UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

PROTEÍNAS DE SHOCK TÉRMICO Y FACTORES REGULADORES DE SHOCK TÉRMICO EN EL ENDOMETRIO DE YEGUAS

ANA LAURA CAMACHO BENITEZ

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2024

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

PROTEÍNAS DE SHOCK TÉRMICO Y FACTORES REGULADORES EN ENDOMETRIO DE YEGUAS

Inmunoexpresión endometrial de la proteína de shock térmico HSP90 y su factor de transcripción HSF-1 en la endometritis post inseminación en yeguas

ANA LAURA CAMACHO BENITEZ

Graciela Pedrana
Director de Tesis

Nicolás Cazales
Co-director

AÑO
2024

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Irene Kalpokas, Doctora en Ciencias Veterinarias,
Universidad de la República,
Casa de la Universidad de Cerro Largo, Tecnólogo en Producción Equina
Uruguay

Sandra Fiala, Doctora en Ciencias Veterinarias,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Brasil

Gustavo Gastal, Doctor en Medicina Veterinaria,
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela, Plataforma de Salud Animal y Unidad de Lechería
Uruguay

AÑO
2024

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

Centro de Posgrados y Educación Permanente
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

ORIENTACIÓN: Maestría En Reproducción Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 29/11/2024, Aula 103

TRIBUNAL: Dra. Irene Kalpokas, Dra. Sandra Fiala, Dr. Gustavo Gastal.

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.661.340-3	ANA LAURA CAMACHO BENITEZ	MB-MB-S	10

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

Durante la presentación la estudiante mejoró notoriamente la información proporcionada en la versión escrita, contextualizando los criterios de elección de los eventos analizados y sacando mayor provecho de los resultados y la técnica utilizada. Demostró manejo de los antecedentes y del trabajo realizado, respondiendo de forma correcta las preguntas del tribunal. Cuanto al documento escrito, el comité solicitó que la estudiante haga ajustes importantes para la versión final de la tesis.

Irene Kalpokas

Gustavo Gastal

Sandra Fiala

DEDICATORIAS Y/O AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle a mi tutora Graciela Pedrana, por ayudarme a buscar siempre la manera de poder combinar la familia, la profesión, la investigación, y de poder estar en todos lados a la vez, ella es un gran ejemplo de una mujer empoderada.

Gracias a mi co-tutor Nicolas Cazales que me enseñó a trabajar en reproducción, y por siempre darme para adelante.

Le agradezco a Paula Lombide por su tiempo dedicado para realizar este trabajo. A Helen Viotti, a Rossana Vasconsellos, y a todas mis compañeras de Histología.

Gracias a Diego y a Renata por ayudarme a encontrar los tiempos para hacer la maestría, y porque somos un gran equipo.

Gracias a mis padres por ser incondicionales, y por ser el motor que me impulsa en todo lo que me propongo.

Gracias a mis colegas:

Diego Puente por estar siempre disponible para ayudarme en mi trabajo, y por tener la humildad de los grandes.

A Hernán Guerrero por estar siempre para ayudarme con mis casos clínicos.

Mario Bonilla que sin conocerme me abrió las puertas para trabajar en San Carlos y por permitirme ser parte del equipo de su veterinaria.

Gracias a Mulata, Morena y a todos aquellos animales que me impulsaron a hacer lo que hago.

Gracias Dios.

ÍNDICE

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE VETERINARIA 1
DEDICATORIAS Y/O AGRADECIMIENTOS i
ÍNDICE ii
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS v
RESUMEN viii
SUMMARY ix
INTRODUCCIÓN 1
Endometritis post inseminación en la yegua 1
Proteínas de shock térmico HSP90 en la regulación del proceso inflamatorio 1
El factor de transcripción HSF-1 regulador de las proteínas de shock térmico en aparato reproductor de hembras en la mujer 2
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS 3
1. Reproducción en la yegua 3
Ciclo estral 3
2. Anatomía del aparato reproductor de la yegua 4
3. Histología del útero: endometrio, miometrio y perimetrio 5
4. Endometritis 6
5. Mecanismos de regulación del proceso inflamatorio 8
6. Proteínas de shock térmico 9
7. Proteína de shock térmico HSP90 en endometrio 10
8. La interrelación de HSP90 con el factor de transcripción HSF-1 11
9. Factor de shock térmico HSF-1 11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 13
HIPÓTESIS 14
OBJETIVOS 14
1) OBJETIVO GENERAL: 14
2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 14
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN 15
Etapa 1. Estudio del factor de shock térmico 1 (HSF-1) en el endometrio durante el ciclo estral y el anestro en yeguas. 15

Etapa 2. 15

a) Estudio del factor de shock térmico 1 HSF-1 en el endometrio 2 y 4 horas post inseminación artificial 15

b) Estudio de la proteína de shock térmico HSP90 en el endometrio 2 y 4 horas post inseminación artificial 15

MATERIALES Y MÉTODOS 16

Etapa 1 (Fases del ciclo estral y anestro): Estudio del factor de shock térmico 1 (HSF-1) en el endometrio durante el ciclo estral y el anestro en yeguas. 16

Animales y diseño experimental 16

Evaluación por ultrasonografía de ciclo estral 16

Biopsias endometriales 18

Control de ausencia de endometritis por realización de biopsias 18

Procesamiento histológico, microtomía 18

Técnica de inmunohistoquímica 19

Análisis digital de imágenes 20

Análisis estadístico 20

Etapa 2: Endometritis inducida post inseminación 21

Animales y diseño experimental 21

Examen ginecológico, ecografía y citología endometrial para ingreso de yeguas al experimento 21

Inseminación artificial 22

Obtención de muestras endometriales 23

Inmunohistoquímica 23

Captura y digitalización de imágenes endometriales 23

Análisis cuantitativos de imágenes de la inmunoexpresión de HSF-1 y HSP90 en endometrio de yeguas 24

Análisis estadístico 24

RESULTADOS 25

Etapa 1. Evaluación del factor HSF-1 durante el ciclo estral y anestro. 25

1. Expresión del factor de shock térmico HSF-1 en endometrio de yeguas adultas durante las etapas de estro y diestro del ciclo estral y durante el anestro, en el epitelio de revestimiento endometrial y en las glándulas endometriales. 25

Etapa 2.1. Evaluación de HSF-1 en endometritis post inseminación 31

1. Expresión del factor HSF-1 en el epitelio de revestimiento endometrial, glándulas

endometriales en endometritis a las 2 horas y 4 horas post inseminación en yeguas y en el grupo control sin inseminación. 31

Etapa 2. 2. Evaluación de la proteína HSP90 en la endometritis post inseminación 36

2. Expresión de la proteína de shock térmico HSP90 en el epitelio de revestimiento endometrial, glándulas endometriales en endometritis a las 2 horas y 4 horas post inseminación en yeguas adultas y en el grupo control en yeguas. 37

DISCUSIÓN 44

Factor de shock térmico HSF-1 en el endometrio de yeguas en ciclo estral y anestro ... 44

Factor de shock térmico HSF-1 en endometritis en yeguas post inseminación 45

Localización citoplasmática, nuclear de la proteína de shock térmico HSP90 en endometrio de yeguas con endometritis post inseminación. 46

Cuantificación de la inmunoexpresión de HSP90 en endometrio de yeguas con endometritis post inseminación. 47

CONCLUSIONES 50

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Imagen histológica del endometrio de yegua adulta con Hematoxilina-Eosina. Se observa el epitelio de revestimiento (flecha negra), estroma endometrial (asterisco) y glándulas endometriales (flecha blanca). Se observan los núcleos de las células epiteliales y conjuntivas de color azul en los núcleos heterocromáticos (basofilia intensa). El estroma conjuntivo se observa eosinófilo por la presencia de fibras de colágeno de tejido conjuntivo Imagen de la autora. Magnificación final 100 aumentos. Barra de escala 100 micrómetros.

Figura 2. Esquema ilustrativo de etapas reproductivas estro, diestro y anestro definidas por ultrasonografía y palpación rectal. Momento de extracción de biopsias endometriales.

Figura 3. Esquema ilustrativo del diseño experimental 2. Grupo control: con yeguas en estro, grupo 2 horas y grupo 4 horas post inseminación cuando se obtuvieron muestras de endometrio.

Figura 4. Imágenes de inmunohistoquímica de la inmunoexpresión del factor de transcripción HSF-1 en endometrio de yeguas durante anestro (a), estro (b) diestro (c). a) En anestro se observan glándulas endometriales pequeñas con escasa inmunomarcación de HSF-1. b) En estro se observa estroma con edema endometrial. Se localiza la inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento y glándulas endometriales. c) En el diestro se observan las glándulas endometriales de mayor diámetro y la inmunoexpresión de HSF-1 en el citoplasma de las células. d) Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica sustituyendo el anticuerpo primario con suero normal equino. Magnificación 200 aumentos. Barra de escala 100 micrómetros. e) Control positivo de la técnica de inmunohistoquímica con carcinoma de glándula mamaria en perra.

Figura 5. Imágenes a mayor aumento de la localización de la inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento endometrial y en glándulas a mayor aumento en yeguas en anestro (a), estro (b) diestro (c). a) En anestro se observa localización escasa a nivel nuclear del factor HSF-1 (flecha negra). b) En estro a nivel nuclear se detecta una intensa inmunoexpresión de HSF-1 (flecha gris). Se localiza la inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento y glándulas endometriales. c) En el diestro la inmunoexpresión de HSF-1 en el núcleo es intensa (flecha blanca gruesa) y en citoplasmas. d) Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica sustituyendo el anticuerpo primario con suero normal equino. Magnificación 400 aumentos. Barras de escala 50 micrómetros.

Figura 6. Cuantificación de la inmunoexpresión del factor de transcripción HSF-1 en endometrio de yegua. Área inmunomarcada de HSF-1 (%). Los resultados se expresaron como medias ± e.e.m. para el anestro, el estro y el diestro, y en el epitelio de revestimiento (barras negras), en el epitelio glandular (barra gris oscuro), y la suma de ambos epitelios de revestimiento y glandular (gris claro). Se observa mayor inmunoexpresión de HSF-1 en etapa de diestro en ambos epitelios. Los literales diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias significativas entre grupos anestro, estro y diestro ($p < 0,05$).

Figura 7. Imágenes de inmunoexpresión de la proteína HSF-1 en el endometrio de yeguas endometritis post inseminación. a) grupo control sin inseminar. b) grupo de yeguas a las 2 horas post inseminación. c) control negativo de la técnica de inmunohistoquímica sustitución del anticuerpo primario por suero normal equino. Magnificación 200 aumentos. Barra de escala 100 micrómetros.

Figura 8. Inmunoexpresión de la proteína HSF-1 en el endometrio de yeguas en estro a las 4 horas post inseminación. a) Imagen a menor aumento de endometrio donde se observa HSF-1 en epitelio y glándulas y estroma endometrial. Barra de escala 100 micrómetros. b) Imagen a mediano aumento de endometrio donde se observa leve marcación de HSF-1. Barra de escala 50 micrómetros. c) Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica sin anticuerpo primario. Magnificación 200 aumentos. Barra de escala 50 micrómetros.

Figura 9. Cuantificación del área inmunomarcada del factor de transcripción HSF-1 en el endometrio de yeguas. Los datos representan el porcentaje de área inmunomarcada (media ± e.e.m) en grupo control yeguas en estro sin inseminar, 2 horas: grupo de yeguas a las 2 horas post inseminación y 4 horas: grupo a las 4 horas post inseminación artificial, en el epitelio de revestimiento (barras negras), en el epitelio glandular (barra gris oscuro), y la suma de ambos epitelios de revestimiento y glandular (gris claro). Se observa mayor inmunoexpresión de HSF-1 en el grupo control en las glándulas endometriales, disminuyendo a las 2 y a las 4 horas. Las letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias significativas entre grupos control, 2 horas y 4 horas post inseminación ($p < 0,05$).

Figura 10. Imágenes de técnica de inmunohistoquímica con inmunoexpresión de la proteína HSP90 en el endometrio de yeguas en estro a las 2 horas post inseminación. a) Imagen a 100 aumentos del endometrio donde se observa intensa marcación de color marrón a nivel del

epitelio de revestimiento y glandular. Barra de escala 100 micrómetros. b) Imagen 400 aumentos se observa la localización citoplasmática y nuclear de HSP90 de color marrón. La inmunoexpresión de HSP90 en las células del epitelio de revestimiento endometrial (flecha negra) y en las células del epitelio glandular (flecha blanca). Asimismo, los fibroblastos y otras células como leucocitos agranulocitos, linfocitos, pertenecientes a las células del tejido conjuntivo laxo del estroma endometrial presentaron una intensa inmunomarcación (círculo). Barra de escala 50 micrómetros.

Figura 11. Inmunoexpresión de HSP90 en el endometrio de yeguas en estro a las 4 horas post inseminación. a) Endometrio de yeguas donde se observa el epitelio de revestimiento y las glándulas de color marrón indicando la presencia de HSP90. Se observa además el edema endometrial característico del estro, que es más notorio en la región más profunda del endometrio. Magnificación 100 aumentos. Barra de escala 100 micrómetros. b) Se observa la localización citoplasmática en las células epiteliales glandulares (flecha blanca) y marcación nuclear en algunas células (flechas negras). Además, se observa un aumento de la celularidad alrededor de las glándulas endometriales con fibroblastos positivos a HSP90 (flechas segmentadas). Magnificación 400 aumentos. Barra de escala 50 micrómetros.

Figura 12. Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en el grupo control en estro sin inseminar de yeguas adultas. a) Imagen representativa de endometrio de yegua en estro donde se observa la inmunoexpresión en núcleos de células del epitelio de revestimiento y en células epiteliales glandulares. b) Imagen representativa de zonas donde la HSP90 se expresó a nivel del citoplasma de las células. c) Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Magnificación 400 aumentos. Barra de escala 50 micrómetros.

Figura 13. Cuantificación del área inmunomarcada de la proteína HSP90 en el endometrio de yeguas. Los datos representan el porcentaje de área inmunomarcada (media ± e.e.m) en grupo control (yeguas en estro sin inseminar), grupo a las 2 horas post inseminación (2 horas) y grupo a las 4 horas post inseminación (4 horas), y en el epitelio de revestimiento (barras negras), en el epitelio glandular (barra gris oscuro), y la suma de ambos epitelios de revestimiento y glandular (gris claro). Se observa mayor inmunoexpresión de HSP90 en el grupo 2 horas en las glándulas endometriales y en el total del endometrio, disminuyendo a las 4 horas y con respecto al grupo control. Las letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias significativas entre grupos control, 2 horas y 4 horas post inseminación ($p < 0,05$).

RESUMEN

La endometritis persistente post-servicio es una de las principales causas de muerte embrionaria temprana en la yegua. Estudios previos han determinado que las proteínas de shock térmico como la proteína de shock térmico 90 (HSP90) y el factor de shock térmico 1 (HSF-1) están involucradas en los mecanismos reguladores de la inflamación. Recientemente hemos descrito cambios en la inmunoexpresión de la HSP90 en el endometrio de yeguas, lo que sugiere un papel regulador durante el ciclo estral. Asimismo, la HSP90 está regulada por el factor HSF-1. Sin embargo, hasta donde sabemos no se han realizado estudios de la expresión de ambas proteínas HSP90 y HSF-1 en la endometritis fisiológica post-inseminación. Por lo tanto, en una primera etapa se analizó la inmunoexpresión de HSF-1 en biopsias de endometrio de yeguas sanas durante el estro (n=5), el diestro (n=7) y el anestro (n=7). En una segunda etapa se analizó la inmunoexpresión de las proteínas HSF-1 y HSP90 en el endometrio de yeguas a las 2 (n=8) y 4 horas (n=6) post-inseminación, y en estro sin inseminar (grupo control: n=16). Se determinó la localización y se cuantificó la inmunoexpresión, porcentaje de área inmunomarcada (%) de HSF-1 y HSP90 en el epitelio de revestimiento y en las glándulas endometriales por inmunohistoquímica y análisis de imágenes (FIJI). Durante el ciclo estral y el anestro el factor HSF-1 se inmunoexpresó en el epitelio de revestimiento y en las glándulas endometriales, a nivel del citoplasma y a nivel nuclear. La inmunoexpresión de HSF-1 fue mayor en el diestro en comparación con el estro y el anestro (7,9 ± 0,2%, 5,1 ± 0,2%, 1,9 ± 0,2%; p<0,0001). La inmunoexpresión de HSF-1 a las 2 y 4 horas post-inseminación se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma del epitelio del revestimiento endometrial y de las glándulas endometriales. La inmunoexpresión de HSF-1 a las 2 horas post-inseminación fue menor con respecto al grupo control (2,34 ± 0,35%, 5,13 ± 0,19%; p<0,0001). La inmunoexpresión de HSP90 fue mayor en las glándulas endometriales a las 2 y 4 horas post-inseminación (4,92 ± 0,24%, 3,72 ± 0,37%) en comparación con el grupo control (1,62 ± 0,28%; p= 0,0001). Esto indica un aumento de HSP90 a las 2 horas post inseminación mientras que a las 4 h post inseminación disminuye. La localización del HSF-1 en el citoplasma sugiere la acción de chaperona, y la localización en el núcleo implica procesos reguladores del ADN como factor de transcripción. Hasta donde sabemos, esta es la primera descripción de la localización celular y tisular del HSF-1 y HSP90 en el endometrio equino normal y post-inseminación. Los altos niveles de inmunoexpresión del HSF-1 durante el diestro (fase lútea) son consistentes con un papel en la preparación del endometrio para la implantación y el desarrollo del embrión. Concluimos que tanto la HSP90 como HSF-1 se expresan en las primeras horas en la endometritis post inseminación en la yegua con un rol clave en el control de la inflamación para posibilitar una futura placentación.

Palabras clave

Endometrio, yegua, proteínas de choque térmico, factor de transcripción, endometritis

SUMMARY

Persistent post-breeding endometritis in mares is one of the main causes of early embryonic death. Recent studies determined that heat shock proteins such as heat shock protein 90 (HSP90) and the heat shock factor 1 (HSF-1) are involved in the inflammation regulatory mechanisms in several tissues. We have recently described changes in the HSP90 immunoexpression in mare´s endometrium, suggesting a regulatory role in the estrous cycle. Likewise, HSP90 is regulated by HSF-1. However, to date, the expression of HSF-1 in the endometrium of mares has not been described. On the other hand, the expression of both HSP90 and HSF-1 proteins in post-breeding endometritis is unknown. Therefore, in the first place the objective was to analyze the HSF-1 expression in the endometrium of mares in endometrial biopsies obtained from healthy mares during estrus (n=5), diestrus (n=7) and anestrus (n=7). Secondly, the immunoexpression of HSF-1 and HSP90 proteins in endometrial samples obtained at 2 (n=8) and 4 (n=6) hours post insemination, and in estrus without insemination (control group: n=16). The localization of both HSF-1 and HSP90 was analyzed by immunohistochemistry and by image analysis (FIJI), and the immunoexpression, percentage of immunolabeled area (%) of in the lining epithelium and in the endometrial glands were quantified. During the estrous cycle and in anestrus, the HSF-1 factor was immunoexpressed in the lining epithelium and in the endometrial glands, at the cytoplasm and nuclear level. HSF-1 immunoexpression was higher in diestrus compared to estrus and anestrus (7.9 ± 0.2%, 5.1 ± 0.2%, 1.9 ± 0.2%; $p<0.0001$). At 2 and 4 hours post-insemination, HSF-1 immunoexpression was observed in both the nucleus and cytoplasm of the endometrial lining epithelium, as well as within the endometrial glands. HSF-1 immunoexpression at 2 hours post insemination was lower than the control group (2.34 ± 0.35% vs. 5.13 ± 0.19%; $p<0.0001$). HSP90 immunoexpression was higher in endometrial glands at 2 and 4 h post insemination (4.92 ± 0.24%, 3.72 ± 0.37%) compared to the control group (1.62 ± 0.28%; $p =0.0001$). This indicates a transient increase in HSP90 at 2 h post insemination while it decreases at 4 h post insemination. The localization of HSF-1 in the cytoplasm suggests the action of a chaperone in the cytoplasm and the localization in the nucleus implies DNA regulatory processes as a transcription factor. To our knowledge, this is the first description of the cellular and tissue localization of HSF-1 and HSP90 in normal equine endometrium. High HSF-1 immunoexpression during diestrus suggests its role in preparing the endometrium for embryo implantation and development. Our findings indicate that both HSP90 and HSF-1 are expressed in the initial hours following post-insemination endometritis in mares, suggesting they play a crucial role in regulating inflammation to facilitate future placentation.

Keywords

Endometrium, mare, heat shock proteins, transcription factor

INTRODUCCIÓN

Endometritis post inseminación en la yegua

La endometritis post inseminación configura un mecanismo fisiológico de reacción del útero para eliminar el exceso de espermatozoides y bacterias (LeBlanc, 2010). El objetivo de este mecanismo es generar un microambiente favorable para la nidación del posible embrión (Christoffersen et al., 2017). Durante la endometritis en la yegua se produce una respuesta inmune innata local y se activa posteriormente al reconocimiento y la señalización del antígeno por parte de las células epiteliales de la mucosa en el endometrio (Nasch et al 2010; Marth et al 2018). Dentro del proceso se produce aumento de neutrófilos y de linfocitos (Tunón et al., 2000). La detección de partículas extrañas induce la activación del sistema inmune innato, que es la primera línea de defensa (Nash et al., 2010). El estroma endometrial está constituido por tejido conjuntivo y por lo tanto, las principales funciones del sistema inmune innato son reclutar células inmunes a los sitios de infección a través de la activación de varias citocinas, incluidas las quimiocinas, activar la cascada del complemento para promover la eliminación de células muertas, inducir la activación del sistema inmune adaptativo a través de la presentación de antígenos, y actuar como una barrera física para los organismos y partículas invasores (Marth et al., 2018).

Proteínas de shock térmico HSP90 en la regulación del proceso inflamatorio

Las proteínas de shock térmico son importantes proteínas que son consideradas claves en la reparación de otras proteínas y regulan entre otros procesos los procesos inflamatorios y están altamente conservadas en todos los reinos (Corigliano et al., 2021). Son proteínas que se expresan constitutivamente en las células y que frente a condiciones de estrés aumentan para proteger a las células de lesiones y de la desnaturalización de proteínas inducida por estrés, que se rectifica mediante el replegamiento y la remodelación por medio de las HSPs (Martine & Rébé, 2019). Una de las principales evaluadas es la HSP90 está regulada por el factor de transcripción de shock térmico-1 (HSF-1). La proteína de shock térmico 90 (HSP90) es una chaperona importante que respalda la función de muchas proteínas cliente proinflamatorias, y su inhibición es analizado como un nuevo mecanismo de acción para las enfermedades inflamatorias en la piel en humanos (Ben Abdallah et al., 2024). Las proteínas como la HSP90 puede ser secretadas en células donde se sugiere que realizan funciones inmunológicas específicas y luego de situaciones de estrés como las mediadas por especies reactivas de oxígeno, el calor, la hipoxia, la irradiación y las citocinas (Hoter et al., 2018).

El factor de transcripción HSF-1 regulador de las proteínas de shock térmico en aparato reproductor de hembras en la mujer

En mujeres se ha analizado que el factor de shock térmico 1 (HSF-1) juega un papel central en el plegamiento o degradación de proteínas intracelulares. Luego de un shock térmico, se fosforila, se trimeriza y transfiere al núcleo para unirse a los sitios de la secuencia de ADN conocidos como elementos de shock térmico. En mujeres HSF-1 juega un papel importante en el carcinoma endometrial y endometriosis promoviendo la supervivencia y longevidad de las células bajo estrés, siendo esta una función que aprovechan las células tumorales para prolongar la supervivencia y desarrollar un estado maligno (Engerud et al. 2014). También el aumento de HSF-1 está relacionado con el grado de invasión endometrial (Wang et al., 2021). Se expresa además en tumores mamarios y está implicado en las metástasis en mujeres (Vydra et al., 2023). Es por esto que está siendo investigado como foco en el tratamiento terapéutico para bloquear su acción en cáncer de mama triple negativo (Viana et al., 2024).

Al activarse el estrés celular, el HSF-1 también juega un rol importante ya que activa la expresión de las HSP para proteger las células. Esta proteína HSF-1 es un factor de transcripción que puede responder a estrés celular de origen endógeno y exógeno induciendo la expresión de las proteínas de shock térmico HSP, como la proteína HSP90. Estas a su vez actúan en el retículo endoplásmico rugoso como proteínas reparadoras y facilitan el replegamiento de proteínas mal plegadas.

Por lo tanto, el conocer los posibles factores reguladores de los mecanismos que ocurren en el endometrio de las yeguas con endometritis post inseminación podrá dar luz a una problemática a nivel reproductivo en equinos que aún no se ha dilucidado.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

1. Reproducción en la yegua

En la producción equina el objetivo principal es asegurar un potro sano por yegua por año, para que esto sea posible hay varios factores que van a incidir, como el clima, la nutrición, condición corporal, sanidad de los animales, y la salud del aparato reproductor. Las yeguas son reproductoras poliéstricas estacionales de día largo, con actividad ovárica máxima en primavera y verano en Uruguay. El factor determinante de la actividad ovárica es la duración del periodo luz/día, proceso conocido como fotoperíodo, y éste depende de la latitud geográfica (Raz and Aharonson-Raz, 2012). Además de fotoperíodo, factores exógenos como la edad, estado reproductivo, nutrición, condición corporal y la temperatura del medio ambiente afectan a la actividad reproductiva estacional de la yegua (Aurich, 2011). La época de inactividad reproductiva se denomina anestro (Davies-Morel, 2022). El anestro se observa fisiológicamente en la mayoría de las yeguas durante el invierno, y se caracteriza por falta de receptividad sexual de la hembra, los ovarios y el tracto reproductivo no dan señales de ciclicidad (McKinnon et al., 2011). El periodo entre anestro y la etapa reproductiva se denomina transición y cursa con ciclos irregulares que pueden durar días o semanas (Aurich, 2011).

Ciclo estral

El ciclo estral se define como el período desde una ovulación a la siguiente y la yegua comienza a ciclar cuando alcanza la pubertad entre los 10-24 meses de edad. El ciclo estral tiene una duración media de 21 días y puede dividirse en dos fases. Una fase folicular que incluye al período denominado estro, con una duración promedio de 4-7 días y la fase luteal que incluye al diestro con una duración de 14-15 días (Brinsko et al., 2011). El estro es el período caracterizado por el deseo sexual y la aceptación del macho por la hembra. El tracto genital está preparado para aceptar y transportar espermatozoides y un ovocito al sitio de fertilización (Raz and Aharonson-Raz, 2012). En esta fase se produce el fenómeno de selección folicular, donde de una cohorte de folículos la mayoría de las veces solo uno pasa a ser el dominante u ovulatorio (Ginther et al., 2008). El folículo dominante crece entre 3 y 5 mm por día, hasta alcanzar su tamaño preovulatorio de 40-45 mm dependiendo de la raza del animal (Samper, 2009). La ovulación ocurre alrededor de las 24-48 horas antes del fin del estro y se denomina día 0 del ciclo (McKinnon et al., 2011). Durante el periodo de diestro,

la yegua no es receptiva al semental, y el tracto genital está preparado para aceptar y nutrir el concepto. En el lugar de la ovulación, se forma el cuerpo lúteo (Brinsko et al., 2011). El cuerpo lúteo madura a partir del día 5 y secreta progesterona. Al final de este periodo el endometrio en respuesta a que no existe un embrión en la luz uterina, secreta prostaglandina F2α, que es luteolítica y causa la caída de los niveles de progesterona al final del ciclo (Roberts, 1979).

El control endocrino del ciclo estral está regulado por el eje hipotálamo-hipofisario-ovárico. El hipotálamo secreta la hormona GnRH, la cual estimula a la adenohipófisis a producir y liberar gonadotropinas, cuyos órganos diana son los ovarios. Dentro de las gonadotropinas se encuentra la hormona folículo estimulante (FSH), responsable del comienzo de una nueva onda folicular y del reclutamiento de folículos. Los grandes folículos secretan inhibina que ejerce un feedback negativo en la producción de FSH (Davies-Morel, 2005). La hormona luteinizante (LH) aumenta pocos días antes del estro y sus concentraciones crecientes inducen la secreción de estrógenos por el folículo preovulatorio, éstos ejercen una retroalimentación positiva que desencadena la ovulación. La LH alcanza su mayor concentración en plasma generalmente un día después de producida la ovulación y en el diestro sus niveles descienden (Ginther et al., 2006). Luego de la ovulación, dentro del folículo colapsado se forma el cuerpo lúteo que secreta progesterona. La concentración máxima de progesterona ocurre entre los días 5 y 10 del ciclo estral, ésta tiene un efecto inhibitorio sobre el eje hipotálamo - hipofisario, particularmente en la liberación de LH, por lo tanto, el estro no comienza hasta que los niveles de progesterona descienden (Palmer, 1978). En ausencia de reconocimiento materno de preñez, el endometrio equino secreta prostaglandina, que es luteolítica, lisa el cuerpo lúteo, entonces los niveles de progesterona caen y se desinhibe el eje hipotálamo- hipofisario, volviéndose a liberar FSH y LH para un nuevo ciclo (Davies-Morel, 2005).

2. Anatomía del aparato reproductor de la yegua

El aparato reproductor de la yegua se compone de dos grupos de órganos: aquellas estructuras que son intrínsecas a la vía reproductiva: ovarios y vías tubulares femeninas (trompa uterina, útero y cuello uterino y vagina) y aquellas estructuras que están físicamente aisladas de la vía reproductiva, y que desempeñan un papel en la regulación de los eventos de la reproducción: glándula pineal, la retina, el hipotálamo, glándula hipófisis (Brinsko et al., 2011). El útero es un órgano muscular hueco que está suspendido dentro de la cavidad pélvica y el abdomen por los ligamentos anchos. Está formado por

dos cuernos y un cuerpo, con forma de letra T o Y cuando se observa dorsalmente en su posición natural en la yegua (Getty et al., 1982). La vascularización del útero se compone a cada lado por tres arterias y venas que forman su camino a través del ligamento ancho. El útero realiza varias funciones, como transportar los espermatozoides desde el sitio de eyaculación hasta la trompa uterina, regula el funcionamiento del cuerpo lúteo, y es el lugar donde se lleva a cabo la implantación del embrión, gestación, parto e involución posparto (Hafez, 2000).

3. Histología del útero: endometrio, miometrio y perimetrio

A nivel histológico la pared uterina está constituida por tres capas, siendo la capa más interna el endometrio, que es glandular y secretora. La capa media con tejido muscular liso denominado miometrio, es responsable de la variación en el tono muscular del útero de la yegua. La capa más externa se denomina perimetrio (Brinsko et al., 2011). El endometrio de la yegua está compuesto de epitelio luminal (epitelio de revestimiento endometrial), un epitelio glandular, y una lámina propia (tejido conjuntivo laxo) (Kenney, 1978). El epitelio endometrial de la yegua es cilíndrico simple o cúbico simple en algunas regiones, la altura y la estructura de las células epiteliales están relacionados con la secreción de hormonas ováricas durante todo el ciclo (Eurell & Frappier 2006). Menos de la mitad de las células epiteliales son ciliadas y las demás células son secretoras de glucoproteínas que producen la leche uterina para el desarrollo del histotrofo durante la implantación y desarrollo placentario (McKinnon et al., 2011). El endometrio además presenta una lámina propia que contiene tejido conjuntivo laxo más superficial o estrato compacto y estrato esponjoso más profundo. El estrato compacto consta de un tejido conjuntivo laxo, muy vascularizado, con muchos fibroblastos. Se hallan presentes en la lámina propia muchos macrófagos y mastocitos. Desde la sangre penetran leucocitos granulocitos y agranulocitos linfocitos B, que luego se diferencian en el conjuntivo a plasmocitos o también llamadas células plasmáticas. El estrato esponjoso consta de tejido conjuntivo denso y menos celular que el superficial (Eurell & Frappier 2006). También hay capilares, arteriolas, vénulas y ocasionalmente pequeñas arterias musculares (Kenney, 1978). Se hallan presentes por todo el endometrio glándulas tubulares ramificadas, simples y arrolladas, revestidas por epitelio cilíndrico simple. La ramificación y enrollamiento de las glándulas son marcadas en la yegua, el aumento de los niveles de estrógenos estimula el crecimiento y la ramificación de las glándulas, y la secreción aumenta por estímulo de la progesterona (Eurell & Frappier 2006). Luego hacia la profundidad del útero encontramos la capa muscular o denominada miometrio presenta una gruesa capa interior circular de músculo liso y una capa externa longitudinal de músculo liso. Entre estas dos capas se encuentra la capa vascular (McKinnon et al., 2011). Por último, la capa más externa se denomina perimetrio está formado por tejido conectivo y se continúa con el ligamento ancho (Getty et al., 1982) y presenta numerosas fibras

colágenas, vasos linfáticos, vasos sanguíneos y nervios que están presentes en esta capa (Eurell & Frappier 2006).

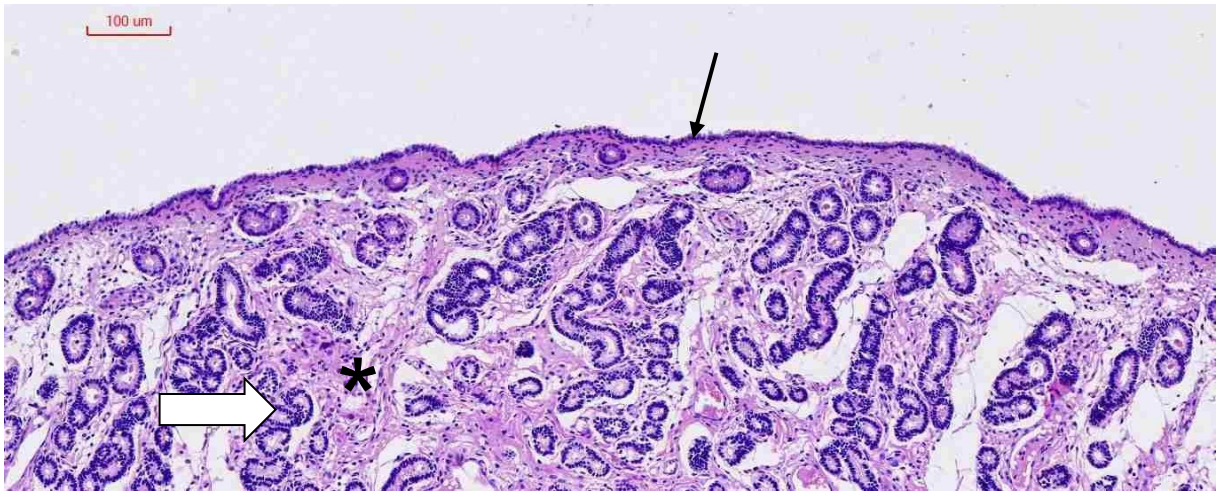


Figura 1. Imagen histológica del endometrio de yegua adulta con Hematoxilina-Eosina. Se observa el epitelio de revestimiento (flecha negra), estroma endometrial (asterisco) y glándulas endometriales (flecha blanca). Se observan los núcleos de las células epiteliales y conjuntivas de color azul en los núcleos heterocromáticos (basofilia intensa). El estroma conjuntivo se observa eosinófilo por la presencia de fibras de colágeno de tejido conjuntivo. Imagen de la autora. Magnificación final 100 aumentos. Barra de escala 100 micrómetros.

4. Endometritis

El éxito reproductivo de un animal no depende únicamente de la producción de gametos, sino también de la generación de un ambiente apropiado para la fertilización, desarrollo embrionario, y para lograr una adecuada implantación, placentación y parto. En este sentido, las patologías del aparato reproductor femenino son la mayor causa de infertilidad a consecuencia de un inadecuado ambiente uterino para la supervivencia del embrión, causando grandes pérdidas para la industria equina (Davies-Morel, 2005).

La endometritis en la yegua es la causa más común de subfertilidad y la tercera enfermedad más común que afecta a las yeguas (Canisso et al 2020). Asimismo, la endometritis es la

principal causa de muerte embrionaria, como consecuencia de un inadecuado ambiente uterino para la supervivencia del embrión, causando grandes pérdidas para la industria equina (Davies-Morel, 2005).

La endometritis post-servicio es considerada fisiológica y transitoria ya que el endometrio desencadena la respuesta inflamatoria con el objetivo remover del útero el exceso de espermatozoides, plasma seminal y contaminantes, promoviendo un ambiente propicio antes de que el embrión ingrese al útero para la implantación entorno del día 6 post-ovulación. Aquellas yeguas que logren resolver esta inflamación antes de las 48 horas, se les denomina yeguas resistentes a endometritis post-servicio, y aquellas yeguas que no logren resolver este proceso inflamatorio dentro de las 48 horas post-servicio, se las considera yeguas susceptibles. En las hembras susceptible se acumulan fluidos uterinos que son perjudiciales para la implantación del embrión, causando pérdidas embrionarias (Katila, 1996; Christoffersen et al., 2017).

El proceso inflamatorio post inseminación se produce al no ser reconocidos los espermatozoides por el sistema inmune de la hembra, siendo un factor extraño al organismo, por lo que se activa el sistema inmunitario innato, que es la primera línea de defensa. Se activa el sistema de complemento, que provoca el reclutamiento de neutrófilos o también llamados polimorfonucleares. Los neutrófilos son considerados la primera línea de defensa del organismo y aumentan su número en la luz uterina. Los primeros neutrófilos que atraviesan el epitelio de revestimiento desde el tejido conjuntivo endometrial (estroma endometrial) ingresan a la luz del útero y se observan desde la primera hora luego de la inseminación artificial, alcanzando su pico máximo entre las 6 y 12 horas post inseminación, y disminuyendo gradualmente hasta desaparecen a las 48 horas en yeguas sanas (Katila, 1996). El proceso de limpieza o “clearence” es seguido por contracciones del miometrio, reguladas por la hormona prostaglandina F2α y la oxitocina, con el objetivo de remover y eliminar del útero el exceso de espermatozoides, bacterias y plasma seminal (Troedsson, 1999). Por otra parte, se menciona en estudios previos que la intensidad del proceso inflamatorio depende de la concentración de espermatozoides (Kotilainen et al., 1994; Cazales et al., 2018; Cazales et al., 2020).

5. Mecanismos de regulación del proceso inflamatorio

La respuesta proinflamatoria se caracteriza por la liberación de citocinas proinflamatorias IL-1β, TNF-α, IL-6 y la quimiocina IL-8 liberadas por células del tejido conjuntivo (Fumuso et al., 2003; Woodward et al., 2013). El endometrio responde rápidamente a la estimulación antigénica con la liberación de mediadores quimiotácticos de las células del estroma endometrial. Una de las principales células son los neutrófilos que resultan en una rápida migración transepitelial hacia el lumen uterino (Pycock y Allen, 1988). Dentro de las células del tejido conjuntivo, que promueven la respuesta inmune, los leucocitos granulocitos neutrófilos denominados polimorfonucleares por su característica de presentar múltiples lobulaciones en su núcleo, son los primeros que llegan al sitio de inflamación. A los 30 minutos de iniciado el proceso inflamatorio los neutrófilos legan por diapédesis, desde la circulación sistémica, saliendo de los capilares sanguíneos hacia la matriz extracelular del tejido conjuntivo. La activación de los neutrófilos provoca la liberación de prostaglandina PGF-2α, que inicia una segunda ola de contracciones miometriales para facilitar la limpieza del útero (Troedsson et al., 1995).

6. Proteínas de shock térmico

Las proteínas de shock térmico (HSP) están conservadas evolutivamente y ayudan a las proteínas durante el estrés, o las dirigen para la degradación cuando la reparación es imposible. Las HSPs protegen a las células y los organismos contra varios tipos de estrés, ya sea promoviendo la supervivencia celular o desencadenando la muerte celular cuando el daño es irreversible (Salmand et al., 2008). La respuesta al shock térmico (HSR) se define como una respuesta molecular inducible a una alteración de la homeostasis proteica que resulta en la expresión elevada de genes citoprotectores para proteger el proteoma contra agresiones tóxicas (Cyran & Zhitkovich. 2022). Por lo tanto, la supervivencia de las células depende de la activación de ese elaborado mecanismo citoprotector de respuesta al shock térmico que es un mecanismo rápido y regula positivamente la transcripción selectiva de genes en respuesta a la acumulación de proteínas al enfrentarse a condiciones ambientales hostiles. Las HSP son importantes en la respuesta celular al estrés y realizan funciones homeostáticas celulares como la regulación del plegamiento de proteínas y el transporte de proteínas a través de las membranas. Investigaciones previas determinaron el papel de las HSP en la respuesta inflamatoria, participando en la transducción de señales de citocinas y en el control de la expresión de genes de citocinas, y mejorando la presentación de antígenos a los linfocitos T (Moseley, 2018; Martine & Rébé, 2019).

Las HSP se muestran en la superficie de las células y son importantes para atacar a las células citotóxicas que conducen a la producción de citocina proinflamatoria como la interleucina IL-1β (Martine & Rébé, 2019). Además, uno de las proteínas más estudiadas, la HSP90, posee la capacidad de ser chaperona e interactúa con las células presentadoras de antígenos a través de receptores específicos, las estimula para secretar citoquinas inflamatorias y media la maduración de las células dendríticas (Corigliano et al., 2021). En revisión reciente se explica en detalles como la resolución del proceso inflamatorio implica la vía de respuesta de shock térmico que es crucial y que orquesta la resolución de la inflamación, principalmente en condiciones de estrés proteotóxico, y que este proceso depende de la regulación positiva de las proteínas de shock bajo el mando del factor de transcripción de shock térmico 1 o HSF-1 (Schroeder et al., 2024). Por lo tanto, las HSP están siendo muy estudiadas para comprender los mecanismos de modulación del sistema inmune. En situaciones de estrés celular la síntesis proteica se ve afectada dando lugar a proteínas mal plegadas o con una conformación inadecuada. En ese contexto de estrés celular se activa la transcripción de genes dirigida hacia proteínas reparadoras conocidas como proteínas de shock térmico (HSP) (Cortés-González et al., 2008). Las HSP responden a situaciones de

estrés desempeñando un papel de protección, por eso se las denomina chaperonas moleculares (De Maio et al., 2012). Se expresan tanto en condiciones fisiológicas, así como en condiciones fisiopatológicas, mediante el plegamiento de otras proteínas, activando procesos antiapoptóticos y mantienen así la homeostasis celular. Estas proteínas se clasifican de acuerdo con su peso molecular en kilodaltons (Kampinga et al., 2009). Dentro de esta clasificación se encuentra la HSP90, una de sus funciones es interactuar con otras proteínas, dentro de las cuales se encuentran los receptores de hormonas esteroideas, como receptores de estrógenos y de progesterona (Prodromou, 2016).

7. Proteína de shock térmico HSP90 en endometrio

Las HSP ya se han descrito en el endometrio de diferentes especies y en diferentes condiciones. Por ejemplo, en la mujer la expresión de las proteínas de shock térmico como la HSP90 fueron descritas y se registraron cambios en la expresión a lo largo del ciclo estral (Tabibzadeh et al., 1996). En la cerda se han descrito en el endometrio durante el período de peri-implantación y en respuesta al estrés térmico (Adur et al., 2022). En condiciones fisiológicas se describió la expresión de HSP90 en endometrio de yegua, en la estación reproductiva y en el anestro, tanto a nivel del epitelio de revestimiento, glándulas y estroma conjuntivo endometrial. En dicho estudio se observó que la proteína HSP90 aumenta en fase proliferativa y disminuye en fase secretora, sugiriendo una vinculación de la acción chaperona de acompañamiento de la HSP90 con los receptores de hormonas esteroideas que regula las estas fases del ciclo estral (Camacho et al 2021).

Por otra parte, en condiciones patológicas las HSP se describieron en endometrio humano y bovino. La HSP90 en endometrio humano se observó que éstas aumentan en hiperplasia endometrial en comparación con endometrio normal, y en el cáncer endometrial se registró un aumento mayor (Wataba et al., 2001). En endometrio bovino se registró su expresión en la endometritis, y se las considera como marcadores de inflamación endometrial (Choe et al., 2010). El aumento de la expresión de HSP se produce en respuesta a un proceso fisiológico común promoviendo la supervivencia celular y protección frente al daño. Los factores que aumentan la expresión de HSP, pueden ser factores ambientales y químicos, causas fisiológicas no relacionadas con el estrés y enfermedades (Hoter et al., 2018).

8. La interrelación de HSP90 con el factor de transcripción HSF-1

En estudios previos realizados en ovocitos de Xenopus (rana) la HSP90 regula moléculas de transducción de señales y factores de transcripción como HSF-1. Se observó la formación de heterocomplejos HSF-1-HSP90 y HSP90 participa en la modulación de HSF-1 en diferentes puntos de la vía de activación-desactivación, influyendo en la interconversión entre conformaciones monoméricas y triméricas, así como en la activación transcripcional y que la HSP90 vincula a HSF-1 con moléculas de señalización celular que coordinan la respuesta al estrés (Ali et al., en 1998). También en levaduras la HSP90 interactúa con las formas monoméricas inactivas y triméricas activas de HSF-1 (Zheng et al., 2018). Por lo tanto, HSP90 podría estar involucrado en la regulación de la interconversión entre estas formas. Los anticuerpos contra HSP90 como la geldanamicina retrasan el desensamblaje de trímeros e inhiben la transcripción inducida por calor de HSF-1, lo que sugiere un papel de HSP90 en la modulación del dominio de activación transcripcional o que la disociación de HSP90 de los trímeros de HSF-1 es necesaria para la competencia transcripcional.

9. Factor de shock térmico HSF-1

El factor de shock térmico HSF-1, es un factor de transcripción de las proteínas de shock térmico, y es un componente clave de la respuesta al shock térmico. La activación del HSF-1 impulsa el aumento de las HSP en respuesta a una lesión o estrés (Knowlton, 2006). El HSF-1 se encuentra como un monómero inactivo en el citoplasma unido a un complejo multichaperona que está gobernado por HSP90. El complejo se disocia y se vuelve a armar continuamente. En situaciones de estrés las proteínas no nativas se acumulan en el citoplasma y compiten con HSF-1 por el sitio de unión al complejo, dando como resultado el aumento de HSF-1 no unido (Zou et al., 1998). En situación es de estrés el factor HSF-1 se activa, lo que resulta en su trimerización, fosforilación, y se transloca al núcleo para unirse a sitios reguladores del ADN (Home et al., 2015), y así iniciar la activación transcripcional de los genes HSP. Luego el factor HSF-1 se une a la región reguladora y desencadena la transcripción masiva de genes como HSP90. El factor HSF-1 mantiene la homeostasis de las proteínas al activar la transcripción de proteínas de shock térmico (HSP) (Anckar y Sistonen, 2011; Gomez-Pastor et al., 2018).

Asimismo, el factor HSF-1 regula la expresión de varios genes que codifican importantes reguladores del crecimiento celular, la supervivencia y el metabolismo (Hahn et al., 2004; Mendillo et al., 2012; Takii et al., 2015). Debido a que promueve la supervivencia y longevidad de las células bajo estrés, las células tumorales utilizan esta función para

prolongar su supervivencia y desarrollan un estado maligno (Dai et al., 2007). En tumores de mama de hembras caninas, se observó que el factor regula la expresión de proteínas de shock térmico con acción antiapoptótica, promoviendo la proliferación celular y evitando la muerte celular (Alcaide et al., 2018). En humanos, el HSF-1 es promotor de metástasis en melanomas malignos, y se asocia con un mal pronóstico cuando aumenta HSF-1 por promover la evasión de la apoptosis, senescencia (Scott et al., 2011). Además, en cáncer de endometrio en mujeres, se observó que el alto nivel de HSF-1 se asocia a una mayor agresión del tumor y una supervivencia del paciente deficiente (Engerud et al., 2014). HSF-1 permite el crecimiento de células malignas, se sobreexpresa en varios tipos de tumores y se asocia con un mal pronóstico. Debido a la importancia de HSF-1 en cáncer se están estudiando inhibidores de HSF-1 como objetivo terapéutico contra el cáncer. Se ha encontrado que varios inhibidores bloquean la actividad de HSF-1, aunque no hay datos preclínicos convincentes sobre su utilidad. Por lo anteriormente mencionado el HSF-1 puede servir como un biomarcador para el pronóstico del cáncer (Sharma & Seo, 2018; Gumilar et al., 2023).

En cuanto a la vinculación con los procesos inflamatorios el HSF-1 inhibe genes que codifican para la síntesis de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), la interleucina 1 (IL-1) y la IL-6, se une al promotor de estas citocinas inflamatorias. Uno de los mecanismos estudiados en los que HSF-1 reprime la expresión de IL-1β es a través de la interacción física con el factor nuclear para la interleucina 6, IL-6 (NF-IL-6), que es un activador de IL-1β. Además, el factor HSF-1 inhibe la expresión de IL-6 al inducir la activación del factor de transcripción 3 (ATF3), un regulador negativo de las citocinas inflamatorias, incluida la IL-6 (Tong et al., 2014).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La endometritis persistente post-servicio es una de las principales causas de muerte embrionaria en yeguas. El proceso inflamatorio post inseminación debería resolverse por ser un mecanismo fisiológico que debe finalizar antes de las 24 a 48 horas, siendo este un factor crítico para determinar la habilidad de la yegua de mantener una preñez. Si la endometritis no se resuelve dentro de las 48 horas puede generar pérdidas embrionarias tempranas (Canisso et al., 2020).

Las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias se producen en distintos momentos de la endometritis en la yegua. Las proinflamatorias predominan al inicio del proceso inflamatorio y las antiinflamatorias al final del proceso para controlar la inflamación. Aquellas yeguas que no resuelven en proceso tienen una producción defectuosa de citoquinas antiinflamatorias (Woodward et al., 2013).

Estudios previos en otros procesos inflamatorios mencionan a las proteínas de shock térmico HSPs como reguladoras del proceso y a su factor de transcripción HSF-1 como factor de transcripción que regula la transcripción de factores pro y antiinflamatorios (Martine & Rebé, 2019).

Asimismo, recientemente evaluamos la expresión de la proteína de shock térmico HSP90 en el endometrio de yeguas durante el ciclo estral y el anestro, sugiriendo un papel regulatorio en el endometrio normal (Camacho et al., 2021). La HSP90 está regulada por el factor HSF-1 (Gómez-Pastor et al., 2018). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la expresión de HSF-1 en el endometrio de yeguas sanas ni con endometritis.

Además, la HSP90 en vacas se expresa durante la endometritis (Choe et al., 2010). Sin embargo, aún no se ha determinado la expresión de las proteínas de shock térmico en la endometritis en yeguas. Por lo tanto, dada la relación entre HSP90 y HSF-1 y su rol en procesos inflamatorios se considera esencial determinar si se expresan ambas proteínas regulando en las primeras horas del inicio del proceso de la endometritis post inseminación en yeguas.

HIPÓTESIS

El factor de transcripción de shock térmico HSF-1 y la proteína de shock térmico HSP90 se expresan y varían temporal y espacialmente en el endometrio de yeguas durante el ciclo estral y en la endometritis post inseminación.

OBJETIVOS

1) OBJETIVO GENERAL:

Determinar la expresión del factor de transcripción HSF-1 y de la proteína de shock térmico HSP90 en el endometrio de yeguas con endometritis post inseminación.

2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Determinar la expresión de HSF-1:

    a) Determinar la inmunolocalización de HSF-1 en el endometrio normal durante estro, diestro y anestro

    b) Cuantificar la inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento y glándulas endometriales durante estro, diestro y anestro.

    c) Determinar la inmunolocalización de HSF-1 en endometrio post inseminación artificial

    d) Cuantificar la inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento y glándulas endometriales post inseminación artificial.

2) Determinar la expresión de HSP90:

    a) Determinar la inmunolocalización de la proteína shock térmico

HSP90 en endometrio post inseminación artificial

b) Cuantificar la inmunoexpresión de HSP90 en el epitelio de revestimiento y glándulas endometriales post inseminación artificial.

ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Se plantearon 2 etapas:

1) En la primera se estudió la expresión de HSF-1 en endometrio de yeguas sanas durante el ciclo estral y el anestro.

2) En la segunda incluyó la realización del análisis del factor HSF-1 y de la proteína HSP90 en el endometrio de yeguas 2 y 4 horas luego de la inseminación artificial.

Etapa 1. Estudio del factor de shock térmico 1 (HSF-1) en el endometrio durante el ciclo estral y el anestro en yeguas.

Etapa 2.

a) Estudio del factor de shock térmico 1 HSF-1 en el endometrio 2 y 4 horas post inseminación artificial

b) Estudio de la proteína de shock térmico HSP90 en el endometrio 2 y 4 horas post inseminación artificial

MATERIALES Y MÉTODOS

Etapa 1 (Fases del ciclo estral y anestro): Estudio del factor de shock térmico 1 (HSF-1) en el endometrio durante el ciclo estral y el anestro en yeguas.

Animales y diseño experimental

Todos los trabajos fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Exp 111130-000644-14), cuyos responsables fueron Sebastián Acuña y Rodrigo Mattos, y participó en el muestreo Oscar Jackson, Ana Laura Camacho Benítez y Rossana Lyle Vasconcellos Quevedo. Se utilizaron yeguas (n=10) cuarto de Milla de 3 a 6 años, de 435 Kg de peso promedio, condición corporal > 3 (1-5), vírgenes y con la sanidad al día. Las yeguas eran sanas, no presentaron historia de enfermedades reproductivas y presentaron una adecuada conformación vulvar. El experimento se llevó a cabo en el establecimiento privado "Haras del Olimar" ubicado en el Departamento de Treinta y Tres, Uruguay (33°S, 54°W), (DICOSE 190735117). Las yeguas se mantuvieron a campo, en el mismo potrero, alimentadas en pasturas naturales, en condiciones de luz natural y con agua disponible *ad libitum*.

Evaluación por ultrasonografía de ciclo estral

Las etapas de estro, diestro y anestro fueron definidas por palpación rectal y ultrasonografía (mediante transductor lineal de 5 MHz, ecógrafo marca Pie Medical, modelo Tringa) de la siguiente manera (Figura 2).

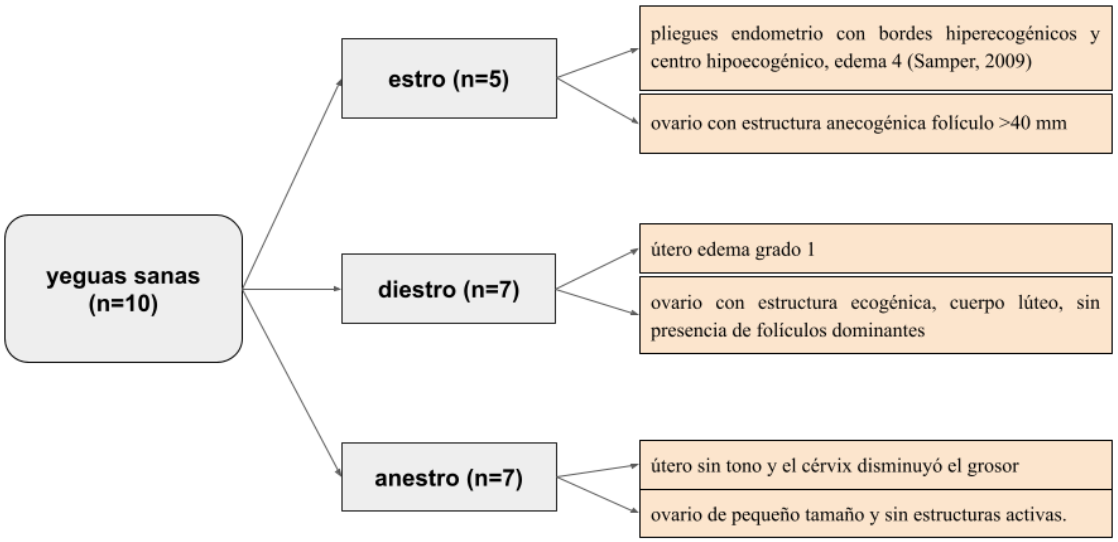


Figura 2. Esquema ilustrativo de etapas reproductivas estro, diestro y anestro definidas por ultrasonografía y palpación rectal. Momento de extracción de biopsias endometriales.

Del total de 10 yeguas, se realizaron biopsias endometriales durante el estro (n=5), en diestro (n=7) y en anestro (n=7). Las biopsias se realizaron en las mismas yeguas a lo largo del período reproductivo y el anestro. En las yeguas cíclicas se dejó pasar un ciclo entre la toma en diestro y estro para no afectar el endometrio. Las muestras de las yeguas cíclicas se tomaron durante los meses de noviembre a abril. Se consideró en estro cuando a la ultrasonografía en el ovario se observó la presencia de una estructura anecogénica, correspondiente a un folículo >40 mm de diámetro y no se evidenció la presencia de cuerpo lúteo activo en ninguno de los ovarios. En el endometrio se observó aumento del ancho de los pliegues endometriales con bordes hiperecogénicos y el centro hipoecogénico, correspondiente a un edema 3 o 4 característico del estro (Samper, 2009). A la palpación rectal el útero no presentó tono y el cérvix aumentó de grosor, lo que indica que está relajado y abierto. Se consideraron en etapa de diestro cuando a la ultrasonografía del ovario se observó una estructura ecogénica característica de un cuerpo lúteo, sin presencia de folículos dominantes y en el útero se observó edema grado 0 característico de diestro (Samper, 2009). A la palpación rectal el útero presentaba tono, y el cérvix disminuyó de grosor, lo que indica que está cerrado. La muestra de diestro se extrajo entre el día 7 y 10 post-ovulación. En el anestro las biopsias se realizaron a durante los meses de junio y julio (anestro invernal profundo). En la ecografía el ovario se observó de pequeño tamaño y sin estructuras activas. A la palpación el útero no presentó tono y el cérvix disminuyó el grosor, por lo que consideramos que estaba en anestro (Miro, 2012). La muestra de anestro se extrajo en días con menos horas de luz.

Biopsias endometriales

Las biopsias endometriales se realizaron de la zona de unión entre el cuerpo y los cuernos uterinos de cada yegua, con una pinza de biopsia marca Jorvet de 60 cm de longitud con una cesta de corte de 1,2 cm por 0,6 cm de ancho. Previamente se realizó higienizado de la zona perineal con jabón neutro y clorhexidina. Las biopsias se fijaron en paraformaldehído al 4 %, pH 7,4 durante 24 horas, para su posterior procesamiento histológico en el laboratorio (Fiala et al., 2007; Cazales et al. 2020).

Control de ausencia de endometritis por realización de biopsias

En las ecografías no se observó fluido intrauterino que denotara un proceso inflamatorio (LeBlanc, 2010). Por otra parte, la evaluación histológica endometrial determinó que las yeguas no presentaban endometritis, por lo que se consideró que eran yeguas con un endometrio con características normales, clasificadas con categoría grado I en la escala de Kenney & Doig, 1986. Se realizó en análisis histólogo considerando un endometrio con un epitelio de revestimiento y glandular, y estroma con características normales sin signos de inflamación. Para la validación que las yeguas no presentaran endometritis subclínica se determinó en 10 campos histológicos a 400 aumentos y no se registró presencia de neutrófilos tal como describe Kenney, 1978 y Kenney y Doig, 1986.

Procesamiento histológico, microtomía

El procesamiento histológico, así como la microtomía y los ensayos de inmunohistoquímica y análisis de imagen se realizaron en la Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Veterinaria de Montevideo, Uruguay. Brevemente, las biopsias endometriales que estaban en fijador fueron deshidratadas sumergiéndose en concentraciones crecientes de etanol (70°, 95° y 100°), y sumergidas luego en cloroformo durante 12 horas, e incluidas posteriormente en 3 baños sucesivos de parafina por 1:30 horas (30 minutos en cada una). Luego se procedió a realizar la microtomía obteniendo cortes de 5 micrómetros de espesor en micrótomo (Leica Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Alemania) que se colocaron en un baño de flotación de agua corriente a 37ºC y luego se colocaron en portaobjetos, que se secaron en estufa para evitar el desprendimiento. Se obtuvieron 20 cortes histológicos por biopsia endometrial.

Técnica de inmunohistoquímica

Para la realización de los ensayos de inmunohistoquímica se prepararon soluciones buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 y buffer citrato 0,01 M pH 6.0. Brevemente, para realizar el ensayo de inmunohistoquímica contra HSF-1 y HSP90, se realizó el desparafinado de los cortes de endometrio en estufa a 60º (15 minutos), y luego se realizó inmersión en xilol (15 minutos); hidratación por inmersión en concentraciones decrecientes de alcoholes (100º, 95º, 70º) e inmersión en PBS durante 5 minutos. Luego se procedió a realizar la recuperación antigénica por calor en microondas con solución buffer citrato durante 3 minutos a 100% de potencia. Luego se procedió a la inactivación de peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%. Luego se incubaron los cortes con anticuerpo primario anti HSF-1 (mouse policlonal ab52813, Abcam), a una concentración de 1/50 por 18 horas a 4°C. Al día siguiente se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado (kit mouse monoclonal HRP/DAB, ab 64259, Abcam, EE. UU.) durante 30 minutos. Luego se incubó con el complejo enzimático estreptavidina-peroxidasa por 30 minutos, para luego realizar el revelado con solución de cromógeno diaminobencidina (DAB) por 1 minuto y se contracoloreó con Hematoxilina de Harris durante 15 segundos. Luego se realizó el virado en agua corriente y la posterior deshidratación en concentraciones crecientes de etanol 70º, 95º y 100º. Por último, se realizó el aclaramiento con xilol, montaje con Entellan® (107960 Sigma-Aldrich, EE. UU.) y se colocaron los cubreobjetos. Para verificar la especificidad de la técnica se realizaron controles negativos reemplazando el anticuerpo primario por suero normal (no inmune). Se incluyó un portaobjetos de control positivo con un carcinoma de glándula mamaria canina (Kijima et al., 2019).

Análisis digital de imágenes

Se capturaron 60 imágenes (30 de epitelio endometrial y 30 de glándulas endometriales) a 400 aumentos, de cada preparado realizado con la técnica de inmunohistoquímica para detectar HSF-1, de cada yegua, y en cada etapa reproductiva. Se utilizó el software (DinoCapture 2,0, AnMoElectronicsCorporation, Taiwan) de la cámara digital (Dino-Eyepiece AM-423X, AnMoElectronicsCorporation, Taiwan) conectada a un microscopio binocular (Premiere profesional, modelo MRP-5000, Manassas, EE. UU.). Se realizó a partir de las imágenes digitales el análisis cuantitativo para determinar el porcentaje de área inmunomarcada de HSF-1 en el epitelio de revestimiento endometrial, y en glándulas endometriales. Dicho procesamiento incluyó la segmentación, binarización, umbralización y creación de macro automatizando el procesamiento de cada imagen con los parámetros de intensidad de coloración marrón (DAB positivos) seleccionados/umbralizados previamente. Se utilizó el software Image J 1.43m, Wayne Rasband open Source, National Institutes of Health, EEUU, http://rsb.info.nih.gov/ij/.

Análisis estadístico

Los resultados de la cuantificación de la variable continua área inmunomarcada de HSF-1, se expresaron como medias ± error estándar de la media (eem). Se compararon las diferencias entre los 3 grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas utilizando el modelo general lineal (GLM) mediante el software SAS (SAS v.9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.). En todos los casos, el nivel de significación fue de $p < 0,05$. En el modelo estadístico se consideró el efecto de la etapa reproductiva (estro, diestro, anestro) y la región endometrial (epitelio, glándulas).

Etapa 2: Endometritis inducida post inseminación

Animales y diseño experimental

El diseño experimental fue aprobado por la Comisión de Experimentación Animal (CEUA) Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (número de protocolo 111130-001637-13). Se llevó a cabo en el frigorífico equino Sarel de la República Oriental del Uruguay, durante la estación reproductiva, entre los meses de octubre y marzo.

Examen ginecológico, ecografía y citología endometrial para ingreso de yeguas al experimento

Se seleccionaron yeguas mestizas (n=30) cíclicas en estro de las cuales se seleccionaron yeguas con un puntaje de condición corporal de >3 (Hennecke et al., 1983, modificada por Malschitzky, 2001) y clínicamente sanas. La edad promedio fue de 10,5 ± 0,5 años (rango 3–15), y el peso promedio fue de 452 ± 5 kg (rango 340–560). Todas las yeguas utilizadas en el experimento se sometieron a un examen ginecológico, palpación y ecografía transrectal (Mattos et al., 1984; Curnow, 1991), antes de incluirse en los grupos experimentales. El día previo a la faena las yeguas cíclicas con comportamiento de celo, sin contenido uterino, que presentarán imagen ecográfica uterina compatible con estro, sin tono uterino y cérvix abierto, ausencia de cuerpo lúteo funcional y folículos de 35 mm de diámetro, se seleccionaron para el experimento. Se realizó luego un examen citológico del lumen uterino luego de una cuidadosa limpieza del área perineal con agua potable y detergente neutro (mínimo tres veces), finalizando la limpieza con una solución jabonosa diluida con clorhexidina al 2 %, se lavó y se secó con papel absorbente. Luego de higienizada la región perineal se procedió a tomar la muestra de citología endometrial mediante el uso de cepillos ginecológicos estériles (Cito-Brush®, Juvaquez, España), utilizando un dispositivo estéril para toma de muestras citológicas (Botupharma, Botucatu, Brasil), evitando la contaminación por el ambiente vestibular, vaginal y cervical (Mattos et al., 1984). Una vez tomada la muestra, el cepillo se rodó suavemente sobre la superficie de un portaobjeto, se dejó secar al aire y se coloreó con tinción de Panóptico Pappenheim (Diff-Quik®, Baxter Healthcare, Miami, USA) para posteriormente evaluarse microscópicamente en búsqueda de leucocitos neutrófilos (polimorfonucleares). Sólo se utilizaron en el experimento yeguas en estro, con buena conformación perineal, sin acúmulo de aire o líquido intrauterino y sin presencia de leucocitos neutrófilos (o polimorfonucleares) al examen citológico.

Inseminación artificial

Las yeguas (n=30) se dividieron al azar en 3 grupos: 1) grupo control (n=16) en estro que no se inseminaron, 2) grupo 2 horas (n=8): yeguas inseminadas y sacrificadas a las 2 horas post inseminación, 3) grupo 4 horas (n=6): yeguas inseminadas y sacrificadas a las 4 horas post inseminación. La inseminación se realizó con semen criopreservado/descongelado de un semental de nueve años con fertilidad demostrada y una tasa de preñez del 40% por ciclo en programas previos de inseminación artificial con esperma criopreservado. Las yeguas fueron inseminadas en el cuerpo del útero vía transcervical con una pipeta de inseminación flexible atraumática de 57 cm de largo (Minitub, Tiefenbach, Alemania), corroborando la ubicación de la punta de la pipeta en el medio del cuerpo uterino por vía transrectal. La dosis inseminante fue de ocho pajuelas de 0,5 ml con 400 x 10^6 espermatozoides totales. El mismo veterinario experimentado realizó todas las inseminaciones. Previo a la inseminación se realizó la higienización de la región perineal con agua, detergente neutro y solución estéril (Laboriodine®, Segmenta, Ribeirão Preto, Brasil), y se secó con una toalla de papel. Luego de la inseminación las yeguas ingresaron a faena y se obtuvieron muestras de endometrio.

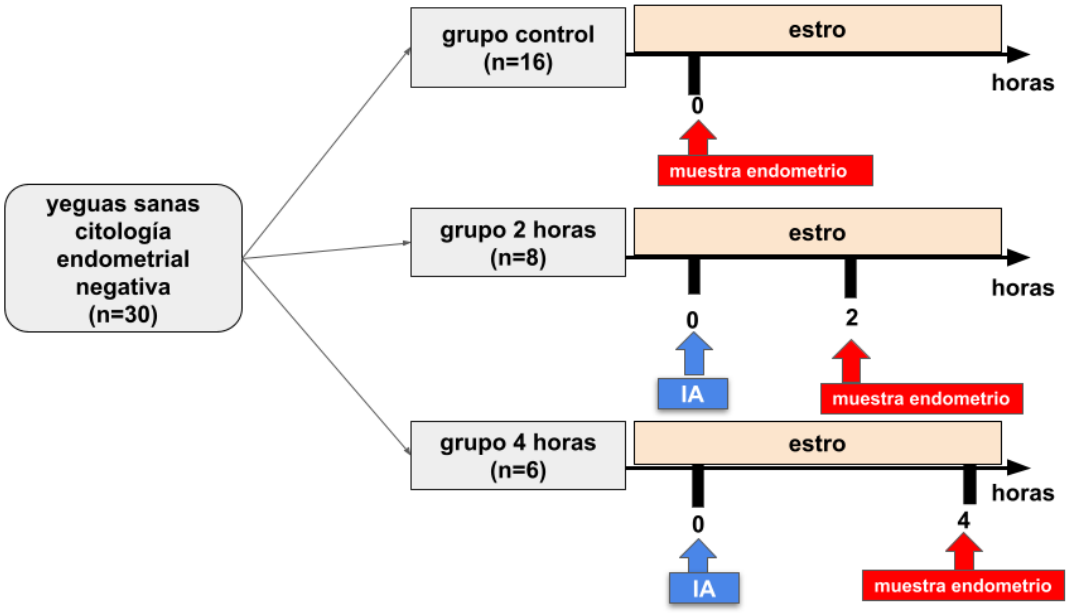


Figura 3. Esquema ilustrativo del diseño experimental 2. Grupo control: con yeguas en estro, grupo 2 horas y grupo 4 horas post inseminación cuando se obtuvieron muestras de endometrio.

Obtención de muestras endometriales

Los tractos reproductivos se recuperaron dentro de los 10 minutos posteriores a la faena. Se recolectaron muestras endometriales de 1,0 cm^3 del cuerpo uterino de cada yegua, con tijera de cirugía (Kenney, 1978), y se conservaron en formalina tamponada al 4% (v/v) durante 48 horas. Luego se realizó el procesamiento histológico ídem al previamente descrito en la etapa 1. Para validar la inflamación post inseminación se observaron los cortes histológicos a 400 aumentos coloreados con hematoxilina-eosina y se determinó en los grupos inseminados presencia de neutrófilos 2 o 3 por campo en 20 campos en la zona de estroma endometrial inmediatamente por debajo del epitelio de revestimiento. El análisis de los polimorfonucleares del proceso inflamatorio se realizó por 3 observadores a 400 aumentos de magnificación final.

Inmunohistoquímica

Los cortes de endometrio fueron desparafinados en estufa a 60 °C durante 15 min, luego se sumergieron en xilol (15 min) y luego se hidrataron por inmersión en concentraciones decrecientes de etanol (100°, 95°, 70°). Para la recuperación antigénica, las secciones de tejido se sumergieron en 300 ml de solución tampón de citrato 0,01 M (pH 6,0) con 5 ml de Tween 20 y se calentaron durante 3 min en un microondas (100%). El bloqueo de las peroxidasas endógenas se realizó mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno H_2O_2 al 3% durante 20 min. Los cortes se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti HSF-1 (ab52813 policlonal de ratón, Abcam; diluido 1/50) o con el anticuerpo primario anti-HSP90 [AC88] (ab13492 monoclonal de ratón, Abcam; 1/50). Posteriormente, las láminas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min con anticuerpo de cabra biotinilado anti-ratón (ab64255 en HRP/DAB Detection IHC Kit ab64259, Abcam, EE. UU.). Luego, las secciones se incubaron con complejo de estreptavidina peroxidasa. Posteriormente, se realizó una detección colorimétrica con un cromógeno tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB) en solución de sustrato de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% (ab64259, Abcam, EE. UU.). Los portaobjetos se contra colorearon con hematoxilina de Harris, se deshidrataban y finalmente se montaban con Entellan® (107960 Sigma-Aldrich). Se incubó un control negativo sin el anticuerpo primario con suero no inmune (dilución 1:500). Se incluyó un portaobjetos de control positivo con un carcinoma de glándula mamaria canina (Kijima et al., 2019).

Captura y digitalización de imágenes endometriales

Para este diseño se utilizó un escáner digital (escáner de portaobjetos histológicos Motic EasyScan One) para captura de imágenes. Se capturaron 60 imágenes (30 de epitelio endometrial y 30 de glándulas endometriales) a 40X de cada preparado realizado con la

técnica de inmunohistoquímica para detectar HSF-1 y HSP90 en el endometrio de yegua.

Análisis cuantitativos de imágenes de la inmunoexpresión de HSF-1 y HSP90 en endometrio de yeguas

Se utilizó el software FIJI (Schindelin et al. 2012, https://imagej.net/software/fiji/downloads) para medir el área inmunomarcada del epitelio de revestimiento y las glándulas endometriales y la suma de los epitelios de revestimiento y glandular.

En las imágenes del epitelio de revestimiento endometrial se midió el área inmunomarcada para HSF-1 y HSP90. Se seleccionó el epitelio con la herramienta de selección a mano alzada en cada imagen y se eliminaron las regiones externas del estroma o las glándulas endometriales. Todas las imágenes recortadas que solo contenían epitelio se procesaron para detectar áreas marrones en el epitelio utilizando el complemento Colour Threshold. Después de la conversión a imágenes binarias (Process–Binary–Make Binary), se midió el área inmunomarcada (Analyse–Measure) utilizando una macro para garantizar la selección de los mismos colores en todas las imágenes.

En las imágenes de las glándulas endometriales se seleccionaron una a una con la herramienta de selección a mano alzada (Freehand selección de FIJI) y se eliminaron las regiones que las rodeaban (herramienta Editar–Borrar el exterior, Clear outside). Para cuantificar cada una de las marcaciones marrones de HSF-1 y HSP90, se utilizó el plugin Colour Threshold para seleccionar áreas marrones específicas DAB positivas. Se utilizó una macro que se generó a partir de pruebas, similar a la medición anterior de HSF-1 y por otra parte de HSP90 en el epitelio endometrial, para seleccionar el mismo color en todas las imágenes y se utilizó un modo por lotes (Batch) para aplicar la macro a todas las imágenes de una carpeta.

Análisis estadístico

En la etapa 2: Todos los resultados se expresaron como medias ± eem. El área inmunomarcada de HSF-1 y de HSP90 se analizó también mediante un análisis de varianza en el modelo general lineal (GLM) utilizando el software SAS (SAS v.9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.). Las diferencias se consideraron significativas cuando p fue menor a 0,05. En el modelo estadístico se consideró el efecto de la inseminación, el tiempo de evaluación de la endometritis post inseminación, la región endometrial (epitelio, glándulas y la suma de los epitelios de revestimiento y glandular). Las diferencias entre los grupos se evaluaron con pruebas post hoc de Tukey y de Fisher.

RESULTADOS

Etapa 1. Evaluación del factor HSF-1 durante el ciclo estral y anestro.

1. **Expresión del factor de shock térmico HSF-1 en endometrio de yeguas adultas durante las etapas de estro y diestro del ciclo estral y durante el anestro, en el epitelio de revestimiento endometrial y en las glándulas endometriales.**

a) Localización de la inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento endometrial

La inmunoexpresión del factor HSF-1 se localizó en el epitelio de revestimiento endometrial en el citoplasma y núcleo de las células secretoras y ciliadas y en algunas células basales.

En anestro la inmunoexpresión de HSF-1 se localizó en el núcleo de células del epitelio de revestimiento epitelial (Figura 4a).

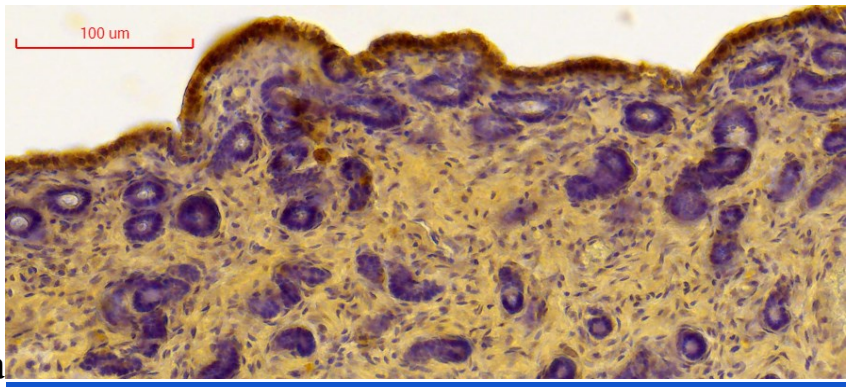
En el estro la inmunoexpresión de HSF-1 se localizó también a nivel nuclear en el epitelio de revestimiento y en el citoplasma de las glándulas (Figura 4b).

En el diestro se observó intensa inmunoexpresión en núcleos de células del epitelio de revestimiento y epitelio glandular, así como en células de tejido conjuntivo del estroma endometrial. La inmunoexpresión de HSF-1 también se observó en el citoplasma de células epiteliales del epitelio de revestimiento y epitelio glandular (Figura 4c).

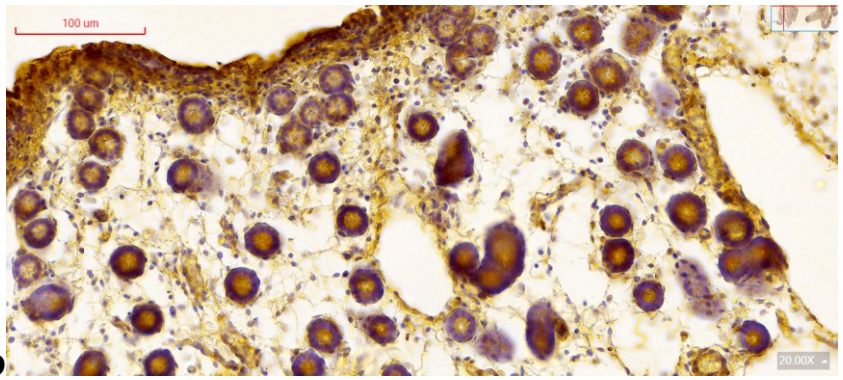
b) Localización de la inmunoexpresión de HSF-1 en las glándulas endometriales

En las glándulas endometriales la inmunoexpresión del factor HSF-1, se observó en la región citoplasmática y escasamente a nivel nuclear en las células epiteliales, siendo en el diestro más evidente la inmunomarcación y una leve inmunomarcación durante el anestro (Figura 4).

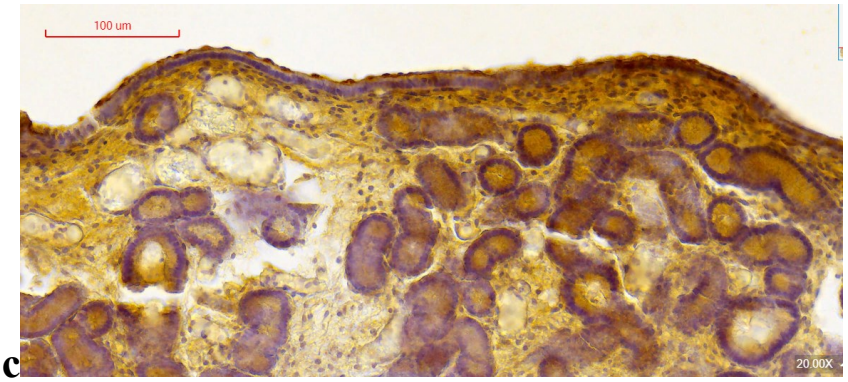
En suma, se observó una mayor inmunoexpresión en diestro en comparación al estro y al anestro (Figura 5).



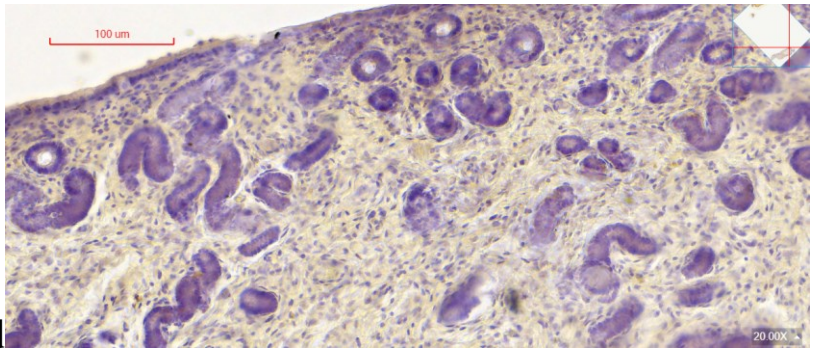
a



b



c



d

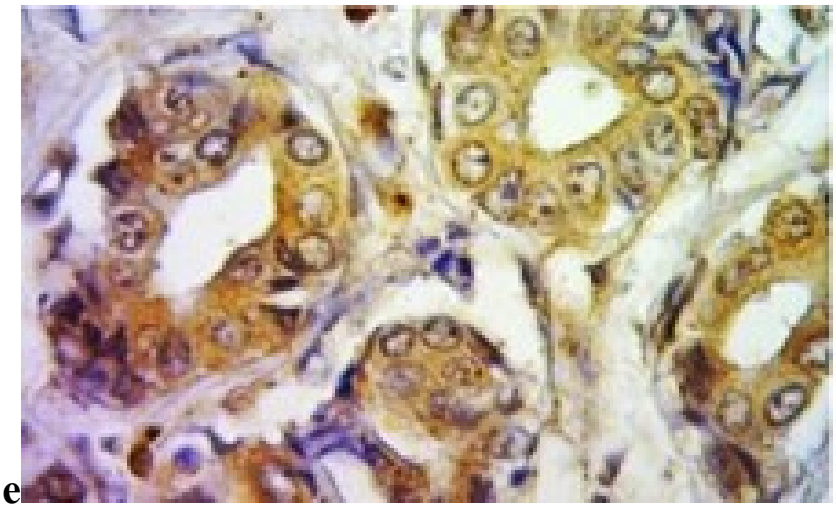
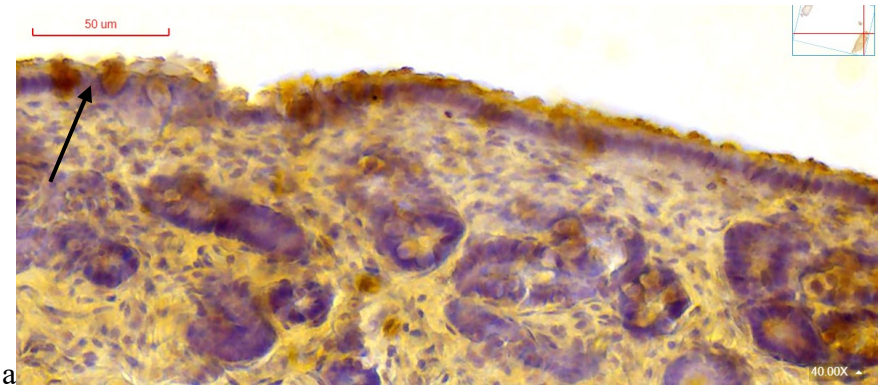
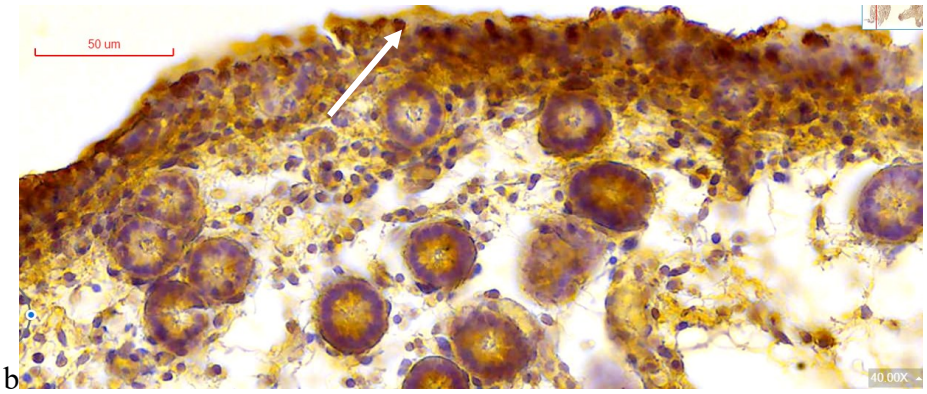
e 

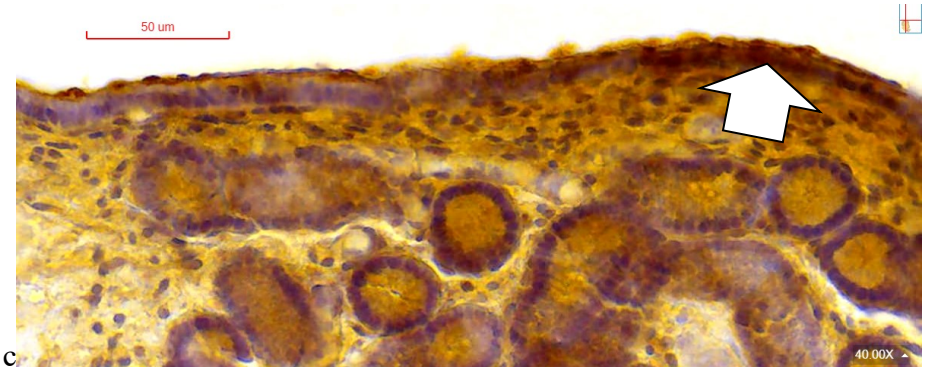
Figura 4. Imágenes de inmunohistoquímica de la inmunoexpresión del factor de transcripción HSF-1 en endometrio de yeguas durante anestro (a), estro (b) diestro (c). a) En anestro se observan glándulas endometriales pequeñas con escasa inmunomarcación de HSF-1. b) En estro se observa estroma con edema endometrial. Se localiza la inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento y glándulas endometriales. c) En el diestro se observan las glándulas endometriales de mayor diámetro y la inmunoexpresión de HSF-1 en el citoplasma de las células. d) Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica sustituyendo el anticuerpo primario con suero normal equino. Magnificación 200 aumentos. Barra de escala 100 micrómetros. e) Control positivo de la técnica de inmunohistoquímica con carcinoma de glándula mamaria en perra.



a



b



c

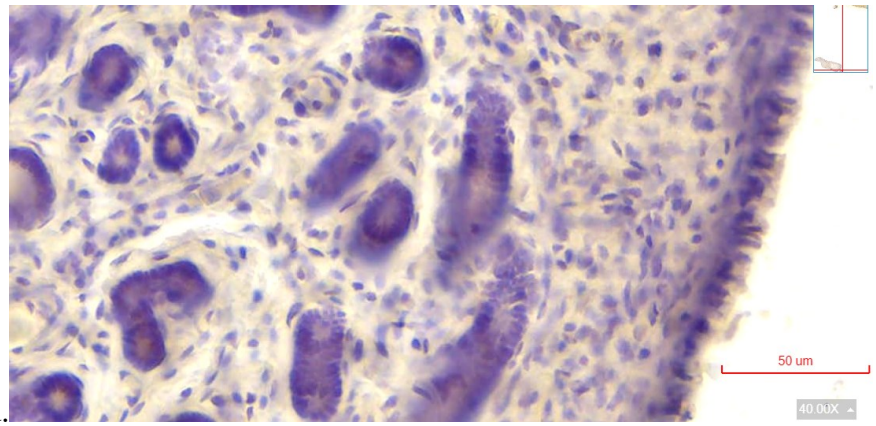
d. 

Figura 5. Imágenes a mayor aumento de la localización de la inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento endometrial y en glándulas a mayor aumento en yeguas en anestro (a), estro (b) diestro (c). a) En anestro se observa localización escasa a nivel nuclear del factor HSF-1 (flecha negra). b) En estro a nivel nuclear se detecta una intensa inmunoexpresión de HSF-1 (flecha gris). Se localiza la inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento y glándulas endometriales. c) En el diestro la inmunoexpresión de HSF-1 en el núcleo es intensa (flecha blanca gruesa) y en citoplasmas. d) Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica sustituyendo el anticuerpo primario con suero normal equino. Magnificación 400 aumentos. Barras de escala: 50 micrómetros.

c) Cuantificación de la inmunoexpresión de HSF-1 durante estro y diestro y anestro, en el epitelio de revestimiento endometrial y en las glándulas endometriales

A nivel del epitelio endometrial el mayor nivel de inmunoexpresión de HSF-1 se observó en diestro ($p<0,0001$) seguido de estro y la menor inmunoexpresión fue en el anestro.

Asimismo, en las glándulas endometriales, la mayor inmunoexpresión de HSF-1 se registró en el diestro, seguido por el estro y luego anestro ($p<0,0001$). El área inmunomarcada de HSF-1 en la etapa de diestro en el epitelio de revestimiento endometrial fue mayor en el diestro ($p = 0,0001$) (7,98 ± 0,22%) que en el estro (5,13 ± 0,19%), y que en el anestro (1,92 ± 0,19%).

El área inmunomarcada de HSF-1 en las glándulas endometriales fue mayor en diestro, seguido por el estro y luego el anestro (8,42 ± 0,47; 5,44 ± 0,43; 0,79 ± 0,41%; $p = 0,0001$).

El área inmunomarcada de HSF-1 en la suma de los epitelios de revestimiento y glandular fue mayor ($p =0,0001$) en diestro (15,92 ± 0,43%) en comparación con el estro (10,27 ± 0,38%) y anestro (2,73 ± 0,36%) (Figura 6).

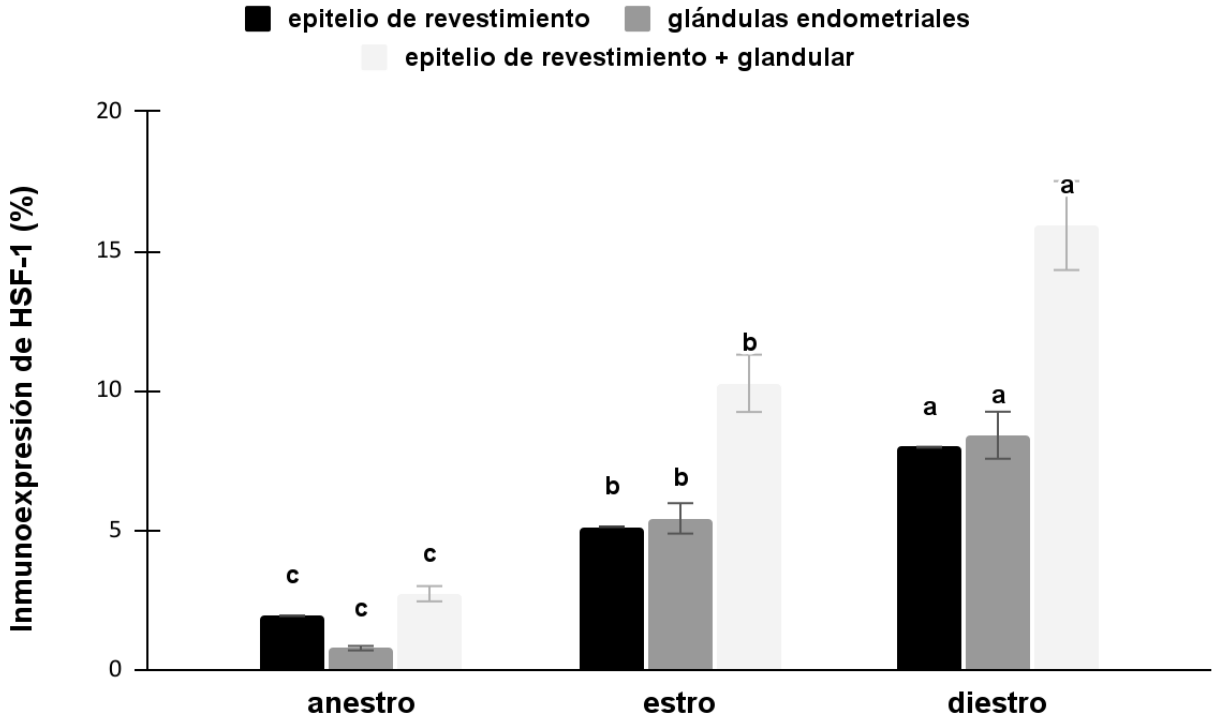


Figura 6. Cuantificación de la inmunoexpresión del factor de transcripción HSF-1 en endometrio de yegua. Área inmunomarcada de HSF-1 (%). Los resultados se expresaron como medias ± e.e.m. para el grupo en anestro, el estro y el diestro, y en el epitelio de revestimiento (barras negras), en el epitelio glandular (barra gris oscuro), y la suma de ambos epitelios de revestimiento y glandular (gris claro). Se observa mayor inmunoexpresión de HSF-1 en etapa de diestro en ambos epitelios. Los literales diferentes en las columnas del mismo color indican diferencias significativas entre grupos anestro, estro y diestro ($p < 0,05$).

Etapa 2.1. Evaluación de HSF-1 en endometritis post inseminación

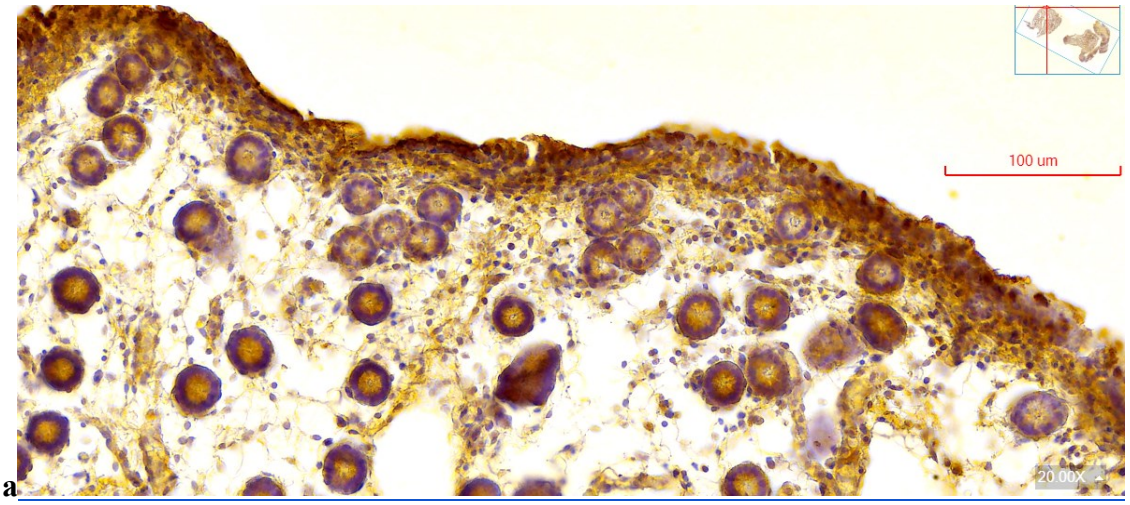
1. **Expresión del factor HSF-1 en el epitelio de revestimiento endometrial, glándulas endometriales en endometritis a las 2 horas y 4 horas post inseminación en yeguas y en el grupo control sin inseminación.**

a) **Localización de la inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF-1 a las 2 horas post inseminación en el epitelio de revestimiento**

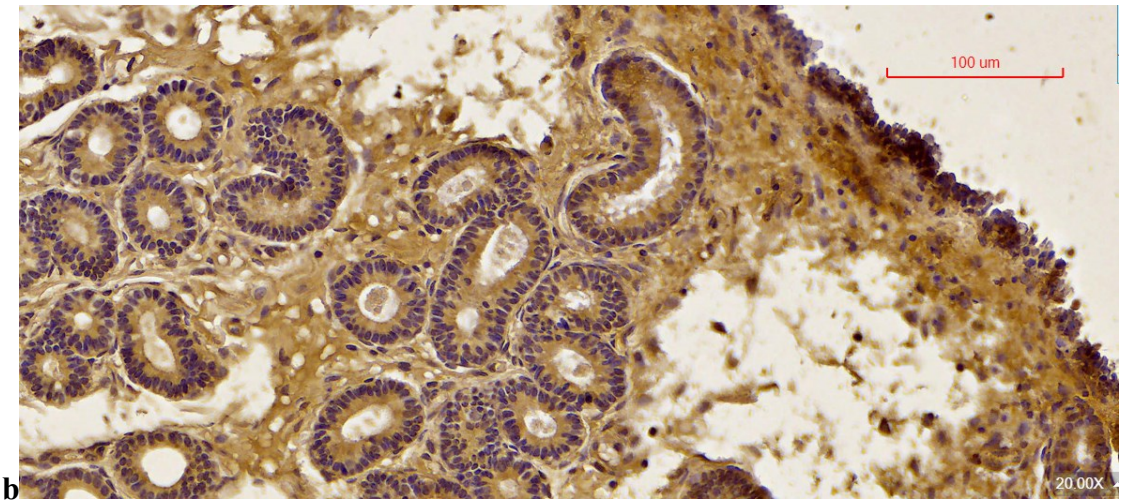
El factor de transcripción de shock térmico HSF-1 se inmunolocalizó en las células del epitelio de revestimiento endometrial a nivel del núcleo y citoplasma (Figura 7).

b) **Localización de la inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF-1 a las 2 horas post inseminación en las glándulas endometriales**

En las células epiteliales glandulares a las 2 horas post inseminación la inmunoexpresión se observó tanto en núcleo como en citoplasma (Figura 7).



a



b

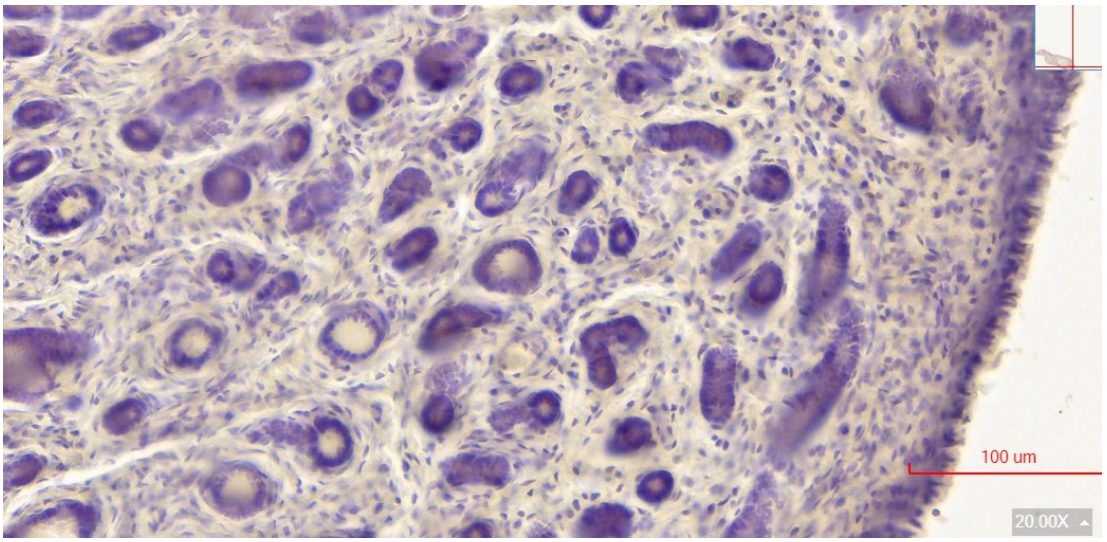
c 

Figura 7. Imágenes de inmunoexpresión de la proteína HSF-1 en el endometrio de yeguas endometritis post inseminación. a) grupo control sin inseminar. b) grupo de yeguas a las 2 horas post inseminación. c) control negativo de la técnica de inmunohistoquímica sustitución del anticuerpo primario por suero normal equino. Magnificación 200 aumentos. Barra de escala 100 micrómetros.

c) Localización de la inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF-1 a las 4 horas post inseminación en el epitelio de revestimiento endometrial

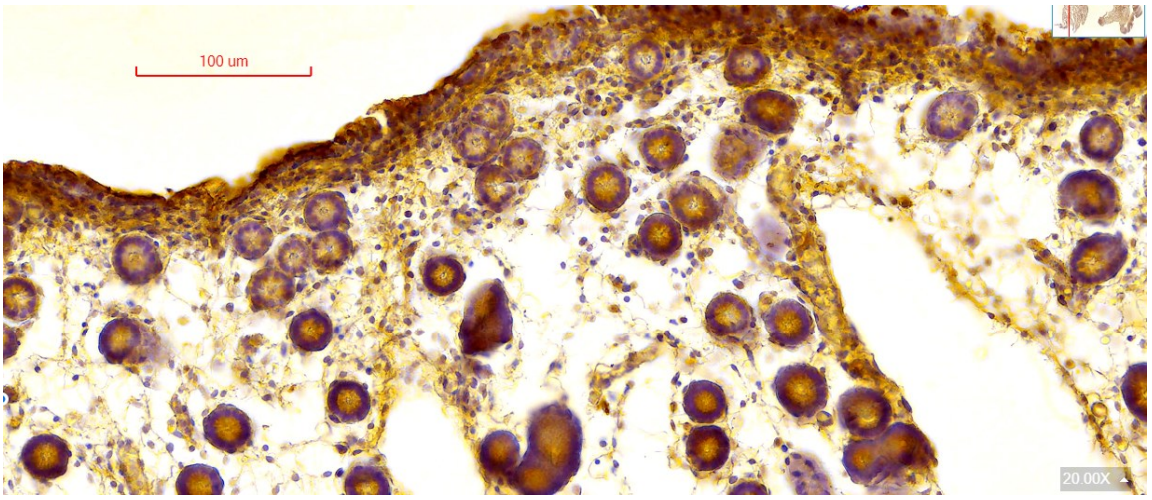
A las 4 horas post inseminación, la inmunomarcación para HSF-1 se localizó tanto en los núcleos y el citoplasma del epitelio de revestimiento endometrial (Figura 8).

d) Localización de la inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF-1 a las 4 horas post inseminación en las glándulas endometriales

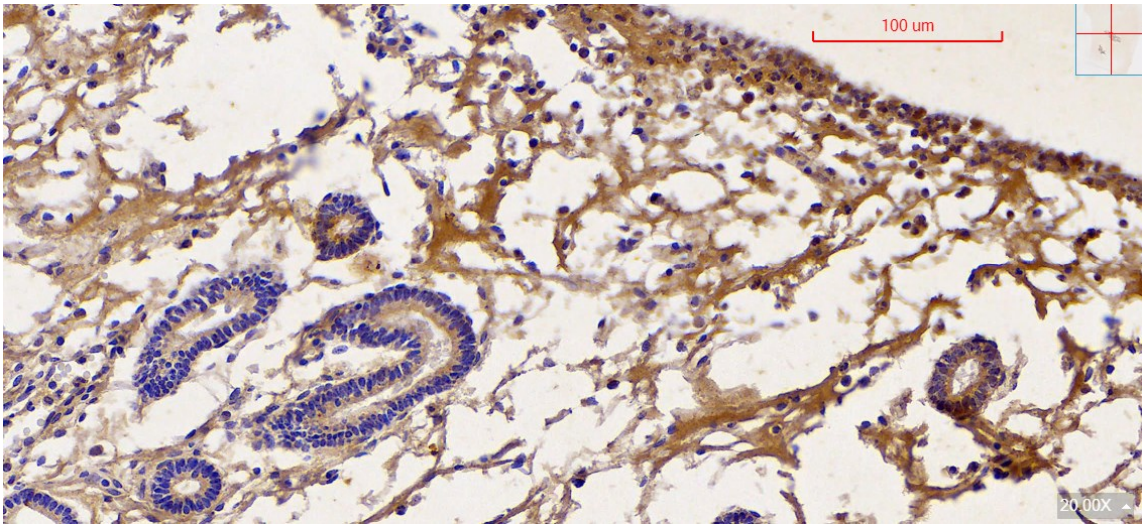
A las 4 horas post inseminación el factor HSF-1 se localizó en el citoplasma de las células epiteliales de las glándulas endometriales y la luz de las glándulas (Figura 8).

Además, en el estroma conjuntivo, se observó el HSF-1 en fibras y en escasas células conjuntivas a nivel nuclear.

a



b



c

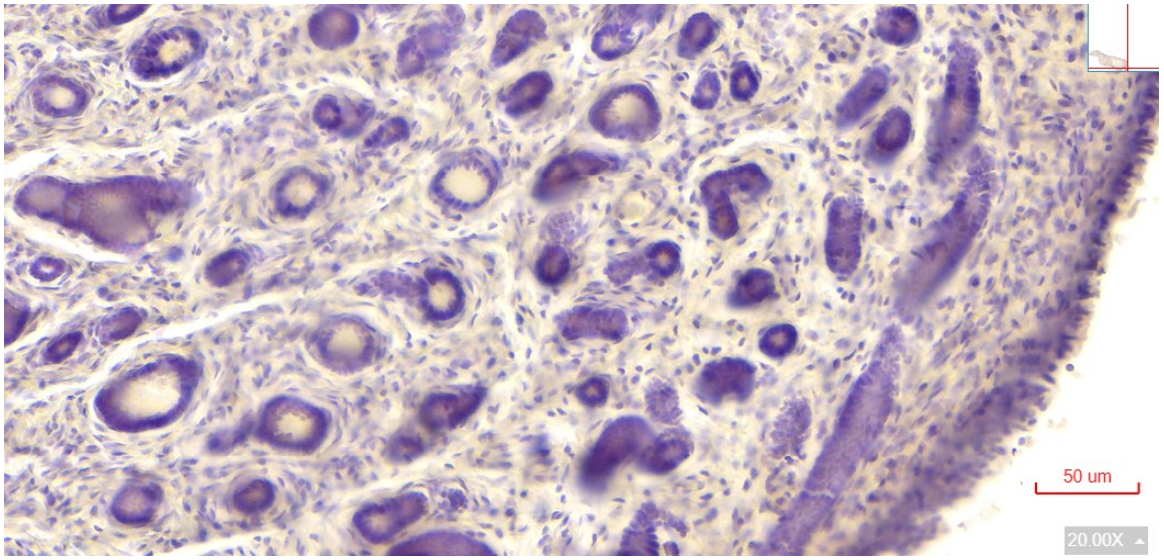


Figura 8. Inmunoexpresión de la proteína HSF-1 en el endometrio de yeguas en estro a las 4 horas post inseminación. a) Imagen a menor aumento de endometrio donde se observa HSF-1 en epitelio y glándulas y estroma endometrial. Barra de escala 100 micrómetros. b) Imagen a mediano aumento de endometrio donde se observa leve marcación de HSF-1. Barra de escala 100 micrómetros. c) Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica sin anticuerpo primario. Barra de escala 50 micrómetros.

e) Cuantificación de la inmunoexpresión de HSF-1 en el endometrio de yeguas a las 2 horas y 4 horas post inseminación y en el grupo control.

La inmunoexpresión de HSF-1 en el epitelio de revestimiento endometrial fue menor ($p = 0,0001$) a las 2 horas post inseminación (2,39 ± 0,16%) en comparación con el grupo control (3,40 ± 0,23%).

En las glándulas endometriales el área inmunomarcada de HSF-1 fue menor el grupo de endometritis a las 4 horas post inseminación (5.29 ± 0,67%, $p< 0,0001$) en comparación con el grupo de endometritis a las 2 horas post inseminación (9,68 ± 0,53%). El grupo control en estro presentó la mayor inmunoexpresión (12,38 ± 0,75%).

Si analizamos la suma total del área inmunomarcada de HSF-1 en el epitelio de revestimiento y glandular en el grupo endometritis a las 2 horas y el grupo a las 4 horas post inseminación fue menor que el grupo control respectivamente (12,06 ± 0,93; 8,64 ± 0,69; 15,8 ± 0,9 <0,05) (Figura 9).

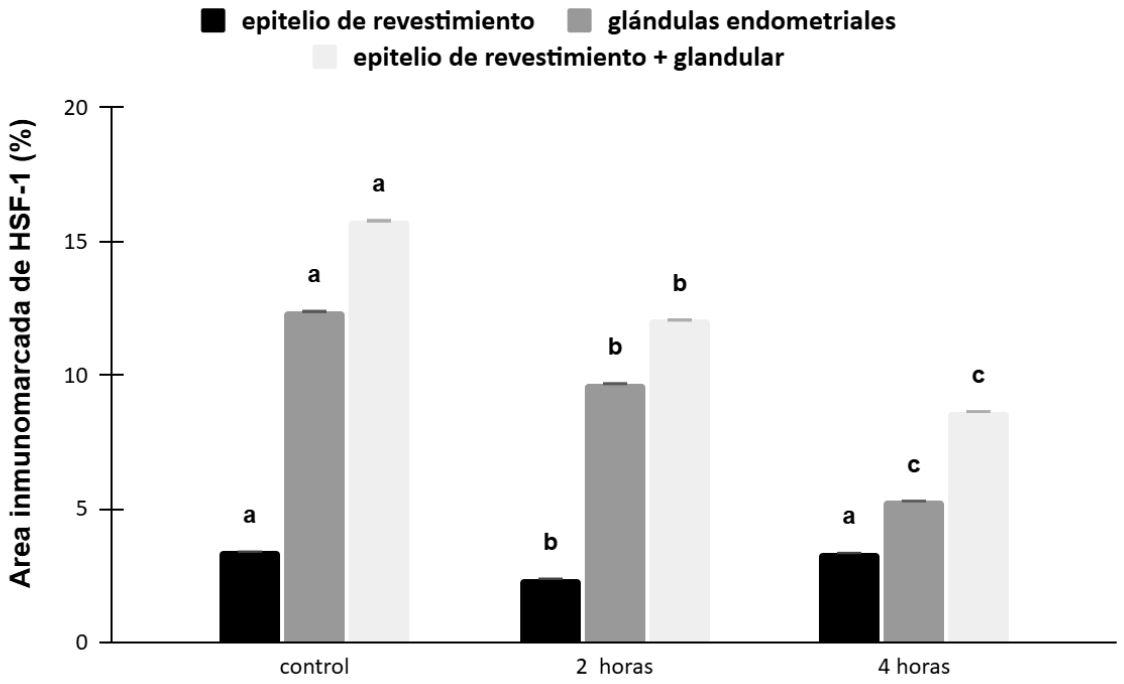


Figura 9. Cuantificación del área inmunomarcada del factor de transcripción HSF-1 en el endometrio de yeguas. Los datos representan el porcentaje de área inmunomarcada (media ± e.e.m) en grupo control yeguas en estro sin inseminar, 2 horas: grupo de yeguas a las 2 horas post inseminación y 4 horas: grupo a las 4 horas post inseminación artificial. en el epitelio de revestimiento (barras negras), en el epitelio glandular (barra gris oscuro), y la suma de ambos epitelios de revestimiento y glandular (gris claro). Se observa mayor inmunoexpresión de HSF-1 en el grupo control en las glándulas endometriales, disminuyendo a las 2 y a las 4 horas. Las letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias significativas entre grupos control, 2 horas y 4 horas post inseminación ($p < 0,05$).

Etapa 2. 2. Evaluación de la proteína HSP90 en la endometritis post inseminación

2. **Expresión de la proteína de shock térmico HSP90 en el epitelio de revestimiento endometrial, glándulas endometriales en endometritis a las 2 horas y 4 horas post inseminación en yeguas adultas y en el grupo control en yeguas.**

a) Localización de la inmunoexpresión de HSP90 en epitelio de revestimiento endometrial a las 2 horas post inseminación

La proteína HSP90 se localizó en el epitelio de revestimiento con endometritis a las 2 horas post inseminación. Se detectó intensa inmunomarcación nuclear y citoplasmática (Figura 10).

b) Localización de la inmunoexpresión de HSP90 en las glándulas endometriales a las 2 horas post inseminación

En el epitelio glandular se observó intensamente inmunomarcación de HSP90 a nivel citoplasmático y nuclear (Figura 10b).

Cabe destacar además que fibroblastos y leucocitos del tejido conjuntivo del estroma endometrial evidenciaron marcación nuclear de HSP90 (Figura 10b).

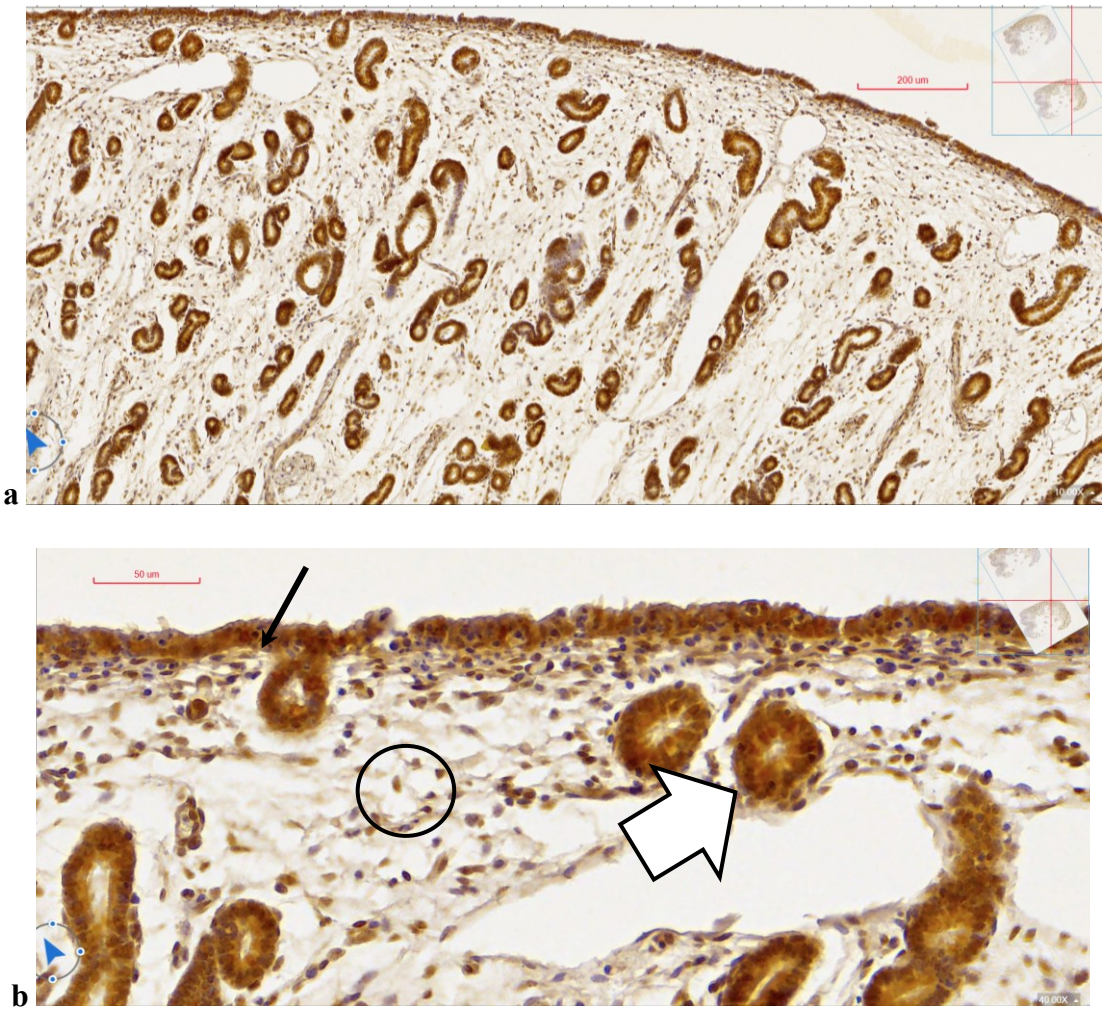


Figura 10. Imágenes de técnica de inmunohistoquímica con inmunoexpresión de la proteína HSP90 en el endometrio de yeguas en estro a las 2 horas post inseminación. a) Imagen a 100 aumentos del endometrio donde se observa intensa marcación de color marrón a nivel del epitelio de revestimiento y glandular. Barra de escala 100 micrómetros. b) Imagen 400 aumentos se observa la localización citoplasmática y nuclear de HSP90 de color marrón. La inmunoexpresión de HSP90 en las células del epitelio de revestimiento endometrial (flecha negra) y en las células del epitelio glandular (flecha blanca). Asimismo, los fibroblastos y otras células como leucocitos agranulocitos, linfocitos, pertenecientes a las células del tejido conjuntivo laxo del estroma endometrial presentaron una intensa inmunomarcación (círculo). Barra de escala 50 micrómetros.

c) Localización de la inmunoexpresión de la proteína HSP90 a las 4 horas post inseminación en el epitelio de revestimiento endometrial.

La inmunoexpresión de la proteína HSP90 se observó a nivel nuclear y a nivel citoplasmático en epitelio de revestimiento a las 4 horas post inseminación. Se evidenció una menor inmunoexpresión en comparación con el grupo de 2 horas post inseminación (Figura 11).

d) Localización de la inmunoexpresión de la proteína HSP90 a las 4 horas post inseminación en las glándulas endometriales.

En las glándulas endometriales la proteína HSP90 se localizó a nivel nuclear y citoplasmático (Figura 11b).

En el estroma endometrial las células del tejido conjuntivo presentaron marcación nuclear. Por ejemplo, se observan fibroblastos con núcleos positivos en el estroma subepitelial, así como en la región entre los cortes transversales de glándulas endometriales (Figura 11).

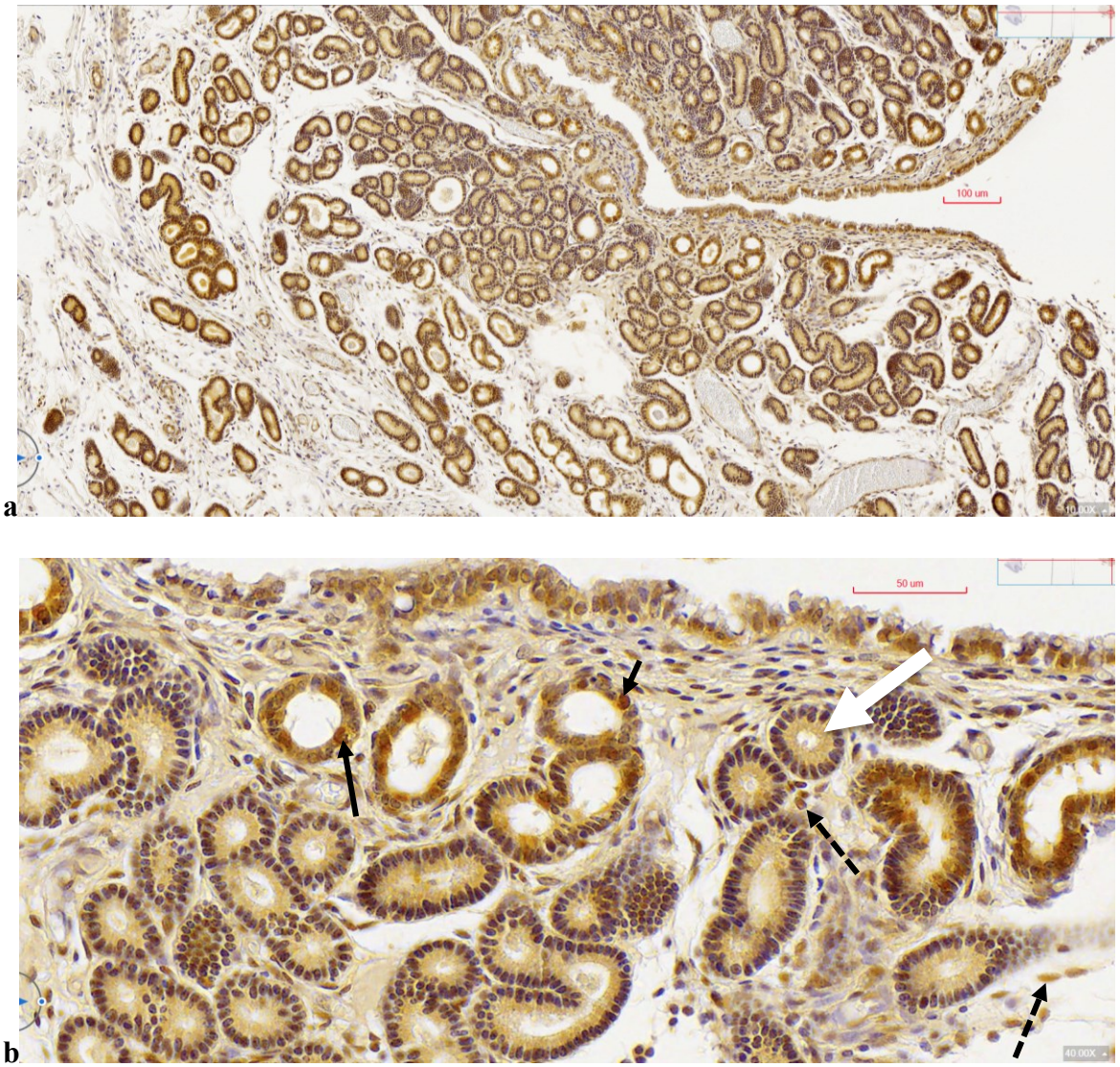
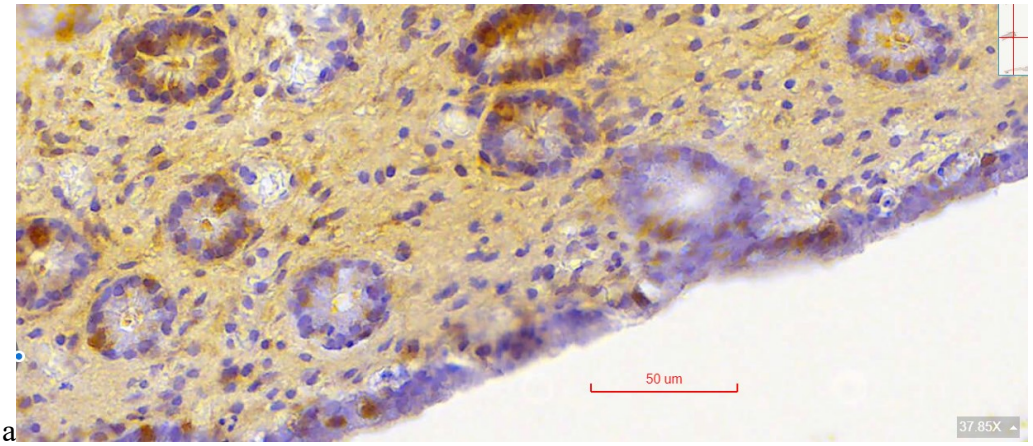


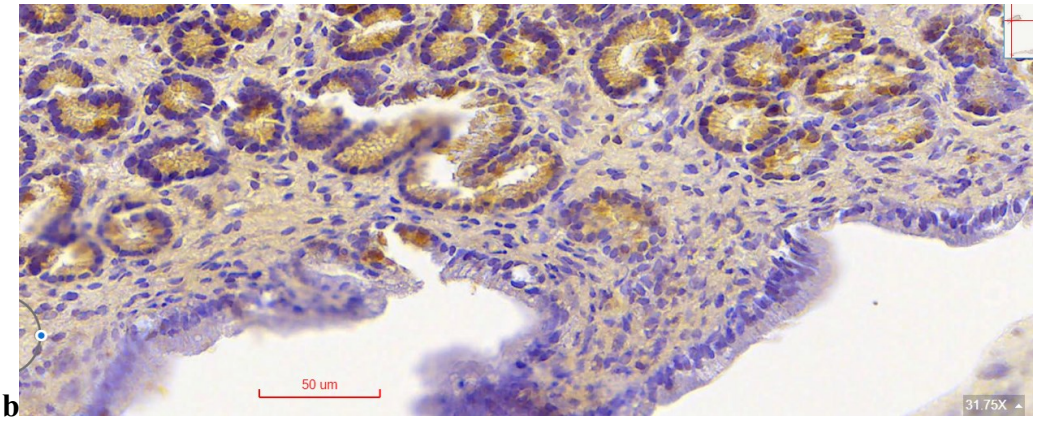
Figura 11. Inmunoexpresión de HSP90 en el endometrio de yeguas en estro a las 4 horas post inseminación. a) Endometrio de yeguas donde se observa el epitelio de revestimiento y las glándulas de color marrón indicando la presencia de HSP90. Se observa además el edema endometrial característico del estro, que es más notorio en la región más profunda del endometrio. Magnificación 100 aumentos. Barra de escala 100 micrómetros. b) Se observa la localización citoplasmática en las células epiteliales glandulares (flecha blanca) y marcación nuclear en algunas células (flechas negras). Además, se observa un aumento de la celularidad alrededor de las glándulas endometriales con fibroblastos positivos a HSP90 (flechas segmentadas). Magnificación 400 aumentos. Barra de escala 50 micrómetros.

e) Localización de la inmunoexpresión de HSP90 en el grupo control en estro sin inseminar

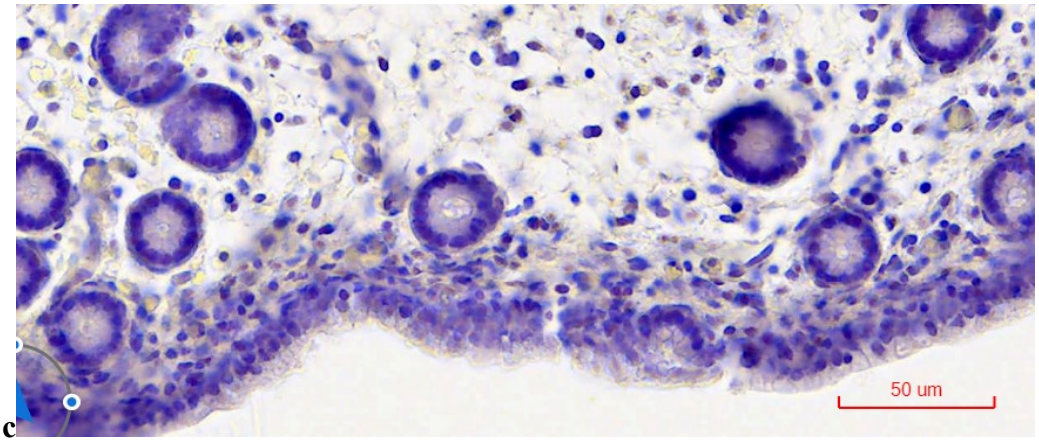
En el grupo control la proteína se expresó a nivel del epitelio de revestimiento de forma leve en algunas células a nivel nuclear intensamente. A nivel de las glándulas endometriales también se observó la inmunomarcación en los núcleos de manera intensa y más leve en los citoplasmas de algunas de las células epiteliales glandulares (Figura 12).



a



b



c

Figura 12. Inmunoexpresión de la proteína HSP90 en el grupo control en estro sin inseminar de yeguas adultas. a) Imagen representativa de endometrio de yegua en estro donde se observa la inmunoexpresión en núcleos de células del epitelio de revestimiento y en células epiteliales glandulares. b) Imagen representativa de zonas donde la HSP90 se expresó a nivel del citoplasma de las células. c) Control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Barra de escala 50 micrómetros.

f) Cuantificación de la inmunoexpresión de HSP90 en el endometrio de yeguas adultas a las 2 horas y 4 horas post inseminación y en el grupo control.

El área inmunomarcada en el epitelio de revestimiento endometrial fue mayor (p = 0,0001) en el grupo a las 2 horas post inseminación (1,59 ± 0,13%) que en el grupo a las 4 horas post inseminación (0,81 ± 0,23%). Sin embargo, no se observaron diferencias (p = 0,51) entre el grupo a las 2 horas post inseminación y el grupo control (1,46 ± 0,15%) en el epitelio de revestimiento endometrial. El área inmunomarcada en el epitelio de revestimiento endometrial fue menor (p = 0,003) en el grupo 4 horas post inseminación (0,81 ± 0,23%) en comparación con el grupo control (1,46 ± 0,15%).

La inmunoexpresión de HSP90 en las glándulas endometriales fue mayor (p =0,007) durante la endometritis 2 horas post inseminación (4,92 ± 0,24%) que en el grupo 4 horas post inseminación (3,72 ± 0,37%) y el grupo control (1,62 ± 0,28%; p = 0,0001). El área inmunomarcada de HSP90 en las glándulas endometriales fue mayor (p = 0,007) en el grupo de endometritis a las 4 horas post inseminación (3,72 ± 0,37%) que en el grupo control (1,62 ± 0,28%).

El área inmunomarcada de HSP90 en la suma de epitelios de revestimiento y glandular fue mayor (p = 0,0002) en el grupo de endometritis 2 horas post inseminación (6,78 ± 0,33%) en comparación con el grupo endometritis 4 horas post inseminación (4,45 ± 0,53%) y en comparación con el grupo control (3,28 ± 0,31%; p 0,0001). Se registró una tendencia a disminuir (p = 0,06) entre el grupo con endometritis 4 horas post inseminación con respecto al grupo 2 horas (Figura 13).

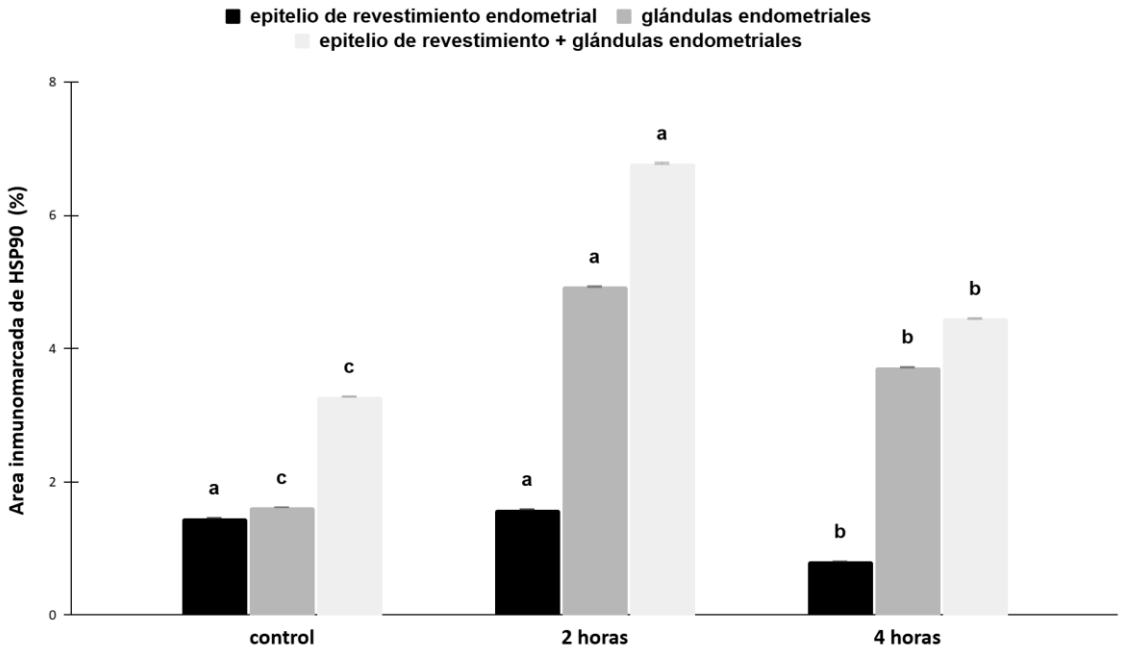


Figura 13. Cuantificación del área inmunomarcada de la proteína HSP90 en el endometrio de yeguas. Los datos representan el porcentaje de área inmunomarcada (media ± e.e.m) en grupo control (yeguas en estro sin inseminar), grupo a las 2 horas post inseminación (2 horas) y grupo a las 4 horas post inseminación (4 horas), y en el epitelio de revestimiento (barras negras), en el epitelio glandular (barra gris oscuro), y la suma de ambos epitelios de revestimiento y glandular (gris claro). Se observa mayor inmunoexpresión de HSP90 en el grupo 2 horas en la glándulas endometriales y epitelio de revestimiento y el glandular, disminuyendo a las 4 horas y con respecto al grupo control. Las letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias significativas entre grupos control, 2 horas y 4 horas post inseminación ($p < 0,05$).

En resumen, la proteína de shock térmico HSP90 aumenta en el endometrio de yeguas después de 2 y 4 horas post inseminación artificial, con una intensa inmunomarcación en las glándulas endometriales.

DISCUSIÓN

El presente estudio determinó que el factor de transcripción HSF-1 se inmunoexpresó en el endometrio de yeguas durante el ciclo estral y en anestro, y durante las 2 y 4 horas post inseminación en el endometrio de yeguas adultas. Hasta donde sabemos éste es el primer reporte de la expresión de HSF-1 en endometrio en yeguas adultas durante el ciclo estral.

Factor de shock térmico HSF-1 en el endometrio de yeguas en ciclo estral y anestro

El factor HSF-1 se localizó en el citoplasma y en el núcleo de las células del epitelio de revestimiento endometrial y en las glándulas endometriales. El HSF-1 en la célula no estresada se encuentra en el citoplasma como un monómero inactivo unido a un complejo de chaperonas, que incluye a la HSP90, y éste complejo se disocia y se vuelve a ensamblar continuamente (Ahn & Thiele 2003). Sin embargo, después del estrés proteo-tóxico, este complejo se rompe, debido a la acción de las HSP fuera de los complejos por la acumulación de proteínas mal plegadas que deben reparar, lo que resulta en un aumento de HSF-1 no unido, entonces se activa, se trimeriza se fosforila y se transloca al núcleo para interactuar con sitios reguladores del ADN para activar la transcripción de genes dirigidos a proteínas de shock térmico (Shi et al. 1998). Por lo tanto, ambas localizaciones de HSF-1 tanto a nivel citoplasmático como nuclear observados en las células del epitelio de revestimiento y en glándulas endometriales implica unión a otras proteínas como HSP90 y la regulación de la transcripción de genes.

Además, en el endometrio ocurren cambios morfológicos a nivel de la altura del epitelio de revestimiento, y del diámetro y densidad de las glándulas endometriales, por lo tanto, podemos sugerir que el HSF-1 está ejerciendo su rol protector sobre las células que van a renovar los epitelios promoviendo la proliferación y diferenciación celular (Salmand et al., 2008). Los cambios detectados en la expresión de HSF-1 en las células de los epitelios de revestimiento y glandulares en las fases reproductivas sugieren la relevancia que posee el HSF-1 en el control de las proteínas de shock térmico, de importancia en la función uterina. Además, en investigaciones previas con las mismas yeguas utilizadas en el presente estudio, se observó que la proteína de shock térmico HSP90 aumentó en estro y disminuyó en el diestro en el endometrio. Esto se asoció a que las HSP90 interactúan con los receptores de hormonas esteroideas que actúan en etapas reproductivas (Camacho et al. 2021).

Por lo tanto, si analizamos los resultados de ambos estudios en el diestro aumenta HSF-1, y disminuye la proteína de shock térmico HSP90. Mientras que durante el estro ocurre lo contrario, disminuye HSF-1 y aumenta HSP90. Este resultado podría deberse a que altos niveles de HSP90 regulan negativamente al HSF-1, ya que la HSP90 tiene una acción represora sobre HSF-1 (Leach et al. 2012). Además, nuestros resultados concuerdan con

datos previos que mencionan que la inhibición de HSP90 o disminución de HSP90 por sí sola, es suficiente para activar HSF-1 en ausencia de factores ambientales estresantes (Zou et al. 1998; Dayalan Naidu and Dinkova-Kostova 2017).

Por otro lado, el aumento detectado de la inmunoexpresión de HSF-1 durante el diestro sugiere una relación con los niveles hormonales de progesterona. La acción de la progesterona durante el diestro en el útero de la yegua, lo hace susceptible a las infecciones bacterianas, mientras que, en estro cuando aumentan los estrógenos, el útero es capaz de eliminar las infecciones (Canisso et al. 2020). El aumento de HSF-1 en diestro sugiere una acción de defensa durante esa etapa por parte el endometrio por estar expuesto a un medio con secreciones endometriales que favorecen el crecimiento de microorganismos, y por lo tanto el desarrollo de la endometritis (Marth et al. 2015). Por lo tanto, la inmunoexpresión del factor de transcripción HSF-1 en el endometrio de la yegua, sugiere que el HSF-1 está involucrado en la regulación de los cambios moleculares en el endometrio de yegua que acontecen durante el ciclo estral y durante el anestro.

Factor de shock térmico HSF-1 en endometritis en yeguas post inseminación

En segundo lugar, el factor de transcripción de shock térmico HSF-1 se expresa en la endometritis a las 2 y 4 horas post inseminación. Este es el primer reporte de la expresión de HSF-1 en el endometrio de yeguas con endometritis fisiológica post inseminación artificial.

Nuestros resultados demuestran que la inmunoexpresión de HSF-1 disminuye a las 2 y a las 4 horas luego de la inseminación artificial. En el endometrio de yeguas a las 2 horas aumentan las citoquinas inflamatorias luego de la monta en yeguas no susceptibles (Woodward et al., 2013). Asimismo, las citocinas proinflamatorias como el TNF-α y la IL-6 actúan en la fase inicial de la inflamación y bloquean la actividad transcripcional de HSF-1 (Schroeder et al., 2024). Por otra parte, el factor de transcripción HSF-1 juega un papel esencial en las células normales y bajo estrés celular, éste activa la transcripción de genes de proteínas reparadoras y regula la respuesta inflamatoria por supresión de interleucinas como IL-6 (Takii et al. 2010). En este sentido, en el endometrio humano estudios previos mencionan que el factor de transcripción HSF-1 juega un rol protector a través de la regulación de citoquinas inflamatorias (Trinklein et al. 2004).

Por lo tanto, al inicio del proceso inflamatorio donde las citocinas se están sintetizando, sugerimos que éstas bloquean la actividad transcripcional de HSF-1 en el endometrio de yeguas. Además, en nuestros resultados a las 2 horas post IA la proteína de shock térmico HSP90 aumenta, sugiriendo una acción represora sobre HSF-1 tal como describe Walker et al., 2009. Finalmente, sugerimos que el factor HSF-1 en el endometrio de la yegua está involucrado en el mecanismo de protección similar al que ocurre en humanos durante el diestro en condiciones normales cuando HSP90 disminuye.

Localización citoplasmática, nuclear de la proteína de shock térmico HSP90 en endometrio de yeguas con endometritis post inseminación.

Nuestros resultados en yeguas con endometritis post inseminación coinciden con lo previamente reportado con respecto a la localización de la proteína HSP90 en el epitelio de revestimiento endometrial, glándulas endometriales durante el estro (Camacho et al., 2021). En el endometrio de yeguas observamos una localización citoplasmática tanto en las células epiteliales como conjuntivas. Tal como mencionamos anteriormente, las proteínas de shock térmico se expresan en condiciones de estrés para proteger a las células. La localización de las HSP es tanto como proteínas intracelulares, pero pueden estar presentes en el líquido extracelular estimulando la respuesta inmunitaria (Liu et al., 2021; Poggio et al., 2021)

En primer lugar, la localización citoplasmática se explica porque la principal función de la HSP90 es interactuar con otras proteínas, dentro de las cuales se encuentran los receptores de hormonas esteroideas, como los receptores de estrógenos y los receptores de progesterona. La HSP90 se une al receptor de hormonas esteroideas en el citoplasma, manteniéndolo en estado inactivo, cuando ingresa su ligando, la HSP90 se libera y el complejo receptor-ligando se transloca al núcleo (Komatsu et al., 1997). En segundo lugar, la localización citoplasmática se explica por su actividad dentro del retículo endoplásmico regulando las proteínas mal plegadas (De Maio et al., 2012). En tercer lugar, la HSP90 realiza la translocación de antígenos desde el medio extracelular al citosol para su degradación en el proteosoma (Srivastava 2002).

Por otra parte, observamos una localización nuclear de la HSP90 en las células epiteliales endometriales. Aunque tradicionalmente se considera una chaperona citosólica, trabajos recientes indican que la HSP90 en el núcleo modula la transcripción a través de la acción en los sitios de regulación del ADN y se encuentra asociada con la cromatina cerca de los sitios de inicio de la transcripción de múltiples genes (Sawarkar et al., 2012). La HSP90 funciona tanto en la regulación de la actividad de factores de transcripción específicos de secuencia como los receptores nucleares y HSF-1, como también en el impacto sobre factores de acción más global que actúan sobre la cromatina y la ARN polimerasa II y en la transcripción modulando la modificación de histonas (Calderwood & Neckers, 2016).

Estudios previos en otros órganos como en testículos de ratón en condiciones normales, las HSP90 se observan mayoritariamente una localización citoplasmática y en menor medida en el núcleo, pero después de un shock térmico, estas aumentan y se presentan en el núcleo (Biggiogera et al., 1996). La localización nuclear de las HSP90 implica su participación en

la síntesis y procesamiento de ARN.

Por otra parte, se observó la localización extracelular, sugiriendo que la HSP90 está involucrada en la modulación del proceso inflamatorio al interactuar con células del tejido conjuntivo. Las HSPs citosólicas se liberan al espacio extracelular formando vesículas internas se liberan fuera de la célula para convertirse en exosomas. También pueden transportarse directamente desde el citoplasma a través de la membrana plasmática con o sin transportador. Además, se produce liberación al espacio extracelular a través de microvesículas que se desprenden de la superficie celular (Li et al., 2022). En el espacio extracelular es modular la respuesta inflamatoria por ejemplo estimulando macrófagos y las estimulan a sintetizar citoquinas proinflamatorias y están implicadas en la comunicación célula-célula, la activación de células inmunes y la promoción de respuestas antiinflamatorias y antiplaquetarias (Reddy et., 2018). Específicamente, se ha estudiado que la HSP90 extracelular como tiene la capacidad de unirse a receptores de superficie y activar funciones celulares relacionadas con la respuesta inmune como activar la secreción de citocinas, la maduración celular y la presentación de antígenos siendo estudiadas como moduladores de la respuesta inmune (Corigliano et al., 2021).

Cuantificación de la inmunoexpresión de HSP90 en endometrio de yeguas con endometritis post inseminación.

La proteína de shock térmico HSP90 aumenta su expresión durante la endometritis post inseminación en yeguas. El aumento de HSP90 es mayor a las 2 horas y luego a las 4 horas disminuye siendo de todas maneras mayor que las yeguas sin inseminar. Hasta donde sabemos este es el primer reporte de la expresión de la proteína HSP90 en estas condiciones de endometritis post inseminación en yeguas.

Sugerimos que el aumento de la HSP90 registrado a las 2 horas post inseminación puede deberse al papel importante que cumplen las proteínas de shock térmico en la regulación de la inflamación, especialmente en la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), y la interleucina-6 (IL-6), II-1β e IL-8 a través de los receptores CD14, TLR2 y TLR4 (Wischmeyer et al., 2020), que predominan en la primera fase de la inflamación en la endometritis en yeguas (Woodward et al., 2013). Asimismo, en la endometritis se activa la respuesta innata y adaptativa del sistema inmunológico, que activa a los neutrófilos, las células asesinas naturales (NK), los macrófagos, las células

dendríticas y los linfocitos T o B (Srivastava 2002). Por otro lado, en estudios previos en yeguas con endometritis post inseminación se observó que con altas dosis de espermatozoides se produce una mayor respuesta inflamatoria (Fiala et al., 2007), siendo la respuesta inflamatoria rápida e intensa a las 2 y 4 hs, y menos intensa a las 12 horas post inseminación con 400 millones de espermatozoides en el cuerpo del útero (Cazales et al., 2020).

Por lo tanto, altas dosis altas de espermatozoides provocan una endometritis produciendo una rápida y eficiente fagocitosis de espermatozoides y bacterias, obteniendo una respuesta inflamatoria rápida e intensa, pero corta en el tiempo. Esto concuerda con nuestros resultados, ya que la HSP90 se vió aumentada a las 2 horas post inseminación con respecto al grupo control, y disminuyó en el grupo de las 4 horas post inseminación. Canisso et al., 2020 describen que a partir de las 2 a 6 horas post inseminación artificial aumenta las citoquinas antiinflamatorias y éstas inhiben la producción de mediadores proinflamatorios. Esto podría explicar la disminución de HSP90 detectada a las 4 horas post inseminación artificial. Las citocinas proinflamatorias actúan para iniciar y aumentar la respuesta inmune, mientras que las citocinas antiinflamatorias modulan las citocinas proinflamatorias y desempeñan un papel importante en la resolución de esta respuesta inflamatoria. En el endometrio de yeguas (Canisso at al., 2020).

En estudios previos en endometrio de yegua durante las fases reproductivas estro, diestro y anestro, la proteína HSP90 fue mayor en el epitelio de revestimiento y en epitelio glandular durante el estro en comparación con el diestro o el anestro (Camacho et al. 2021). Esto se asoció a que la principal función de la HSP90 es interactuar con otras proteínas, dentro de las cuales se encuentran los receptores de hormonas esteroideas, como receptores de estrógenos y receptores de progesterona. La HSP90 se une al receptor de hormonas esteroideas en el citoplasma, manteniéndolo en estado inactivo, cuando ingresa su ligando, la HSP90 se libera y el complejo receptor-ligando se transloca al núcleo (Komatsu et al., 1997).

Asimismo, en cerdas las HSPs tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria controlada que es necesaria para la implantación del concepto y el crecimiento del trofoblasto y están asociadas con la decidualización, la implantación y la placentación (Adur et al., 2022). A pesar de ser momentos distintos en la vida reproductiva y especies diferentes, sugerimos que el rol de HSP90 para controlar la endometritis post inseminación en yeguas es fundamental y similar al descrito para el control de la respuesta inflamatoria para la implantación del embrión en la cerda. Por otra parte, los embriones expresan HSP para hacer frente a condiciones de manipulación estresantes, incluida la variación térmica y el entorno

celular alterado, por lo tanto, las HSP mejoran la tasa de éxito de la fertilización in vitro (Jee et al., 2021).

Finalmente, podemos afirmar que la proteína de shock térmico HSP90 se expresa en el revestimiento epitelial y en las glándulas endometriales del endometrio de yeguas adultas durante el ciclo estral y se sobreexpresa en el inicio de la endometritis fisiológica post inseminación. La intensidad de la inmunoexpresión varía temporal y espacialmente durante el ciclo estral. Por su parte, el factor de transcripción HSF-1 disminuye durante el estro y el anestro, y aumenta durante el diestro, tanto en el revestimiento epitelial como en las glándulas endometriales, y disminuye su expresión a las 4 horas primeras horas post inseminación artificial.

En síntesis, tanto la proteína HSP90 como el factor de shock térmico HSF-1 se expresan en el endometrio en las primeras horas del proceso inflamatorio post inseminación para controlarlo y mantener así un ambiente uterino que promueva la posible implantación. Por lo tanto, se sugiere que ambas proteínas contribuyen a la resolución de la endometritis post inseminación artificial en yeguas, evento clave para lograr una preñez exitosa.

CONCLUSIONES

En la endometritis post inseminación la proteína de shock térmico HSP90 y el factor de transcripción HSF-1 se expresan en el endometrio de yeguas siendo esenciales en la regulación del proceso inflamatorio.

En primer lugar, concluimos que el factor de transcripción HSF-1 se expresa levemente en el epitelio de revestimiento y glándulas y estroma endometrial, durante distintos momentos reproductivos durante el ciclo estral en el estro y diestro y durante el anestro en yeguas.

En segundo lugar, el factor de shock térmico HSF-1 se expresa y varía espacial y temporalmente, en el endometrio a las 2 y 4 horas post inseminación artificial cuando ocurre la endometritis fisiológica.

En tercer lugar, la expresión de HSP90 post inseminación artificial en el endometrio de yeguas es bifásica, aumentando después de 2 horas y disminuyendo a las 4 horas, siendo evidente su expresión en epitelio y en las glándulas endometriales.

Finalmente, concluimos que tanto el factor de transcripción HSF-1 como la proteína de shock térmico HSP90 están involucradas en el proceso inflamatorio en la endometritis fisiológica post inseminación en yeguas sugiriendo una regulación del proceso inflamatorio mediado por estas proteínas. Ambas proteínas regulan el inicio en las primeras horas en la endometritis post inseminación en la yegua, y son esenciales para el control del proceso inflamatorio, determinando que el establecimiento de la futura placentación sea posible.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adur, M. K., Seibert, J. T., Romoser, M. R., Bidne, K. L., Baumgard, L. H., Keating, A. F., & Ross, J. W. (2022). Porcine endometrial heat shock proteins are differentially influenced by pregnancy status, heat stress, and altrenogest supplementation during the peri-implantation period. Journal of animal science, 100(7), skac129. https://doi.org/10.1093/jas/skac129.

Ahn, S.-G., & Thiele, D. J. (2003). Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. Genes & Development, 17(4), 516–528. https://doi.org/10.1101/gad.1044503

Alcaide, F., Alsina, L., Camacho, Ana., Jassid, M., Lombide, P., Miscevicius, N., Pedrana, G., Viotti, MH. (2018). Inmunoexpresión del factor de transcripción HSF-1 en tumores de mama en hembras caninas del Hospital Veterinario en Montevideo, Uruguay. XXVI JJI Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM. Mendoza Argentina.

Ali, A., Bharadwaj, S., O'Carroll R, Ovsenek N. HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in Xenopus oocytes. (1998) Molecular Cell Biology. 18(9): 4949-60. doi: 10.1128/MCB.18.9.4949

Anckar J, Sistonen L (2011) Regulation of HSF-1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. Annual Review of Biochemistry. 80: 1089-1115. doi: 10.1146/annurev-biochem-060809-095203

Aurich C. (2011). Reproductive cycles of horses. Animal reproduction science, 124(3-4), 220–228. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.005

Ben Abdallah, H., Bregnhøj, A., Ghatnekar, G., Iversen, L., & Johansen, C. (2024). Heat shock protein 90 inhibition attenuates inflammation in models of atopic dermatitis: a novel mechanism of action. Frontiers in immunology, 14, 1289788. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1289788

Biggiogera, Tanguay, Marin, Wu, Martin, & Fakan. (1996). Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: An immunoelectron microscopical study. Experimental Cell Research, 229(1), 77-85. https://doi.org/10.1006/EXCR.1996.0345

Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, HinrichorasK, Hartman D (2011). Manual of Equine Reproduction. Missouri, Elsevier, 332 pp.

Camacho Benítez, A., Vasconcellos, R., Lombide, P., Viotti, H., Pérez, W., Cazales, N., Cavestany, D., Martin, G. B., & Pedrana, G. (2021). Heat shock protein HSP90

immunoexpression in equine endometrium during oestrus, dioestrus and anoestrus. Anatomia, Histologia, Embryologia, 50(1), 50–57. https://doi.org/10.1111/ahe.12598

Calderwood. (2010). Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription. Signal Transduction Insights, 2, 13. https://doi.org/10.4137/STI.S3994

Calderwood, S. K., & Neckers, L. (2016). Hsp90 in Cancer: Transcriptional Roles in the Nucleus. Advances in cancer research, 129, 89–106. https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.08.002

Canisso, I. F., Segabinazzi, L. G. T. M., & Fedorka, C. E. (2020). Persistent breeding-induced endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. International Journal of Molecular Sciences, 21(4), 1432. https://doi.org/10.3390/ijms21041432

Cazales, N., Sandra, F., Cavestany, D., Mattos, R. C. (2018). Insemination dose and site with frozen semen affects the sperm transport and inflammatory response in mares? Journal of Equine Veterinary Science, 66, 109-110. DOI: 10.1016/j.jevs.2018.05.155

Cazales Penino, N., Estradé, MJ., & Costa Mattos, Rodrigo. (2020). Inseminación artificial con semen congelado equino: reacción inflamatoria, transporte espermático y técnica de inseminación. Veterinaria (Montevideo), 56(214), e401. https://doi.org/10.29155/vet.56.214.2

Cortés-González, C. C., Ramírez-González, V., Ariza, A. C., & Bobadilla, N. A. (2008). Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa. Revista de Investigación Clínica, 60(4), 311–320. http://doi.org/10.1016/S0214-9168(09)72041-8

Choe, C., Park, J. W., Kim, E. S., Lee, S. G., Park, S. Y., Lee, J. S., Cho, M. J., Kang, K. R., Han, J., & Kang, D. (2010). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine endometrium with endometritis. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 14(4), 205–212. https://doi.org/10.4196/KJPP.2010.14.4.205

Christoffersen M, Troedsson M. Inflammation and fertility in the mare. Reproduction of Domestic Animals. 2017 52(3):14-20. doi: 10.1111/rda.13013

Curnow, EM. (1991). Ultrasonography of the mare's uterus. Equine Veterinary Education; 3(4): 190-93. https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.1991.tb01518.x

Cyran, A. M., & Zhitkovich, A. (2022). Heat Shock Proteins and HSF-1 in Cancer. Frontiers in oncology, 12, 860320. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.860320

Corigliano, M. G., Sander, V. A., Sánchez López, E. F., Ramos Duarte, V. A., Mendoza

Morales, L. F., Angel, S. O., & Clemente, M. (2021). Heat Shock Proteins 90 kDa: Immunomodulators and Adjuvants in Vaccine Design Against Infectious Diseases. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 8, 622186. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.622186

Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A. B., & Lindquist, S. (2007). Heat Shock Factor 1 is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. Cell, 130, 1005–1018. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.020

Davies-Morel, M. (2005). Breeding Horses. ISBN: 978-1-405-12966-4 Ed.Wiley-Blackwell. 224 pp.

Davies-Morel, M. (2022). Equine reproductive physiology, breeding and stud management 3rd Edition. ePDF: eISBN: 978-1-78064-073-0358 Ed. CABI Digital Library. 397 pp

Dayalan Naidu, S., & Dinkova-Kostova, A. T. (2017). Regulation of the mammalian heat shock factor 1. The FEBS Journal, 284(11), 1606–1627. https://doi.org/10.1111/febs.13999

De Maio A, Gabriella Santoro M, Tanguay RM, Hightower LE (2012). Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: A new view of biology, a new society, and a new journal. Cell Stress Chaperones 17: 139–143. doi: 10.1007/s12192-012-0320-z

Engerud, H., Tangen, I., Berg, A. et al. High level of HSF-1 associates with aggressive endometrial carcinoma and suggests potential for HSP90 inhibitors. (2014) Br J Cancer 111, 78–84. https://doi.org/10.1038/bjc.2014.262

Eurell JA, & Frappier BL. (2006) Dellmann's Textbook of Veterinary Histology. 6th ed.Blackwell Publishing,. ISBN 0-7817-4148-3. 420 pp

Fiala, S. M., Pimentel, C. A., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M., & Mattos, R. C. (2007). Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. Theriogenology, 67(3), 556–562. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.005

Fliss, A. E., Benzeno, S., Rao, J., & Caplan, A. J. (2000). Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 72(5), 223–230. https://doi.org/10.1016/s0960-0760(00)00037-6

Fumuso, E., Giguère, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I., & Bowden, R. A. (2003). Endometrial IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha, mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis. Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. Veterinary immunology and immunopathology, 96(1-2), 31–41. https://doi.org/10.1016/s0165-2427(03)00137-5

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA (2008). Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Periovulatory Hormones: What's New? Journal of Equine Veterinary Science. 28: 454–460. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.07.008

Ginther, OJ., Utt, MD., Bergfelt, DR., & Beg, MA. (2006). Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. Animal reproduction science, 95(1-2), 144–150. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.10.008

Getty R, Sisson S, Grossman JD, Martín Roldán R (1982). Anatomía de los animales domésticos. Filadelfia, MASSON, 1416 p.

Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E. T., & Thiele, D. J. (2018). Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. Nature reviews. Molecular cell biology, 19(1), 4–19. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.73

Gumilar, K. E., Chin, Y., Ibrahim, I. H., Tjokroprawiro, B. A., Yang, J.-Y., Zhou, M., Gassman, N. R., & Tan, M. (2023). Heat Shock Factor 1 Inhibition: A Novel Anti-Cancer Strategy with Promise for Precision Oncology. Cancers, 15(21), 5167. https://doi.org/10.3390/cancers15215167

Hafez ESE and BH (2000). Reproducción e Inseminación Artificial en animales. México D.F, McGraw-Hill, 519 p.

Hahn, J. S., Hu, Z., Thiele, D. J., & Iyer, V. R. (2004). Genome-Wide Analysis of the Biology of Stress Responses through Heat Shock Transcription Factor. Molecular and Cellular Biology, 24(12), 5249–5256. https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5249-5256.2004

Home, T., Jensen, R. A., & Rao, R. (2015). Heat shock factor 1 in protein homeostasis and oncogenic signal integration. Cancer Research, 75(6), 907–912. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2905

Hoter, A., El-Sabban, M. E., & Naim, H. Y. (2018). The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. International journal of molecular sciences, 19(9), 2560. https://doi.org/10.3390/ijms19092560

Janus P, Kuś P, Vydra N, Toma-Jonik A, Stokowy T, Mrowiec K, Wojtaś B, Gielniewski B, Widłak W. (2022). HSF-1 can prevent inflammation following heat shock by inhibiting the excessive activation of the ATF3 and JUN&FOS Genes. Cells. 11(16):2510. doi: 10.3390/cells11162510.

Jee, B., Dhar, R., Singh, S., & Karmakar, S. (2021). Heat Shock Proteins and Their Role in

Pregnancy: Redefining the Function of "Old Rum in a New Bottle". Frontiers in cell and developmental biology, 9, 648463. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.648463

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. Cell Stress Chaperones 14: 105–111. doi: 10.1007/s12192-008-0068-7

Katila, T. (1995). Onset and Duration of Uterine Inflammatory Response of Mares after Insemination with Fresh Semen, Biology of Reproduction, 52, Issue monograph_series1, 515–517, https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.515

Katila, T., Celebi, M., & Koskinen, E. (1996). Effect of timing of frozen semen insemination on pregnancy rate in mares. Acta veterinaria Scandinavica, 37(3), 361–365. https://doi.org/10.1186/BF03548102

Kenney RM (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. Journal of American Veterinary Medicine Association. 172: 241–262.

Kenney, RM and Doig, PA. (1986) Equine endometrial biopsy. In: Morrow, D.A., Ed., Current Therapy in Theriogenology, W.B. Saunders, Philadelphia, 723-729.

Kijima, T., Prince, T., Neckers, L., Koga, F., & Fujii, Y. (2019). Heat shock factor 1 (HSF-1)-targeted anticancer therapeutics: overview of current preclinical progress. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 23(5), 369–377. https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1602119

Knowlton A.A. (2006). NFkappaB, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. Cardiovascular research, 69(1), 7–8. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.10.009

Komatsu, T. (1996). Expression of Heat Shock Proteins HSP70 and HSPSO in Endometrial Carcinomas, 330–338.

Komatsu, T., Konishi, I., Fukumoto, M., Nanbu, K., Koshiyama, M., Mandai, M., & Mori, T. (1997). Messenger ribonucleic acid expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in human endometrium and myometrium during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab, 82(5), 1385–1389. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9141521

Kotilainen, T., Huhtinen, M., & Katila, T. (1994). Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. Theriogenology, 41(3), 629–636. https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90173-g

Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2015). Repression of the Heat Shock Response Is a

Programmed Event at the Onset of Reproduction. Molecular cell, 59(4), 639–650. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.027

LeBlanc M. M. (2010). Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, 45 Suppl 2, 21–27. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x

Leach, M. D., Budge, S., Walker, L., Munro, C., Cowen, L. E., & Brown, A. J. P. (2012). Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by HSF-1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. PLoS Pathogens, 8(12), e1003069. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003069

Li, D. Y., Liang, S., Wen, J. H., Tang, J. X., Deng, S. L., & Liu, Y. X. (2022). Extracellular HSPs: The Potential Target for Human Disease Therapy. Molecules (Basel, Switzerland), 27(7), 2361.

Liu, H., Zhang, Z., Huang, Y., Wei, W., Ning, S., Li, J., Liang, X., Liu, K., & Zhang, L. (2021). Plasma HSP90AA1 Predicts the Risk of Breast Cancer Onset and Distant Metastasis. Frontiers in cell and developmental biology, 9, 639596. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.639596

Malschitzky, E., Schilela, A., Richer, L., Mattos, A., Gregori, R.M., Mattos, R.C. (2001). Artificial photoperiod in pregnant mares and its effect on pregnancy length and postpartum reproductive performance. Pferdeheilkunde Equine Medicine. 17. 565-569. doi: 10.21836/PEM20010605

Marth, C. D., Young, N. D., Glenton, L. Y., Noden, D. M., Browning, G. F., & Krekeler, N. (2015). Deep sequencing of the uterine immune response to bacteria during the equine oestrous cycle. BMC Genomics, 16(1), 934. https://doi.org/10.1186/s12864-015-2139-3

Marth C.D., Firestone S.M., Hanlon D., Glenton L.Y., Browning G.F., Young N.D., Krekeler N. Innate immune genes in persistent mating-induced endometritis in horses. Reprod. Fertil. Dev. (2018);30:533–545. doi: 10.1071/RD17157

Martine, P., & Rébé, C. (2019). Heat Shock Proteins and Inflammasomes. International journal of molecular sciences, 20(18), 4508. https://doi.org/10.3390/ijms20184508

Mattos, RC., Mattos, A., Klug, E., Günzel, A. (1984). Citologia endometrial na égua como método diagnóstico auxiliar e complementar. Rev Bras Reprod Anim; 8(2):83-90.

Mendillo, M. L., Santagata, S., Koeva, M., Bell, G. W., Hu, R., Tamimi, R. M., ... & Lindquist, S. (2012). HSF-1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. Cell, 150(3), 549-562. doi:

10.1016/j.cell.2012.06.031

McKinnon A, Squires E, Vaala W, Varner D (2011). Equine Reproduction, 2ª ed. Chichefter, Ed. Wiley-Blackwell, 3288 pp.

Miro J. (2012). Ovarian ultrasonography in the mare. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, 47 Suppl 3, 30–33. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02043.x

Moseley P. L. (1998). Heat shock proteins and the inflammatory response. Annals of the New York Academy of Sciences, 856, 206–213. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08327.x.

Nash D.M., Sheldon I.M., Herath S., Lane E.A. Markers of the uterine innate immune response of the mare. Anim. Reprod. Sci. 2010;119:31–39. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.11.008.

Palmer E (1978). Control of the oestrous cycle of the mare. Journal of Reproduction and Fertility 5: 495–505.

Pycock JF, Allen WE. Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis. The Veterinary Record. 1988 Aug;123(8):193-195. DOI: 10.1136/vr.123.8.193

Poggio, P., Sorge, M., Seclì, L., & Brancaccio, M. (2021). Extracellular HSP90 Machineries Build Tumor Microenvironment and Boost Cancer Progression. Frontiers in cell and developmental biology, 9, 735529. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.735529().

Prodromou C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. The Biochemical journal, 473(16), 2439–2452. https://doi.org/10.1042/BCJ20160005.

Raz, T., & Aharonson-Raz, K. (2012). Ovarian Follicular Dynamics During the Estrous Cycle in the Mare. Israel Journal of Veterinary Medicine, 67(1), 11-18.

Reddy, V. S., Madala, S. K., Trinath, J., & Reddy, G. B. (2018). Extracellular small heat shock proteins: exosomal biogenesis and function. Cell stress & chaperones, 23(3), 441–454. https://doi.org/10.1007/s12192-017-0856-z

Roberts SJ (1979). Obstetricia veterinaria y patologica de la reproducción. Buenos aires, Hemisferio Sur, 2021 p.

Salmand, P. A., Jungas, T., Fernandez, M., Conter, A., & Christians, E. S. (2008). Mouse heat-shock factor 1 (HSF-1) is involved in testicular response to genotoxic stress induced by doxorubicin. Biology of reproduction, 79(6), 1092–1101.

https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070334

Samper JC (2009). Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Missouri, Elsevier, 336 p.

Sawarkar, R., Sievers, C., & Paro, R. (2012). Hsp90 globally targets paused RNA polymerase to regulate gene expression in response to environmental stimuli. Cell, 149(4), 807–818. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.061

Scott, K. L., Nogueira, C., Heffernan, T. P., van Doorn, R., Dhakal, S., Hanna, J. A., Min, C., Jaskelioff, M., Xiao, Y., Wu, C. J., Cameron, L. A., Perry, S. R., Zeid, R., Feinberg, T., Kim, M., Vande Woude, G., Granter, S. R., Bosenberg, M., Chu, G. C., DePinho, R. A., … Chin, L. (2011). Proinvasion metastasis drivers in early-stage melanoma are oncogenes. Cancer cell, 20(1), 92–103. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.025

Sharma C, Seo YH. Small Molecule Inhibitors of HSF1-Activated Pathways as Potential Next-Generation Anticancer Therapeutics. Molecules. 2018 Oct 24;23(11):2757. doi: 10.3390/molecules23112757. PMID: 30356024; PMCID: PMC6278446.

Shi, Y., Mosser, D. D., & Morimoto, R. I. (1998). Molecular chaperones as HSF-1-specific transcriptional repressors. Genes & Development, 12(5), 654–666. https://doi.org/10.1101/gad.12.5.654

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E. et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods 9, 676–682 https://doi.org/10.1038/nmeth.2019

Schroeder, H. T., De Lemos Muller, C. H., Heck, T. G., Krause, M., & Homem de Bittencourt, P. I. (2024). Heat shock response during the resolution of inflammation and its progressive suppression in chronic-degenerative inflammatory diseases. Cell stress & chaperones, 29(1), 116–142. https://doi.org/10.1016/j.cstres.2024.01.002

Srivastava P. (2002). Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. Annual review of immunology, 20, 395–425. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064801

Tabibzadeh, S., Kong, Q. F., Satyaswaroop, P. G., & Babaknia, A. (1996). Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. Human reproduction (Oxford, England), 11(3), 633–640. https://doi.org/10.1093/humrep/11.3.633

Takii, R., Inouye, S., Fujimoto, M., Nakamura, T., Shinkawa, T., Prakasam, R., Tan, K., Hayashida, N., Ichikawa, H., Hai, T., & Nakai, A. (2010). Heat Shock Transcription Factor 1 inhibits expression of IL-6 through activating transcription factor 3. The Journal of Immunology, 184(2), 1041–1048. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902579

Tong, Z., Jiang, B., Zhang, L., Liu, Y., Gao, M., Jiang, Y., Li, Y., Lu, Q., Yao, Y., & Xiao, X. (2014). HSF-1 is involved in attenuating the release of inflammatory cytokines induced by LPS through regulating autophagy. Shock 41(5), 449–453. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000118.

Trinklein, N. D., Murray, J. I., Hartman, S. J., Botstein, D., & Myers, R. M. (2004). The role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. Molecular Biology of the Cell, 15, 1254–1261. https://doi.org/10.1091/mbc.E03-10

Troedsson M.H, Liu I, Ing M, Pascoe J (1995)., Smooth Muscle Electrical Activity in the Oviduct, and the Effect of Oxytocin, Prostaglandin F2α, and Prostaglandin E2 on the Myometrium and the Oviduct of the Cycling Mare, Biology of Reproduction, 52 (1), 475–488, https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.475

Troedsson M. H. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. Theriogenology, 52(3), 461–471. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00143-0

Tunón A-M, Katila, T., Magnusson, U., Nummijärvi, A., & Rodriguez-Martinez, H. (2000). T-cell distribution in two different segments of the equine endometrium 6 and 48 hours after insemination. Theriogenology, 54(6), 835–841. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00395-2.

Viana, P.H.L., Schvarcz, C.A., Danics, L.O. et al. (2024). Heat shock factor 1 inhibition enhances the effects of modulated electro hyperthermia in a triple negative breast cancer mouse model. Scientific Reports 14, 8241 . https://doi.org/10.1038/s41598-024-57659-x

Vydra N, Toma-Jonik A, Janus P, Mrowiec K, Stokowy T, Głowala-Kosińska M, Sojka DR, Olbryt M, Widłak W. (2023) An Increase in HSF-1 Expression Directs Human Mammary Epithelial Cells toward a Mesenchymal Phenotype. Cancers (Basel). 15(20):4965. doi: 10.3390/cancers15204965

Wang, Y., Xiu, J., Yang, T. et al. HSF-1 promotes endometriosis development and glycolysis by up-regulating PFKFB3 expression. (2021). Reproductive Biology and Endocrinology 19, 86 https://doi.org/10.1186/s12958-021-00770-9 HSF-1

Wataba KW, Aito TS, Ukunaka KF, Shihara KA, Ishimura MN, Udo RK (2001). Over-Expression of Heat Shock Proteins in Carcinogenic Endometrium. International Journal of Cancer 456: 448–456. https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::AID-IJC1077>3.0.CO;2-F

Wischmeyer, P. E., Mintz-Cole, R. A., Baird, C. H., Easley, K. A., May, A. K., Sax, H. C.,

Kudsk, K. A., Hao, L., Tran, P. H., Jones, D. P., Blumberg, H. M., & Ziegler, T. R. (2020). Role of heat shock protein and cytokine expression as markers of clinical outcomes with glutamine-supplemented parenteral nutrition in surgical ICU patients. Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 39(2), 563–573. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.02.045

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Betancourt, A., Horohov, D., Scoggin, K. E., Squires, E. L., & Troedsson, M. H. (2013). Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. Reproduction (Cambridge, England), 145(3), 289–296. https://doi.org/10.1530/rep-12-0452

Zheng X, Beyzavi A, Krakowiak J, Patel N, Khalil AS, Pincus D. (2018) HSF-1 phosphorylation generates cell-to-cell variation in Hsp90 levels and promotes phenotypic plasticity. Cell Reports. 22(12):3099-3106. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.083

Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F., & Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF-1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF-1. Cell, 94(4), 471–480. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81588-3