

Relación de expresión del IGF-IR en secreciones uterinas de vacas de diferentes razas y grados de endometritis posparto

Relationship of IGF-IR expression in uterine secretions of cows of different breeds and levels of postpartum endometritis

Ana Z. Ruiz¹ y José R. Pérez Machado^{2*}

¹Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra Fisiología Animal.

²Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos (UNERG). Decanato de Ingeniería Agronómica. Departamento de Producción Animal. *Correo electrónico: jorapevet@gmail.com

RESUMEN

En sistemas ganaderos de producción tropical, al seleccionar hembras reproductoras es más importante considerar adaptabilidad al medio, reproducción y salud, que producción individual; para relacionar los aspectos anteriores se requiere medir variables como: raza, involución uterina y metabolismo posparto, a través de técnicas biotecnológicas pocas veces utilizadas en el diagnóstico de salud reproductiva en hembras bovinas. El objetivo planteado es: relacionar la expresión del receptor del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-IR) en secreciones uterinas de vacas de diferente raza o tipo con el nivel de citología uterina durante el periodo posparto temprano. Metodología: Entre 30 a 45 días del posparto se tomaron raspados de la superficie endometrial (cytobrusch) y secreciones uterinas, a vacas Carora (n=19), Siboney (n=17) y F1 Holstein x Brahman (n=16), se cuantificó el número de neutrófilos presentes en la citología para determinar el grado de inflamación endometrial, diferenciando dos grupos: SC (endometritis sub clínica/n=26) y EC (endometritis clínica/n=12); además de determinar por WesternBlot la expresión del IGF-IR en secreciones uterinas por raza y grupo. Resultados y conclusiones: El grupo SC de raza Carora (n=4) y Siboney (n=8), presentaron bandas de IGF IR (130 KDal), evidentemente más gruesas y marcadas, que las observadas en F1 y los grupos EC. La metodología aplicada puede servir para orientar la evaluación de salud uterina posparto y diferenciar la resistencia a la aparición de afecciones posparto, entre tipos raciales, bajo condiciones tropicales.

Palabras clave: Enfermedad uterina posparto, IGF IR, WesternBlot.

ABSTRACT

For tropical livestock production systems, in selecting breeding females is more important to consider adaptability to the environment, reproduction and health, that individual production; to relate the above aspects is required to measure variables such as breed, uterine involution and postpartum metabolism through biotechnology techniques rarely used in the diagnosis of reproductive health at bovine female. The stated goal is to relate receptor expression insulin-like growth factor I (IGF -IR) in uterine secretions of cows of different breed or type with the level of uterine cytology during the early postpartum period. Methodology: Between 30 to 45 days postpartum were taken by cytobrusch of uterine secretions, Carora cows (n = 19) , Siboney (n = 17) and F1 Holstein x Brahman (n = 16), counted the number of neutrophils present in cytology to determine the degree of endometrial inflammation, differentiating two groups: SC (sub clinical endometritis / n = 26) and EC (clinical endometritis / n = 12); and to determine by Western blot expression of the IGF-IR in uterine secretions and breed. Results and conclusions: The SC Carora breed group (n = 4) and Siboney (n = 8) showed IGF IR bands (130 kDal) obviously thicker and marked, than those seen in F1 and EC groups. The methodology can be used to guide the evaluation of postpartum uterine health and resistance to differentiate the appearance of postpartum conditions, including breed types, under tropical conditions.

Key word: postpartal uterine health, IGF IR, WesternBlot.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, los sistemas de producción doble propósito representan más del setenta y cinco por ciento de las unidades de producción, encargadas de la producción de leche y carne, no es un secreto que dichos sistemas se han mantenido por muchas décadas estancados en su producción, determinando un déficit que es necesario suplir con masivas importaciones.

En sistemas de producción tropicales, es más importante considerar adaptabilidad al medio, reproducción y salud, que nivel de producción individual, cuando se pretenda lograr mejoras genéticas en los rebaños y esto solo se logra orientando la selección o realizando cruzamientos que permitan mejorar estos aspectos; algunos autores concuerdan que en el trópico, más que maximizar la producción potencial de leche por animal, se deben establecer estrategias destinadas a la obtención de vacas con niveles de producción y reproducción que puedan ser sustentadas por los sistemas pastoriles.

Para elevar los niveles de eficiencia reproductiva en los rebaños en sistemas de doble propósito, se requiere de vacas adaptadas a las condiciones agroecológicas (temperatura y humedad), alimenticias (pastoreo de forrajes de moderada a baja calidad), sanitarias (resistencia a enfermedades infectocontagiosas), que le permitan recuperar rápidamente las condiciones de homeostasis orgánica, después de eventos reproductivos (gestación y parto) y fisiológicos (lactación), para esto se requiere del conocimiento amplio de los procesos fisiológicos que ocurren durante el periodo posparto, que orienten la aplicación de medidas de manejo alimentario, sanitario y reproductivo, además de la mejor selección de hembras para la cría, orientadas a mejorar la rentabilidad del negocio ganadero en sistemas doble propósito, en función de esto es prioritario y necesario conocer cómo medir estas variables, para poder predecir su comportamiento y dar uso adecuado a las mismas.

En rebaños bajo sistemas de doble propósito en el trópico, son pocas las investigaciones que incluyen a su vez las variables: condición corporal y tipología racial, en relación con el proceso de involución uterina y en consecuencia su efecto sobre fertilidad posparto, que al final

determinará la futura producción de leche y carne indispensable para garantizar la nutrición y salud de la población nacional. Así mismo, es poca o casi nula la aplicación de biotecnologías que permitan diagnosticar y/o predecir la salud durante el posparto, con el fin de orientar la selección de reproductores con mejores índices reproductivos.

En la actualidad se promueve el uso de aplicaciones biotecnológicas que colaboren en el diagnóstico de las afecciones metabólicas y endocrinas que afecten la producción animal, entre ellas están los marcadores de respuesta metabólica como el factor de crecimiento semejante a insulina tipo I y su receptor (IGF-IR) los cuales a nivel endocrino actúan promoviendo la regeneración celular y de los tejidos orgánicos. (Llewellyn *et al.*, 2008).

Por estas razones, la determinación y relación de expresión del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IFG-IR) en secreciones uterinas y el grado de la citología uterina durante el periodo posparto temprano (cuarta a quinta semana), puede orientar en la determinación de la salud reproductiva, durante el proceso de involución uterina, lo que a su vez permitiría pronosticar el futuro reproductivo de la vaca; pudiese indicar diferencias en el comportamiento y resistencia a las afecciones posparto en las diferentes razas o tipos raciales y no menos importante, orientaría las estrategias para prevenir las afecciones puerperales que retardan el reinicio de la actividad ovárica.

Fundamentados en lo expuesto anteriormente, se plantea el objetivo de: relacionar la expresión del receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo I en secreciones uterinas de vacas Carora, F1 Holstein x Brahman y Siboney, con diferente grado de inflamación endometrial.

La utilidad e importancia de los resultados, radica en la aplicación de la técnica de *Western Blot*, para diferenciar la expresión del receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-IR) en secreciones uterinas de vacas con diferente grado de inflamación endometrial y perfil metabólico posparto; esta metodología podría servir para identificar vacas con resistencia a sufrir afecciones inflamatorias, vacas que reinician más temprano su actividad ovárica posparto bajo determinadas condiciones

de manejo, con esto orientar la selección genética de reproductores y aplicar medidas de manejo que mejoren los índices reproductivos en rebaños ganaderos de sistemas doble propósito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 4 grupos raciales de vacas preñadas en el último mes de gestación (n=65), con uno a cinco partos previos (Cuadro 1), con condición corporal (CC) entre 2,5 y 3 (Fattet y Jaurena, 1988), que no presentaran signos ni síntomas de afecciones infecto contagiosas o adquiridas. Todas las vacas se manejaron de forma similar, pastoreo en potreros con pasto *Urochloa brizantha*, durante la tarde y noche, con suplementación de 1,5 kg de alimento concentrado (16% proteínas) previo al único ordeño del día. El experimento se llevó a cabo en la Centro técnico productivo socialista "Florentino", en la población de Sabaneta, estado Barinas, altitud 90 a 120 msnm, precipitación anual 1000 a 1200 mm, durante la época de lluvias (Julio a Noviembre 2012).

Todas las vacas fueron muestreadas entre la cuarta semana y quinta semana (33 a 40 días posparto) donde suponemos, fundamentados en la bibliografía revisada, se ha completado el proceso de involución uterina; para obtener las siguientes muestras:

1.- Se tomaron muestras para citología uterina, por el método del cepillo uterino Gabler *et al.* (2010), para lo cual se realiza previamente limpieza del área perineal y vulvar del animal (agua y alcohol), se palpa vía rectal el cuello uterino, se procede a introducir el catéter

protegido (*citologybrush. Minitube17214®*) por vía vaginal, para atravesar el canal cervical y tomar el raspado uterino, que inmediatamente fue fijado (*Fixcell®*) en lámina de vidrio porta objeto, para su posterior coloración (*Wright-Giemsa* modificado, *Sigma-Aldrich* WG16-500® ml). Posteriormente, se cuantificó los neutrófilos presentes en la citología, contando cien células dentro del frotis coloreado, (LeBlanc, 2002; *et al.*, 2005), de esta manera se determinó el grado inflamatorio a nivel uterino.

2.- Se tomaron muestras de secreciones uterinas, por el método del cepillo uterino e inmediatamente lavar a presión el cepillo utilizando jeringa estéril con 2 mL de agua bidestilada estéril y lograr diluir la muestra, almacenadas de inmediato en crio viales y conservadas a -196 °C hasta su procesamiento.

3.- Para determinar la expresión de IGF IR a nivel del útero, se conformó un pool de muestras de secreción endometrial de vacas de la misma raza, con diagnóstico citológico de endometritis clínica Carora (CC), F1 HxB (F1C) y Siboney (SC) y con diagnóstico de endometritis sub clínica Carora (CS), F1 HxB (F1S) y Siboney (SS), para proceder por el método de *Western Blot* (Ruiz y Kittok, 2008) a evidenciar diferencias en la expresión del IGF-IR, entre razas e inter razas, con controles positivos de tejido adiposo, hepático y secreciones de vacas sin inflamación endometrial (sanas).

Fases de *Western blot*:

Extracción de proteínas: las muestras de secreción uterina de los tres grupos de estudio,

Cuadro 1. Número de vacas en el experimento, agrupadas por tipología.

RAZA	N° vacas
Carora	19
Siboney	17
F 1 (Holstein x Brahman)	16
Gyr	16
Total	68

se descongelaron y se homogeneizaron durante 10 seg. Durante la extracción de proteína se mantuvo la temperatura tanto de las muestras como de los reactivos a 4°C. Cada muestra fue mezclada en una proporción 1:1 con buffer de extracción. Dicha solución inicial de la muestra fue centrifugada a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C, transfiriendo el sobrenadante a un microtubo de 1,5 mL, repitiéndose tres veces.

Quantificación de proteína total: se determinó la concentración proteica total de cada muestra mediante un método colorimétrico (BCA™ *protein assay kit*; *Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA*), Inicialmente se preparó una dilución 1/100 a partir de la solución inicial de la muestra para preparar siete tubos de las soluciones usadas en la cuantificación de la curva estándar, identificadas con letras desde la A hasta la I, conteniendo 5 mL de Buffer de extracción y una ampolla de 1mL de Albúmina Sérica Bovina (BSA) provista por el kit, en las proporciones calculadas: adicionalmente es necesario preparar 20mL del Reactivo de Trabajo, utilizando 19,6mL del Reactivo A y 0,4mL del Reactivo B (proporción 50:1), ambos provistos por el kit.

La placa se cubre con papel de aluminio y se incuba a temperatura ambiente durante 30min, para finalmente medir la concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$) haciendo uso de un espectrofotómetro (*Multiskan FC, Thermo Scientific*), a una longitud de onda de 560nm.

Electroforesis vertical: se preparó una solución de agarosa al 2%, con la finalidad de sellar, una vez polimerizada la solución, el borde inferior del equipo de electroforesis, inmediatamente después se prepara el gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), del tipo discontinuo (15%-5%) y se coloca el gel de corrida al 15% de una solución al 30% de Acrilamida/Bis acrilamida en el espacio dejado entre los dos vidrios del aparato de electroforesis, esperando 1 hora para lograr la solidificación. Seguidamente, se colocó el gel de apilamiento al 5% de la misma solución de Acrilamida/Bis acrilamida, insertando inmediatamente el peine plástico para la formación de los canales de descarga.

Para mantener hidratado el gel es necesario retirar el sello de agarosa del borde inferior del

aparato de electroforesis y sumergir el gel en Buffer de almacenamiento cubriendo el aparato con papel plástico y manteniéndolo a 4°C hasta el momento de la corrida electroforética.

En microtubos de 1,5 mL se prepara la solución a descargar en los canales del gel, dichos microtubos son agitados y sumergidos en agua a 100°C durante un minuto, procediendo inmediatamente a descargar las soluciones en el gel. Se usó una mezcla de marcador de Peso Molecular proteico (26681; *BlueRanger®; Pierce*) y control positivo (proteínas de tejido adiposo de ovejo). Se deja un canal vacío y luego se descargan cada una de las muestras. Se cierra el equipo de Electroforesis Vertical, se conectan correctamente los terminales a la fuente de poder (*ThermoScientific*), se ajusta a 138 voltios y se inicia la corrida a una temperatura de 4°C, durante tres horas.

Transferencia de proteínas del gel a la membrana: al sacar el aparato de electroforesis de la nevera, botar todo el líquido de su interior y de la bandeja. Se coloca el papel filtro en la cámara de transferencia, se humedece bien con el Transfer Buffer. Separar ambos vidrios ayudándose con el separador por la esquina superior. Al separar ambos vidrios, cortar inmediatamente sobre el vidrio el gel en el extremo superior izquierdo (lado donde se colocó el marcador molecular) para identificar la cara frontal del mismo y los sobrantes que quedan al retirar el peine.

Tomar el primer filtro que está en la cámara humedecido con Buffer y se coloca sobre el vidrio. Se voltea quedando el vidrio arriba y se coloca el filtro de nuevo en la cámara. Sacar la membrana de nitrocelulosa, la cual está entre dos papeles azules y dentro de ellos debe cortarse a la medida del gel, cuadrando que sobre membrana por los lados del gel. Humedecer con suficiente "Transfer buffer" de modo de evitar alguna burbuja y finalmente colocar otra lámina de papel filtro humedecida con "Transfer buffer" sobre la membrana.

Cerrar correctamente el equipo (cerrar perillas alternándolas), conectar los terminales a la fuente de poder (*Labnet*) y ajustar a 10 voltios y 300 mili amperes por un tiempo aproximado de 2 horas. Se utiliza esta fuente de poder porque el rango mínimo de la fuente de poder *Thermo*, es de 20 Voltios y se necesitan 10 Voltios.

Al culminar el tiempo establecido, retirar cuidadosamente el gel y la membrana del equipo de transferencia y colocarlos en recipientes diferentes. Añadir a la membrana, una pequeña cantidad de solución de Ponceau S (P7170 Sigma-Aldrich) y agitar por unos minutos hasta observar las bandas dejadas por las proteínas en su trayectoria. Lavar con NaOH al 0,1% y agua destilada hasta eliminar la coloración rojiza dejada por el Ponceau S en la membrana. Por otra parte, añadir al gel, una pequeña cantidad de "0,01% Azul Brillante Coomassie (20278 Pierce) y (Coomassie Blue, metanol y ácido acético), para observar la trayectoria dejada por las proteínas durante la corrida y las que no se transfirieron a la membrana. Se guarda el gel teñido en el recipiente tapado bañado en el colorante en la nevera a 4°C para escanearlo.

Bloqueo y colocación del primer anticuerpo: Para este trabajo se utilizó como primer Ac: IGF-IsR Código Sigma I-7151, 20 µL a una dilución de 1:500. Esta secuencia es de humano probado en Cabras (Human-Goat).

Se inicia sumergiendo la membrana en una bolsa (Ziploc®) con los 100 mL de "Blocking Buffer" (TBST + 5% de leche descremada), la bolsa es colocada en un recipiente en la plataforma rotatoria con movimiento suave durante una hora a 4°C. Se saca la membrana de la bolsa y se lava la membrana 2 veces por 5 minutos cada una con TBST con movimiento suave a 4°C directo en un recipiente.

Se coloca el primer anticuerpo (20µL) disuelto en 10mL de TBST + 5% de leche descremada, para dejar incubar con agitación durante toda la noche a 4 °C en una bolsa. Al culminar el tiempo, lavar la membrana 3 veces por 5 minutos cada una con TBST con movimiento suave a 4°C.

Colocación del segundo anticuerpo: en este caso como segundo Ac se utilizó Rabbit anti Goat Código A-5420, de Lab. Sigma 10 µL a una dilución de 1:1000. En este segundo Ac se encuentra conjugada la enzima peroxidasa. Colocar el segundo anticuerpo en 10mL de TBST + 5% de leche descremada (0,5g de leche en 10mL de TBST). Incubar con agitación de 1 a 3 horas en una bolsa. Culminado el periodo, sacar la membrana de la bolsa, colocar en un recipiente de plástico y lavar con TBST 3 veces

por 15 minutos cada una en agitación, fuera de la nevera.

Lavar 2 veces por 15 minutos cada una con TBS en agitación igualmente fuera de la nevera.

Reincubación de membrana: la membrana debe permanecer en bolsa con TBST, en la nevera a 4°C hasta que se vuelva a utilizar. Para reincubarla, se lava en un recipiente con TBST 3 veces x 2 min en la plataforma rotatoria. Aparte, se prepara el TBST (10mL) + leche descremada (0,5g) en un tubo de 15mL y colocamos el primer Ac y en este caso utilizamos 40µL. IGF-IR (I 1751). Se colocó en una bolsa y se deja toda la noche en movimiento en la plataforma a 4°C.

Preparación del cassette y revelado del film: preparar el cuarto oscuro antes del inicio del trabajo. Se necesitan 3 recipientes: uno para agua destilada, otro para el fijador y el tercero para el revelador. Se prepararon 1000mL de cada uno, diluyendo 200mL de fijador en 800mL de agua destilada.

Colocar la membrana de nitrocelulosa en un recipiente seco y sobre esta 2mL de "SuperSignal® West pico Luminol/Enhancer Solución" y 2mL de "SuperSignal® West pico Stable/PeroxideSolution" de manera consecutiva con movimiento suave y esperar si ocurre la reacción de quimioluminiscencia, la cual se manifiesta por la emisión de luz. Abrir el cassette y colocar la membrana de nitrocelulosa sobre el lado opuesto a la pantalla intensificadora (lado negro). Colocar el film sobre la membrana de nitrocelulosa y cerrar inmediatamente el cassette.

Luego proceder al revelado: deslizar suavemente el film en el recipiente con el revelador. Tapanlo y agitarlo por 5seg y dejarlo en reposo por 30seg. Este proceso debe repetirse entre 5 y 7 veces. En nuestro caso lo hicimos 6 veces. La agitación se realiza con movimientos de 180°, luego lavar en agua destilada, pasar a fijador por 3 min y enjuagamos por 30 seg. Para finalizar se observa la placa, identificando cada muestra y la expresión de la proteína, procediendo luego a escanear, guardar la información en computadora e imprimir en papel.

Análisis estadístico:

Se planteó un diseño de bloques completamente aleatorizados, considerando la raza como factor

cualitativo y el grado de inflamación del endometrio como los niveles. En todos los casos el nivel de confianza fue del 95%, determinando el nivel de significación estadística cuando $P < 0,05$ (Chacin, 2000). La determinación del tamaño de la muestra se realizó, considerando el nivel de la investigación (nivel III de correlación) y las variables cuantitativas insertadas en la investigación, basándose en la variabilidad o porcentajes de aparición reportado previamente por investigadores en trabajos similares (valor calculado de Z en tablas: 1,96).

Para las variables cuantitativas que no seguían una distribución normal como la raza (R) y los grados de inflamación endometrial (GIE) se empleó el test de *Kruskal-Wallis*. Los datos fueron analizados a través del Programa de análisis estadístico PASW Statistic 18.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relación entre la raza y la susceptibilidad a sufrir endometritis posparto

No se determinó efecto de la raza de las vacas sobre la probabilidad de sufrir diferentes grados de inflamación endometrial en la quinta semana posparto, cuando se analizó por el método de *Kruskal Wallis* (no paramétricos) Cuadro 2 y Figura 1. Los resultados contrastan con los reportados por Pérez (2009), en vacas mestizas con niveles medios a bajos de producción en sistemas doble propósito, donde se observó una tendencia del tipo racial para la presencia de secreciones uterinas asociadas a mayor grado de inflamación endometrial.

En los grupos de vacas de diferente raza, se pudo observar un comportamiento similar en cuanto a la cantidad de vacas clasificadas por citología, como sanas (cito 0), con endometritis subclínica (cito 1) y con endometritis clínica (cito 2), respectivamente (Figura 1), con un total de 57,5% casos de vacas con afecciones inflamatorias posparto y 39,3% casos de endometritis subclínica obtenidos en el experimento para el periodo posparto en que se realizó la evaluación, coincidiendo estos resultados con los reportados por LeBlanc, (2012), que reporta 35-50% de vacas con al menos un tipo de patología inflamatoria entre la tercera y séptima semana pos parto, de las cuales 10 a 30% son endometritis diagnosticables citológicamente y resultados superiores a los reportados por Madoz *et al.* (2013), quienes indican prevalencia de 17% de casos de endometritis sub clínica en vacas a pastoreo, para similar intervalo pos parto.

Expresión del Receptor para factor de crecimiento similar a la insulina Tipo I

Se pudo evidenciar mayor intensidad de expresión del IGF-IR en las vacas Carora (CS) y Siboney (SS) que presentaron endometritis subclínica, en comparación con la menor expresión en vacas de la misma raza con endometritis clínica (CC y SC, respectivamente) y con las vacas F1 con endometritis subclínica y clínica (FC y FS) o las vacas sin inflamación endometrial o animales sanos (S), como se puede observar en la Figura 2.

El mayor nivel de expresión observado en vacas CS y SS, en comparación con las vacas con endometritis clínica, se pudiese explicar por el

Cuadro 2. Número de vacas con diferente grado de inflamación endometrial, para cada grupo racial.

Raza	Sana	Sub Clínica	Clínica
Siboney	9	4	4
Carora	8	8	2
F1 (HxB)	5	6	4
Gyr	6	8	2
TOTAL	28	26	12

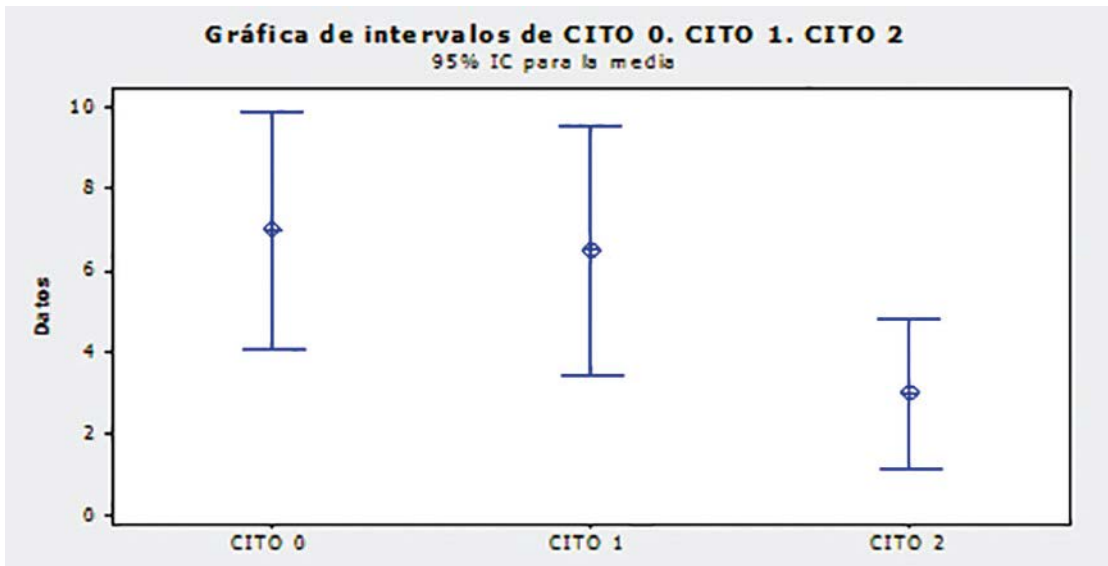


Figura 1. Intervalos de cito 0, cito 1 y cito 2, en la población total de vacas del ensayo.

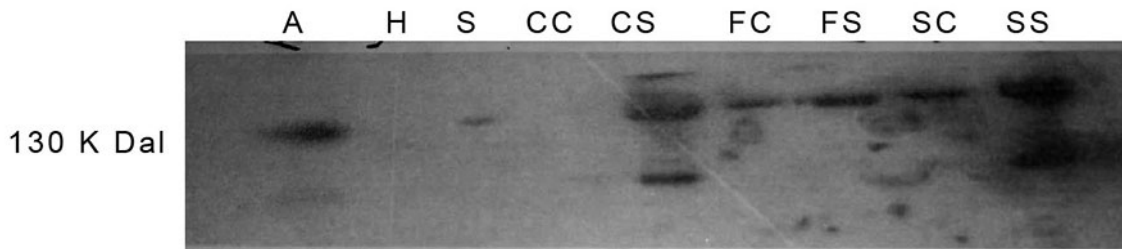


Figura 2. Expresión de IGF- IR (130 KDal) en secreciones uterinas de vacas de diferente raza y grado de inflamación endometrial (A control positivo IGF-IR, H muestra de tejido hepático, S vacas sanas, CC vacas Carora con endometritis clínica, CS vacas Carora con endometritis subclínica, FC vacas F1 con endometritis clínica, FS vacas F1 con endometritis subclínica, SC vacas Siboney con endometritis clínica y SS vacas Siboney con endometritis subclínica).

incremento en la síntesis proteica del IGF-IR en las células endometriales que responden al proceso de inflamación aguda que está ocurriendo en el útero, a lo anterior se suman el aporte de IGF-IR por los neutrófilos que invaden la superficie endometrial durante las primeras etapas del proceso de inflamación aguda endometrial. Esta respuesta se diferencia a la que ocurre en las vacas con cuadros de endometritis clínica, donde mayoritariamente se encuentran células muertas y detritus celulares consecuencia del proceso infeccioso provocado por invasión de bacterias que promueven la

degradación proteica y el estado de inflamación crónica, como lo evidenciado por O'Connor *et al.* (2008).

Llewellyn *et al.* (2008) señalaron que los cambios en la biodisponibilidad de la familia del IGF está implicada en la tasa de recuperación uterina y en la eficiencia reproductiva, al demostrar la expresión del IGF II y del IGF IR en el estroma profundo del endometrio y miometrio, así como de IGFBP-2-4 y 6 en el estroma caruncular e IGFBP-3 en epitelio endometrial.

No se conocen reportes previos a esta investigación, sobre la determinación de la expresión del IGF-IR, de muestras de secreciones uterinas; aunque si de la utilización del citobrush como método que permite obtener suficiente material de calidad para preparar citologías y extraer mRNA endometrial (Ghasemi *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

No se detectaron diferencias entre las razas estudiadas, en cuanto a la probabilidad de sufrir endometritis subclínica o clínica, cuando el nivel de CC (2,5 a 3) es similar en todas las vacas en estudio (*Kruskal Wallis*).

El método de *Western blot* permitió la detección por primera vez de la expresión del IGF-IR en secreción uterina, así mismo demostró ser útil para la determinación de diferencias en la expresión del IGF-IR, en vacas de diferentes razas y con diferentes grados de inflamación endometrial en sistemas doble propósito, por lo que puede ser considerado como método diagnóstico que colabore en la selección de vacas resistentes a las enfermedades uterinas posparto.

Las vacas Carora y Siboney con endometritis subclínica presentaron mayor expresión del IGF-IR, en comparación con las vacas de otra raza y de la misma raza pero con otros cuadros de inflamación endometrial. Basados en los resultados, se podría especular que durante el periodo de balance energético negativo del posparto temprano, las vacas de raza Carora y Siboney, mostraron más rápida recuperación del endometrio asociada esto a los factores metabólicos que van ligados a la regeneración celular que depende de la disponibilidad de IGF-IR en las células endometriales.

AGRADECIMIENTOS

A la tutora, Dra. Ana Ruiz y el laboratorio de biotecnología de la cátedra de fisiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV-Maracay. Así como al Personal del Centro Técnico Productivo Socialista Florentino (CTPSF) de Sabaneta estado Barinas, del convenio INIA- EMBRAPA (Empresa Brasileira

de Pesquisa Agropecuaria) y de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT).

LITERATURA CITADA

- Chacin, F. 2000. *Diseño y análisis de experimentos*. Ediciones del vicerrectorado académico Universidad Central de Venezuela. 387 p.
- Fattet, I. y M. Jaurena. 1988. El estado corporal de las vacas lecheras. Editorial: Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 8 p.
- Gabler, E. 2010: Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8,152.
- Ghasemi, F., P. Gonzalez-Cano, P. Griebel and C. Palmer. 2012. Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology*. 78(7):1538-47. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.06.022. Epub 2012 Aug 25.
- Kasimanickan, R., T. Duffield, R. Foster, C. Gartley, K. Leslie, J. Walton and W. Johnson. 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Canadian Veterinary Journal*. 46(3), 255-259.
- LeBlanc, S., T. Duffield, K. Leslie, K. Bateman, G. Keefe, J. Walton and W. Johnson. 2002. Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 85(9), 2223-2236.
- LeBlanc, S. J. 2012. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reproduction Domestic Animal*. 47 5:18-30.
- Llewellyn, S., R. Fitzpatrick, D. Kenny, J. Patton and D. Wathes. 2008. Endometrial expression of the insulin-like growth factor system during uterine involution in the postpartum dairy cow. *Domestic Animal Endocrinology* 34.391-402.

- Madoz, L., M. Giuliadori, M. Jaureguiberry, J. Plöntzke, M. Drillich and R. de la Sota. 2013. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J DairySci.* 96(7): 4333-9.
- O'Connor, J., R. McCusker, K. Strle, R. Johnson, R. Dantzer and K. Kelley. 2008. Regulation of IGF-I Function by Proinflammatory Cytokines: At the Interface of Immunology and Endocrinology. *Cell Immunol.* 252(1-2), 91–110.
- Pérez, J. 2009. Efecto de la tipología racial y manejo sobre condición corporal e involución uterina en vacas en sistemas doble propósito. Trabajo de ascenso. Área Ingeniería Agronómica. Universidad Rómulo Gallegos. San Juan de los Morros. estado Guárico. 55 p.
- Ruiz, A. y R. Kittok. 2008. La subunidad nmdar-1 del receptor n-Metil-D-Asparato (NMDAR) en el hipotálamo del ovino mediante el análisis de Western Blot. *Revista Científica. FCV-LUZ.* 18, 28-33.