



## Causas de infertilidad en la yegua: Complejo Endometritis

Problemas de fertilidad derivados de la acumulación de líquido en el interior del útero son comunes en la yegua. La baja fertilidad es debida a fallos en la implantación del embrión. En otras ocasiones la endometritis provoca liberación de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  y por tanto la regresión del cuerpo lúteo. Es importante tener en cuenta que en ocasiones estos problemas se derivan de una infección endometrial pero esto no siempre es así.

En 1975 Hughes y Loy demostraron que tras la inoculación intrauterina de *Streptococcus zooepidermicus* la respuesta variaba en yeguas jóvenes (vírgenes) y en yeguas de edad avanzada (multíparas o vacías en el celo anterior). Las yeguas jóvenes mostraban una reacción inflamatoria aguda, mientras en las yeguas de más edad no aparecía una reacción marcada. Mientras las yeguas jóvenes no mostraban signos de infección a los pocos días, las yeguas de edad desarrollaban una infección crónica con descarga vaginal. En las yeguas jóvenes la infección se resolvía espontáneamente y eran capaces de concebir en el celo siguiente. Este trabajo clásico es en el que basa gran parte del conocimiento actual del problema: la persistencia de la endometritis es la causante de la sub-fertilidad/infertilidad, y son estas yeguas las que requieren tratamiento. Hoy día la denominada endometritis post cubrición, se reconoce como una de las principales causas de infertilidad o subfertilidad en la yegua.

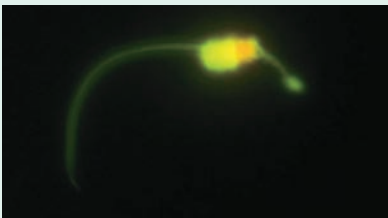


La endometritis en la yegua se puede subdividir en infección aguda, crónica y endometritis inducida por el apareamiento (natural o artificial). El principal factor del que depende el control de esta patología es la existencia de mecanismos de defensa que eliminen los contenidos uterinos tras el apareamiento o el parto. Estos mecanismos pueden estar comprometidos por razones puramente anatómicas, como puede ser un útero péndulo o la falta de funcionalidad cervical, o bien por cambios degenerativos como pérdida de la contractilidad miometrial, fibrosis cervical, elastosis vascular o linfagiectasia. Un aspecto que cobra especial importancia en los últimos años, es el reconocimiento del hecho que la respuesta uterina al agente patógeno varía, y que esto es tremendamente importante de cara al diagnóstico y al tratamiento que busca mejorar la fertilidad de la yegua problema. Por ello, un diagnóstico exacto y un tratamiento específico deben ser la base de un programa de mejora de la fertilidad en yeguas problemáticas. De hecho estudios recientes demuestran que los resultados de las ecografías y citologías obtenidas mediante hisopos uterinos tienen menos sensibilidad para el diagnóstico de infecciones endometriales por gérmenes Gram negativos que los lavados uterinos a bajo volumen o el cultivo de muestras de biopsia uterina.



## Respuesta del aparato genital femenino al semen

Tanto en la monta natural, como tras la inseminación artificial el semen se deposita directamente en el útero. Esto significa que todos los componentes del eyaculado: espermatozoides, plasma seminal, pero también bacterias y otros elementos presentes en el eyaculado se depositan en el útero. Aunque durante mucho tiempo se pensó que la respuesta inflamatoria uterina era debida a los microorganismos, hoy día se sabe, que son los propios espermatozoides, y no éstos, los responsables de esta reacción inflamatoria. Recientemente, se ha observado en nuestro laboratorio la presencia de espermatozoides equinos que presentan una alteración en la situación del fosfolípido de membrana fosfatidilserina, la presencia de este fosfolípido en la membrana externa es una señal para que el espermatozoide sea fagocitado.



Espermatozoide que presenta translocación de la fosfatidilserina (en verde) a la membrana externa. Esto constituye una señal para ser fagocitado.

Tras la monta, la mayoría de los espermatozoides permanecen en el útero. Tan solo unos pocos, tras un proceso no totalmente bien comprendido de selección espermática, alcanzan la unión útero-tubárica. La mayoría de los espermatozoides permanecen en el útero desencadenando una reacción inflamatoria. El plasma seminal modula la respuesta inflamatoria uterina, si bien los mecanismos implicados no se comprenden en su totalidad.

En la mayoría de las yeguas, esta respuesta al semen desaparece en 24-72 horas. Esta reacción es fisiológica, y además de participar en la selección espermática cumple la función de eliminar el exceso de espermatozoides y “limpiar” el endometrio para que cuando a los 5,5 días de la ovulación el embrión alcance el útero, encuentre el mejor ambiente para su implantación y desarrollo.

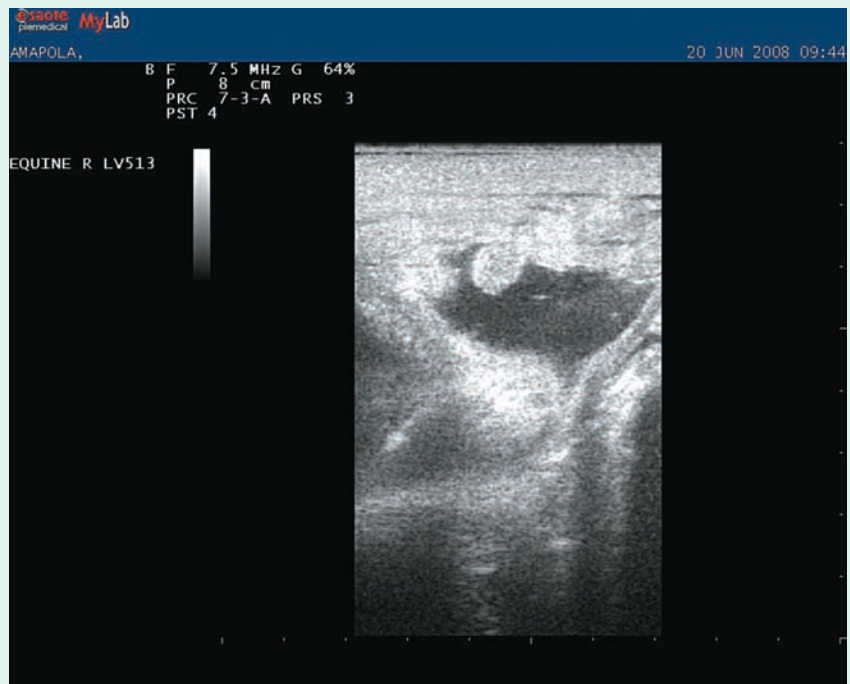
Sin embargo, si la endometritis persiste más allá del día 4 o 5 del diestro, el ambiente uterino será incompatible con la supervivencia embrionaria, además la persistencia de la reacción inflamatoria determinará la liberación de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  con el consecuente descenso de los niveles plasmáticos de progesterona.

## Identificación de las yeguas susceptibles

La identificación de estas yeguas se basa en la historia clínica y en el examen ecográfico del útero. La presencia de exceso de fluidos en el útero antes de la ovulación debe hacer que consideremos estas hembras como “yeguas problemáticas”.

### Ecografía uterina

Se admite que la **presencia de fluido intrauterino** se asocia a una menor tasa



Ecografía uterina mostrando el exceso de líquido endometrial.

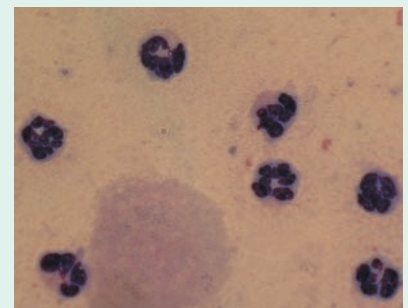
de gestación. Más concretamente la presencia de **2 o más** centímetros de líquido en el interior del útero en la fase estral, o entre las 6 horas anteriores y 36 posteriores a la monta es un claro diagnóstico de yegua susceptible a la endometritis post cubrición. De hecho, un exceso de fluidos en útero se correlaciona con un incremento en el número de células inflamatorias en la citología uterina. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la ausencia de fluido uterino no excluye la endometritis. Así, en un estudio reciente en PSI (Burlison et al, 2010), en yeguas en las que se aislaron *E Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp*, o bacterias consideradas no patógenas, tan solo se observó la presencia de exceso de fluido uterino en menos del 40% de los casos. Sin embargo, cuando se aislaron *Streptococcus beta hemolíticos*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* o algas el exceso de líquido se detectó entre el 45 y el 55% de los casos.

Otras anomalías en la ecografía y que se asocian con una menor fertilidad son: un exceso de edema pre o post cubrición, patrones aberrantes de edema, o la presencia de manchas hiperecogénas pequeñas y gruesas compatibles con aire en el interior del útero.

## CITOLOGÍA Y CULTIVO UTERINO

Son dos técnicas habituales para el diagnóstico de la endometritis. El aislamiento de un microorganismo en

el interior del útero, junto con la detección de más de dos neutrófilos por campo usando el objetivo de x40 (citología uterina positiva) se consideran diagnósticos de endometritis.



Citología endometrial mostrando numerosos neutrófilos.

Sin embargo, puede darse el caso de citología uterina positiva y cultivo negativo y viceversa, aunque ambas situaciones se asocian a endometritis y baja fertilidad. En este sentido se ha podido comprobar que yeguas infectadas con *E coli*, *S aureus*, y *Pseudomonas spp* presentan



un menor porcentaje de citologías positivas (más de dos neutrófilos por campo con el objetivo x40), en torno al 19 al 33%, mientras que infecciones por *Klebsiella* o *Streptococos beta hemolíticos* suponen porcentajes de citologías positivas en el rango del 50 al 75%. En general infecciones uterinas en las que hay líquido en útero se asocian a una mayor presencia de neutrófilos en la citología vaginal. **Esto significa, que no todos los patógenos inducen la misma respuesta uterina.** Otras posibles causas de citología uterina positiva son: pneumovagina, reflujo de orina al útero, el semen, y el exceso de producción de moco endometrial. Todo ello implica la necesidad de establecer una buena estrategia de diagnóstico, utilizando las técnicas de **citología endometrial, cultivo uterino mediante hisopo, mediante lavado endometrial de bajo volumen, o cultivo de la biopsia endometrial.** De todas ellas el **cultivo uterino mediante hisopo es la de sensibilidad más baja con tan solo 0,35, por lo que hay un gran número de falsos negativos,** mientras que la citología y el cultivo de la biopsia tienen sensibilidades de 0,82 y 0,77 respectivamente. La sensibilidad de las tres técnicas es alta 0,92 para la biopsia y 1 para la citología y el cultivo. Una alternativa al hisopado uterino es el lavado uterino de bajo volumen, que se ha descrito tiene una sensibilidad de 0,70, sin embargo la citología del lavado uterino tiende a subestimar la inflamación, con un 70% de los cultivos uterinos positivos negativos a la inflamación, sin embargo cuando se añade la presencia de detritus y líquido de recogida turbio, como criterio de inflamación, solo el 11% de los cultivos uterinos positivos se podrían clasificar como falsos positivos. El cultivo uterino usando lavado de bajo volumen parece ser especialmente útil para el diagnóstico de infecciones uterinas por *E coli*. Un estudio reciente en Kentucky (Riddle et al, 2007) usando más de 2000 muestras pareadas de citología endometrial y cultivo de hisopos endometriales reveló que la primera era mucho más eficaz en el diagnóstico de la endometritis, y los resultados de la citología endometrial, además mostraban mucha mejor correlación con la fertilidad. Yeguas con entre 0-2 neutrófilos por campo de x40 tenían tasas de gestación por celo a los 28 días del 60%, mientras

que en aquellas con entre 2-5 neutrófilos era del 36%, y de tan solo el 23% en yeguas con más de 5 neutrófilos por campo. Si bien es verdad que un cultivo uterino positivo también se relacionaba con bajas tasas de gestación aun cuando los resultados de la citología eran negativos. En todo caso han de interpretarse los resultados de estas pruebas en relación con el caso clínico en particular, y tenerse en cuenta que una citología uterina positiva, un cultivo uterino positivo o un líquido de lavado uterino turbio, constituyen por si solos una prueba inequívoca de endometritis.

### TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRITIS

Si bien no hace mucho tiempo se consideraba que fertilidades de entre el 50-60% eran aceptables, hoy día, consideramos como normal rangos en torno al 75-85%. Este incremento se debe en gran medida a un **mejor conocimiento del problema del complejo endometritis** en la yegua, su fisiopatología, nuestra capacidad para diagnosticar e identificar yeguas susceptibles, y unas mejores estrategias de tratamiento. El éxito del tratamiento se basa sobre todo en que aseguremos la reinstauración de la contractilidad uterina. **De tal modo hoy se reconoce que los dos aspectos más importantes que explican el éxito obtenido en los últimos años en el tratamiento de las endometritis, y por tanto en la mejora de los resultados reproductivos son: el lavado uterino con soluciones salinas isotónicas y el uso de ecbólicos.**

### Manejo de la yegua susceptible

El manejo de estas yeguas debe ir encaminado a **“ayudar”** al útero a eliminar los productos de la reacción inflamatoria fisiológica que se produce tras la monta o inseminación. Hay que recordar la importancia de la corrección de **factores predisponentes** de tipo anatómico (Caslick), u otros. Sin embargo hay que tener cuenta el tipo de yeguas con las que trabajamos; defectos que requieran un Caslick son más comunes en yeguas con sangre inglesa y no tanto en otras razas, como en nuestro Pura Raza Español. El uso de antibióticos debe ser racional; durante la década de los 90 del pasado siglo se

atribuyó al excesivo uso de antibióticos un incremento en la aparición de endometritis micóticas. Este tipo de endometritis se diagnostica con menor frecuencia en la actualidad debido a un uso más racional de la terapia antimicrobiana. El control post inseminación es imprescindible en estas yeguas. Teniendo en cuenta que el establecimiento del reservorio espermático se produce a las 4 horas de la IA, y que el embrión no entra en el útero hasta los 5,5 días de la ovulación, se pueden tratar estas yeguas desde las 4 horas tras la IA hasta los 2-3 días de la ovulación. Debido a que la concentración plasmática de progesterona aumenta significativamente tras la ovocitación, provocando el cierre cervical, no es recomendable aplicar tratamientos más allá del periodo indicado, día 2, como mucho 3, tras la ovulación. Un punto importante a tener en cuenta es que **estas yeguas se deben controlar y tratar antes y después de la inseminación**, esto es, se debe preparar a la yegua para la inseminación y controlar su estado después de ésta. El tratamiento se basa en tres aspectos, la gran mayoría de las veces en combinación: lavado uterino, aplicación de ecbólicos (oxitocina, carbetocina, prostaglandinas) y antibióticos.

### LAVADO UTERINO

El lavado uterino supone lo siguiente:

- 1.- Elimina los fluidos retenidos y también otros productos resultantes del proceso inflamatorio. Esto **favorece la función fagocitaria y la eficacia de los antibióticos.**
- 2.- La distensión uterina que induce, y el estímulo térmico derivado de la adecuada temperatura de la solución de lavado (42°C) **provoca contracciones uterinas** favoreciendo la eliminación del exceso de fluidos.
- 3.- La solución de lavado, solución salina fisiológica o ringer lactato normalmente empleadas, gracias a un suave efecto irritante endometrial, si está la temperatura correcta, 42°C, **atraen neutrófilos** al endometrio

La solución salina se administra por gravedad usando una sonda adecuada, infundiendo 1 litro de cada vez.





Lavado uterino.

Tras cada administración el líquido recogido se debe inspeccionar, para evaluar su aspecto, contenido, y, eventualmente utilizar el líquido recogido para cultivo, antibiograma y citología.



Líquido de lavado recogido en una yegua con píometra.

Es recomendable evitar la entrada de aire en el útero, para ello la sonda debe estar llena de líquido de lavado al introducirla y el líquido de lavado recogerse en el mismo envase que se infunde. En estas yeguas es importante asegurarse que se ha recogido todo el líquido de lavado, realizando ecografías si es necesario. Debemos recordar que son yeguas con problemas para eliminar el exceso de líquidos, por tanto los lavados se deben combinar con la aplicación de oxitocina para asegurar el completo vaciado uterino. **El momento ideal de realizar lavados tras la inseminación está entre las 4 y 18 horas** posteriores. La razón es que a las 4 horas ya se ha formado el reservorio espermático en la unión útero tubárica, por lo que no alteraremos a partir de este momento la población espermática, y que si bien el embrión no entra en el útero hasta los 5,5 días de la ovulación, no sería con-

veniente manipular el cérvix cuando la progesterona plasmática comienza a aumentar. Además, muchos estudios señalan que las yeguas lavadas entre las 4 y 6 horas de la inseminación presentan tasas de fertilidad superiores a las lavadas entre las 18 y 20 horas. También se ha de recordar que se ha de combinar la aplicación de oxitocina con el lavado uterino.

### OXITOCINA

La oxitocina es un buen tratamiento para la acumulación de líquidos. Es sencillo de aplicar y frecuentemente provoca la evacuación completa del contenido uterino. La dosis a emplear es de 20 UI. Dosis superiores a 25 UI se han relacionado con menores tasas de gestación.

También el análogo de mayor vida media, carbetocina, se puede emplear, a la dosis de 0.14 mg/yegua 12 y 24 horas tras la IA.

### PROSTAGLANDINAS SINTÉTICAS

El análogo sintético cloprostenol estaría especialmente indicado en yeguas con linfagiectasias a la dosis de 250 microgramos 12 y 24 horas tras la IA, evitando su aplicación tras la ovulación.

### NUEVAS ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO

Las técnicas clásicas de tratamiento buscan corregir los defectos en los mecanismos de defensa uterinos, neutralizar las bacterias y controlar la reacción inflamatoria post cubrición. Esto se consigue mediante la corrección quirúrgica de defectos anató-

micos, la mejora del drenaje uterino tras la cubrición, y el control del crecimiento bacteriano. Sin embargo, nuevas estrategias implican el uso de **mucolíticos, agentes quelantes**, y la administración de **esteroides** para modular la respuesta inmune.

### MUCOLÍTICOS

No todas las infecciones responden a los lavados uterinos y/o a los antibióticos. Este fallo puede deberse a anomalías anatómicas que favorezcan la reinfección, a la degradación de los antibióticos por los exudados uterinos (la propia infección incrementa la secreción de moco uterino), o a la producción de **biofilms** por los microorganismos. En yeguas con los mecanismos de defensa uterinos comprometidos también se observa un incremento en el moco uterino, al igual que en yeguas con endometritis crónica en las que hay un incremento en el grosor de la capa mucosa que cubre el endometrio. **El exceso de moco puede interferir la penetración del antibiótico, inactivar los aminoglucósidos, e interferir el transporte espermático hasta el oviducto.** Por lo tanto el uso de mucolíticos está justificado. Los agentes que se incluyen en este grupo son el Dimetilsulfóxido (DMSO), y la N-acetilcisteína (NAS). La N acetilcisteína es un agente mucolítico que rompe los puentes disulfuro entre los polímeros de mucina, y por lo tanto, reduce la viscosidad del moco. Además la NAS posee propiedades antioxidantes y probablemente antimicrobianas. Generalmente se emplea en irrigación intrauterina en solución al 0,6 o al 3,3%.

### BIOFILMS

Una de las causas que pueden explicar el fallo en el tratamiento de las endometritis crónicas, es la producción de **BIOFILMS** por bacterias Gram negativas, levaduras y hongos. Los biofilms bacterianos consisten en colonias de microorganismos de distinto tipo, que conviven rodeados por una matriz extracelular, coexistiendo en una relación simbiótica. En muchas ocasiones esta población simbiote es parte de la flora normal, y sirve para prevenir la colonización por microorganismos patógenos. **Los biofilms confieren protección frente a los antibióticos**, aunque el mecanismo exacto que confiere esta protección aún no ha sido definido, se proponen varias teorías para explicarlo. Una de ellas su-



giere que el biofilm impide la penetración del antibiótico en la matriz extracelular de la bacteria, otra afirma que es debido a la baja actividad metabólica bacteriana en el biofilm, mientras que una tercera propone que dentro del biofilm se desarrollan microorganismos resistentes.

*Pseudomonas aeruginosa* es un potente productor de biofilms, que se aísla con frecuencia en yeguas con endometritis crónica. Otros productores de biofilms que se aíslan en caso de endometritis incluyen: *Staphylococcus epidermis*, *E coli*, *E cloacae* y un buen número de hongos y levaduras, infecciones que por otra parte son más comunes en yeguas viejas pluríparas, con defectos anatómicos que comprometen las defensas uterinas. Estas infecciones suelen ser bastante difíciles de tratar. Recientes evidencias sugieren que el uso de **agentes quelantes** pueden mejorar la actividad antibiótica, eliminar los exudados y romper el biofilm. Entre ellos se ha usado la combinación EDTA-TRIS (ácido etilendiaminotetracético 50 mM Trome-tramina (Tris) 3.5 M). Esta combinación se comercializa en algunos países con el nombre de Tricide®. La última generación de este fármaco está compuesta de 8 mM de EDTA-2Na 2H<sub>2</sub>O y 20mM de 2 amino-2-hidroximetil-1,2 propanodiol. (Medical Molecular Therapeutics, Athens Georgia USA). Su mecanismo de acción parece basarse en su capacidad de quelar Ca<sup>++</sup> y/o Mg<sup>++</sup> de la membrana externa, alterando la permeabilidad de la pared celular, facilitando la entrada de los antimicrobianos. Además el daño que provoca en la membrana altera la capacidad osmorreguladora del microorganismo llevando al colapso osmótico de la bacteria. A diferencia de las bacterias, las paredes bacterianas de los hongos están formadas principalmente por polisacáridos (beta glucanos y quitina) y proteínas. Los agentes quelantes parecen alterar proteínas indispensables para el mantenimiento de la pared al eliminar cationes divalentes.

Para ejercer su acción deben entrar en contacto directo con el microorganismo, por ello se deben infundir volúmenes de entre 200 y 500 ml. **Un protocolo recomendado** (LeBlanc, 2010) es el siguiente; se infunde entre 200 y 500 ml de solución quelante el día uno, se hace un lavado uterino a las 24 horas, si el líquido de lavado sale turbio o se aprecian restos de moco se hace una nueva infusión de quelante el día 2. A partir del día 3 se realizan lavados uterinos seguidos de infusión de antibióticos durante 5 días.

## MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Como ya se ha indicado, durante el celo se puede acumular fluido en el interior del útero por varias razones. La primera es por no drenarse a través del cérvix por un fallo en los mecanismos de defensa uterinos, por un exceso de producción debido a una inflamación crónica, o bien por un reflujo de orina hacia el interior del útero. Cambios degenerativos en el útero como una elastosis vascular, también pueden contribuir a la acumulación de fluido intrauterino. La elastosis vascular reduce la fertilidad debido a un descenso en la perfusión endometrial y a alteraciones en el drenaje uterino debido al compromiso del retorno venoso en los lechos capilares. A lo largo de los últimos 20 años el tratamiento de la acumulación de líquido uterino ha estado enfocado a favorecer el drenaje físico del líquido acumulado. **Sin embargo, recientemente se ha visto que la modulación de la respuesta inmune con esteroides cerca o en el momento de la monta ha incrementado las tasas de fertilidad** en yeguas con acumulo de líquido e inflamación uterina.

El mecanismo de acción se basa en el **control de la producción de citoquinas pro-inflamatorias**. Esta terapia está especialmente indicada en yeguas añosas que sufren **inflamación asociada a la edad** "inflamm-aging". La inflamación asociada a la edad se caracteriza por ser una respuesta inflamatoria sistémica, de bajo grado, asociada a la edad avanzada descrita en caballos y en humanos. Se manifiesta por la **sobreproducción de citoquinas inflamatorias**. La obesidad además agrava esta condición. Se ha demostrado que las células mononucleares de los caballos de edad avanzada producen más citoquinas pro-inflamatorias que los jóvenes, además la obesidad incrementa su producción. La administración de una dosis única de **dexametasona** (50 mg i.v, alrededor de 0.1 mg/Kg) en la hora siguiente a la inseminación junto a las medidas habituales post cubrición, mejora la fertilidad en yeguas que presentan tres o más factores de riesgo de endometritis. Los factores de riesgo considerados son: historia reproductiva anormal, mala conformación perineal, fallo de cierre cervical en diestro, cultivo endometrial positivo, 2 o más centímetros de líquido en útero antes de

la cubrición, mas de 1,5 cm de líquido después de la cubrición y/o que persiste más de 36 horas. Otro protocolo usa prednisolona a dosis de 0.1 mg/Kg cada 12 horas durante 4 días empezando 48 h después de la cubrición.

## APLICACIÓN INTRAUTERINA DE ANTIBIÓTICOS

La aplicación intrauterina de antibióticos presenta cierta controversia. Sin embargo, en ocasiones puede ser difícil realizar lavados más allá de las 12 horas de la ovulación y la aplicación intrauterina de antibióticos puede ser una alternativa.

## BIBLIOGRAFÍA Y LECTURAS RECOMENDADAS

- BURLESON MD, LEBLANC MM, RIDDLE WT; Hendricks KEM 2010 Endometrial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares Animal Reproduction Science 121S S103.
- EATON S, RAZ T, CARD C; 2010 Toll like receptor -2 and -4 in the equine endometrium during physiologic post breeding endometritis Animal Reproduction Science 121S S96-S97
- HUGHES JP, LOY RG; 1975 The relation of infection to infertility in the mare and stallion Equine Veterinary Journal 7: 155-159.
- LEBLANC MM; (2010) Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post mating induced endometritis in the mare Reproduction in Domestic Animals 45 (Suppl 2): 21-27.
- MORRESEY PR, CAUSEY RC, LEBLANC MM; 2010 Scanning electron microscopy of ciliated endometrial cells from reproductively normal mares and from mares with delayed uterine clearance Animal Reproduction Science 121S: s94-s95
- RIDDLE WT, LEBLANC MM, STROMBERG AJ; 2007 Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice Theriogenology 68: 395-402.

Por **Prof. Dr. Fernando J. Peña**  
Laboratorio de Reproducción Equina,  
Universidad de Extremadura.

