La última yegua de este grupo presentó problemas hasta el día del parto, cuando se encontraron cambios congestivos en la evaluación placentaria y el nacimiento de un potro séptico.

No existió diferencia significativa ($p>0.7$) entre la edad de las yeguas sanas y la de las yeguas que desarrollaron placentitis (Cuadro 3). Dentro de este último grupo, la edad promedio de las yeguas que tuvieron un potro séptico muerto fue casi 5 años superior a la edad promedio del resto de las yeguas, sin embargo, debido a la amplia variación en la edad de las yeguas involucradas y al bajo número de casos esta diferencia no fue significativa ($p>0.05$), por lo que no es posible saber si existe una relación real entre edad y riesgo de sufrir placentitis. Con respecto al grosor de la unión útero-placentaria no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las yeguas sanas y aquellas con placentitis ni a los 240 días ni al término de la gestación ($p>0.05$).

La relación entre el peso del potro y el peso de la placenta en las yeguas sanas estuvo dentro del rango normal de 10 a 11%. Mientras que en el grupo con placentitis se encontró una relación de entre el 12 y el 18%. (Cuadro 3).

5.2 Evaluación de la placenta

En las yeguas sanas las placentas fueron expulsadas dentro de las primeras tres horas después del inicio del parto, y en todos los casos se identificaron como completas, con cambios leves relacionados con la interacción entre el feto y el útero, que indicaron procesos normales sin patologías que comprometieran su función. (Fig. 1A, B).

En el grupo con placentitis las placentas también fueron expulsadas completas dentro de las primeras tres horas después del inicio del parto. En general se observaron congestionadas, con edema y atrofia de vellosidades de grado moderado (Fig. 1C, D) a severo (Fig. 1E, F). Las lesiones del grupo con placentitis se clasificaron como ascendentes ya que abarcaban la membrana corioalantoidea y la estrella cervical.(Canisso et al., 2015).

SANAS



PLACENTITIS

MODERADA



SEVERO



Figura 1. Fotografías representativas de cambios macroscópicos observados en la placenta de yeguas sanas (A y B) y de yeguas con placentitis (C, D, E y F). A) área del corion de color rojizo-chocolatoso. B) área del alantoides unida con el amnios a través del cordón umbilical (flecha) de coloración blanco azulada. C) lesión localizada en la porción de la placenta correspondiente al cuerno gestante (flecha), congestión moderada general y atrofia de vellosidades leve en el área correspondiente al cuerpo del útero (*). D) área del alantoides con congestión severa en la región correspondiente a la base de los cuernos uterinos y cerca de cérvix (flechas). E) atrofia de vellosidades severa que ocupa la totalidad del área correspondiente al cuerpo uterino (flecha). F) edema severo en el área del cérvix, que al momento del parto se mantuvo unido, provocando asfixia del potro (flecha; evidencia de placenta previa).

Cuadro 3. Características de la población de estudio. PP: placenta previa, SD: sin dato. Lesiones ascendentes: que abarcan en general la placenta desde el cérvix hasta la punta de los cuernos uterinos. A: aborto.

<i>Grupos</i>	SANAS (n=5)	PLACENTITIS (n=10)				
		Sanos	Sanos	Sépticos		
<i>Viabilidad del potro</i>	Vivos (n=5)	Vivos (n=3)	Vivos (n=3)	Muerto (n=1)	Muerto (n=1)	Muertos (n=2)
<i>Yeguas</i>						
<i>Edad, años (rango, años)</i>	10.5±1.6 (9-13)	9.3±4.1 (6-14)	(9.3±3.5) (6-13)	14.2±4.5 (8-18)		
<i>Unión útero-placentaria (mm)</i>	7-12	7-12	7-12	7-12	7-12	7-12
<i>Parto, días (rango, días)</i>	344±4.7 (338-350)	337.3±11.9 (329-351)	327±14 (325-351)	308 ^A	327	328±2.12 (327-330)
<i>Placenta</i>	Normal	Lesiones ascendentes	Lesiones ascendentes	PP	PP	Lesiones ascendentes
<i>Signos externos de placentitis</i>	-	-	-	-	-	Ubre prematura y secreción vaginal
<i>Relación peso potro y placenta (%)</i>	10-11	12-16	14-16	SD	SD	15- 18
<i>Potros</i>						
<i>Peso, Kg (rango, peso)</i>	51.3±1.99 (44-57)	45.0±3.6 (42-49)	41.6± 8.3 (32-49)	SD	SD	46±5.6 (42-50)

5.3 Concentración de eqAFP

La figura 2 muestra la concentración de la alfa-feto proteína a los 240 y 320 días en el suero de las yeguas sanas y de las yeguas que desarrollaron datos clínicos de placentitis. En las yeguas con placentitis, las concentraciones de eqAFP fueron significativamente superiores a las de las yeguas sanas ($p < 0.05$). A los 240 días de gestación las concentraciones en las yeguas con placentitis fueron 9.8 veces superiores a las de las yeguas sanas, mientras que a los 320 días las diferencia entre ambos grupos fue de 2.8 veces.

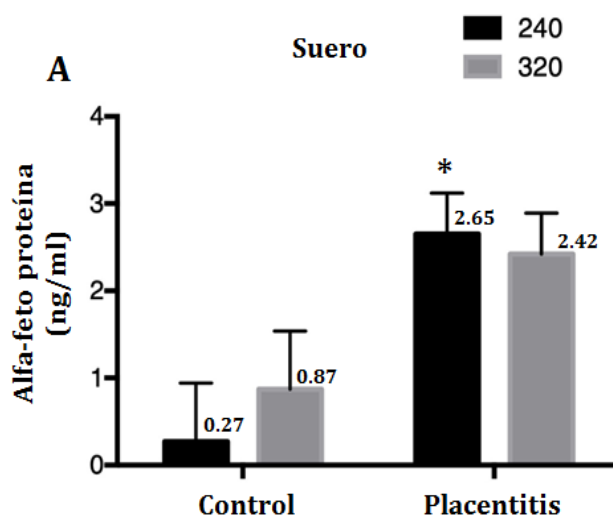


Figura 2. Concentración de alfa-feto proteína a los 240 y 320 días de gestación en yeguas con y sin placentitis. El asterisco indica diferencia significativa entre las yeguas sanas y las yeguas con placentitis.

La concentración de alfa-feto proteína determinada tanto a los 240 como a los 320 días de gestación en las yeguas con placentitis y que terminaron abortando o pariendo potros sépticos muertos fue significativamente más elevada ($p < 0.05$) que la de las yeguas que tuvieron potros vivos sanos o potros sépticos vivos. Dentro de cada grupo no se encontraron diferencias en las concentraciones entre los 240 y los 320 días de la gestación. (Figura 3.).

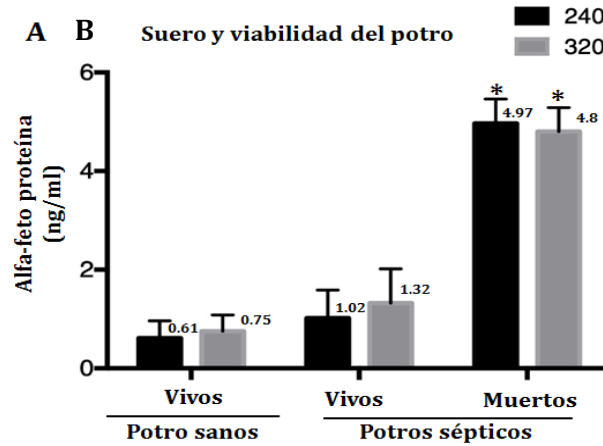


Figura 3. Relación entre la viabilidad del potro al parto y la concentración de alfa-feto proteína a los 240 y 320 días de gestación en yeguas con y sin placentitis. Los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las yeguas que parieron potros sépticos muertos comparadas con las que parieron potros sanos o potros sépticos que sobrevivieron.

5.3 Expresión del miRNA-21 en plasma

El perfil de expresión del miR-21 en plasma tendió a aumentar en la gestación a término en yeguas con o sin placentitis, pero el aumento no fue significativo en ningún tipo de yeguas ($p > 0.05$). Tampoco existieron diferencias entre las yeguas con y sin placentitis. (Figura 4.).

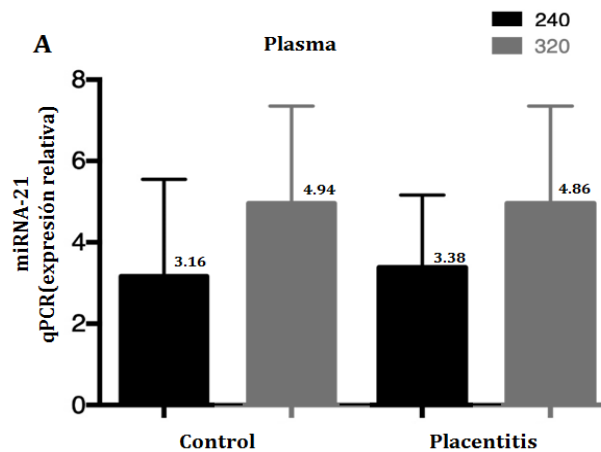


Figura 4. Perfil de expresión del miRNA-21 en plasma de yeguas control y en las yeguas con placentitis. No existieron diferencias significativas ni entre etapas de la gestación ni entre yeguas con o sin placentitis ($p > 0.05$).

5.5 Expresión del miRNA-374 en plasma

Aunque la expresión del miR-374 en plasma a los 320 días fue dos veces mayor en las yeguas con placentitis que en aquellas sin placentitis, la diferencia no fue significativa ($p>0.05$). Tampoco hubo diferencias significativas entre los tipos de yegua ni a los 240 ni a los 320 días (Figura 5).

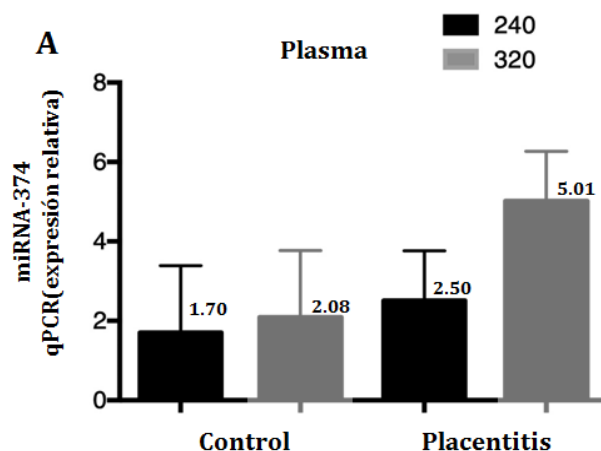


Figura 5. Perfil de expresión del miRNA-374 en plasma de yeguas con y sin placentitis. Las diferencias entre etapas de la gestación o entre grupos no son significativas ($p>0.05$).

5.6 Expresión de los miRNAs en placenta

Para escoger las muestras de tejido sano y con lesiones de las placentas al parto tanto en yeguas sanas con placentitis nos basamos en la evaluación macroscópica (Figura 1) y de la histopatología (Figura 6).

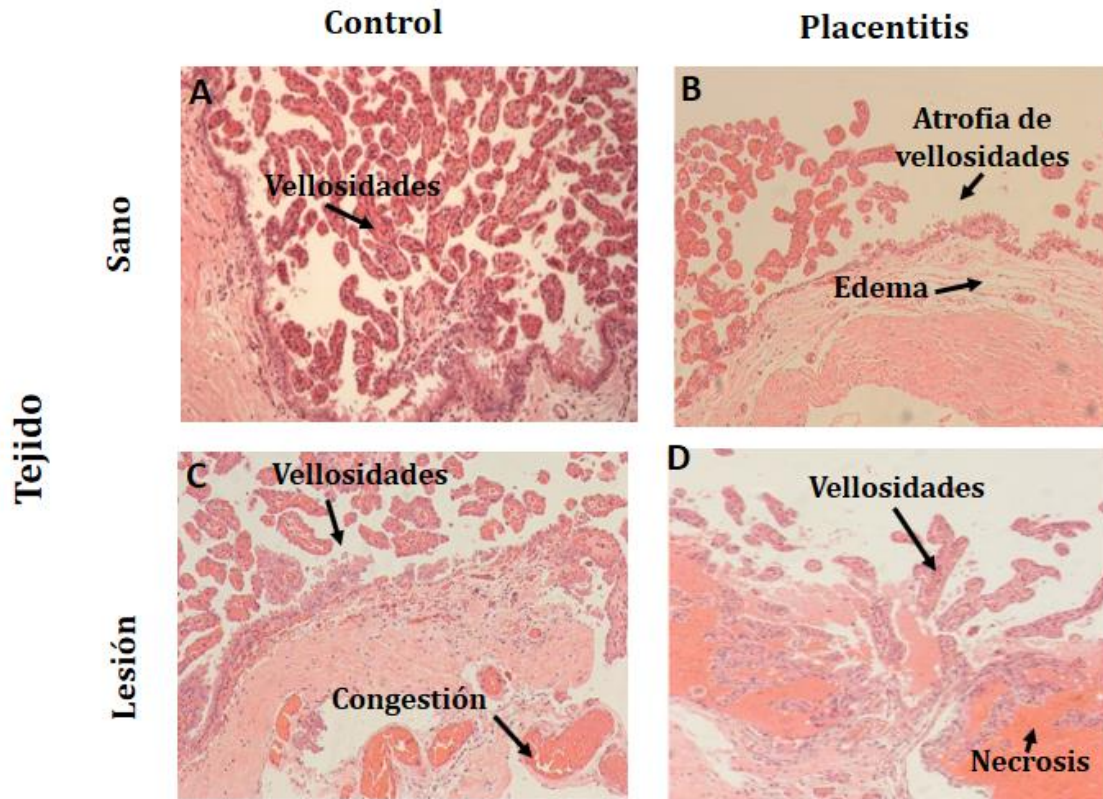


Figura 6. Histopatología del tejido sano y con lesión de las placentas de yeguas control y yeguas con placentitis. A) Tejido control sano: vellosesidades ampliamente desarrolladas. B) Tejido control con lesión causada por contacto directo con los posteriores del feto, atrofia de vellosesidades y edema. C) Tejido placentitis sano: vellosesidades amorfas, con cambios en la base donde está en contacto con tejido conjuntivo, áreas de congestión moderada. D) Tejido de placentitis con lesión: necrosis que rodea a las vellosesidades desde su base, desprendimiento de las mismas.

5.6.1 miRNA-21

Las diferencias en la expresión de miR-21 entre áreas sanas o áreas con lesión de placentas derivadas de gestaciones normales o de gestaciones con placentitis no fueron significativas ($p > 0.05$). (Figura 7).

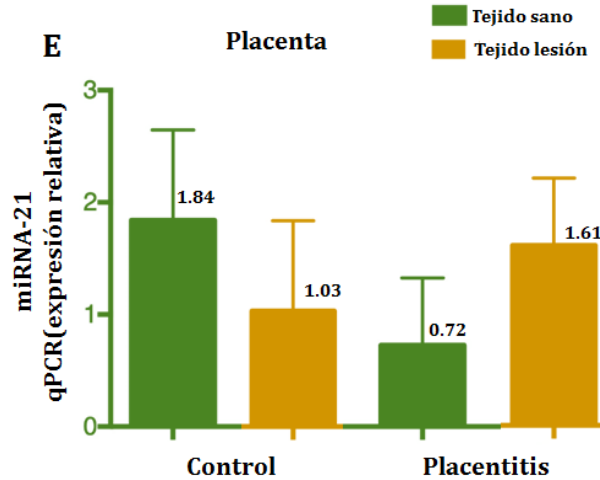


Figura 7. Perfil de expresión del miR-21 de los tejidos al parto en los grupos de yeguas control y yeguas con placentitis. Las diferencias entre áreas de tejido sano y áreas de tejido con lesiones no fueron significativas para ningún tipo de gestación ($p > 0.05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre tejidos de gestaciones normales o con placentitis.

5.6.2 miRNA-374

La expresión del miRNA-374 en áreas de tejido lesionadas de las yeguas sin placentitis (yeguas control) disminuyó significativamente con respecto al tejido control sano ($p < 0.05$; Figura 8). Cabe mencionar que la presencia de áreas con lesiones en placentas sanas es una consecuencia normal del contacto directo que tienen los miembros posteriores del feto con la placenta (evento no patológico).

Tanto las áreas sin lesiones como las áreas lesionadas de placentas con placentitis tuvieron una expresión de miRNA-374 significativamente menor ($p < 0.05$) que las áreas sanas de placentas control (Figura 8). Dentro del grupo de placentitis, la expresión de miRNA-374 no fue significativamente diferente entre áreas lesionadas y áreas sanas de la placenta ($p > 0.05$)

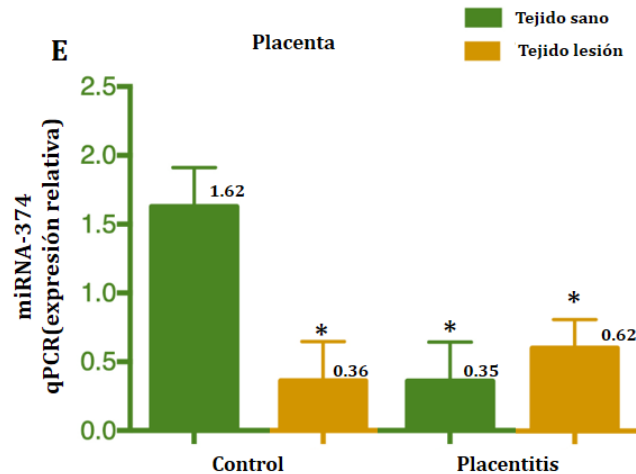


Figura 8. Perfil de expresión del miR-374 en áreas de tejidos placentarios sanos o lesionados en yeguas control y yeguas con placentitis. La expresión del miRNA en tejidos con placentitis, ya sea sanos o con lesión fue significativamente menor en comparación con el tejido control sano. También fue significativamente menor en el tejido con lesión del grupo control que en el tejido sano del mismo grupo ($p < 0.05$).

5.7 Expresión de los miRNAs en áreas lesionadas o sanas de placentas con placentitis y su relación con la viabilidad del potro

En el grupo de yeguas con placentitis se determinó la relación entre la expresión de cada miRNA en áreas lesionadas o sanas de la placenta y la viabilidad de sus potros al parto. Para esto, los potros fueron clasificados como: potros sanos vivos, potros sépticos vivos o potros sépticos muertos. La determinación de las áreas lesionadas o sanas se realizó con base en la evaluación macroscópica (Figura 1) y la histopatología de los tejidos (Figura 9).

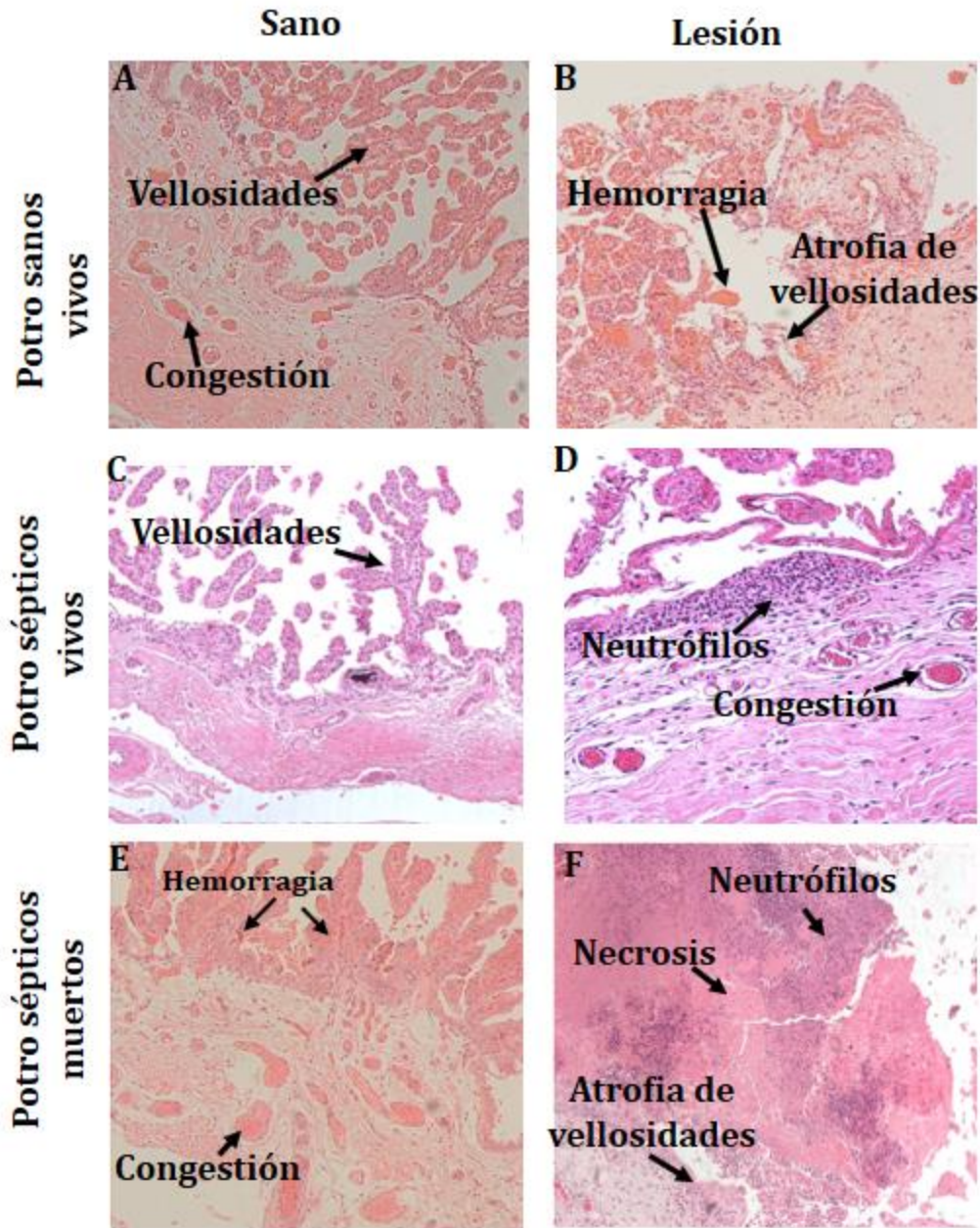


Figura 9. Histopatología de la placenta. Imágenes representativas de tejido sano o con lesión en la placenta de yeguas con placentitis que tuvieron potros sanos, sépticos vivos o sépticos muertos. A) Tejido sano de la placenta de un potro sano vivo: congestión moderada. B) Tejido con lesión de la placenta de un potro sano vivo: atrofia de vellosidades y se observan hemorrágicas. C) Tejido sano de la placenta de un potro séptico vivo: vellosidades amorfas. D) Tejido con lesión de la placenta de un potro séptico vivo: placentitis supurativa con predominancia de neutrófilos en la base de las vellosidades; atrofia severa de vellosidades y congestión. E) Tejido sano de la placenta de un potro séptico muerto: vellosidades rodeadas por necrosis y hemorragia desde la base. F) Tejido con lesión de la placenta de un potro séptico muerto: Ausencia de vellosidades y placentitis necrosupurativa con predominancia de neutrófilos.

5.7.1 miRNA-21

No hubo diferencias significativas en la expresión del miR-21 ni entre tipo de tejido (sano o lesionado) ni entre placentas de potros sanos, sépticos vivos o sépticos muertos (Figura 10).

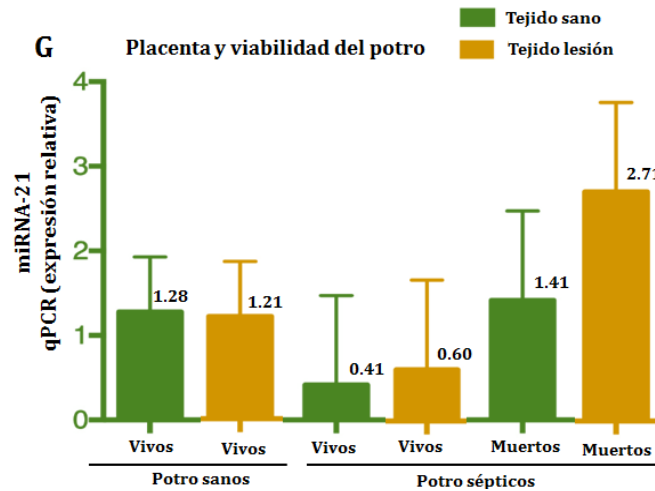


Figura 10. Perfil de expresión del miR-21 en áreas de tejido placentario sanas o con lesión de yeguas con placentitis que parieron potros sanos vivos, sépticos vivos o muertos. Las diferencias entre grupos o entre tipos de tejido no son significativas ($p > 0.05$).

5.7.2 miRNA-374

No existió diferencia en la expresión de miRNA-374 ni entre tejidos sanos y lesionados, ni entre tejidos placentarios de los diferentes tipos de potros ($p > 0.05$). Aunque el promedio más alto se encontró en áreas de tejido placentario sano de potros vivos sanos, las diferencias entre este grupo y cualquier otro no fueron significativas ($p > 0.05$).

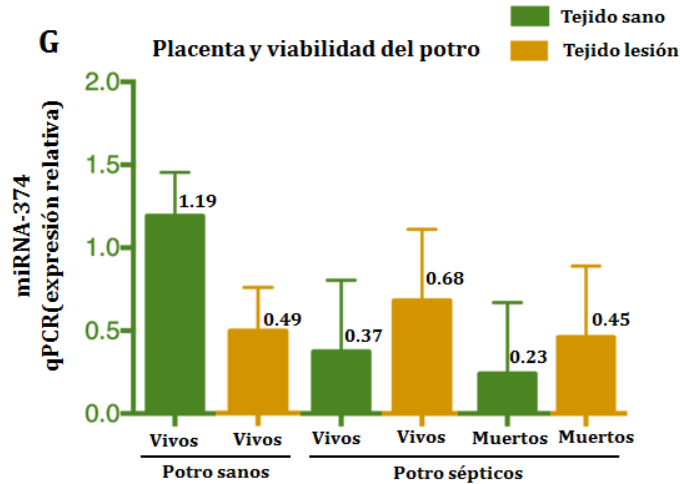


Figura 11. Perfil de expresión del miR-374 en los tejidos Fig. 5A-F de yeguas con placentitis que parieron potros sanos vivos, sépticos vivos o muertos. No existieron diferencias significativas ($p > 0.05$).

6. DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han reportado la utilidad de la determinación de las concentraciones de α -feto proteína como prueba diagnóstica rutinaria en mujeres embarazadas para detectar condiciones del feto incompatibles con la vida, así como anomalías infecciosas e inflamatorias de la placenta (Mizejewski, 2004, 2007, 2015). Los defectos en el tubo neural y las anomalías del desarrollo no son comunes en embriones y fetos equinos, pero las yeguas son propensas a infecciones cervicales y uterinas que afectan la placenta, con mayor frecuencia a partir del segundo tercio de la gestación, lo que pone en riesgo el bienestar y el desarrollo del feto. (Cummins et al., 2008).

Se han descrito niveles elevados de eqAFP en yeguas con problemas como reabsorción embrionaria, gestaciones gemelares y abortos (Sorensen, Neely, Read, & Grapell, 1990). La determinación de eqAFP también se ha propuesto como un marcador de patologías placentarias en el último tercio de la gestación, ya que se han encontrado niveles elevados de la proteína en la sangre materna y en los fluidos fetales en gestaciones que cursan con placentitis (Canisso et al., 2015; Sorensen et al., 1990; Vincze et al., 2018).

Los resultados del presente trabajo confirman la asociación entre la presencia de placentitis y las concentraciones de eqAFP en la sangre materna, así como el posible papel de la determinación de eqAFP como marcador temprano del desarrollo de placentitis, ya que en las muestras obtenidas en el día 240 de la gestación se observó un incremento significativo en la concentración de eqAFP en las yeguas que posteriormente desarrollaron signos clínicos o histopatológicos de placentitis, tales como desarrollo prematuro de la ubre a partir del día 270 de la gestación, secreción vaginal a partir del día 300 de la gestación, placenta previa, aborto o cambios morfológicos e histológicos del tejido corioalantoideo detectados al momento del parto, (Fig. 2).

Tanto Sorensen et al (1990) como Vincze et al (2018) encontraron que las concentraciones de eqAFP en yeguas sin signos de patología placentaria aumentan conforme avanza la gestación. Solo durante la semana previa al parto se produce una drástica reducción en las concentraciones de AFP, Vincze et al. (2018). En el presente trabajo también se encontró que las yeguas sanas tendieron a tener niveles más elevados de eqAFP a los 320 días de gestación en comparación con el día 240, aunque la diferencia no fue significativa ($p < 0.05$), lo que podría deberse al pequeño número de gestaciones sin placentitis que fueron estudiadas. Al igual que en mujeres, se desconoce la causa del aumento en las concentraciones de AFP conforme avanza la gestación. Por otra parte, en el presente trabajo no se evaluaron las concentraciones de AFP en los potros neonatos, pero otros autores han reportado que en la circulación de potros sanos las concentraciones de la proteína están elevadas al nacer y decrecen durante la primera semana de vida, a diferencia de los potros que muestran signos de patología en este mismo periodo, los que mantienen concentraciones elevadas de eqAFP durante las primeras 24 a 48 h de nacidos (Prell et al., 2016).

En el presente trabajo se demostró que tanto a los 240 como a los 320 días de gestación las concentraciones de AFP en la sangre materna son significativamente

más elevados en las yeguas destinadas a parir un potro séptico que muestra signos de enfermedad durante las primeras 24 h de vida y muere, comparado con las yeguas que parirán potros viables (Fig.3). Por esta razón, se propone que la determinación de eqAFP en la circulación materna pudiera ser considerada como una prueba diagnóstica complementaria para predecir a partir de los 240 días de gestación tanto el desarrollo de placentitis clínica como una posible falta de viabilidad del producto al concluir la gestación. Sin embargo, se necesita más estudios, con un mayor número de yeguas, para poder evaluar la eficiencia, precisión y valor predictivo de este posible método diagnóstico.

Por otro lado, los miRNAs se han reportado como importantes reguladores de las funciones celulares y de los tejidos, incluyendo la activación e inhibición del proceso inflamatorio modulado por el sistema inmunológico (Tahamtan et al., 2018). El miR-21 es un regulador importante del TLR-4 por medio de la cascada de señalización MyD88 y NF- κ B para la síntesis de citocinas pro y anti inflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10). Ha sido principalmente estudiado en macrófagos y reportados también en células del trofoblasto (Alam & O'Neill, 2011; Kamity et al., 2019; Luke A. O'Neill et al., 2011). Sin embargo, en el presente trabajo no fue posible encontrar ninguna asociación entre la expresión de miRNA-21 en los tejidos placentarios o sus niveles en la circulación materna y el desarrollo de placentitis o la viabilidad de los potros al nacimiento (Figs. 4, 7 y 10).

En mujeres con gestaciones sanas y trabajo de parto activo (horas antes de expulsar al feto) se ha reportado que la expresión del miR-21 disminuye significativamente en comparación con mujeres sin trabajo de parto. En el mismo estudio se reportó que en las mujeres con un proceso de corioamnionitis también disminuye la expresión del miR-21 comparado con las mujeres sin trabajo de parto, sin embargo, aumentaba significativamente en comparación con las mujeres que tienen un trabajo de parto activo normal (García-Rodríguez, Sánchez-González, Osorio-Caballero, Díaz, & Herrera, 2018).

En el presente trabajo se observó una tendencia no significativa ($p > 0.05$) a una mayor expresión de miRNA-21 en las áreas lesionadas de las placentas de los potros no viables (Fig.10), lo que podría indicar que la placentitis efectivamente desencadena la respuesta inflamatoria mediada por el miRNA-21. Sin embargo, aún en el caso de confirmarse esta diferencia en estudios futuros, no serviría como un marcador durante la gestación, ya que estaría limitado a ser detectado en placentas obtenidas después del parto, ya que no se encontró ninguna asociación entre las concentraciones de miRNA-21 en sangre materna durante la gestación y la presencia o ausencia de placentitis.

Se ha demostrado que el miRNA-374 en tejido adiposo regula mRNAs involucrados en las vías del proceso inflamatorio, incluida la señalización de la IL-17A, la adhesión de granulocitos y la diapédesis (Doumatey et al., 2018), así como procesos de hipoxia y angiogénesis (Looney et al., 2015). Se ha informado que en yeguas con gestaciones sanas, la expresión de miRNA-374 es mayor a los 300 días en comparación con los 240 días de gestación (Loux et al., 2017). Los resultados del presente trabajo sugieren que este aumento entre el día 240 y el último mes de la gestación es más marcado en las yeguas con placentitis (Fig.5) en comparación con gestaciones sanas, lo que reforzaría el posible valor de este miRNA como un marcador de placentitis en etapas avanzadas de la gestación. Sin embargo, es interesante observar que la expresión de este miRNA disminuyó significativamente en los tejidos de placentas con placentitis y aún en las áreas lesionadas de placentas sanas en comparación con las áreas sanas de placentas sanas. Esto podría indicar que la elevación en la sangre materna de yeguas con placentitis no se debe a un aumento en la transcripción de estos miRNAs en la placenta, sino en un mayor paso hacia la circulación materna desde los tejidos lesionados. Otra posibilidad sería que en la placentitis o en áreas lesionadas de la placenta se produzca un efecto bifásico, con mayor expresión que en placentas sanas durante la gestación avanzada y menor expresión en la placenta a término. Por otra parte, en el presente trabajo también se determinó que la expresión de este miRNA en los tejidos placentarios de potros sépticos vivos y muertos tendió a ser

menor que la expresión en áreas sanas de las placentas de los potros sanos (Fig.11).

En este estudio se esperaba que el patrón de expresión de cada miRNA fuera similar en la circulación materna y en la placenta, lo que no ocurrió. Sin embargo, debe mencionarse que este estudio tiene limitantes. La primera se refiere al número de reducido número de yeguas en cada categoría. La segunda limitante es que no se estudiaron placentitis inducidas experimentalmente, sino casos ocurridos espontáneamente en una población propensa a desarrollar problemas placentarios debido al ambiente en el que vive, lo que aumenta la variabilidad en los resultados y dificulta establecer valores de referencia en cuanto al nivel y expresión de cada marcador evaluado. Por otra parte, las muestras de sangre materna fueron obtenidas a los 240 y 320 días de la gestación, mientras que las muestras para histopatología de la placenta se obtuvieron una vez ocurrido el parto, por lo que no se puede hacer una comparación contemporánea entre las variables en sangre materna y en placenta. Las muestras tomadas durante la gestación representan un registro obtenido al inicio o durante el progreso de la placentitis, mientras que las muestras de tejidos obtenidos después del parto indican el estado de la placenta después de haber sufrido el proceso inflamatorio.

Diversos modelos experimentales de infección de placenta en equinos han demostrado el efecto de la inoculación con bacterias patógenas sobre la inducción de placentitis (Carrick, 2010; Ousey, 2006). Haciendo una revisión sistemática en diversas bases de datos internacionales se encontraron pocas publicaciones que describan el seguimiento y evaluación de la gestación en yeguas Pura Sangre Inglés, así como la identificación de factores de riesgo en yeguas con problemas placentarios desarrollados espontáneamente, por lo que a pesar de sus limitantes el presente estudio es novedoso, ya que describe el cambio en la expresión de dos miRNAs de posible interés, y el aumento en las concentraciones de la eqAFP durante el desarrollo de la placentitis no inducida.

7.CONCLUSIÓN

- 1) Es factible detectar aumentos significativos en las concentraciones de eqAFP por lo menos 60 días antes de que se observen signos clínicos de placentitis.
- 2) Un estudio posterior con mayor número de yeguas podría confirmar o negar la posibilidad de utilizar una elevación en los niveles de miRNA-374 en sangre materna a los 300 días de gestación como marcador de placentitis.
- 3) La significativa disminución en la expresión del miRNA-374 en tejido placentario con lesiones detectables por histopatología, sugiere que la determinación de este miRNA en tejidos placentarios podría complementar o sustituir el diagnóstico histopatológico de esta condición.
- 3) Estos resultados en conjunto sugieren que algunas de las variables evaluadas en este trabajo pueden ser utilizados como marcadores que aportan información para la evaluación clínica de la gestación y para el desarrollo de índices de riesgo que pueden ser complementarios para diagnóstico de las patologías placentarias y el pronóstico de la viabilidad fetal en yeguas.

8.REFERENCIAS

- Acuña, S. M., Floeter-Winter, L. M., & Muxel, S. M. (2020). MicroRNAs: biological regulators in pathogen-host interactions. *Cells*, 9(1), 113. doi:10.3390/cells9010113
- Ahn, J. H., Kwak, J., Lee, J. H., & Lee, S. S. (2018). Efficient and accurate analysis of microRNA using a specific extension sequence. *Mol Biol Rep*, 45(4), 611-619. doi:10.1007/s11033-018-4200-1
- Alam, M. M., & O'Neill, L. A. (2011). MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. *Eur J Immunol*, 41(9), 2482-2485. doi:10.1002/eji.201141740
- Allen, W. R., Wilsher, S., Stewart, F., Ousey, J., & Fowden, A. (2002). The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. *Journal of Endocrinology* 172, 237–246.
- Antczak, D. F., de Mestre, A. M., Wilsher, S., & Allen, W. R. (2013). The equine endometrial cup reaction: a fetomaternal signal of significance. *Annu Rev Anim Biosci*, 1, 419-442. doi:10.1146/annurev-animal-031412-103703
- Bian, H., Zhou, Y., Zhou, D., Zhang, Y., Shang, D., & Qi, J. (2019). The latest progress on miR-374 and its functional implications in physiological and pathological processes. *J Cell Mol Med*, 23(5), 3063-3076. doi:10.1111/jcmm.14219

- Boeta, A. M. (2018). Equinos. In F. d. M. V. y. Z.-. UNAM (Ed.), *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos* (1ra ed., pp. 503-518). Ciudad de México: Lucía Rangel Porta y Juan H. Hernandez Medrano.
- Cai, M., Kolluru, G. K., & Ahmed, A. (2017). Small molecule, big prospects: microRNA in pregnancy and its complications. *J Pregnancy*, 2017, 15. doi:10.1155/2017/6972732
- Canisso, I. F., Ball, B. A., Scoggin, K. E., Squires, E. L., Williams, N. M., & Troedsson, M. H. (2015). Alpha-fetoprotein is present in the fetal fluids and is increased in plasma of mares with experimentally induced ascending placentitis. *Anim Reprod Sci*, 154, 48-55. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.12.019
- Canisso Igor, D., MSc, PhD, DACT, DECAR*, Barry A. Ball, D., PhD, DACT, Erdal Erol, D. M., PhD, Edward L. Squires, M., PhD, DACT (hon), & Mats H.T. Troedsson, D., PhD, DACT, DECAR. (2015). Comprehensive review on equine placentitis. *AAEP PROCEEDINGS*, 61, 490-509.
- Carrick, J. B. (2010). Placentitis in horses a major cause of late term foetal loss. *Rural Industries Research and Development Corporation*, 10/156(October).
- Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Photini, S. M., Schleussner, E., Markert, U. R., & Morales-Prieto, D. M. (2015). Dissimilar microRNA-21 functions and targets in trophoblastic cell lines of different origin. *Int J Biochem Cell Biol*, 68, 187-196. doi:10.1016/j.biocel.2015.08.018
- Conley, A. J. (2016). Review of the reproductive endocrinology of the pregnant and parturient mare. *Theriogenology*, 86(1), 355-365. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.049
- Coutinho da Silva, M. A., Canisso, I. F., MacPherson, M. L., Johnson, A. E., & Divers, T. J. (2013). Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Vet J*, 45(5), 619-624. doi:10.1111/evj.12034
- Cummins, C., Carrington, S., Fitzpatrick, E., & Duggan, V. (2008). Ascending placentitis in the mare: A review. *Irish Veterinary Journal* 61(5), 303-313.
- Doumatey, A. P., He, W. J., Gaye, A., Lei, L., Zhou, J., Gibbons, G. H., . . . Rotimi, C. N. (2018). Circulating MiR-374a-5p is a potential modulator of the inflammatory process in obesity. *Sci Rep*, 8(1), 7680. doi:10.1038/s41598-018-26065-5
- García-Rodríguez, A., Sánchez-González, C. M., Osorio-Caballero, M., Díaz, N. F., & Herrera, H. F. (2018). Expresión de microRNAs asociados con corioamnionitis en suero materno. *Ginecología y Obstetricia de México*, 86(3), 174-185. doi:10.24245/gom.v86i3.1809
- Gold, J. R., Chaffin, K., Burgess, B. A., & Morley, P. S. (2016). Factors associated with nonsurvival in foals diagnosed with perinatal asphyxia syndrome. *Journal of Equine Veterinary Science*, 38, 82-86. doi:10.1016/j.jevs.2015.12.004
- Hollis, A. R., & Starkey, M. P. (2018). MicroRNAs in equine veterinary science. *Equine Vet J*, 50(6), 721-726. doi:10.1111/evj.12954
- Hong, C. B., Donahue, J. M., Giles, R. C., Murphy, M. B. P., Poonacha, K. P., Roberts, A. W., . . . Swerczek, T. W. (1993). Etiology and pathology of equine placentitis. *J Vet Diagn Invest*, 5, 56-63.
- Kamity, R., Sharma, S., & Hanna, N. (2019). MicroRNA-mediated control of inflammation and tolerance in pregnancy. *Front Immunol*, 10, 718. doi:10.3389/fimmu.2019.00718
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(2), 126-139. doi:10.1038/nrm2632
- Kumarswamy, R., Volkman, I., & Thum, T. (2011). Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol*, 8(5), 706-713. doi:10.4161/rna.8.5.16154
- Looney, A. M., Walsh, B. H., Moloney, G., Grenham, S., Fagan, A., O'Keeffe, G. W., . . . Murray, D. M. (2015). Downregulation of umbilical cord blood levels of miR-374a in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *J Pediatr*, 167(2), 269-273 doi:10.1016/j.jpeds.2015.04.060

- Loux, S. C., Fernandes, C. B., Dini, P., Wang, K., Wu, X., Baxter, D., . . . Ball, B. A. (2019). Small RNA (sRNA) expression in the chorioallantois, endometrium and serum of mares following experimental induction of placentitis. *Reprod Fertil Dev*, *31*(6), 1144-1156. doi:10.1071/RD18400
- Loux, S. C., Scoggin, K. E., Bruemmer, J. E., Canisso, I. F., Troedsson, M. H., Squires, E. L., & Ball, B. A. (2017). Evaluation of circulating miRNAs during late pregnancy in the mare. *PLoS One*, *12*(4), e0175045. doi:10.1371/journal.pone.0175045
- Luke A. O'Neill, Sheedy, F. J., & McCoy, C. E. (2011). MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, *11*(3), 163-175. doi:10.1038/nri2938
- Lyle, S. K. (2014). Immunology of infective preterm delivery in the mare. *Equine Vet J*, *46*(6), 661-668. doi:10.1111/evj.12243
- Macpherson, M. L., & Bailey, C. S. (2008). Treating the Mare with Placentitis: A Clinical Approach. *Journal of Equine Veterinary Science*, *28*(11), 703-708. doi:10.1016/j.jevs.2008.10.008
- Medrano, J. H. H. (2018). Edocrinología y diagnóstico de gestación. In F. d. M. V. y. Zootecnia-UNAM (Ed.), *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos* (1ra ed., pp. 207-214). Ciudad de México: Lucía Rangel Porta y Juan H. Hernández Medrano.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*(7203), 428-435. doi:10.1038/nature07201
- Mercado, M. G. M., Morales, M. A. P., & Galindo, E. A. Z. (2015). Estructura y función de la alfa-feto proteína. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, *58*(Julio-Agosto), 5-13.
- Mizejewski, G. J. (2004). Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development. *Experimental Biology and Medicine*, *229*, 439-463.
- Mizejewski, G. J. (2007). Physiology of alpha-fetoprotein as a biomarker for perinatal distress: relevance to adverse pregnancy outcome. *Exp Biol Med (Maywood)*, *232*(8), 993-1004. doi:10.3181/0612-MR-291
- Mizejewski, G. J. (2015). Alpha-fetoprotein (AFP) and inflammation: is AFP an acute and/or chronic phase reactant? *Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases*, *03*(01), 191. doi:10.4172/2329-8790.1000191
- Morresey, P. R. (2005). Prenatal and Perinatal Indicators of Neonatal Viability. *Clinical Techniques in Equine Practice*, *4*(3), 238-249. doi:10.1053/j.ctep.2005.07.005
- Morris, S., Kelleman, A. A., Stawicki, R. J., Hansen, P. J., Sheerin, P. C., Sheerin, B. R., . . . LeBlanc, M. M. (2007). Transrectal ultrasonography and plasma progesterone profiles identifies fetoplacental compromise in mares with experimentally induced placentitis. *Theriogenology*, *67*(4), 681-691. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.05.021
- Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2015). MicroRNAs in placental health and disease. *Am J Obstet Gynecol*, *213*(4 Suppl), S163-172. doi:10.1016/j.ajog.2015.05.057
- Ousey, J. C. (2006). Hormone profiles and treatments in the late pregnant mare. *Vet Clin North Am Equine Pract*, *22*(3), 727-747. doi:10.1016/j.cveq.2006.08.004
- Ousey, J. C., Houghton, E., Grainger, L., Rosedale, P. D., & Fowden, A. L. (2005). Progesterone profiles during the last trimester of gestation in Thoroughbred mares with normal or compromised pregnancies. *Theriogenology*, *63*(7), 1844-1856. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.08.010
- Pabón-Martínez, Y. V. (2011). MicroARNs: una visión molecular *Salud UIS* *43*, 289-297.
- Parslow, T. G., Stites, D. P., Terr, A. I., & Imboden, J. B. (2002). *Inmunología Básica y Clínica* (D. L. F. Gil Ed. Decima ed.). México D.F.
- Pasquel, S. G., & Daba, M. M. (2011). *Neonatología Equina* Buenos Aires, Argentina: Inter-Medica.

- Potapovich, A. I., Pastore, S., Kostyuk, V. A., Lulli, D., Mariani, V., De Luca, C., . . . Korkina, L. G. (2009). alpha-fetoprotein as a modulator of the pro-inflammatory response of human keratinocytes. *Br J Pharmacol*, *158*(5), 1236-1247. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00401.x
- Prell, M., Canisso, I. F., Schnobrich, M., Riddle, T., Ellerbrock, R. E., & Wilkins, P. (2016). Alpha-fetoprotein as a marker for equine neonatal disease. *Proceedings of the Society for Theriogenology Annual Conference, Asheville, NC, USA*
- Roa, I., Smok, S. C., & Prieto, G. R. (2012). Placenta: anatomía e histología comparada. *Int. J. Morphol*, *30* (4), 1490-1496.
- Ryan, P. L., Christiansen, D. L., Hopper, R. M., Bagnell, C. A., Vaala, W. E., & Leblanc, M. M. (2009). Evaluation of systemic relaxin blood profiles in horses as a means of assessing placental function in high-risk pregnancies and responsiveness to therapeutic strategies. *Ann N Y Acad Sci*, *1160*, 169-178. doi:10.1111/j.1749-6632.2008.03802.x
- Shikichi, M., Iwata, K., Ito, K., Miyakoshi, D., Murase, H., Sato, F., . . . Nambo, Y. (2017). Abnormal pregnancies associated with deviation in progesterin and estrogen profiles in late pregnant mares: A diagnostic aid. *Theriogenology*, *98*, 75-81. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.04.024
- Sohn, E. J., Won, G., Lee, J., Lee, S., & Kim, S. H. (2015). Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b mediates the anti-angiogenic properties of melatonin in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. *J Cancer*, *6*(1), 19-28. doi:10.7150/jca.9591
- Sorensen, K., Neely, D. P., Read, W., & Grapell, P. M. (1990). Measurement and clinical significance of equine fetal protein in pregnant mares serum. *Equine Veterinary science*, *10*, 417-421.
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, *5*(6), 463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177
- Szabat, M., & Kierzek, R. (2017). Parallel-stranded DNA and RNA duplexes - structural features and potential applications. *FEBS J*, *284*(23), 3986-3998. doi:10.1111/febs.14187
- Tahamtan, A., Teymouri-Rad, M., Nakstad, B., & Salimi, V. (2018). Anti-inflammatory microRNAs and their potential for inflammatory diseases treatment. *Front Immunol*, *9*, 1377. doi:10.3389/fimmu.2018.01377
- Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2010). *Introducción a la Biotecnología* (M. M. Romo Ed.). Madrid, España: PEARSON EDUCACIÓN, S.A. .
- Torres Courchoud, I., & Perez Calvo, J. I. (2016). Biomarcadores y práctica clínica. *An Sist Sanit Navar*, *39*(1), 5-8. doi:10.4321/S1137-6627/2016000100001
- Vincze, B., Gaspardy, A., Kulcsar, M., Baska, F., Balint, A., Hegedus, G. T., & Szenci, O. (2015). Equine alpha-fetoprotein levels in Lipizzaner mares with normal pregnancies and with pregnancy loss. *Theriogenology*, *84*(9), 1581-1586. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.08.006
- Vincze, B., Solymosi, N., Debnar, V., Kutvolgyi, G., Kriko, E., Wolfling, A., & Szenci, O. (2018). Assessment of equine alpha-fetoprotein levels in mares and newborn foals in the periparturient period. *Theriogenology*, *122*, 53-60. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.08.026
- Wang, Z., Liu, Y., Shao, M., Wang, D., & Zhang, Y. (2018). Combined prediction of miR-210 and miR-374a for severity and prognosis of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Behav*, *8*(1), e00835. doi:10.1002/brb3.835
- Wilsher, S. (2005). The fetal foal: placenta. *Equine vet. J.*, 22-25.
- Zarco, L. (2018). Diferenciación sexual. In F. d. M. y. Zootecnia-UNAM (Ed.), *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos* (1ra ed., pp. 35-47). Ciudad de México: Lucia Rangel y Juan H. Hernández.

