



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE  
LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE  
ARGININA EN EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO Y FETAL EN OVINOS”**

**TÉSIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA

**ANAHY DANAÉ VARGAS VELÁZQUEZ**

TUTOR PRINCIPAL

PhD. HÉCTOR JIMÉNEZ SEVERIANO  
Cenid-Fisiología, INIFAP y FES-C, UNAM

COMITÉ TUTORAL

PhD. DAVID ALEJANDRO CONTRERAS CARO DEL CASTILLO  
CEIEPAA

PhD. CESAR AUGUSTO MEJÍA GUADARRAMA  
Cenid-Fisiología, INIFAP y FES-C, UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la vida por dejarme llegar hasta este punto de mi formación académica y permitir superarme día a día a pesar de todos los obstáculos, dándome la fortaleza necesaria para llegar a cumplir esta meta.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de seguir adelante en mis estudios.

Al Cenid-Fisiología del INIFAP por permitirme obtener grandes conocimientos dentro de sus instalaciones y por darme la oportunidad de conocer a grandes personas y profesionales que me enseñaron gran parte de los conocimientos que ahora poseo.

A mi tutor principal el Dr. Héctor Jiménez, por su apoyo incondicional, tanto en lo personal como académico, así como su paciencia, comprensión, atención y consejos.

Al Dr. Alejandro Contreras y a la Dra. Griselda Valdés, por compartir conmigo sus conocimientos, por ser participe en toda la realización del trabajo de tesis, por esas desveladas con las borregas y lo consejos en laboratorio, gracias por creer en mí.

Al Dr. Cesar Mejía, por sus recomendaciones, consejos y sugerencias, gracias por enriquecer este trabajo.

Al Dr. Mario Espinoza, porque siempre me ha brindado su apoyo en todo momento de estrés, por su colaboración y consejos, gracias por hacerme sentir en familia y demostrarme que los grados académicos por sí solos no definen a las personas.

Al CONACYT por brindarme su apoyo económico, simplemente no lo hubiese logrado sin él.

## DEDICATORIAS

A mis padres Josué y Ana, mi infinito amor y agradecimiento por el incondicional apoyo para llegar hasta este momento de mi vida, aún en aquellos momentos en los que estábamos distantes, por tener siempre la paciencia necesaria, por sus valiosos consejos que me han hecho una mujer responsable y consiente del lugar que ocupo en esta vida, siempre me han demostrado que no hay herencia más grande que la educación, siempre se los agradeceré, espero que me alcance la vida para retribuirles un poco de lo mucho que me han dado. A mi hermano Amhed que pese a la distancia siempre tuvo las palabras correctas para alentarme y darme el más sincero apoyo... Gracias por siempre creer en mí.

A mi familia de 10, por siempre preguntar y echarme porras para cumplir este sueño... en especial a mi tía Chata y Alicia, gracias por su amor.

A la familia García, que me ha recibido como una hija, quiero que sepan que son parte importante en la realización de éste sueño, gracias Sra. Cristina y Nelly por su amor y confianza me han hecho intentar ser mejor cada día.

A todos esos ángeles que estoy segura que desde donde están me cuidan y estarían orgullosos de mí... a ustedes abuelitos, a mi abue, a mi tía Mari, a mi tía Ara y a mi primo Rigel, siempre los recuerdo... Gracias por sus momentos de alegría. A todos mis amigos, en especial a David, Fernando, Isaac, Gaby, Mayra, Nancy e Iris, por compartir valiosos momentos y recuerdos... gracias por siempre apoyarme.

Y por supuesto a ti Yair que me has brindado comprensión, paciencia y amor, por todos estos años juntos, donde hemos derribado murallas y luchado batallas, por ser mi confidente, amigo y por despertar en mí ese maravilloso sentimiento llamado amor. Por ser mi motor y ayudarme a no caer, y cuando fue así me ayudaste a superarlo, por demostrarme que los sueños se hacen realidad cuando se trabaja por ellos y por enseñarme lo maravillosa que es esta vida cuando tienes a una gran persona a tu lado. Gracias por no soltarme y estar Siempre Juntos...Solo me queda decir TE AMO...

Este logro no solo es mío... es también de ustedes, gracias!...

## RESUMEN

La suplementación con arginina tiene un impacto positivo sobre el desarrollo y crecimiento del conceptus, y la angiogénesis. El objetivo general fue determinar los efectos de la administración de arginina al inicio de la gestación, sobre el desarrollo embrionario, la angiogénesis endometrial y el crecimiento fetal en el primer y segundo tercio de la gestación. Se utilizaron 56 ovejas, las cuales distribuyeron al azar a uno de dos grupos: a) Arginina, administración iv cada 8 h de HCl-Arginina diluida en solución salina fisiológica (SSF), equivalente a 27 mg de arginina/kg PV, durante un máximo de 35 días; b) Testigo, administración de 5 ml de SSF iv; para ello se colocó un catéter en la vena yugular. Las ovejas se subdividieron en ambos grupos a los 6, 9, 15, 35 y 90 días de gestación, momento en el cual se intervinieron para colectar los conceptus para ser evaluados, y muestras uterinas para ser analizadas mediante morfometría y técnicas de biología molecular. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza, para un DCA (PROC GLM, SAS 9.1) con previas transformaciones, o como un diseño anidado de dos niveles, usando el procedimiento MIXED de SAS. El tratamiento con arginina tuvo un efecto favorable en la calidad y viabilidad de los embriones de 6 y 9 días, en la densidad vascular endometrial a los 15 días, en la expresión de VEGF y VEGFR2, desarrollo vascular, y crecimiento de los fetos de 35 días. En conclusión, la arginina mejora las condiciones intrauterinas al incrementar la expresión de VEGF y VEGFR2, con lo que aumenta el desarrollo vascular, y así el transporte de nutrientes para favorecer el desarrollo y calidad embrionaria, y el crecimiento fetal.

Palabras Clave: Arginina, Embrión/Feto, Desarrollo Vascular Endometrial, VEGF.

## **ABSTRACT**

Arginine supplementation has a positive impact on development and growth of the conceptus, and angiogenesis. The overall objective was to determine the effects of arginine administration at the beginning of pregnancy on embryonic development, angiogenesis endometrial and fetal growth in the first and second trimester of pregnancy. 56 sheep were used, and randomly assigned to one of two groups: a) Arginine administration iv every 8 h of Arginine-HCl diluted in physiological saline solution (PSS), equivalent to 27 mg of arginine/kg BW for 35 days; b) Control group, administration of 5 ml of SSF IV; for this purpose a catheter placed into the jugular vein. The sheep were divided into two groups at 6, 9, 15, 35 and 90 days of gestation, at which time they were intervened to collect the conceptus to be evaluated, and uterine samples collected for analysis by morphometry and molecular biology techniques. Data were processed by analysis of variance, for DCA (PROC GLM, SAS 9.1) with previous transformations, or as a nested two-level design using the MIXED procedure of SAS. Arginine treatment had a positive effect on the quality and viability of embryos of 6 and 9 days, endometrial vascular density at 15 days, and in the expression of VEGF and VEGFR2, vascular development and growth of fetuses 35 days. In conclusion, administration of arginine may improve intrauterine conditions to increase expression of VEGF and VEGFR2, thereby increasing vascular development, and thus the transport of nutrients to promote the growth, embryo quality, and fetal growth.

Keywords: Arginine, Embryo/fetus, Vascular endometrial development, VEGF.

INDICE	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
1. Gestación en Ovinos	2
1.1. Desarrollo embrionario pre-implantacional	2
1.2. Desarrollo embrionario temprano	4
1.2.1. Reconocimiento materno de la gestación	4
1.2.2. Implantación embrionaria	5
1.2.2.1. Moléculas de adhesión en la implantación	6
1.3. Importancia del endometrio y las glándulas uterinas durante la gestación	9
1.3.1. Cambios en la pared uterina durante la gestación	9
1.3.2. Secreciones de las glándulas endometriales: Histotrofo	12
1.3.2.1. Nutrientes selectos del histotrófo ovino	13
1.4. Formación de la placenta	14
1.5. Desarrollo y crecimiento fetal	19
2. Arginina	19
2.1. Síntesis de la arginina	20
2.2. Catabolismo de la arginina	21
2.3. Transporte de la arginina	23
3. Óxido nítrico	23
4. Poliaminas	24
5. Arginina, óxido nítrico (ON) y poliaminas en la gestación	25
5.1. Efectos de la arginina en el desarrollo embrionario temprano e implantación	26
5.2. Efectos de la arginina en el crecimiento fetal	29
5.3. Efectos de la arginina en el desarrollo y vascularización de la placenta	29
6. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	30
6.1. Receptores del VEGF	32
6.2. Regulación del VEGF	34
6.3. Relación del VEGF con ON	34

III.	HIPÓTESIS	36
IV.	OBJETIVOS	36
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
1.	Condiciones generales	37
2.	Número de animales y su manejo	37
3.	Manejo de los tratamientos	37
4.	Obtención y manejo de muestras	38
4.1	Recolección y clasificación de embriones y fetos	38
4.2	Recolección de muestras y observaciones en útero	42
5.	Procesamiento de las muestras para su análisis	42
5.1.	Histología y morfometría	42
5.1.1.	Fijación e inclusión en parafina	42
5.1.2.	Tinción con hematoxilina y eosina (HyE)	42
5.1.3.	Análisis morfométrico en útero	43
5.2.	Cuantificación del mRNA del VEGF y de VEGF-R2	44
5.2.1.	Purificación de RNA	44
5.2.2.	Síntesis de cDNA con RT-PCR	45
5.2.3.	PCR Tiempo real	45
6.	Análisis estadístico	46
VI.	RESULTADOS	47
VII.	DISCUSIÓN	61
VIII.	CONCLUSIONES	69
IX.	BIBLIOGRAFÍA	70
X.	ANEXOS	83

## LISTA DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

CUADROS	Pág.
1. Numeración asignada a los embriones de acuerdo a su etapa de desarrollo.	39
2. Numeración asignada a los embriones de acuerdo a su calidad embrionaria.	40
3. Numeración asignada a los embriones de 15 d de gestación al considerar su etapa de desarrollo.	41
4. Oligonucleótidos especie-especifico utilizados para PCR tiempo real.	46
5. Promedios $\pm$ EE y rango del número de cuerpos lúteos (CL's), características de los embriones encontrados y la relación entre el número de embriones y el número de CL's, en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 6 días de gestación.	47
6. Promedios $\pm$ EE y rango del número de cuerpos lúteos (CL's), características de los embriones encontrados y la relación entre el número de embriones y el número de CL's, en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 9 días de gestación.	48
7. Número de embriones (Emb) en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo), evaluadas a los 6 y 9 días de gestación.	49
8. Promedios $\pm$ EE y rango del número y características de los cuerpos lúteos (CL's), el número de embriones y la relación entre el número de embriones (EMB) y el número de CL's, en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 15 días de gestación.	49
9. Promedios $\pm$ EE y rango de las características de los cuerpos lúteos (CL's) y ovarios, el número y características de los fetos, la relación entre el número de fetos y el número de CL's y longitud de carúnculas, en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 35 días de gestación.	50
10. Promedios $\pm$ EE y rango de las características de los fetos, el peso de los placentomas y el peso de los órganos fetales y su relación con el peso fetal	51

de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 90 días de gestación.

11. Promedios  $\pm$  EE y rango de las características de los cuerpos lúteos (CL's) y ovarios, número de fetos y placentomas, y la relación entre el número de fetos y el número de CL's, de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 90 días de gestación. 52
12. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en la vasculatura endometrial de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 15 días de gestación. 53
13. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en la vasculatura endometrial de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 35 días de gestación. 54
14. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en la vasculatura endometrial de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 90 días de gestación. 56
15. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en las glándulas endometriales de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 15 días de gestación. 57
16. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en las glándulas endometriales de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 35 días de gestación. 58
17. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en las glándulas endometriales de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 90 días de gestación. 59

18. Promedios  $\pm$  EE y rango del Número de copias del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y su Receptor (VEGFR2) en el útero de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluados a los 15, 35 y 90 días de gestación. 60

<b>FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
1. Desarrollo embrionario peri-implantacional	3
2. Efecto de los receptores de progesterona en la implantación	7
3. Placentoma en las ovejas	15
4. Modelo de angiogénesis de la placenta ovina durante los últimos dos tercios de la gestación	18
5. Síntesis de arginina	21
6. Papeles de la arginina en el desarrollo y crecimiento embrionario y fetal en los mamíferos	26
7. Acciones de leucina y arginina para iniciar la motilidad del trofoectodermo	29
8. Papel del ON y el VEGF en la angiogénesis vascular y relajación muscular	35
9. Endometrio de oveja del grupo Arginina a los 15 días de gestación. 200X	53
10. Endometrio de oveja del grupo Testigo a los 15 días de gestación. 200X	53
11. Endometrio de oveja del grupo Arginina a los 35 días de gestación. 200X	55
12. Endometrio de oveja del grupo Testigo a los 35 días de gestación. 200X	55
13. Endometrio de oveja del grupo Arginina a los 90 días de gestación. 200X	55
14. Endometrio de oveja del grupo Testigo a los 90 días de gestación. 200X	55
<b>ANEXOS</b>	<b>Pág.</b>
1. Preparación de PBS 10x	83
2. Preparación de PFA 4%	84
3. Procesamiento de tejidos	85
4. Tinción con Hematoxilina y Eosina	86
5. Metodología utilizada para Morfometría	87
6. Preparación del gel de agarosa al 1.2%	88

## I. INTRODUCCIÓN

La pérdida de embriones y fetos, como consecuencia de condiciones intrauterinas desfavorables representa un problema muy importante para la optimización de la eficiencia reproductiva en los animales domésticos (Wu et al., 2006). Se ha estimado que entre 25 y 50% de los embriones ovinos en desarrollo sufren de muerte embrionaria (Luther et al., 2010) y que dos tercios de estas pérdidas se producen durante el periodo de peri-implantación (Nancarrow, 1994; Luther et al., 2010). Para explicar estas pérdidas deben considerarse factores genéticos, infecciosos y nutricionales. Dentro de estos factores, la subnutrición tiene efectos negativos sobre la calidad de los ovocitos, el desarrollo embrionario y la formación de blastocistos (Borowczyk et al., 2006). Adicionalmente la capacidad y el entorno uterino es un factor determinante que limita la sobrevivencia y el desarrollo del feto (Wu et al., 2006; Gootwine et al., 2007). Por ejemplo, el crecimiento prenatal es sensible a los efectos directos e indirectos de la nutrición materna, la cual puede modificar el ambiente uterino en todas las etapas de la gestación. Este efecto materno es particularmente evidente en las hembras que presenten múltiples conceptus, ya que la demanda de nutrientes y el espacio para mantener a todos los embriones/fetos no pueden ser debidamente cumplidos (Gluckman y Hanson., 2004).

La arginina es un aminoácido indispensable para la supervivencia del organismo, así como para el crecimiento y desarrollo del embrión/feto y el recién nacido (Wu et al., 2009). Diversos estudios han reportado que la arginina puede modular la función reproductiva a través de sus metabolitos, entre los que se encuentra el óxido nítrico (ON) y las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina), los cuales son cruciales durante el desarrollo embrionario temprano (Kwon et al., 2003b; Luther et al., 2010), implantación (Van Winkle, 2001), crecimiento fetal (Mateo et al., 2007; Lassala et al., 2009, 2010, 2011) y la angiogénesis de la placenta y endometrial, que es determinante para el suministro adecuado de nutrientes al feto (Kim et al., 2007). Con base en estos reportes se planteó el objetivo de determinar el efecto de la administración de arginina a ovejas durante el primer tercio de gestación, sobre la sobrevivencia, calidad y desarrollo embrionario, así como sobre la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la angiogénesis en el endometrio y el desarrollo fetal en el segundo tercio de la gestación.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. Gestación en ovinos

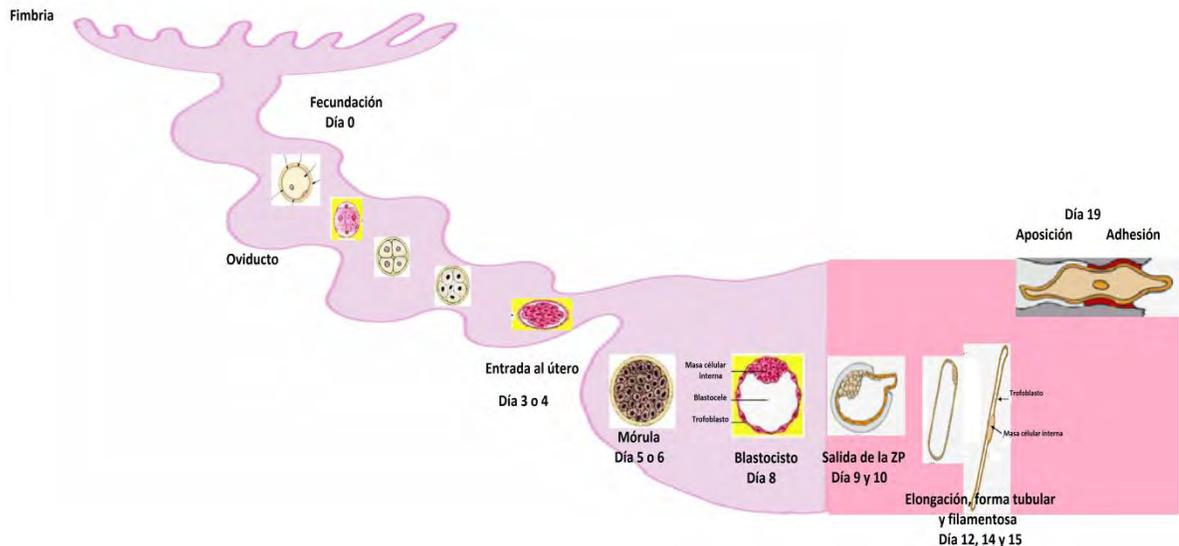
En general, los mamíferos son vivíparos; es decir, su desarrollo embrionario y fetal se completa dentro del útero. Este periodo se denomina gestación, el cual se extiende desde la fecundación hasta la expulsión del feto y de las membranas extraembrionarias. En las ovejas, la gestación dura aproximadamente 150 días (rango de 144 a 152 días) (Vejlsted, 2006), y se divide en 3 periodos; gestación temprana (el primer tercio o los primeros 50 días), mediados de la gestación (el segundo tercio o del día 50 al 100) y la gestación tardía (el tercer tercio o los últimos 50 días) (Osnaya, 2008).

Se ha estimado que entre 25 y 50% de los embriones ovinos en desarrollo sufren de muerte embrionaria y que dos tercios de estas pérdidas se producen durante el periodo de peri-implantación (Luther et al., 2010), es decir, durante el periodo crítico del reconocimiento materno de la gestación, de la adhesión al útero (implantación) y del desarrollo placentario inicial. Existen muchos factores que juegan un papel en la pérdida embrionaria y fetal, entre ellos se encuentran la calidad de semen, la calidad de los ovocitos y el medio ambiente uterino, o el propio embrión. Los factores ambientales que pueden influir en la sobrevivencia embrionaria o fetal incluyen factores internos, como la capacidad y el entorno uterino (Wu et al., 2006; Gootwine et al., 2007), o factores externos, como la nutrición de la madre, ya que el crecimiento prenatal es sensible a los efectos directos e indirectos de la nutrición materna en todas las etapas de la gestación.

#### 1.1. *Desarrollo embrionario pre-implantación*

Después de la fertilización en el oviducto, el cigoto resultante, realiza una secuencia de divisiones mitóticas (segmentación), que dan lugar a la formación de los blastómeros. Las divisiones embrionarias ocurren sin disminuir la masa celular total y sin alterar el diámetro y la forma esférica del embrión, pero con un incremento en el número de células, así el embrión se mueve al útero alrededor del día 3 o 4 después de la fertilización en la etapa de 8 a 16 células (Fig.1). Ya en el útero, el embrión se encuentra con un fluido uterino rico

en nutrientes necesarios para continuar la división celular. En el día 5 o 6 post-fertilización, cuando el embrión, aún dentro de la zona pelúcida, ha llegado a la etapa de 16 a 32 células, se forman uniones estrechas entre los blastómeros individuales y el embrión comienza a compactarse para formar la mórula. Esta es la primera etapa crítica del desarrollo del embrión y es un paso esencial para la diferenciación y formación de blastocistos (Larue et al., 1994). En el día 8 se aprecia la formación de una cavidad (blastocelo) y la diferenciación de las células embrionarias en una masa celular interna y un trofoectodermo, que dan lugar al feto y a los tejidos de la placenta, respectivamente. A partir de este momento el blastocisto se expande, y entre los días 9 y 10 (0,4 mm) sale de la zona pelúcida. Desde la fertilización y hasta la formación del blastocisto, mientras todavía se encuentra dentro de la zona pelúcida, el embrión permanece de forma esférica y sin mayores cambios de diámetro. Después de la formación del blastocisto y de la eclosión, el embrión continúa expandiéndose y el trofoblasto cambia de ser redondo o esférico a una forma tubular y filamentosa entre los días 12 (33 mm), 14 (68 mm) y 15 (150-190 mm) de gestación, con membranas extra-embrionarias que se extienden hacia el cuerno uterino contralateral entre los días 16 y 20 (Morris et al., 2000). Con la ruptura de la zona pelúcida, el desarrollo, implantación y diferenciación del blastocisto alargado es dependiente del medio uterino.



**Fig. 1. Desarrollo embrionario peri-implantacional.** (Modificado a partir de Bazer et al., 2012c).

## **1.2. Desarrollo embrionario temprano**

El periodo de desarrollo embrionario es caracterizado por el reconocimiento materno de la gestación y por la implantación en el útero (nidación) (Spencer y Bazer, 2004).

El alargamiento del conceptus ovino es un requisito previo para la implantación central, la aposición y adhesión entre el trofoectodermo y el epitelio luminal uterino. Hacia el día 19 comienza una adherencia débil a las paredes uterinas. Esta fijación no es firme y consiste mayormente en una aposición de tejidos, sin embargo estas membranas proveen una superficie amplia para la absorción de nutrientes desde la superficie uterina y permite la excreción de desechos del embrión (Guillomot, 1995).

### *1.2.1. Reconocimiento materno de la gestación*

Los mecanismos de la señalización del reconocimiento consisten en estrategias por la cual el conceptus y el útero materno se comunican bioquímicamente para asegurar que exista en forma ininterrumpida síntesis y liberación de la progesterona ( $P_4$ ). En los rumiantes (incluyendo ovejas, vacas y cabras) la señalización para el reconocimiento de la gestación está dada por el IFN-T, que es secretado por las células mononucleares del trofoectodermo del conceptus alrededor del día 14 de la gestación. La secreción del IFN-T suprime el mecanismo uterino de secreción de un patrón luteolítico de prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) para asegurar el mantenimiento de los cuerpos lúteos (CL) funcionales para la producción de la progesterona (Bazer et al., 2009a, 2010, 2011). La progesterona es necesaria para el establecimiento y mantenimiento de un ambiente intrauterino compatible con las funciones del útero en la implantación y placentación, que son esenciales para un resultado exitoso de la gestación (Spencer et al., 2004a).

La secreción del IFN-T está regulada por el desarrollo del conceptus, iniciando la secreción cuando los blastocistos esféricos y grandes se transforman a una forma tubular y filamentosa alargada (Bazer et al., 2010).

El IFN-T suprime la transcripción del receptor alfa de los estrógenos (ESR1), con lo cual los estrógenos ya no pueden inducir la expresión del receptor de oxitocina (OXTR) en el

epitelio uterino. De esta forma se inhibe el desarrollo de los mecanismos luteolíticos que requieren de la acción de la oxitocina (OXT) para inducir los pulsos de PGF2 $\alpha$  (Bazer et al., 2010). La supresión de la expresión de ESR1 por el IFN-T también evita que los estrógenos induzcan a los receptores de progesterona (PR) en el epitelio endometrial. Esto es fundamental, ya que la ausencia de los PR en el epitelio uterino es necesario para la implantación y para la expresión de los genes que son inducidos por la progesterona (P<sub>4</sub>) y estimulados por el IFN-T, apoyando el crecimiento y desarrollo del conceptus, así como a la implantación, establecimiento y mantenimiento de la gestación (Spencer et al., 2004a, b; Bazer et al., 2010, 2011).

### *1.2.2. Implantación embrionaria*

La implantación implica la fijación del embrión en desarrollo al epitelio luminal uterino, a través de interacciones secretoras y físicas durante un período restringido conocido como “ventana de receptividad” (Dey et al., 2004). Este periodo se establece por acciones de la progesterona que regula la producción local de citocinas, factores de crecimiento, factores de transcripción y prostaglandinas (Paria et al., 2002). Además, si el desarrollo del blastocisto es sincrónico con la receptividad uterina, inicia una cascada de adhesión en las superficies apicales del trofoectodermo y epitelio uterino.

La implantación se divide en las siguientes etapas (Spencer et al., 2004b):

1. Entre el día 8 y 9 de gestación: Debido al crecimiento del blastocisto y a la acción de las proteasas uterinas y/o embrionarias, se provoca la ruptura de la zona pelúcida y la eclosión del blastocisto.
2. Entre los días 9 y 13 de gestación: Aún no se observan contactos celulares definitivos entre el conceptus y el endometrio, sin embargo el blastocisto se encuentra posicionado centralmente e inmovilizado en el cuerno uterino. En esta etapa se da la elongación del blastocisto, la cual es necesaria para que se logren las siguientes etapas de la implantación.
3. Entre los días 13 y 15 de gestación: Existe una reducción de las microvellosidades apicales que cubren el trofoectodermo, con lo que inicia la aposición (asociación) del embrión con el epitelio luminal del endometrio, seguido de una adhesión inestable. En las ovejas, la aposición se produce primero en la proximidad de la

masa celular interna, es decir, del embrión propiamente dicho, y se extiende hacia el extremo del conceptus alargado. El trofoblasto desarrolla vellosidades en forma de dedo o papilas que penetran en los conductos superficiales de las glándulas uterinas, lo que sirve para anclar al conceptus durante la peri-adhesión, para absorber las secreciones de las glándulas uterinas (Guillomot et al., 1993) y para facilitar la formación de las interacciones adhesivas entre el trofoblasto y el endometrio.

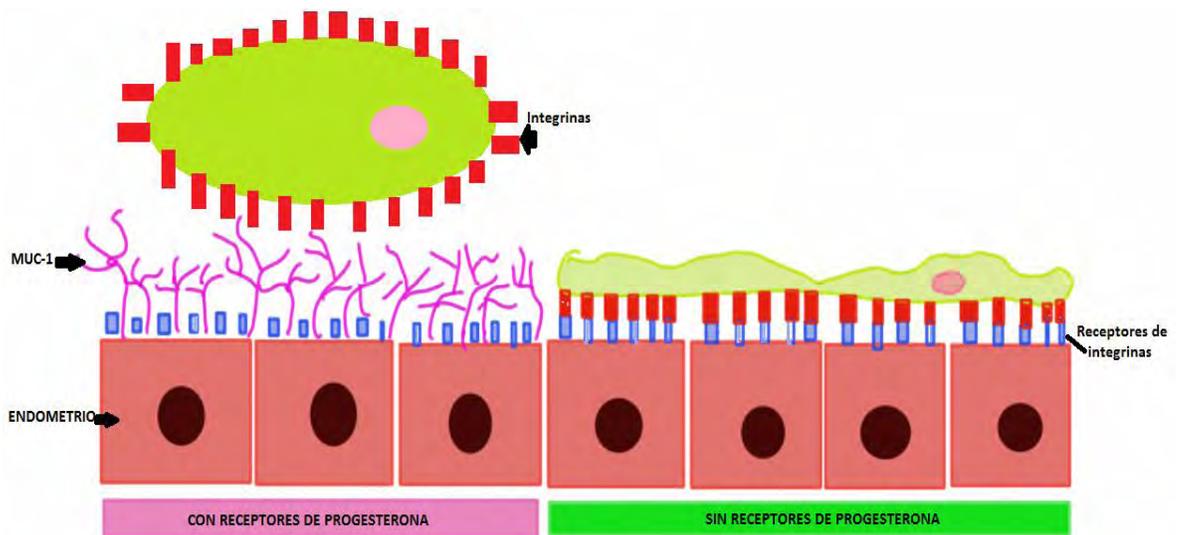
4. Entre el día 16 y 22 de gestación: El trofoblasto comienza a adherirse firmemente al epitelio endometrial. La expresión del gen del IFN-T se detiene en las regiones del trofoectodermo que han establecido contactos celulares con el epitelio luminal. Las células gigantes binucleadas del trofoblasto (BNC) se han diferenciado del trofoblasto mononuclear para el día 16, pero sólo las células trofoblásticas mononucleares se adhieren al epitelio luminal endometrial.

#### *1.2.2.1. Moléculas de adhesión en la implantación*

La unión inicial del conceptus requiere la alteración en la expresión de los componentes anti-adhesivos, principalmente mucinas, del epitelio luminal que inhiben la fijación (Brayman et al., 2004). Además existen moléculas de adhesión en la superficie del epitelio luminal uterino, que permiten el contacto inicial con el trofoectodermo, para progresivamente desarrollar una adhesión estable (Burghardt et al., 2002). La adhesión inicial está mediada por moléculas que funcionan como ligando específico de unión a carbohidratos, incluyendo a las selectinas y galectinas (Carson et al., 2000). Las interacciones de baja afinidad son seguidas por la adhesión, la cual implica a integrinas estables expresadas en el trofoectodermo y en el epitelio luminal del útero, así como a sus ligandos en la matriz extracelular materna, que también tienen papeles en la adhesión, migración, invasión, organización del citoesqueleto y de señalización bidireccional (Burghardt et al., 2002).

La pérdida de los receptores de progesterona en el epitelio uterino (Fig. 2) inmediatamente antes de la implantación (después del día 11 o 13 de la gestación), se puede correlacionar directamente con la reducción de expresión de ciertos genes, tales como la proteína MUC-1, lo que es un prerrequisito para que el trofoectodermo acceda al

epitelio luminal uterino para la implantación (Johnson et al, 2001), además de ser necesario para la expresión de otros genes durante la gestación, tales como la galectin-15, osteopontina, serpinas uterinas ovina (o proteínas de la leche uterina) (Spencer et al., 2004a), así como de progestamedinas, particularmente el factor de crecimiento fibroblástico 10 (FGF10), FGF7 y/o el factor de crecimiento hepático (HGF) que ejercen efectos parácrinos sobre el epitelio uterino y el trofoectodermo del conceptus, que expresan receptores para FGF7, FGF10 (FGFR2IIIb) y HGF (MET; proto-oncogéno) en las ovejas (Satterfield et al., 2008).



**Fig. 2. Efecto de los receptores de progesterona en la implantación.** En el endometrio se inhibe la expresión de los receptores de progesterona, lo que permite la disminución en la expresión de MUC-1, un aumento en las integrinas adhesivas necesarias para la cascada de implantación y un aumento en la expresión de genes y proteínas en el epitelio uterino (Modificado a partir de Bazer et al., 2012c).

a. MUC-1

A medida que el blastocisto se acerca al epitelio luminal endometrial, se encuentra con el glicocálix. Un componente del glicocalix es la MUC-1, una gran glicoproteína transmembranar expresada en la superficie apical de una variedad de epitelios del tracto reproductivo (Brayman et al., 2004). La MUC-1 se encuentra en el epitelio luminal para proporcionar una barrera a la unión, pero se reduce debido a la activación de las

proteasas de la superficie celular (Carson et al., 2006), iniciando así la cascada de adhesión, al eliminarse esta barrera antiadherente se pueden exponer otras glicoproteínas que participan en la adhesión del trofoblasto al epitelio luminal.

#### b. Galectina-15

La expresión de galectina- 15 se encuentra en el epitelio luminal y glandular de endometrio de ovejas (Gray et al., 2004). Su expresión comienza y aumenta entre los días 10 y 14 de gestación, para luego reducirse entre los días 14 y 16. Estas alteraciones temporales y espaciales de la galectina-15 en el epitelio endometrial, la convierten en un mediador de las interacciones del conceptus y endometrio durante la implantación. El papel extracelular es funcionalmente unir a los b-galactosidos sobre las glicoproteínas, tales como las mucinas, integrinas, fibronectina y otras glicoproteínas y glicolípidos, permitiendo que funcione como un molécula de adhesión celular entre el blastocisto y el endometrio.

#### c. Las integrinas

Las integrinas comprenden a una familia de receptores transmembranales glicoproteicos, intrínsecos y heterodiméricos que median la diferenciación celular, la motilidad y la adhesión. El papel central de las integrinas en la cascada de adhesión de la implantación es estabilizar la adhesión y mediar en la migración celular, la proliferación y la diferenciación a través de numerosos intermediarios en la señalización. En las ovejas, la receptividad para la implantación no parece relacionarse con los cambios en los patrones temporales o espaciales de la expresión de las integrinas, sin embargo la implantación depende de la expresión de otras glicoproteínas, tales como la galectina-15, osteopontinas y fibronectinas, que son ligandos para los heterodímeros de las integrinas (Gray et al., 2004).

#### d. Osteopontinas (OPN)

Las OPN son un ligando de unión a las integrinas, que son relacionados con diversos procesos como la angiogénesis, la supervivencia celular y la gestación (Johnson et al., 2003a). En las ovejas, las OPN secretadas se unen a los receptores de las integrinas expresadas en el trofoblasto y en el epitelio uterino, donde se estimulan cambios en la

proliferación, migración, supervivencia, adhesión y remodelación del conceptus, el cual se alarga posiciona y se adhiere al epitelio luminal (Garlow et al., 2002). De esta manera las OPN sirven como un ligando que controla la adhesión entre el trofoblasto y el endometrio, esencial para la implantación y placentación (Johnson et al 2003a, b).

### **1.3. *Importancia del endometrio y las glándulas uterinas durante la gestación***

Los factores maternos son importantes reguladores del crecimiento y desarrollo del conceptus en el útero, por lo que el útero se debe someter a un rápido crecimiento y remodelación durante la gestación con la finalidad de acoger al conceptus para apoyar su crecimiento y desarrollo (Bazer et al., 2011).

La pared uterina madura esta formada por dos componentes funcionales, el miometrio y el endometrio:

- El miometrio es el componente del músculo liso de la pared uterina e incluye una capa circular interna derivada de la capa intermedia de células mesenquimales ductales y una capa longitudinal externa.
- El endometrio es el revestimiento de la mucosa interna del útero, e histológicamente se compone de dos tipos de células epiteliales, el epitelio luminal y el glandular, que son dos compartimientos estromales estratificados que incluyen una zona de estroma densamente organizada (estrato compacto) y un estroma organizado libremente (estrato esponjoso), los vasos sanguíneos, y las células inmunes. El endometrio de ovejas adultas consiste de un gran número de áreas aglandulares llamadas carúnculas, cubiertas por una capa sencilla de epitelio luminal, y áreas intercarunculares intensamente glandulares (Igwebuike, 2009). Las carúnculas son los sitios de implantación superficial y placentación, mientras que las áreas intercarunculares del endometrio contienen un gran número de glándulas uterinas ramificadas en espiral (Gray et al., 2001).

#### **1.3.1. *Cambios en la pared uterina durante la gestación***

Durante el período de implantación, el útero crece y se remodela sustancialmente con el fin de apoyar el desarrollo y crecimiento rápido del conceptus en los dos tercios

posteriores de la gestación. Las modificaciones estructurales uterinas importantes que sirven para asegurar la implantación del conceptus son las siguientes:

- *Vascularización de las carúnculas y formación de placentomas:*

Durante la implantación, el endometrio presenta criptas carunculares profundas, las cuales son penetradas por vellosidades cotiledonarias del conceptus (Davis et al., 2000), con lo cual el embrión en desarrollo puede anclarse firmemente en la superficie del endometrio materno. De esta manera se forman los placentomas, los cuales son sitios para el intercambio hemotrófico de nutrientes y metabolitos entre el conceptus y la madre. La parte fetal de los placentomas son los cotiledones, mientras que los sitios de contacto materna son las carúnculas.

La formación de las criptas carunculares implica la ampliación del diámetro luminal uterino, así como el aumento de la vascularización de los tejidos uterinos, especialmente de las carúnculas. Desde el día 12 al 24 de la gestación, la densidad de volumen microvascular en los tejidos carunculares del cuerno grávido del útero ovino aumenta 1.8 veces en ambas áreas carunculares e inter-carunculares del endometrio (Reynolds y Redmer, 1992). También se ha informado de un aumento adicional en la vascularización caruncular de 2 veces desde el día 50 hasta el día 140 de gestación a través de aumentos relativamente pequeños en el número de vasos, y un aumento de 2 a 3 veces en el diámetro vascular (Borowicz et al.2007).

El aumento en la vascularización de las carúnculas, se debe al aumento en la secreción de factores angiogénicos por parte de los tejidos endometriales. Se ha informado que entre el día 50 y 140 de gestación, la angiogénesis de las carúnculas se correlaciona positivamente con la expresión de los receptores-1 (FLT1), angiopoyetina-2 (ANGPT2) y la guanilato ciclasa soluble (GUCY1B3) del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Borowicz et al., 2007). Con el aumento en la vascularización, entre el día 11 y el día 30 de la gestación se incrementa la tasa de flujo sanguíneo uterino aproximadamente de 4 a 6 veces. Este aumento de la vascularización uterina y el flujo sanguíneo garantiza la función placentaria para satisfacer las demandas metabólicas del crecimiento fetal durante la gestación (Igwebuike, 2009).

- *Adenogénesis uterina*

La adenogénesis es la diferenciación y desarrollo morfológico de las glándulas uterinas, lo que es un evento postnatal en los mamíferos, que es vulnerable a los efectos adversos endocrinos, tales como los progestágenos y los estrógenos (Bartol et al., 2006).

La adenogénesis de una oveja comienza durante su desarrollo fetal y se completa después del nacimiento, por lo que aunque el potencial genético de la función uterina que tendrá en la vida adulta se define durante su concepción, el éxito reproductivo en los eventos relacionados con el desarrollo embrionario, que son regulados por la morfogénesis de la glándula endometrial, es determinado por los periodos de organización endometrial en su vida como neonato y adulto (Gray et al., 2001).

Los cambios que completan la adenogénesis endometrial en las ovejas, y que implican una morfogénesis de ramificación, son los siguientes:

- a) Feto: Entre los 135 y 150 días de gestación, se observa el desarrollo de las glándulas endometriales como invaginaciones profundas del epitelio luminal en hendiduras inter-nodulares.
- b) Neonato: Entre el día 0 y 7 postnatal inicia la génesis de las glándulas endometriales, cuando aparecen invaginaciones superficiales a lo largo del epitelio luminal en áreas inter-carunculares. Entre los 7 y 14 días postnatales, el epitelio glandular naciente prolifera y se invagina en el estroma, formando estructuras tubulares que se ramifican alrededor del día 21 postnatal. Hacia el día 56 postnatal, las áreas carunculares e intercarunculares son histológicamente similares a la del útero adulto.
- c) Adultos. Aunque la pared uterina ovina es histológicamente madura a las 8 semanas después del nacimiento, la maduración final puede ocurrir hasta la pubertad o incluso durante la primera gestación (Gray et al., 2001).

Durante la gestación, el útero de las ovejas se expone de forma secuencial a los estrógenos, progesterona, interferón-tau, lactógeno placentario y la hormona de crecimiento placentario, con lo que se activa y mantiene la remodelación del endometrio, el crecimiento uterino, y la morfogénesis de las glándulas endometriales, así como la función secretora (Noel et al., 2003). Durante cada

gestación se produce una marcada hiperplasia e hipertrofia de las glándulas endometriales, probablemente en respuesta a la creciente demanda de apoyo histotrófico por unidad feto-placentar (Stewart et al., 2000). Así, durante la gestación las glándulas endometriales intercarunculares crecen en longitud (4 veces) y anchura (10 veces) y establecen una ramificación lateral (Igwebuike et al., 2009). La hiperplasia de las glándulas endometriales se produce entre el día 15 y 50 de la gestación, lo que es seguido por hipertrofia para aumentar su superficie, lo que permite una producción máxima de secreciones después del día 60 de la gestación (Stewart et al., 2000). La máxima función diferenciada de las glándulas endometriales se produce entre el día 80 y 120 de la gestación. Después del parto, las glándulas endometriales sufren de una regresión entre el día 1 y 28 postparto lo que es parte del proceso de la involución uterina (Spencer y Bazer, 2004).

### *1.3.2. Secreciones de las glándulas endometriales: Histotrofo*

Las glándulas endometriales sintetizan y secretan una variedad de enzimas, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, hormonas, proteínas de transporte, iones, factores mitógenicos, proteasas, aminoácidos, glucosa, fructosa, vitaminas y otras sustancias, denominados colectivamente como histotrofo (Bazer et al., 2012c). Las secreciones de las glándulas endometriales son los principales reguladores de la supervivencia y desarrollo del conceptus, así como de la producción de la señal del reconocimiento de la gestación, la implantación y la placentación (Carson et al., 2000; Gray et al., 2001; Spencer y Bazer, 2004).

- *Su papel en la nutrición del conceptus y la proliferación del trofoblasto*

Durante el período de pre-implantación, a partir del día 4 al 15, el conceptus está en el lumen uterino, donde se nutre a partir del histotrofo, de hecho tras la implantación el embrión sigue requiriendo en forma crítica de la nutrición histotrófica (Igwebuike, 2009). La nutrición histotrófica, que se deriva principalmente de las secreciones de las glándulas uterinas, es absorbida por las areolas placentarias, que son estructuras de la placenta de los rumiantes que se desarrollan sobre la superficie de cada glándula uterina, y están especializadas para la absorción y el transporte del histotrofo hacia el útero (Spencer y Bazer, 2004).

Además de proporcionar la nutrición para el conceptus, el histotrofo contiene factores de crecimiento y citocinas que promueven las funciones mitogénicas del trofoblasto ovino y de las células del mioblasto (Martal et al., 1997), así como la proliferación y migración celular del trofoblasto (Song et al., 2008).

- *Su papel en la interacción conceptus-madre*

En las secreciones uterinas se encuentran proteínas que pueden ser importantes mediadores de las interacciones maternas-conceptus y en la placentación. Una de estas proteínas es la osteopontina, un componente ácido de la matriz extracelular que también es conocida como fosfoproteína-1 secretora (SPP-1), la cual se une a receptores de las integrinas que se expresan en el endometrio y en las células trofoblásticas (Johnson et al., 2007). Otras proteínas son las galectinas, que tienen funciones en la adhesión celular, el crecimiento y la apoptosis, una de ellas es la galectina-15, la cual ha sido relacionada con el crecimiento del blastocisto, el alargamiento y la implantación (Satterfield et al., 2006; Lewis et al., 2007).

#### *1.3.2.1. Nutrientes selectos del histotrofo ovino*

Existen efectos diferenciales producidos por la leucina, arginina, glutamina, glucosa (nutrientes selectos) y la SPP1 en la migración, proliferación y adhesión del conceptus. Estos efectos son críticos para la transición del blastocisto de una forma esférica a una tubular y filamentosa, lo que a su vez se requiere para que sea capaz de producir la señalización del reconocimiento de la gestación y la implantación (Bazer et al., 2011).

Se ha informado que el blastocisto requiere de la presencia de leucina o arginina para exhibir expansión, motilidad, y el crecimiento del trofoectodermo requerido para la implantación (Martin et al., 2003). Para que la leucina y la arginina coordinen estos eventos deben iniciar la señalización celular a través de la cinasa de serina-treonina o la vía mTOR, y así regular la síntesis de proteínas y el catabolismo y aumentar la expresión de IGF2 (Nielsen et al., 1995), NOS (Martin y Sutherland, 2001), y ODC (Kimball et al., 1999).

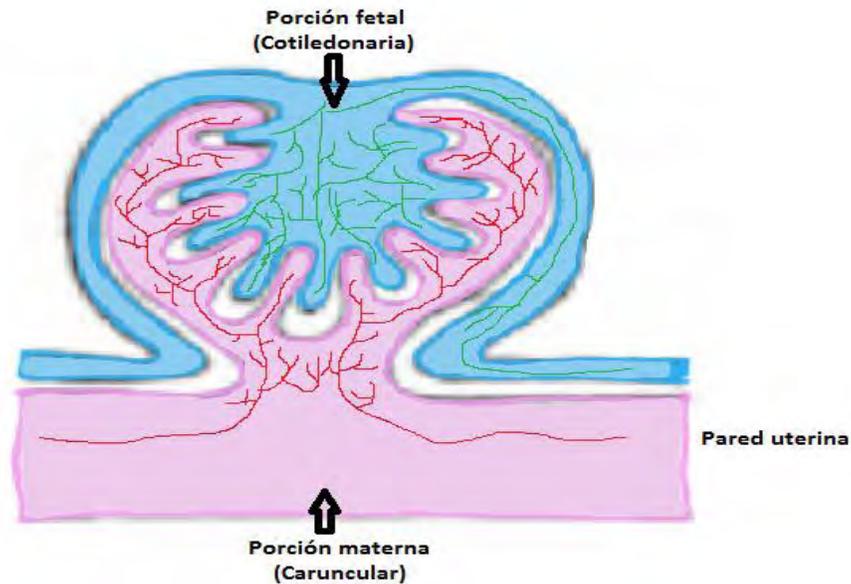
- *Vía de señalización celular de la rapamicina (mTOR/FRAP1) en la gestación*

La vía de señalización celular de la rapamicina (mTOR /FRAP1) juega un papel importante en la regulación del crecimiento y metabolismo celular en respuesta a factores de crecimiento y al estado nutricional (Bazer et al., 2012c). El mTOR es una cinasa serina/treonina evolutivamente conservada, que se expresa cuando la acción de la PI3K y AKT1 se reduce, así el mTOR controla el crecimiento y la proliferación celular mediante la activación de la proteína cinasa ribosomal S6 (RPS6K), para fosforilar al RPS6 y regular la síntesis de proteínas, así como iniciar la traducción del ARNm, la síntesis de ribosomas, la expresión de genes relacionados con el metabolismo, la autofagia y la reorganización del citoesqueleto (Kim et al., 2002). La vía mTOR es un "sistema de detección de nutrientes" estimulado por la SPP1, el factor de crecimiento similar a la insulina 2, la glucosa y la arginina (Kim et al., 2010) para apoyar el desarrollo del blastocisto (Martin et al., 2003; Kim et al., 2008; Bazer et al., 2011).

#### **1.4. Formación de la placenta**

La placenta es un órgano formado por dos porciones, una fetal (corión) y otra materna (endometrio). Constituye el único medio de conexión entre el feto y el útero materno, mediante el cual las circulaciones sanguíneas materna y fetal interactúan sin mezclarse para lograr el apropiado transporte de nutrientes y oxígeno al feto desde la sangre materna, así como la eliminación de desechos producidos por el feto (Osnaya, 2008).

La clasificación de las placentas por sus características histológicas, está determinada principalmente por las capas de células que están presentes en las membranas extraembrionarias y en el útero, que separan los dos sistemas vasculares. La oveja tiene una placenta epitelio-corial, en donde el conceptus forma células trofoectodérmicas binucleadas que invaden y se unen al útero para formar células multinucleadas o sincitiotrofoblásticas, y se mantienen todas las capas de tejido entre los sistemas sanguíneos del útero y la placenta. La placenta de los rumiantes comprende de 60 a 100 placentomas (Bazer et al., 2009a), por medio de los cuales se intercambian nutrientes transplacentarios, gases y desechos (Fig. 3, Reynolds et al., 2010).



**Fig. 3. Placentoma en las ovejas** (Modificado a partir de Reynolds et al., 2010).

El desarrollo de la placenta consiste en la formación de una extensa red vascular (crecimiento y desarrollo de los lechos vasculares) desde el endometrio hacia la placenta, con lo cual se apoya el crecimiento y función de la placenta, así como el adecuado flujo sanguíneo, y con ello el correcto crecimiento fetal (Reynolds y Redmer, 1995).

El aporte sanguíneo demandado por la placenta ocurre gracias a dos procesos críticos; la angiogénesis y la vasodilatación (Reynolds y Redmer, 1995).

- *Angiogénesis en la placenta*

La formación de nuevos vasos se produce a través de la vasculogénesis y la angiogénesis, que son dos procesos consecutivos y críticos para el crecimiento y desarrollo de todos los tejidos, incluyendo la placenta (Borowicz et al., 2007; Reynolds et al., 2010). Mientras que la vasculogénesis es la formación de vasos sanguíneos que se originan por la diferenciación de células mesenquimales pluripotenciales provenientes de células progenitoras hemangiogénicas, la angiogénesis se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos ya existentes (Demir et al., 2007). Para que estos procesos se den, se requiere de la migración de angioblastos (Charnock et al., 2004), proliferación de células endoteliales, formación de un tubo

vascular a partir de otro preexistente, e incremento en la permeabilidad. El citotrofoblasto dispara la vasculogénesis y la angiogénesis; mientras la gestación progresa, las células estromales y de Hofbauer toman la tarea de activar el desarrollo de los vasos sanguíneos (Demir et al., 2007).

- *Desarrollo vascular placentaria en las ovejas*

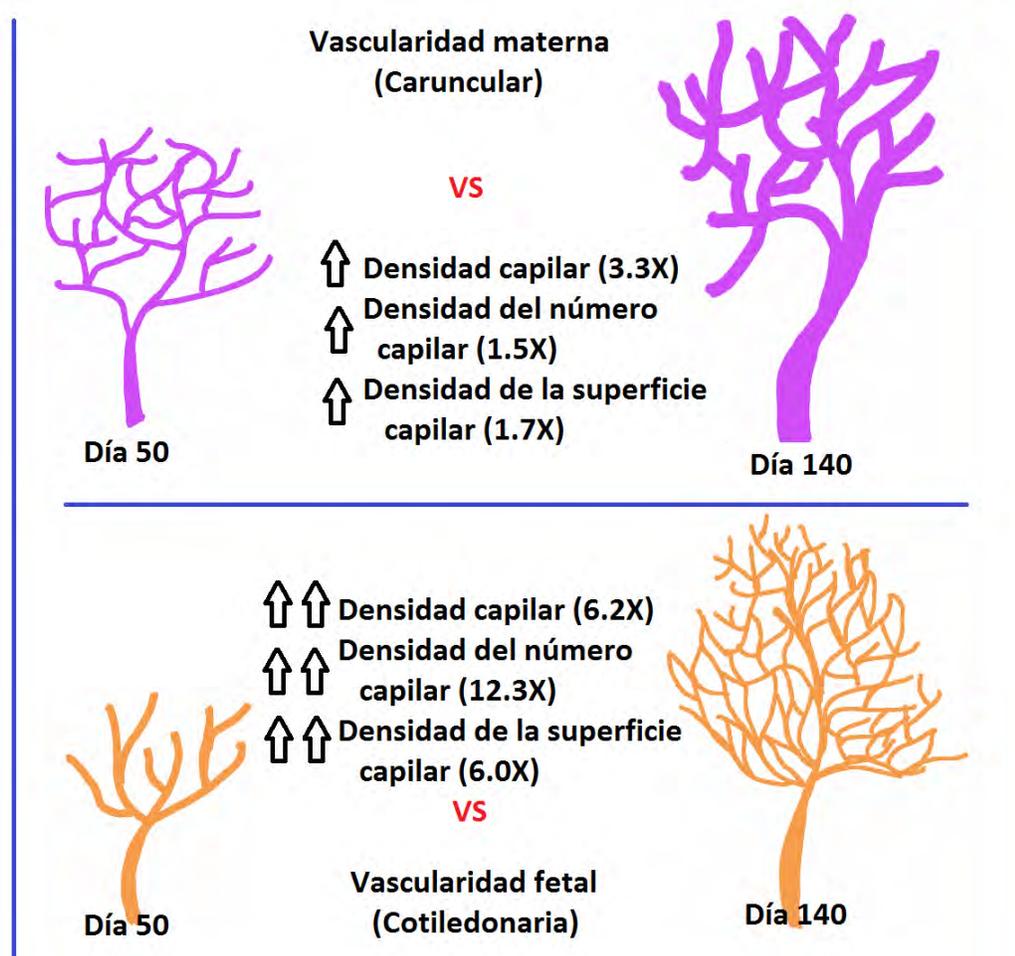
Para la evaluación de la angiogénesis de la placenta se han aplicado métodos histológicos clásicos que implican fijación, inclusión en parafina, seccionado y tinción, seguido por un análisis estereológico (usando microscopía confocal y análisis de imagen computarizado) (Reynolds et al., 2005a; Borowicz et al, 2007; Vonnahme et al., 2007).

Usando esta metodología, Reynolds y Redmer (1992) informaron que la angiogénesis en el endometrio se inicia en la gestación temprana, ya que existe un aumento en la vascularidad a partir del día 12-14 de la gestación en el cuerno uterino grávido, seguido por un aumento en el crecimiento vascular en el cuerno no grávido por el día 30. Por su parte, Grazul et al., (2010) reportan que existe un aumento dramático en el desarrollo vascular entre los días 14 al 20 de la gestación, y que este desarrollo se mantiene hasta el día 30, ya que se observó que el área y superficie vascular, así como el área promedio por vaso, y la expresión de varios factores angiogénicos aumentaron durante este periodo. Además, la tasa de flujo sanguíneo uterino aumenta aproximadamente de 4 a 6 veces desde el día 11 al 30 y así se mantiene durante toda la gestación (Reynolds et al, 1984). También se ha establecido que la densidad vascular en el útero ovino aumenta durante los primeros 6 días de la implantación y es mayor en las zonas cercanas al embrión (Spencer et al., 2004b). Estos cambios en el desarrollo vascular corresponden con el periodo de reconocimiento materno de la gestación, con la unión inicial/implantación de las membranas fetales al epitelio uterino, y con el inicio del crecimiento y desarrollo de la placenta (Spencer et al., 2007, 2008; Bazer et al., 2009a, b). Esto seguramente favorece el intercambio de nutrientes y particularmente de oxígeno en la interface materno-embriionario.

Estos métodos histológicos cuantitativos, han servido para comparar el desarrollo vascular del tejido endometrial (placenta materna) con el tejido cotiledonario (placenta fetal), y así observar que existen diferencias dramáticas en su arquitectura microscópica

microvascular, y en su función fisiológica (Reynolds y Redmer, 1995; Borowicz et al., 2003; Reynolds et al., 2005b). Así, a los 24 días de gestación la densidad vascular del endometrio, aumenta 2 veces (Reynolds y Redmer, 1992, 2001) hasta mediados de la gestación y luego más lentamente a partir de entonces (Reynolds y Redmer, 2001; Reynolds et al., 2005a). En contraste, la densidad vascular de los tejidos de la placenta fetal, o cotiledones, permanece relativamente constante hasta la mitad de la gestación (entre los días 40 y 80), y empieza a aumentar drásticamente durante el último tercio de la gestación en asociación con el aumento en el crecimiento del feto (Kwon et al., 2004; Reynolds et al., 2010).

También se ha creado un modelo de desarrollo microvascular de la placenta ovina durante los últimos dos tercios de la gestación (Fig. 4, Reynolds et al., 2010). En este modelo, del día 50 hasta el 140 de la gestación, la vasculatura del endometrio presenta un aumento de 2.2 veces en el tamaño, con solo pequeños aumentos en el número (1.5 veces) o en la superficie vascular (1.7 veces), dando como resultado un modesto aumento de 3.3 veces en el área vascular. De esta forma, la microvasculatura del compartimiento de la placenta materna, está compuesta casi exclusivamente de grandes vasos con una alta capacidad de transporte (Reynolds et al., 2005b). Por su parte, los lechos vasculares de los cotiledones (fetal) presentan principalmente una ramificación, resultando en un aumento de 12.3 veces en el número de vasos acompañada con una disminución de 1.9 veces en el tamaño vascular. El aumento relativo de 6.2 veces en el área vascular y la superficie vascular de los cotiledones fetales pueden explicarse por este patrón de crecimiento de la ramificación y que está compuesto principalmente de abundantes capilares pequeños, diseñados como un sistema de alta velocidad para la absorción de nutrientes, al aumentar el flujo sanguíneo (Reynolds et al., 2005b; Borowicz et al., 2007). De esta forma, la arquitectura microvascular de la placenta ovina es ideal tanto para el transporte de nutrientes (del lado materno), y la absorción de nutrientes (del lado fetal) (Reynolds et al., 2005a).



**Fig. 4. Modelo de angiogénesis de la placenta ovina durante los últimos dos tercios de la gestación** (Modificado a partir de Reynolds et al., 2010).

- *Regulación de la angiogénesis placentaria*

Aunque numerosas moléculas han sido implicadas en la regulación de crecimiento vascular, se ha identificado que los principales factores que regulan la vascularización en la placenta son el VEGF, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y las angiopoyetinas (ANGPT), así como sus respectivos receptores (Reynolds y Redmer, 2001). En cuanto a la regulación de la expresión de estos factores en el útero-placenta, los estrógenos parecen ser un factor clave. En ovejas ovariectomizadas, el mRNA del VEGF endometrial, FGF, ANGPT1, y ANGPT2 sufren una fuerte regulación hacia arriba pocas horas después del tratamiento con estrógenos, lo que se asocia con un aumento

dramático en la vascularización uterina y el flujo sanguíneo (Johnson et al., 2006). Además, la expresión del mRNA de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS o NOS3), que produce al óxido nítrico (ON) es importante para regular la angiogénesis y la vasodilatación (Reynolds y Redmer, 2001; Redmer et al., 2005; Borowicz et al., 2007), ya que se ha propuesto que el aumento intracelular de ON y la consecuente activación de múltiples proteínas cinasas, son fundamentales en la regulación de la síntesis placentaria del VEGF y FGF (Song et al., 2009).

### **1.5. Desarrollo y crecimiento fetal**

Para la mayoría de los mamíferos, la última parte de la gestación se caracteriza predominantemente por el rápido crecimiento y desarrollo del feto. El patrón de crecimiento típico del feto sigue una curva en forma sigmoide, en donde el desarrollo se produce a un ritmo lento, aumenta exponencialmente durante mediados y finales de la gestación, y concluye con un lento crecimiento a corto plazo. El crecimiento y el desarrollo de la placenta (evaluada conforme a su longitud y peso) preceden al crecimiento fetal en las ovejas debido a que el feto requiere una placenta funcional para la obtención de nutrientes, oxígeno y otros factores tróficos necesarios para su crecimiento y desarrollo (Bazer et al., 2012b). Así, el peso de la placenta aumenta 5 g/d del día 25 al 70, mientras que del día 70 al 140 su ritmo de crecimiento se reduce a 1.7 g/d. En contraste, el peso fetal del día 25 al 70 se incrementa 2.5 g/d, y del día 70 al 140 es de 41 g/d (Bazer et al., 2012b).

## **2. Arginina**

La arginina es nutricionalmente, un aminoácido semi-esencial o condicionalmente esencial para los mamíferos gestantes (Wu et al., 2009), ya que se necesita para un crecimiento óptimo y desarrollo fetal (Wu et al., 2004a). Esto se debe a que el feto no tiene desarrollado el eje intestinal-renal para la síntesis de arginina endógena a partir de glutamina, glutamato y prolina (Wu et al., 2004b).

Además de ser una unidad para la síntesis de proteínas, la arginina es uno de los aminoácidos más versátiles, ya que es el precursor para la síntesis de muchas moléculas

biológicamente activas, incluyendo el óxido nítrico (ON), la ornitina, las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina), la creatina y la agmatina (Wu y Morris, 1998). También la arginina regula las vías metabólicas clave que son críticas para la salud, el crecimiento, la reproducción y la homeostasis de los animales (Morris, 2009).

### **2.1. Síntesis de la arginina**

En la mayoría de los mamíferos, la arginina circulante en la sangre se deriva de la dieta y de fuentes endógenas (incluyendo tanto la síntesis de novo como la degradación de proteínas) (Wu et al. 2013). El suministro de la arginina en la dieta de gestación es insuficiente para satisfacer las necesidades de arginina durante la gestación, por lo que se requiere la síntesis endógena de arginina para apoyar el desarrollo embrionario y de la placenta, así como el crecimiento fetal (Chacher et al., 2013).

La síntesis de novo (Fig. 5) de la arginina en mamíferos se da a partir de L-glutamina (Wu y Morris, 1998).

1. La enzima fosfato dependiente de glutamina transforma la glutamina a glutamato.
2. El glutamato es convertido a L-glutamil fosfato y L-glutamil semialdehído por la acción de P5C sintetasa.
3. A continuación se lleva a cabo una reacción espontánea no enzimática para la formación de L-Pirrolina-5-carboxilato.
4. Este último se convierte a L-ornitina por la reacción de ornitina aminotransferasa.
5. A partir de ésta se produce citrulina por acción de la enzima ornitina carbamoiltransferasa.

Hasta aquí todas las reacciones se llevan a cabo en la mitocondria de los enterocitos.

6. La citrulina pasa al citosol y se convierte en L-arginosuccinato por la acción de la enzima arginosuccinato sintasa.

- Finalmente a partir del arginosuccinato se sintetiza la arginina por acción de arginosuccinato liasa.

Cabe señalar que la glutamina y el glutamato se absorben en el intestino delgado, y la arginina formada llega a la circulación general para ser usada por los órganos periféricos (Wu et al., 2009).



**Fig. 5. Síntesis de arginina** (Modificado a partir de Wu y Morris, 1998).

## 2.2. Catabolismo de la arginina

La arginina es precursor de moléculas importantes y se puede catabolizar por múltiples vías. Las enzimas que inician la degradación de la arginina son la arginina-glicina amidinotransferasa, la arginina descarboxilasa, las arginasas y la óxido nítrico sintasa (NOS). Con la excepción de la arginina descarboxilasa, todas estas enzimas actúan sobre el grupo guanidino de la arginina (Morris, 2004).

- Arginina-glicina amidinotransferasa:** Esta enzima cataliza a la arginina en creatina (Morris, 2004), la cual juega un papel en el metabolismo energético del músculo esquelético y en las células neuronales, donde sirve como una forma de almacenamiento de fosfato de alta energía (Wu y Morris, 1998).

- b) **Arginina descarboxilasa:** Esta enzima convierte a la arginina a  $\text{CO}_2$  y agmatina, en el cerebro y riñón. La agmatina es un ligando para los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos que puede actuar como un neurotransmisor.
- c) **Arginasas:** Existen dos isoformas, la citosólica (tipo I) y la mitocondrial (tipo II). La arginasa tipo I está presente principalmente en los hepatocitos y en mucho menor grado en el intestino delgado, tejido mamario y en ciertas placentas. La arginasa tipo II se expresa en las células y tejidos extrahepáticos. Las arginasas juegan un papel importante en la síntesis de glutamato y prolina a través de la producción de ornitina (Wu y Morris, 1998). El glutamato, es un neurotransmisor excitador que puede dar lugar a otra molécula de señalización celular: el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Wu y Morris, 1998). La prolina y la hidroxiprolina derivada, juegan papeles importantes en la cicatrización de heridas, enfermedades inflamatorias crónicas y en la infección (Morris, 2002). La ornitina sirve como precursor para la biosíntesis de poliaminas, que son cationes alifáticos que pueden regular la expresión génica, transducción de señales, la función del canal de iones, la síntesis de proteínas, la apoptosis, así como la proliferación celular y la diferenciación (Thomas y Thomas, 2001; Flynn et al., 2002; Zhao et al., 2008). La enzima ornitina descarboxilasa es la que sintetiza a las poliaminas a partir de la ornitina (Zhao et al., 2008).
- d) **Óxido nítrico sintasa (NOS):** Existen tres isoformas de esta enzima, las cuales fueron nombradas de acuerdo al tipo de célula en las que fueron aisladas por primera vez. La NOS endotelial y neuronal se expresan constitutivamente en las células y su actividad está regulada por el complejo  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina. La NOS inducible actúa de una manera independiente del calcio (Wu y Morris, 1998). El catabolismo de la arginina por las NOS resulta en la liberación de óxido nítrico (ON) y citrulina. El ON es un radical libre que funciona como un importante mediador de numerosos procesos biológicos, incluyendo la vasodilatación, la respuesta inmune y la neurotransmisión (Wu y Meininger, 2002). La citrulina es un intermedio clave en el ciclo de la urea y un antioxidante eficaz para la protección de ADN, lípidos y proteínas del daño oxidativo inducido por radicales hidroxilo. Aunque la citrulina no es un precursor para la síntesis de proteínas del tejido,

puede ser reciclado efectivamente para producir arginina, debido a la presencia generalizada de la sintasa de argininosuccinato y liasa argininosuccinato en los tejidos (Wu y Morris, 1998).

### **2.3. Transporte de la arginina**

Los requerimientos de arginina en la mayoría de las células de los mamíferos se cumplen principalmente por la absorción de arginina extracelular a través de transportadores específicos, ya que este nutriente no puede pasar por difusión simple a través de la membrana celular (Morris, 2009). Como un aminoácido catiónico, sus transportadores actúan de la misma forma que con la lisina, ornitina e histidina. El sistema  $y^+$  fue el primer sistema de transporte identificado como un transportador de aminoácidos catiónicos (CAT), este sistema es selectivo para los aminoácidos catiónicos y es independiente de  $Na^+$  (Wu y Morris, 1998).

Además, los sistemas  $b^+$  y  $B^+$  pueden transportar aminoácidos neutros, así como aminoácidos catiónicos. Estos dos sistemas se distinguen por su dependencia de  $Na^+$ , ya que el sistema  $B^+$  es dependiente de  $Na^+$ , mientras que el sistema  $b^+$  es independiente de  $Na^+$ .

El cuarto sistema de transporte, llamado  $y^+L$ , tiene una alta afinidad tanto por los aminoácidos neutros como para los catiónicos, y el transporte de los aminoácidos catiónicos a través de este sistema es independiente de  $Na^+$ .

### **3. Óxido nítrico**

El óxido nítrico (ON) es una molécula de tamaño pequeño y estructura muy simple, de carácter fuertemente hidrofóbico. A temperatura y presión ambientales se encuentra en estado de gas incoloro, su vida media es ultracorta (6 milisegundos), presentando una solubilidad en agua similar a la del oxígeno puro (Ferrero, 2001). Debido a que posee un electrón no apareado en su estructura también se le considera un radical libre del nitrógeno (Duarte et al., 2008).

El ON es considerado un regulador clave de la angiogénesis, la embriogénesis temprana de mamíferos, el crecimiento trofoblástico de la placenta, y el desarrollo en el útero del

conceptus (Maul et al., 2003). Además es un mediador importante de numerosos procesos biológicos, incluyendo las funciones vasculares (Ignarro et al., 2001), la neurotransmisión (Green, 1995), la secreción de hormonas y la inflamación.

Las diversas funciones de ON pueden ser atribuidos a sus propiedades físicas y químicas, y al rango de células que lo sintetizan. El ON reacciona con una variedad de blancos específicos, incluyendo proteínas como el guanilato ciclasa y la enzima citocromo P-450. Su forma de acción es uniéndose al grupo hemo de la guanilato ciclasa, una enzima soluble que cataliza la formación de GMP cíclico (GMPc) a partir de guanosina trifosfato (GTP). El GMPc activa las proteínas cinasas dependientes de GMPc y la fosforilación de proteínas blanco, lo que desencadena entonces una serie de respuestas fisiológicas (por ejemplo la vasodilatación arterial y la biogénesis mitocondrial). De esta forma, la síntesis de ON controla el tono vascular, y mantiene la estructura de la pared arterial, ya que reprime la proliferación de las células musculares lisas. Por otra parte, el ON tiene acción antiagregante sobre las plaquetas e inhibe la adhesión de los leucocitos al endotelio (Ignarro et al., 2001).

La síntesis del ON se realiza a partir de la arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Gao et al., 2009c). Se trata de una reacción muy compleja en la que se necesita oxígeno molecular y diversas coenzimas: tetrahidrobiopterina (BH4), NADPH, FAD, FMN, grupo hemo y calmodulina (Wu y Meininger, 2009). La enzima eNOS es la responsable de la formación habitual de ON, mientras que la nNOS produce niveles bajos (Gao et al., 2009c). Además si la disponibilidad de arginina o de BH4 disminuyen, en vez de formarse ON se produciría entonces la síntesis alternativa del radical superóxido ( $O_2^-$ ) por la eNOS (Wu y Meininger, 2009).

#### **4. Poliaminas**

Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) son reguladores clave de la angiogénesis, la embriogénesis temprana de los mamíferos, el crecimiento trofoblástico placentario y el desarrollo embrionario en el útero (Lefevre et al., 2011a, b). A través de la unión intracelular al ARN, ADN, nucleótidos trifosfatos, proteínas, y otras moléculas cargadas negativamente, las poliaminas (moléculas policatiónicas) regulan la expresión génica, la transducción de señales, la función de los canales iónicos, así como del ADN,

la síntesis de proteínas y la diferenciación de las células (Igarashi y Kashiwagi., 2000; Ishida et al., 2002). Las poliaminas también son captadoras endógenas de especies reactivas de oxígeno, protegiendo así al ADN, proteínas y lípidos del daño oxidativo, por lo tanto, son esenciales para la proliferación, diferenciación y función celular (Kwon et al., 2003b).

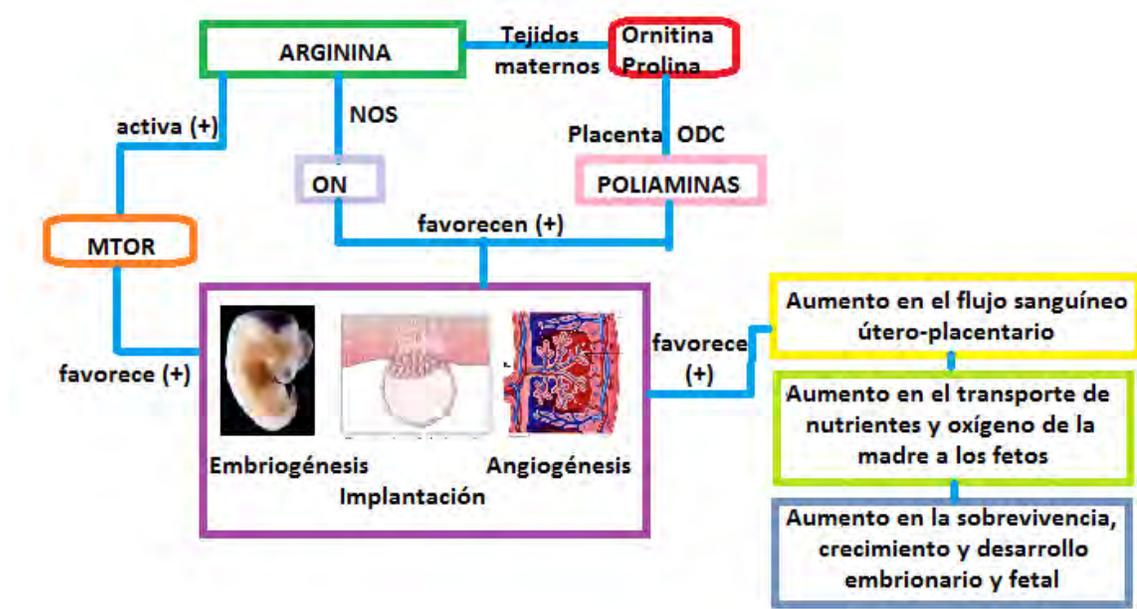
La ornitina descarboxilasa (ODC) es la enzima que sintetiza a las poliaminas en las células de los mamíferos (Kwon et al., 2003b). Esta enzima cataliza la descarboxilación de la ornitina (un producto de la hidrólisis de la arginina por la arginasa) a putrescina, que se convierte posteriormente en espermidina y espermina por la espermidina sintasa y espermina sintasa, respectivamente (Wu et al., 2009; Gao et al., 2009b).

Se ha informado de un incremento en las concentraciones de ornitina y arginina (sustratos para la síntesis de poliaminas) en el líquido alantoideo ovino (un reservorio de nutrientes en el feto) entre los días 30 y 60 de gestación (Kwon et al., 2003a). Tales cambios coinciden con el período de rápido crecimiento de la placenta ovina (Reynolds y Redmer, 1995). Con base a esto, se probó la hipótesis de que las actividades de ODC y arginasa placentaria y la síntesis de poliaminas fueron máximas durante la primera mitad de la gestación (Kwon et al., 2003b). De hecho se ha encontrado, que el endometrio uterino, así como los fetos de muchas especies (incluyendo ratones, ratas, ovejas, yeguas, humanos y cerdos), tienen la capacidad de catabolizar la arginina debido a la expresión de NOS y ODC durante la gestación (Kwon et al., 2003a, 2004; Wu et al., 2006; Gao et al., 2009b). Además, la inhibición de la síntesis de las poliaminas impide la embriogénesis y el crecimiento fetal (Kim et al., 2011b).

## **5. Arginina, óxido nítrico (ON) y poliaminas en la gestación**

El aminoácido arginina juega un papel vital en la reproducción debido a que es precursor para el óxido nítrico, poliaminas, y proteínas (Wu y Morris, 1998; Wu et al., 2009). Se han realizado diversos estudios, en donde se han evaluado los posibles efectos de la arginina y sus subproductos en eventos cruciales para el establecimiento y mantenimiento de la gestación en los mamíferos, incluyendo el desarrollo embrionario temprano, la

implantación, el crecimiento y la vascularización de la placenta y posiblemente en la quiescencia uterina y maduración cervical (Fig. 6) (Gregg, 2003; Kwon et al., 2003b, 2004; Wu et al., 2006; Zhao et al., 2008; Lassala et al., 2008).



**Fig. 6. Papeles de la arginina en el desarrollo y crecimiento embrionario y fetal en los mamíferos.** La administración de arginina mejora la síntesis de ON y poliaminas durante la gestación, lo que mejora la transferencia de nutrientes de la madre al conceptus, apoyando su supervivencia, crecimiento y desarrollo (Modificado a partir de Wu et al., 2013).

### 5.1. Efectos de la arginina en el desarrollo embrionario temprano e implantación

En esta etapa de desarrollo embrionario, se ha observado que la arginina es el mayor estimulante de la proliferación, la migración y la síntesis de proteínas en las células del trofoctodemo ovino (Kim et al., 2011a, b; Bazer et al., 2012b). De esta forma Kim et al. (2011a) investigaron las vías por las que la arginina actúa en las células del trofoctodermo, y las principales conclusiones fueron que la arginina: (1) aumenta la fosforilación de RPS6K de una manera dependiente de la dosis con el máximo efectos a 0,2 mM; (2) aumenta las formas fosforiladas de AKT1, RPS6K y RPS6 sobre los niveles

basales a los 15 minutos y el efecto es mantenido hasta los 60 min; (3) aumenta la fosforilación de RPS6K nuclear y de RPS6 citoplasmática en 30 minutos; y (4) estimula la proliferación y migración de las células del trofoectodermo (Kim et al., 2011a). Además se ha reportado que la arginina participa en la motilidad e implantación del blastocisto (Martin y Sutherland, 2001; Martin et al., 2003), ya que al igual que la glucosa, la leucina y la glutamina, la arginina puede estimular la vía de señalización mTOR, que desempeña un papel crucial en la síntesis de proteínas, la proliferación celular, y la modulación de la estructura del citoesqueleto intracelular (Bazer et al. 2010; Kong et al., 2012; Lei et al., 2011). Con estos efectos de la arginina, en ratas se ha observado que la suplementación con arginina durante la gestación temprana resulta en un aumento en la supervivencia embrionaria y en el tamaño de la camada (Zeng et al., 2008). Así, también la administración intravenosa de arginina mejoró la supervivencia embrionaria en ovejas gestantes (Luther et al. 2008).

Los subproductos de la arginina, como lo es el ON también ha sido considerado esencial para el desarrollo embrionario y la implantación. En estudios realizados en embriones murinos se demostró que el desarrollo normal in vitro requiere la producción de ON por el propio embrión, y que una inhibición de la síntesis de ON, logrado mediante la adición de inhibidores de la NOS a los medios de cultivo, detiene el desarrollo del embrión (Chen et al., 2001). Además, la presencia de mRNA de las tres isoformas de NOS en los embriones preimplantacionales de roedores proporciona evidencia de la importancia de la producción de ON en el embrión (Tranguich et al., 2003). Aunque los mecanismos moleculares de ON en la regulación del desarrollo y supervivencia embrionario siguen sin estar claros, la vía GMPc está implicada en la transducción de señales del desarrollo embrionario reguladas por ON (Chen et al., 2001).

Como ya se mencionó el óxido nítrico también participa en la modulación de los cambios vasculares que acompañan a la implantación del trofoblasto, que parece estar regulada por una interacción de ON con el estrógeno y la progesterona (Sengoku et al., 2001) y mediada por GMPc. De manera adicional la acción de ON en la implantación podría implicar la inducción de proteasas que degradan la matriz, lo que resulta en la remodelación de la matriz extracelular necesaria para la invasión del trofoblasto (Novaro et al., 2001).

Por su parte, las poliaminas son importantes para la etapa embrionaria temprana. Los estudios en ratones muestran que la expresión de la ornitina descarboxilasa en el estroma uterino es dependiente de la presencia de un blastocisto activo en los sitios de implantación (Zhao et al. 2008), y la homeostasis de poliaminas uterinas es importante para la proliferación de las células del endometrio (Zhao et al., 2008). Las poliaminas son esenciales para la implantación del embrión y críticas para su supervivencia y desarrollo (Ishida et al., 2002; Zhao et al., 2008).

Aparte de estos efectos, la arginina y sus subproductos tienen un papel fundamental en la motilidad del blastocisto. Martin et al. (2003) informaron que la leucina, la arginina, el ON y las poliaminas participaban activamente en este proceso (Fig. 7), de forma que la leucina transportada dentro de las células del trofoectodermo por el sistema B<sup>0</sup>+, activa la vía de señalización mTOR, además de actuar como un transportador para la captación de arginina. La fosforilación de 4EBP por la vía mTOR, eleva la traducción de proteínas y aumenta la cantidad de ornitina descarboxilasa (ODC) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGFII). El aumento de arginina al interior, proporciona el sustrato para la arginasa (para formar ornitina) y la óxido nítrico sintasa (NOS) (para formar el óxido nítrico, ON). El IGFII puede actuar a través de su receptor para aumentar la actividad de la NOS, mientras que mayores niveles de ODC conducen a un aumento de la síntesis de poliaminas.

Por su parte, el ON puede actuar de una forma paracrina y autocrina, y a través de la señalización para la activación de la adenilato ciclasa soluble para producir GMPc, por lo que el ON producido por el trofoectodermo podría ser importante para iniciar su motilidad así como para promover la dilatación capilar materna durante la implantación. En relación con las poliaminas, se ha visto que pueden activar la motilidad a través de Rac 1 (Martin et al., 2003). En estudios se ha encontrado una relación entre la actividad de la ODC, la transformación celular y la motilidad celular, así como la sobreexpresión de ODC conduce a una mayor motilidad e invasividad del blastocisto, mientras que la disminución de las poliaminas resulta en la inhibición de la migración y cambios en la organización del citoesqueleto (Ray et al., 2002).



desarrollo y función de la placenta durante toda la gestación (Kwon et al., 2004). Cabe señalar que ambos tejidos de la placenta (materna y fetal) ovina producen ON y poliaminas en patrones que coinciden con los períodos de mayor crecimiento placentario y fetal (Zheng et al., 2000; Kwon et al., 2003b, 2004). En general, las poliaminas son esenciales para el desarrollo de la placenta (Kim et al., 2011a), ya que regulan el crecimiento y la proliferación celular en la placenta (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Thomas y Thomas, 2001).

Por su parte, el ON regula el flujo de sangre a través de los tejidos (incluyendo el útero y la placenta) (Joyce et al., 2005; Reynolds et al. 2006). El ON también estimula la angiogénesis de la placenta y, por lo tanto, el crecimiento vascular placentario (Reynolds y Redmer, 2001; Bird et al., 2003; Maul et al., 2003; Kwon et al., 2004; Zeng et al., 2008). Además, el ON inhibe la liberación de la endotelina 1 (un vasoconstrictor) por las células endoteliales y previene la adhesión de leucocitos al endotelio y la agregación plaquetaria (Wu et al. 2009). Al administrar arginina exógena se aumenta la síntesis endógena de ON (Wu y Meininger, 2002), por lo que la administración de arginina ha demostrado que mejora la circulación útero-placentaria y el peso del bebé al nacer en mujeres que presentan fetos con retraso del crecimiento intrauterino (Di Renzo et al., 2005; Xiao y Li, 2005).

La mediación de la angiogénesis por ON se puede producir mediante la activación de la transducción y el crecimiento celular y la diferenciación a través de la activación de la NOS, la elevación de GMPc, la activación de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y favoreciendo la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) (Zheng et al., 2006). Además, ON puede regular la expresión de otros factores angiogénicos como el VEGF (Reynolds y Redmer, 2001)

## **6. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)**

El VEGF es una glicoproteína homodimérica de 45 Kda, de carácter básico (Espinosa y Rosado, 2002). El VEGF es un potente agente mitógeno y factor de sobrevivencia de las células endoteliales para estimular la vasculogénesis y la angiogénesis (Ferrara, 2004;

Martínez y Herrera, 2006) ya que favorece la proliferación, migración y crecimiento de las células endoteliales (Geva y Jaffe, 2002; Wang et al., 2002).

El VEGF se le ha considerado como el principal factor involucrado en la angiogénesis (Espinosa y Rosado, 2002). Este factor de crecimiento tiene un papel muy importante en el proceso de implantación ya que modula el crecimiento y remodelación vascular, provocando el incremento de la permeabilidad vascular en el endometrio. La implantación y la subsecuente placentación del embrión no son posibles si previamente el VEGF no torna receptivo al endometrio para el desarrollo del embrión. Se ha observado que los ratones knock-out para el gen VEGF pueden concebir pero no producen descendencia viable (Hoozemans et al., 2004). La falta del gen de VEGF en estos ratones provoca la muerte al inicio del desarrollo, lo cual indica el importante papel que tiene este factor de crecimiento en la ruta de señalización para el desarrollo vascular (Ferguson et al., 2005).

La familia VEGF tiene varios integrantes: VEGF-A (dominante en el endometrio), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el Factor de crecimiento placentario (PlGF) (Redmer et al., 2005; Martínez y Herrera, 2006) y cinco principales subtipos de receptores: VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (Kdr, Flk-1), VEGF-R3, así como la forma soluble de Flt-1 (sFlt-1) y Flk-1 (sFlk-1). Tanto VEGF como sus receptores de membrana se expresan en el endometrio y en las placentas de oveja y cerda (Charnock et al., 2004). De esta familia de transcritos, el más estudiado es el VEGF-A, que es referido simplemente como VEGF. El VEGF-B y PLGF se unen a VEGFR1 y modulan la actividad de VEGF-A en las células endoteliales durante el desarrollo embrionario (VEGF-B) y durante la angiogénesis patológica (PLGF) (Sallinen et al., 2009). Aunque VEGF-C y VEGF-D se unen a VEGFR2 en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, su principal función es unirse a su receptor (VEGFR3) en el tejido linfático para promover el desarrollo de los vasos linfáticos durante el desarrollo embrionario (Redmer et al., 2005). Finalmente VEGF-E es un homólogo de VEGF producido por el virus Orf que afecta a cabras y ovejas (Jussila y Alitalo, 2002).

El gen de VEGF se compone de 8 exones separados por 7 intrones a partir del cual se han identificado 12 isoformas en mamíferos, como resultado del procesamiento de corte y empalme (Doyle, 2009) del transcrito primario o pre-RNA del gen de VEGF. Las proteínas que resultan de las isoformas de VEGF contienen 121, 145, 148, 165, 184 y 206 aminoácidos (Nowak et al., 2008). Este número de aminoácidos es el que le da el nombre

particular a cada isoforma de VEGF. Todas las isoformas de VEGF-A poseen los exones 1 a 5 y 8, mientras que la presencia o ausencia de los exones 6a, 6b y 7, determina cada una de las variantes así como las características de cada isoforma (Zygalaki et al., 2005).

Recientemente, se ha demostrado que el exón 8 tiene dos sub-exones, 8a y 8b, este exón conformado por dos sitios, el sitio de corte proximal que dará origen a las isoformas angiogénicas (VEGF<sub>xxx</sub>a), y el sitio de corte distal, dará origen a las isoformas anti-angiogénicas (VEGF<sub>xxx</sub>b) siendo xxx el número de aminoácidos de la proteína de cada isoforma (Nowak et al., 2008).

El VEGF parece tener tres formas de participación en el desarrollo vascular normal, primero es capaz de iniciar la angiogénesis promoviendo la proliferación y quimioatracción de las células endoteliales (Reynolds y Redmer, 1998). Segundo, mantiene la viabilidad de vasos sanguíneos inmaduros y tercero facilita el recubrimiento del vaso con pericitos (Gerber et al., 1998). Con relación a la viabilidad de vasos sanguíneos inmaduros, VEGF participa en la supervivencia de las células endoteliales induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y A1 (Gerber et al., 1998).

### **6.1. Receptores del VEGF**

La actividad biológica de VEGF está mediada principalmente por dos receptores tipo tirosina cinasa denominados VEGFR-1 o Flt-1 y VEGFR2 o Flk-1 (Ferrara y Davis, 1997), sin embargo se han reportado otros receptores tales como el VEGFR-3 o Flt-4, la neuropilina 1 y 2 (NRP-1 y NRP-2 respectivamente) a los cuales también se une el VEGF (Jia et al., 2004). La interacción del VEGF, con sus receptores de membrana (VEGFR1 y VEGFR2) se reconoce como el principal estimulador de la angiogénesis (proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales) (Ferrero, 2001; Redmer et al., 2005).

El VEGF se une a sus receptores con alta afinidad, aunque existen diferencias entre ambos receptores. La glicoproteína de VEGFR1 tiene un peso de 180-KDa y en las células endoteliales, es mediador de la proliferación, quimiotaxis y supervivencia celular (Greenaway et al., 2004), se une al VEGF con una constante de disociación (Kd) de 10-20 pM, por lo que se considera que el factor tiene una alta afinidad para este receptor en

comparación con el VEGFR2 que tiene una  $K_d$  de 75-125 pM (Waltenberger et al., 1994). Sin embargo, la capacidad de autofosforilación del VEGFR-2 es al menos 10 veces mayor que la de VEGFR-1, lo cual indica que VEGFR-2 tiene una mayor capacidad en la transducción de las señales de VEGF (Zeng et al., 2001; Ferrara, 2004). De esta manera, se considera que VEGFR2 es el mayor mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de permeabilidad de VEGF (Ferrara, 2004). Lo anterior sugiere que la función del VEGFR-1 es la de atraer a VEGF, reduciendo de ese modo el número de moléculas de VEGF disponibles para unirse a VEGFR2 (Zeng et al., 2001). Estas evidencias sugieren que ambos receptores desencadenan efectos diferentes en respuesta al ligando. Así, el VEGFR1 puede regular la angiogénesis haciendo poco disponible el ligando a VEGFR2 (Zeng et al., 2001). El VEGFR-3 se expresa sólo en células endoteliales venosas en el embrión, y se limita al sistema linfático en el adulto, tiene funciones en el desarrollo cardiovascular en el embrión, en particular en la linfangiogénesis (Zeng et al., 2001).

Tanto VEGFR1 y VEGFR2 son receptores tipo tirosina cinasa que contienen siete dominios extracelulares de unión similares a inmunoglobulinas, una región transmembranal y un dominio intracelular de señalización tirosina cinasa interrumpido por un inserto de cinasa de 69 aminoácidos (Ferrara, 2004; Redmer et al., 2005). El segundo y tercer dominio extracelular representa la unión al ligando, mientras que las regiones del cuarto al séptimo dominio son esenciales para la dimerización del receptor (Olsson et al., 2000).

El VEGF se une al segundo dominio extracelular de los receptores lo cual ocasiona la dimerización con otro receptor (Olsson et al., 2000), lo que conduce a su activación y la posterior autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio intracelular del receptor, originando una cascada de señales intracelulares que provoca la activación de varias proteínas como las MAPK, PKC, PI3K, PKB las cuales activan la transcripción genética específica en el núcleo e induce múltiples respuestas celulares como son: permeabilidad vascular, sobrevivencia, proliferación y migración celular (Martínez y Herrera, 2006; Ferrara, 2009).

Adicionalmente por corte y empalme de los ARNm inmaduros de VEGFR-1 y VEGFR-2, se producen formas solubles de ambos receptores (sVEGFR-1 o sFlt-1 y sVEGFR-2 o

sFlk-1). Las proteínas de estos receptores carecen de dominios transmembranales e intracelulares con lo cual no pueden traducir señales, sin embargo, mantienen los dominios de unión al ligando, conservando la misma afinidad por VEGF, que los receptores de membrana (Robinson y Stringer, 2001). Esta circunstancia hace que los receptores solubles de VEGF sean competitivos por el ligando, evitando así que tenga interacción con los receptores de membrana, lo que les confiere un efecto anti-angiogénico (Sallinen et al., 2009).

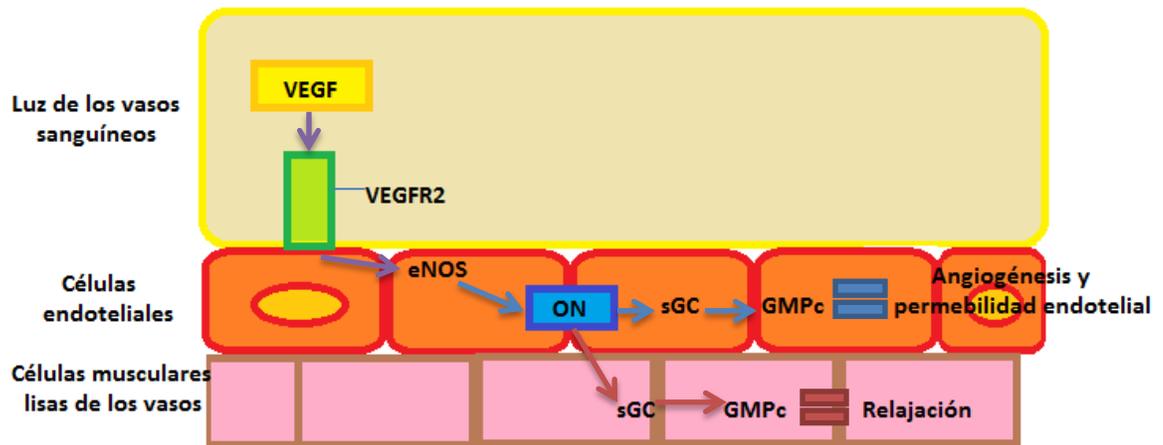
## **6.2. Regulación del VEGF**

La expresión y secreción del VEGF se da a través de diferentes mecanismos y factores, dentro de ellos encontramos que el principal inductor es la hipoxia (Zhang et al., 2011), a través del factor inducible de hipoxia 1 (HIF1), sin embargo existen otros estímulos como el de los estrógenos, progesterona, factores de crecimiento (EGF, TGF- $\alpha$  y  $\beta$ , KGF o factor de crecimiento derivado de queratinocitos, IGF, FGF y PDGF) y distintas citocinas (IL-1  $\alpha$  y IL-6) (Martínez y Herrera, 2006). Además se ha visto que la expresión de los receptores es dependiente del NO y del propio VEGF (Ferrera, 2004).

## **6.3. Relación del VEGF con ON**

Se ha demostrado que el ON puede interactuar con agentes vasoactivos y angiogénicos, entre los cuales se encuentra el VEGF. De hecho, el ON se ha implicado en la angiogénesis mediante la modulación de la expresión del VEGF (Chwaliz y Garfield, 2000; Zhang y Zhu, 2002). Como se sabe, el VEGF es necesario en la formación y crecimiento de los vasos sanguíneos (Demir et al., 2007; Arroyo y Winn, 2008; Yao et al., 2011), para inducir su permeabilidad, así como la proliferación de las células endoteliales vasculares y promover la migración celular (Ferrara, 2004). Además se ha demostrado que estimula la liberación de ON en las células endoteliales (Krause et al., 2011), ya que induce la expresión de iNOS y eNOS, a través de la activación de VEGFR-1 y VEGFR-2, siendo un mecanismo que contribuye a los efectos vasculares del VEGF (Fig. 8). De hecho, se ha demostrado que la angiogénesis inducida por VEGF requiere la síntesis de ON derivado de la actividad de eNOS (Ahmad et al., 2006). Cuando el ON se une con la guanilato ciclasa, desencadena una cascada de señalización por medio de la cual favorece la síntesis de un factor de transcripción llamado Factor Inducible de Hipoxia (HIF), principal

regulador de VEGF (Zhang et al., 2011). Así el VEGF regula el flujo sanguíneo del útero y la placenta mediante la estimulación de la producción de ON por las células endoteliales y ON, a su vez, puede estimular la expresión de VEGF (Zhang y Zhu, 2002), por lo que el ON y el VEGF son parte de un mecanismo de retroalimentación positiva durante la angiogénesis endometrial y el flujo sanguíneo (Mata et al., 2008), asegurando así una adecuada vascularización placentaria y endometrial.



**Fig. 8. Papel del ON y el VEGF en la angiogénesis vascular y relajación muscular.** VEGF se une a su receptor VEGFR2 en las células endoteliales donde activa a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) para producir la señalización de ON. ON provoca un aumento de GMP cíclico (a través de la vía de la guanilato ciclasa), estimulando así el crecimiento celular endotelial y por lo tanto a la angiogénesis. Además el ON se difunde en las paredes del vaso, y en las células musculares lisas de los vasos aumenta el GMP cíclico resultando en una relajación vascular y aumento del flujo sanguíneo (Modificado a partir de Mehta, 2011).

### **III. HIPOTÉISIS**

La administración de arginina a ovejas durante el primer mes de gestación favorecerá la supervivencia, calidad y desarrollo embrionario. Adicionalmente, estimulará la angiogénesis endometrial, lo cual tendrá efectos favorables sobre el crecimiento fetal en los dos primeros tercios de la gestación.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Determinar los efectos de la administración de arginina al inicio de la gestación, sobre el desarrollo embrionario, la angiogénesis endometrial y el crecimiento fetal en el primer y segundo tercio de la gestación.

#### **Objetivos Específicos**

- Evaluar el efecto de la Arginina sobre la supervivencia y la calidad embrionaria durante la etapa de desarrollo pre-implantacional.
- Evaluar el efecto de la Arginina sobre el número de embriones y/o fetos y el crecimiento fetal durante el primer y segundo tercio de la gestación.
- Evaluar el efecto de la Arginina sobre el desarrollo de la vasculatura endometrial y la expresión de VEGF y su receptor R2, a los 15, 35 y 90 días de gestación.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Condiciones generales**

El estudio se realizó en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicado en el estado de Querétaro, México (20° 43'Norte, 100° 15'Oeste, 1900 msnm). El clima es BSw (semi-seco estepario con lluvias en verano); la temperatura promedio es de 16.7°C, y la precipitación pluvial anual promedio es de 485 mm. El periodo del estudio fue del mes de diciembre del 2012 a febrero del 2013.

### **2. Número de animales y su manejo**

Se emplearon 56 hembras ovinas de las razas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, con un peso promedio de 47 kg y una condición corporal de 2.8 (escala 1 a 5). Los animales fueron alojados en corraletas individuales con acceso a agua *ad libitum* y se les ofreció una dieta a base de ensilaje de maíz (3.3% de Proteína cruda y 55% de Humedad).

Todas las ovejas fueron sometidas a un programa de sincronización del estro por medio de la aplicación de un dispositivo intravaginal (CIDR, Pfizer, México) que contiene 0.3 g de progesterona, durante 8 días y a su retiro se administró 5 mg de PGF2 $\alpha$  (Lutalyse, Pfizer, México). A las 24 h de retirar el dispositivo se inició la detección de celos y se les dio servicio utilizando tres sementales calificados como satisfactorios en la evaluación de la capacidad reproductiva. La detección de celos y montas se realizaron en tres horarios al día: 08:00 h, 12:00 h y 16:00 h. con la rotación de los 3 sementales, por lo que cada oveja recibió por lo menos 2 servicios en horarios consecutivos y con sementales diferentes.

### **3. Manejo de los tratamientos**

Inicialmente, las ovejas fueron distribuidas de manera aleatoria a uno de dos grupos: Arginina (n= 29) y Testigo (n= 27). Después del segundo servicio, a cada oveja se le colocó un catéter en la vena yugular (Montiel, 2010) para aplicar los tratamientos, como se describe abajo; los grupos iniciales se subdividieron en subgrupos, dependiendo de la edad de gestación a la cual fueran a registrarse las observaciones, de la siguiente forma:

grupos de 6 y 9 días ( $n= 6$  en cada grupo), 15 días (arginina  $n= 7$ ; testigo  $n= 5$ ), 35 y 90 días ( $n= 5$  en cada grupo). En esta subdivisión se trató de mantener dentro de cada edad, grupos de ovejas homogéneos en cuanto a peso, condición corporal y edad. Se preparó una solución de HCl-Arginina (Sigma-Aldrich, USA, cat. A6969) en solución salina fisiológica (SSF; PiSA, México) a una concentración de 200 mg por ml. Así, se aplicaron dosis equivalentes a 27 mg de Arginina/ kg de peso corporal (Wu et al., 2007a; Lassala, 2008; Luther et al., 2010) a cada oveja del grupo Arginina. En estudios previos, se ha demostrado que después de la administración i.v. de HCl-Arginina a ovejas gestantes, hay una elevación inicial, cuya concentración circulante regresa a sus niveles basales después de 5 h (Wu et al., 2007a); por tal motivo, estas dosis se aplicaron 3 veces al día (08:00, 16:00 y 24:00 h), durante un máximo de 35 días (incluso a las ovejas del grupo de 90 días), a partir del horario correspondiente después del segundo servicio. A las ovejas del grupo Testigo se les administró 5 ml de SSF, por la misma vía y en los mismos horarios y tiempos que en el grupo Arginina.

#### **4. Obtención y manejo de muestras**

Cabe señalar que la fertilidad general en el experimento fue de 69.6% y solamente se analizaron los datos de las ovejas gestantes. De este modo, la  $n$  de cada grupo quedo de la siguiente manera; Ovejas del grupo 6 (Arg= 5, Tes= 4), del grupo 9 (Arg y Tes= 5), del grupo 15 (Arg= 3, Tes= 5), del grupo 35 (Arg= 2, Tes= 5) y del grupo 90 (Arg= 3, Tes= 2).

##### **4.1. Recolección y clasificación de embriones y fetos**

*Embriones de 6 y 9 d de gestación de los grupos de ovejas 6 y 9, respectivamente.* La recolección de los embriones se llevó a cabo por medio de laparotomía como lo describe Schiewe et al., (1990). El manejo pre-quirúrgico que recibieron las ovejas fue un ayuno de 17 h y sin acceso a agua; momentos antes de la cirugía se tranquilizaron a las ovejas con Xilacina 2% (PiSA, México, dosis: 0.1 mg/kg PV). Se lavó y rasuró el vientre, y se les aplicó una solución antiséptica en la parte ventral medial. Posteriormente se les colocó un anestésico general (Ketamina, PiSA, México, dosis: 2mg/kg PV) para poder sujetarlas en una camilla colocándola en decúbito dorsal con los miembros extendidos y amarrados de cada extremo de la camilla. Se realizó una incisión en línea media; al exteriorizar los

cuernos uterinos para los lavados, se observaban los ovarios para contar el número de cuerpos lúteos en cada ovario. Posteriormente, cada cuerno uterino se lavó por separado; mediante una incisión roma de la pared uterina se insertó una sonda Foley de dos vías calibre 8 FR, en la luz del cuerno uterino a la altura de su unión con el cuerpo uterino, para después inflar el globo de dicha sonda con la finalidad de mantenerla en su lugar. El medio de lavado fue PBS 1X (Anexo 1; pH 7.4, a una concentración de 10 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ , 137 mM NaCl y 2.7 mM KCl), se administraron 100 ml lentamente a través de un catéter tipo Tomcat (Minitube, Alemania) al cuerno uterino y después fue removido hacia el filtro concentrador de embriones por medio de un masaje al cuerno lavado. Durante este procedimiento, el útero fue humedecido con PBS 1X para mantenerlo hidratado.

Una vez terminada la recolección, los embriones fueron cambiados a una caja de Petri (55 x 9 mm) con PBS 1X para ser evaluados usando un microscopio estereoscópico. En la evaluación se les asignó un código numérico referente al estadio de desarrollo y calidad (Noriega et al., 1995). La asignación de la calidad y etapa la hicieron dos personas con experiencia amplia en este tipo de evaluación, utilizando los criterios citados por Robertson y Nelson (1998) en el Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones los cuales se describen a continuación (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Numeración asignada a los embriones de acuerdo a su etapa de desarrollo.	
Número	Etapa
1	Sin fertilizar
2	2 a 12 células
3	Mórula temprana
4	Mórula
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto

7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto pre-eclosionado
9	Blastocisto eclosionado
10	Pre-streak 1
11	Pre-streak 2
12	Streak

Cuadro 2. Numeración asignada a los embriones de acuerdo a su calidad embrionaria.	
Número (calificación)	Características
<b>1 (Excelente o bueno)</b>	Embriones con al menos el 85% de masa embrionaria viable y que corresponden al estado de desarrollo esperado.
<b>2 (Regular)</b>	Moderadas irregularidades en la forma de la masa embrionaria y al menos el 50% debe estar intacta y viable.
<b>3 (Pobre o malo)</b>	Presentan irregularidades mayores en la forma de la masa embrionaria y al menos 25% del material celular debe estar intacto y viable.
<b>4 (Muerto o Degenerado)</b>	Embriones degenerados, ovocitos o embriones de 1 célula no viables.

*Embriones de 15 d de gestación y fetos de 35 y 90 d de gestación, de los grupos de ovejas 15, 35 y 90, respectivamente.* Las ovejas se sacrificaron para recuperar el tracto uterino, el cual fue trasladado al laboratorio inmediatamente después para su procesamiento. Al momento de obtener el tracto uterino se recolectaron los ovarios y se separaron los cuerpos lúteos, los cuales fueron contabilizados y pesados en forma individual. Los embriones de 15 d de edad se recolectaron mediante el lavado de los cuernos uterinos, de la misma manera que se describió para las ovejas de 6 y 9 d de gestación. Los embriones fueron clasificados de acuerdo a su etapa de desarrollo, asignándoles un código numérico (Cuadro 3), de acuerdo a los criterios sugeridos por Vejlsted et al., (2006).

Cuadro 3. Numeración asignada a los embriones de 15 d de gestación al considerar su etapa de desarrollo

Número	Etapa de desarrollo embrionario
1	Embryo Neural Plate (ENP)
2	Embryo Early Neural Groove (EENG)
3	Embryo Neural Groove (ENG)
4	Embryo Late Neural Groove (ELNG)

Los fetos de 35 y 90 días de edad fueron recuperados directamente a través de incisiones en los cuernos uterinos. Posteriormente fueron contabilizados, pesados y medidos (la longitud céfalo-caudal, y el diámetro antero-posterior a nivel del esternón, para lo cual se utilizó un vernier). Adicionalmente, a los fetos de 90 días se les midió el diámetro a nivel del ombligo y se les extrajo el corazón, el hígado, los riñones y los pulmones, los cuales se pesaron por separado.

#### **4.2. *Recolección de muestras y observaciones en útero***

En las ovejas de 15, 35 y 90 d de gestación, se incidió cada cuerno uterino de forma longitudinal. En las gestaciones de 35 d se registró la longitud de 5 carúnculas de la parte media de los dos cuernos uterinos de cada oveja; en las gestaciones de 90 d se diseccionaron todos los placentomas y se pesaron en forma individual. Se obtuvieron muestras de todo el tejido uterino, de la región media de los cuernos uterinos, del lado donde se encontraban los embriones o fetos. Unas muestras fueron congeladas sumergiéndolas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento para la cuantificación del mRNA del VEGF y VEGF-R2; otras muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y almacenadas a 4°C para su análisis mediante técnicas de histología y morfometría.

### **5. Procesamiento de las muestras para su análisis**

#### **5.1. *Histología y morfometría***

##### *5.1.1. Fijación e inclusión en parafina*

Las muestras uterinas se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% (Anexo 2; JT Baker, USA, S898-07) en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS 1X; Anexo 1), a una proporción de una parte de tejido por 3 de PFA en un contenedor que fue refrigerado durante 24 h a 4°C. Después se desechó el fijador y se lavaron las muestras en 2 ocasiones con PBS 1X por 5 min cada una, para ser almacenadas a -20°C en metanol (100%, JT Baker, USA, 9012-03) hasta su procesamiento en el procesador automático de tejidos (Anexo 3; marca Microm, modelo STP 120-1), para ser incluidas en bloques de parafina.

##### *5.1.2. Tinción con hematoxilina y eosina (HyE)*

De cada muestra de tejido incluido en parafina, se hicieron cortes de 10 µm de espesor en un microtomo (marca Microm, modelo hm335e); los cortes se colocaron flotando en baño maría (marca Electrothermal, modelo MH8516) con agua destilada a 40°C y se colocaron 3 cortes consecutivos en cada laminilla; en total, 2 laminillas por oveja. Las secciones de tejido fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (Anexo 4).

### 5.1.3. Análisis morfométrico en útero

De cada muestra de útero, se eligió al azar un corte procesado para ser analizado mediante un microscopio de campo claro (marca Axiostar plus) conectado a una cámara digital a color (marca Color view) y una computadora. Se obtuvieron 4 fotografías por tejido a un aumento de 200x, las cuales fueron evaluadas mediante un programa de análisis de imágenes (Analysis opti basic) (Anexo 5). En este programa se utilizó un cuadrado de área conocida ( $240,270 \mu\text{m}^2$ ) y dentro de este cuadrado se contaron y delimitaron los vasos y glándulas endometriales presentes. Este programa tiene la función de calcular en cada objeto delimitado (ej. un vaso), su área, perímetro, diámetro mayor y menor; con base en los datos obtenidos, se calcularon las siguientes variables de respuesta:

- Densidad vascular y glandular: es el número de vasos o glándulas endometriales por unidad de superficie ( $200,000 \mu\text{m}^2$ ).
- Superficie vascular y glandular: es la suma de los perímetros de todos los vasos o glándulas presentes en el cuadrado de área conocida.
- Área vascular y glandular: Es el porcentaje que representa la suma de todas las áreas ocupadas por los vasos o glándulas, localizados dentro del área conocida y con relación a esta última; da referencia al área (%) ocupada por la vasculatura o glándulas en el endometrio. Esta variable se obtuvo con la siguiente fórmula:  
% Área vascular o glandular= (suma de las áreas de los vasos o glándulas/ área conocida) X 100
- Área promedio por vaso y glándula
- Perímetro promedio por vaso y glándula
- Diámetro mayor promedio por vaso y glándula
- Diámetro menor promedio por vaso y glándula

Para mejor comprensión, los datos de las variables densidad vascular, densidad glandular, superficie vascular y superficie glandular, se ajustaron a un área de  $200,000 \mu\text{m}^2$ .

## **5.2. Cuantificación del mRNA del VEGF y de VEGF-R2**

### *5.2.1. Purificación de RNA*

A las muestras de útero congeladas se les extrajo el RNA total por el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987).

El tejido fue pesado en una báscula analítica (marca Mettler, modelo AE160, Suiza) y colocado en un tubo de fondo plano, en donde se le agregó 1 ml de la solución de fenol y guanidina (Trizol, Invitrogen, 15596-018, USA) por cada 50 a 100 mg de tejido para ser disuelto con un homogeneizador de tejidos (marca Ingeniurbüro cat. M. Zippere, modelo 815028-01, USA), después se recuperó el homogenizado y se colocó en un microtubo estéril de 2.0 ml (Thermo Scientific, 3434, USA) y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente para asegurar la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Al homogenizado se le agregaron 200  $\mu$ l de Cloroformo por cada ml de Trizol utilizado, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se incubó de 2 a 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min, y al centrifugarse, la mezcla se separó en 3 fases: una fase orgánica (contiene proteínas), una intermedia (contiene el DNA), y una fase incolora acuosa en la parte superior (contiene el RNA total). Ésta última se recuperó y se colocó en un tubo nuevo de 2.0 ml, en donde se añadió 500  $\mu$ l de Isopropanol por cada ml de Trizol, se agitó e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min para que el RNA se precipitara y formara un pelet hacia un lado del fondo del tubo. Se removió el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 75% por cada ml de Trizol para que se enjuagara el pelet de RNA, se agitó y se centrifugó nuevamente a 7,500 rpm por 5 min. Posteriormente el sobrenadante se decantó con el cuidado para no tirar el pelet, el cual se dejó secar por 5-10 minutos a temperatura ambiente y se disolvió por medio de pipeteo en 200-300  $\mu$ l de agua molecular (Sigma, w4502, USA), se dejó incubar a una temperatura de 55-60°C por 10 min. El RNA total así obtenido se congeló a -80°C hasta su uso.

Para verificar la calidad y cantidad de RNA total recuperado, se tomaron 2  $\mu$ l y se midió la absorbancia a 260 y 280 nM mediante un espectrofotómetro UV-Vis, (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA). La integridad del RNA total, se verificó haciendo un gel de agarosa al 1.2% (Anexo 6) en Tris Acetato (TAE Ultrapure 1X, Invitrogen, R44262, USA)

como amortiguador de corrida (Tris Acetato 0.04M, 57.1 ml de ácido acético glacial y EDTA 0.5M pH 8.0) usando 2  $\mu$ l de la muestra.

### 5.2.2. *Síntesis de cDNA con RT-PCR*

Los siguientes procedimientos se realizaron en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, ubicada en Coyoacán, D.F. México. Para la síntesis de cDNA se utilizó el estuche comercial SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, 18080-051, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se realizó usando 2  $\mu$ g de RNA total, 1  $\mu$ l de Primers Poli T (50  $\mu$ M), 1  $\mu$ l dNTP y se ajustó el volumen a 10  $\mu$ l con agua molecular. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y se colocó en hielo por 1 min. Posteriormente se preparó la mezcla para la síntesis de cDNA la cual consistió en: 2  $\mu$ l de 10X RT Buffer, 4  $\mu$ l de 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l de 0.1 M DTT, 1  $\mu$ l de RNase Out y 1  $\mu$ l de SuperScript III RT. Esta última mezcla se diluyó con los 10  $\mu$ l que contenían el RNA, posteriormente se colocó en un termociclador con una incubación a 50°C durante 50 min, seguido de la detención de la reacción a 85°C por 5 min y a 4°C por 2 min. Al finalizar el ciclo, el tubo se centrifugó y colocó en hielo, se le agregó 1  $\mu$ l de RNase H para eliminar todo el posible RNA presente y finalmente se incubó 20 minutos a 37°C y posteriormente se almacenó a -70°C hasta su uso.

### 5.2.3. *PCR en tiempo real*

Para cuantificar la expresión del gen VEGF y VEGFR-2 por PCR en tiempo real, se utilizó una curva estándar generada previamente (Zamora, 2013), para lo cual realizaron una amplificación, purificación, cálculo del número de copias y diluciones seriadas con concentraciones conocidas para cada uno de los genes de interés. Utilizando así la curva estándar y los oligos del gen de interés del laboratorio anteriormente mencionado, se procedió a la siguiente reacción para la realización de la PCR en tiempo real: 9  $\mu$ l de cDNA de cada muestra (dilución 1:10), 10  $\mu$ l de la mezcla TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, 4324018, USA), 1  $\mu$ l de mezcla de sonda más oligos del gen de interés (0.9  $\mu$ M; Cuadro 4), obteniendo un volumen final de 20  $\mu$ l. Las mezclas se colocaron en un termociclador de tiempo real, StepOne Plus (Applied Biosystems, USA)

con las siguientes condiciones: un ciclo inicial a 50°C por 2 min y 95°C por 10 min y 40 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por un minuto.

Cuadro 4. Oligonucleótidos especie-específicos utilizados para PCR tiempo real\*.

Gen	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del amplicón
VEGF	Fwd: GGA TGT CTA CCA GCG CAG C Rev: TCT GGG TAC TCC TGG AAG ATG TC Sonda: TCT GCC GTC CCA TTG AGA CCC TG	69 pb
VEGF-R2	Fwd: CTT CCA GTG GGC TGA TGA CC Rev: GCA ACA AAC GGC TTT TCA TGT Sonda: AGA AGA ACA GCA CGT TCG TCC GGG	65 pb

Fwd: Oligonucleótido Sentido

Rev: Oligonucleótido Antisentido.

Las sondas tuvieron como reportero a TAMRA y apagador FAM.

\*Oligos diseñados y utilizados por el trabajo de Zamora, 2013 en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la UAM-X.

## 6. Análisis estadístico

Los datos donde había una sola observación por oveja fueron sometidos a un análisis de varianza, para un diseño completamente al azar, usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS, con una previa transformación a  $\sqrt{y+0.5}$  (datos de conteo) o arco-seno  $\sqrt{p}$  (datos de proporciones). Los datos donde había más de una observación por oveja, por ejemplo las mediciones de los fetos (peso, longitud, diámetro y peso de órganos), peso de los placentomas y longitud de carúnculas, fueron analizados como un diseño anidado de dos niveles, usando el procedimiento MIXED de SAS. El modelo incluyó el factor fijo de tratamiento y el efecto aleatorio de la oveja, anidado dentro del tratamiento, y el valor de cada observación anidado dentro de la oveja.

## VI. RESULTADOS

### Efecto de la arginina durante el desarrollo pre-implantacional embrionario.

A los 6 días de gestación (Cuadro 5) las ovejas tratadas con Arginina tuvieron un mayor número de CL's en comparación con las ovejas del grupo testigo (P=0.009); igualmente, tuvieron mayor número de embriones con calidad excelente y buena (P=0.05) y la tendencia a un mayor número de embriones que correspondían al estadio de desarrollo esperado (P=0.08); respecto al número y calidad de los embriones no se detectaron diferencias entre tratamientos.

Cuadro 5. Promedios  $\pm$  EE y rango del número de cuerpos lúteos (CL's), características de los embriones encontrados y la relación entre el número de embriones y el número de CL's, en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 6 días de gestación.

Variable de respuesta	6 días				
	Arginina (n= 5)	Rango	Testigo (n= 4)	Rango	P
Núm. CL's	2.8 $\pm$ 0.1	2 - 3	2 $\pm$ 0	2	0.009
Núm. Embriones	2.2 $\pm$ 0.4	1 - 3	1.2 $\pm$ 0.1	1 - 2	0.18
Calidad de Embriones	1.3 $\pm$ 0.31	1 - 4	2.0 $\pm$ 0.34	1 - 3	0.18
Embriones calidad excelente-buena	2 $\pm$ 0.3	1 - 3	0.7 $\pm$ 0.2	1	0.05
Embriones que corresponden a la edad esperada	1.4 $\pm$ 0.3	1 - 3	0.5 $\pm$ 0.3	1	0.08
Relación embriones/CL	0.8 $\pm$ 0.5	0.3 - 1	0.6 $\pm$ 0.4	0.5 - 1	0.4

En el Día 9 de gestación (Cuadro 6) se observaron resultados similares en cuanto al número de CL's, aunque la diferencia entre los grupos fue menor (P=0.04); por otro lado, no se detectaron efectos del tratamiento sobre las variables relacionadas con el número y calidad de los embriones.

Cuadro 6. Promedios  $\pm$  EE y rango del número de cuerpos lúteos (CL's), características de los embriones encontrados y la relación entre el número de embriones y el número de CL's, en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 9 días de gestación.

Variable de respuesta	9 días				
	Arginina (n= 5)	Rango	Testigo (n= 5)	Rango	P
Núm. CL's	2.8 $\pm$ 0.2	2 - 4	1.8 $\pm$ 0.1	1 - 2	0.04
Núm. Embriones	2.0 $\pm$ 0.4	1 - 4	1.2 $\pm$ 0.2	1 - 2	0.2
Calidad de Embriones	2.1 $\pm$ 0.6	1 - 4	1.6 $\pm$ 0.6	1 - 4	0.7
Embriones calidad excelente-buena	1.0 $\pm$ 0.4	1 - 2	1.0 $\pm$ 0.3	1 - 2	0.9
Embriones que corresponden a la edad esperada	1.2 $\pm$ 0.4	1 - 2	1.0 $\pm$ 0.3	1 - 2	0.9
Relación embriones/CL	0.7 $\pm$ 0.4	0.3 - 1	0.7 $\pm$ 0.4	0.5 - 1	1

En el cuadro 7 se presenta el número de embriones que se observaron individualmente en cada oveja de los tratamientos Arginina y Testigo. En esta tabla se observa que las ovejas del grupo Arginina tuvieron más embriones en forma individual (generalmente entre 2 y 3 embriones) en comparación con las ovejas del grupo Testigo, que tuvieron principalmente 1 y como máximo 2 embriones. En el día 6, la mediana (3 vs 1) y la moda (3 vs 1) fueron mayores en el grupo arginina, comparado con el testigo. Igualmente, en el día 9, la mediana (2 vs 1) y la moda (1.5 vs 1) fueron mayores en el grupo arginina.

Cuadro 7. Número, mediana y moda de los embriones (Emb) en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo), evaluadas a los 6 y 9 días de gestación.

6 días				9 días			
Arginina		Testigo		Arginina		Testigo	
# Oveja	# Emb	# Oveja	# Emb	# Oveja	# Emb	# Oveja	# Emb
1	3	1	1	1	1	1	2
2	3	2	1	2	2	2	1
3	1	3	2	3	2	3	1
4	3	4	1	4	4	4	1
5	1			5	1	5	1
Mediana	3	Mediana	1	Mediana	2	Mediana	1
Moda	3	Moda	1	Moda	2	Moda	1

### Efecto de la arginina en los embriones de 15 días y en los fetos de 35 y 90 días de gestación.

A los 15 días de gestación (Cuadro 8) no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, en ninguna de las variables evaluadas de los CL's ( $P \geq 0.9$ ) y de los embriones ( $P \geq 0.2$ ).

Cuadro 8. Promedios  $\pm$  EE y rango del número y características de los cuerpos lúteos (CL's), el número de embriones y la relación entre el número de embriones (EMB) y el número de CL's, en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbely, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 15 días de gestación.

	15 días				
	Arginina (n= 3)	Rango	Testigo (n= 5)	Rango	p
# CL's	2.3 $\pm$ 0.2	2 - 3	2.4 $\pm$ 0.3	1 - 4	0.9
Peso promedio de CL's (mg)	411 $\pm$ 69	300 - 500	457 $\pm$ 53	300 - 600	0.6
Peso total de CL's (mg)	926 $\pm$ 174	800 - 1,600	1,006 $\pm$ 175	900 - 1,100	0.7
# Embriones	1.7 $\pm$ 0.3	1 - 2	1.6 $\pm$ 0.2	1 - 2	0.2
Relación EMB/ CL's	0.9 $\pm$ 0.3	0.7 - 1	0.7 $\pm$ 0.4	0.5 - 1	0.4

A los 35 días de gestación (Cuadro 9) los fetos de las ovejas tratadas con Arginina tendieron a ser más pesados en comparación con los fetos de las ovejas testigo ( $P=0.07$ ); igualmente, fueron más largos ( $P=0.01$ ) y tuvieron mayor diámetro a nivel del esternón ( $P=0.02$ ). En las demás variables evaluadas a esta edad de gestación, como el número de cuerpos lúteos y fetos, peso total de la camada y longitud de las carúnculas no se detectaron diferencias significativas entre las ovejas tratadas con Arginina y el grupo Testigo ( $P \geq 0.20$ ).

Cuadro 9. Promedios  $\pm$  EE y rango de las características de los cuerpos lúteos (CL's) y ovarios, el número y características de los fetos, la relación entre el número de fetos y el número de CL's y longitud de carúnculas, en ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 35 días de gestación.

	35 días				
	Arginina (n= 2)	Rango	Testigo (n= 5)	Rango	P
# CL's	2.5 $\pm$ 0.6	2 - 3	2.6 $\pm$ 0.4	2 - 4	0.9
Peso promedio de CL's (mg)	492 $\pm$ 123	300 - 600	396 $\pm$ 78	200 - 600	0.5
Peso total de los CL's (mg)	1,150 $\pm$ 200	1,000 - 1,300	966 $\pm$ 126	700 - 1,300	0.5
# Fetos	1.5 $\pm$ 0.4	1 - 2	1.2 $\pm$ 0.2	1 - 2	0.5
Relación Fetos/ CL's	0.7 $\pm$ 0.2	0.3 - 1	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 - 0.5	0.2
Peso de la camada (gr)	2.5 $\pm$ 0.5	1.9 - 3	1.7 $\pm$ 0.3	1.2 - 3	0.2
Peso de los Fetos (gr)	1.7 $\pm$ 0.1	1.4 - 1.9	1.4 $\pm$ 0.08	1.2 - 1.5	0.07
Longitud céfalo-caudal de los Fetos(cm)	2.7 $\pm$ 0.04	2.6 - 2.7	2.5 $\pm$ 0.03	2.4 - 2.6	0.01
Diámetro a nivel del esternón de los Fetos (cm)	1.5 $\pm$ 0.05	1.4 - 1.5	1.2 $\pm$ 0.03	1.1 - 1.3	0.02
Peso de ambos ovarios (gr)	3.5 $\pm$ 0.6	2.5 - 4.5	3.0 $\pm$ 0.4	2.5 - 3.9	0.5
Longitud de las carúnculas (mm)	7.7 $\pm$ 0.6	5 - 10	6.7 $\pm$ 0.4	2 - 10	0.2

A los 90 días de gestación (Cuadro 10) únicamente se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos a favor del grupo Arginina, en la relación del peso de los riñones fetales/ peso fetal (P= 0.005), mientras que en las demás variables no se encontraron diferencias. En el grupo testigo se observaron tendencias en el diámetro fetal (P=0.06) y el peso de los riñones fetales (P=0.08).

Cuadro 10. Promedios  $\pm$  EE y rango de las características de los fetos, el peso de los placentomas y el peso de los órganos fetales y su relación con el peso fetal de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 90 días de gestación.

	90 días				
	Arginina (n= 3)	Rango	Testigo (n= 2)	Rango	P
No. de fetos/oveja	1.6 $\pm$ 0.6	1 - 2	1 $\pm$ 0	1	0.2
Peso de los Fetos (gr)	461 $\pm$ 22	401 - 497	522 $\pm$ 31	487 - 558	0.2
Peso de la camada (gr)	771 $\pm$ 136	449 - 992	522 $\pm$ 166	487 - 558	0.4
Longitud de los Fetos(cm)	23.9 $\pm$ 0.5	22.7 - 24.6	24.7 $\pm$ 0.6	24 - 25.5	0.3
Diámetro a nivel del esternón de los Fetos (cm)	6.8 $\pm$ 0.02	6.8 - 6.9	6.9 $\pm$ 0.04	6.9 - 7	0.06
Diámetro a nivel del ombligo (cm)	7.5 $\pm$ 0.1	6.9 - 7.9	7.6 $\pm$ 0.2	7.5 - 7.6	0.8
Peso promedio de los placentomas (gr)	10.3 $\pm$ 1.1	0.8 - 41.2	8.2 $\pm$ 1.4	1.2 - 26.6	0.3
Peso total de los placentomas (gr)	777 $\pm$ 131	509 - 1,053	526 $\pm$ 160	467 - 585	0.3
Relación peso de la camada/ peso total de los placentomas (gr)	1 $\pm$ 0.3	0.8 - 1.3	1 $\pm$ 0.3	0.8 - 1.2	0.9
Relación peso fetal/ peso total de los placentomas	0.6 $\pm$ 0.2	0.4 - 0.9	1 $\pm$ 0.3	0.8 - 1.2	0.2
Peso del corazón fetales (gr)	3.9 $\pm$ 0.3	3.2 - 4.9	4.1 $\pm$ 0.4	3.8 - 4.2	0.9
Relación peso del corazón fetal/ peso fetal (%)	0.8 $\pm$ 0.1	0.7 - 0.9	0.8 $\pm$ 0.1	0.7 - 0.9	0.6
Peso de pulmones fetales (gr)	22.6 $\pm$ 2.3	20.6 - 24	21.2 $\pm$ 2.8	16.7 - 25.7	0.7
Relación peso de los pulmones fetales/ peso fetal (%)	4.9 $\pm$ 0.4	4.6 - 5.4	4 $\pm$ 0.8	3.4 - 4.6	0.2
Peso de riñones fetales (gr)	6.3 $\pm$ 0.2	6.1 - 6.7	7.2 $\pm$ 0.3	3.4 - 3.7	0.08
Relación peso de los riñones fetales/ peso fetal (%)	1.4 $\pm$ 0.1	1.2 - 1.5	0.7 $\pm$ 0.02	0.6 - 0.7	0.005
Peso del hígado fetal (gr)	34.1 $\pm$ 1.9	31.8 - 34.8	33.2 $\pm$ 2.5	29.1 - 37.4	0.8
Relación peso del hígado fetal/ peso fetal (%)	7.4 $\pm$ 0.7	6.6 - 8	6.3 $\pm$ 0.5	6 - 6.7	0.2

En las variables que conciernen a los cuerpos lúteos, número de embriones y placentomas (Cuadro 11) no se encontraron diferencias significativas.

Cuadro 11. Promedios  $\pm$  EE y rango de las características de los cuerpos lúteos (CL's) y ovarios, número de fetos y placentomas, y la relación entre el número de fetos y el número de CL's, de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluadas a los 90 días de gestación.

	90 días				
	Arginina (n= 3)	Rango	Testigo (n= 2)	Rango	P
# CL's	2.3 $\pm$ 0.4	2 - 3	1.5 $\pm$ 0.4	1 - 2	0.2
Peso promedio de CL's (mg)	401 $\pm$ 103	200 - 600	625 $\pm$ 126	500 - 800	0.3
Peso total de CL's (mg)	876 $\pm$ 109	700 - 1,100	865 $\pm$ 133	800 - 1,000	1
Peso de ambos ovarios (gr)	2.6 $\pm$ 0.3	2.4 - 3.1	2.3 $\pm$ 0.3	1.9 - 2.4	0.5
# Fetos	1.7 $\pm$ 0.3	1 - 2	1.0 $\pm$ 0.3	1	0.2
Relación Fetos/ CL's	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 - 1	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 - 1	0.9
# de Placentomas	72.7 $\pm$ 8.4	53 - 91	71 $\pm$ 10.3	53 - 77	1

### **Efecto de la arginina en el desarrollo vascular del endometrio a los 15, 35 y 90 días de gestación.**

A los 15 días de gestación (Cuadro 12), el tratamiento con arginina favoreció la densidad vascular (número de vasos) ( $P=0.03$ ) comparado con el testigo; sin embargo, los vasos tendieron a ser de menor tamaño, pues en promedio, el perímetro ( $P=0.06$ ), el área ( $P=0.08$ ), el diámetro mayor ( $P=0.01$ ) y el diámetro menor ( $P=0.01$ ) fueron mayores en el grupo testigo que en el grupo arginina.

Cuadro 12. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en la vasculatura endometrial de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 15 días de gestación.

	Arginina (n= 3)	Rango	Testigo (n= 5)	Rango	P
Densidad vascular/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	13 $\pm$ 6	7 - 17	7 $\pm$ 1	5 - 9	0.03
Superficie Vascular ( $\mu\text{m}$ )/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	1,705 $\pm$ 721	1,175 - 2,906	1,245 $\pm$ 297	1,109 - 2,061	0.2
Área Vascular (%)	8 $\pm$ 4	4 - 11	9 $\pm$ 5	4 - 16	0.8
Área Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}^2$ )	1,664 $\pm$ 339	1,340 - 2,017	3,487 $\pm$ 1,440	2,188 - 5,479	0.08
Perímetro Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}$ )	152 $\pm$ 42	120 - 199	206 $\pm$ 27	176 - 245	0.06
Diámetro Mayor Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}$ )	53 $\pm$ 10	49 - 63	76 $\pm$ 10	65 - 90	0.01
Diámetro Menor Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}$ )	32 $\pm$ 4	27 - 35	47 $\pm$ 7	39 - 56	0.01

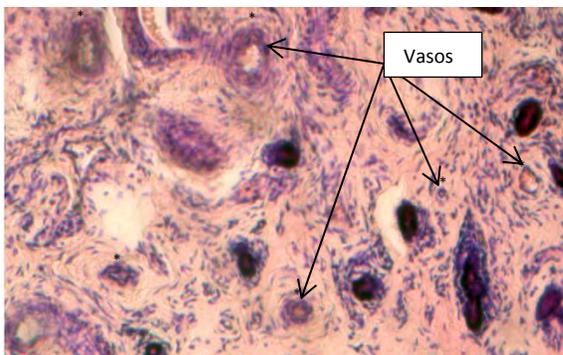


Fig. 9. Endometrio de oveja del grupo Arginina a los 15 días de gestación. 200x

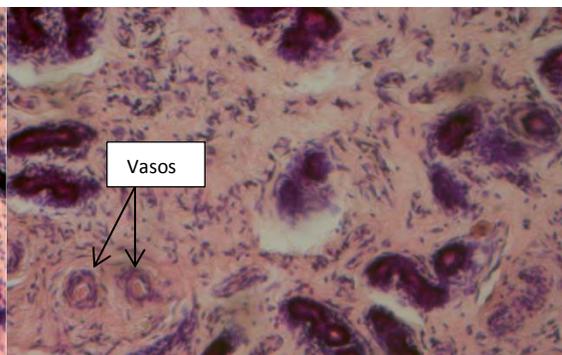


Fig. 10. Endometrio de oveja del grupo Testigo a los 15 días de gestación. 200x

A los 35 días (Cuadro 13), en el grupo arginina tendió a existir menor número de vasos por unidad de superficie ( $P=0.1$ ), sin embargo el porcentaje del área vascular tendió a ser mayor ( $P=0.1$ ) debido a que en el grupo arginina los vasos fueron más grandes en el área promedio ( $P=0.02$ ), el perímetro ( $P=0.009$ ), el diámetro mayor ( $P=0.02$ ) y el diámetro menor ( $P=0.001$ ).

Cuadro 13. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en la vasculatura endometrial de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 35 días de gestación.

	Arginina (n=2)	Rango	Testigo (n= 5)	Rango	P
Densidad Vascular/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	8 $\pm$ 0	6 - 10	11 $\pm$ 3	7 - 16	0.1
Superficie Vascular ( $\mu\text{m}$ )/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	1,649 $\pm$ 80	1,477 - 1,706	1,707 $\pm$ 315	1,388 - 1,980	0.8
Área Vascular (%)	14 $\pm$ 5	10 - 17	10 $\pm$ 2	6 - 13	0.1
Área Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}^2$ )	4,603 $\pm$ 417	2,809 - 5,605	2,293 $\pm$ 617	1,325 - 4,224	0.02
Perímetro Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}$ )	278 $\pm$ 7	247 - 282	195 $\pm$ 27	154 - 263	0.009
Diámetro Mayor Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}$ )	90 $\pm$ 4	80 - 93.5	65.8 $\pm$ 10	48 - 85	0.02
Diámetro Menor Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}$ )	52 $\pm$ 2	43 - 54.7	36 $\pm$ 3	29 - 42	0.001

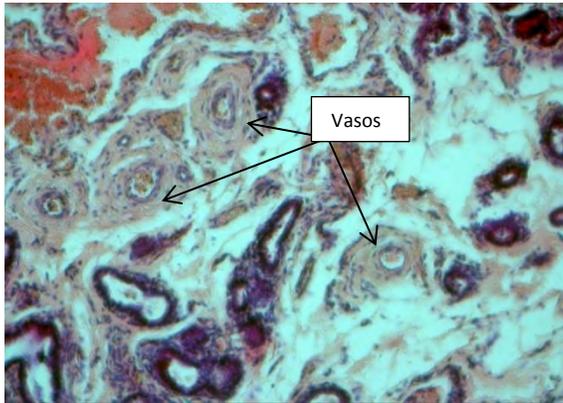


Fig. 11. Endometrio de oveja del grupo Arginina a los 35 días de gestación. 200x

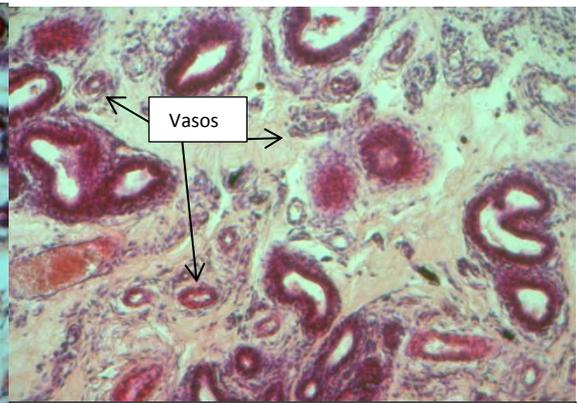


Fig. 12. Endometrio de oveja del grupo Testigo a los 35 días de gestación. 200x

A los 90 días de gestación (Cuadro 14) no se detectaron diferencias entre tratamientos ( $P > 0.9$ ) para ninguna de las variables de la vasculatura endometrial evaluadas.



Fig. 13. Endometrio de oveja del grupo Arginina a los 90 días de gestación. 200x

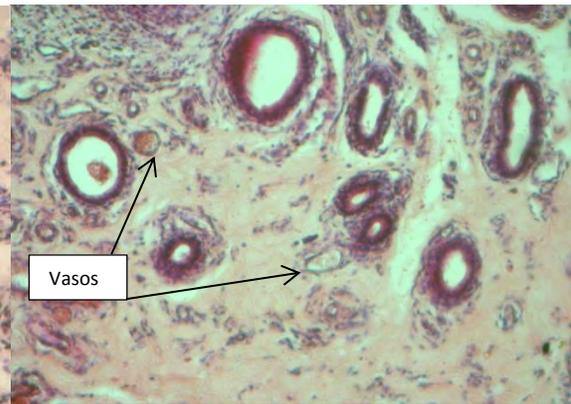


Fig. 14. Endometrio de oveja del grupo Arginina a los 90 días de gestación. 200x

Cuadro 14. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en la vasculatura endometrial de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 90 días de gestación.

	Arginina (n= 3)	Rango	Testigo (n= 2)	Rango	P
Densidad vascular/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	12 $\pm$ 6	7 - 19	11 $\pm$ 4	8 - 14	0.9
Superficie Vascular ( $\mu\text{m}$ )/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	1,887 $\pm$ 474	1,347 - 2,233	1,611 $\pm$ 124	1,523 - 1,798	0.5
Área Vascular (%)	16 $\pm$ 10	9 - 27	12 $\pm$ 2	11 - 14	0.7
Área Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}^2$ )	4,652 $\pm$ 637	1,154 - 9,921	3,001 $\pm$ 557	1,899 - 4,101	0.7
Perímetro Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}$ )	221 $\pm$ 130	130 - 370	171 $\pm$ 24	154 - 189	0.6
Diámetro Mayor Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}$ )	83 $\pm$ 48	50 - 138	67 $\pm$ 5	63 - 70	0.7
Diámetro Menor Promedio por Vaso ( $\mu\text{m}$ )	47 $\pm$ 28	28 - 80	37 $\pm$ 5	34 - 40	0.7

**Efecto de la arginina en el desarrollo glandular del endometrio a los 15, 35 y 90 días de gestación.**

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las variables del desarrollo glandular evaluadas a los 15 días ( $P \geq 0.4$ ; Cuadro 15), 35 días ( $P \geq 0.02$ ; Cuadro 16) y 90 días ( $P \geq 0.02$ ; Cuadro 17) de gestación. Únicamente a los 35 días de gestación en el grupo arginina se detectó la tendencia a ser mayor el diámetro glandular promedio ( $P=0.1$ ).

Cuadro 15. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en las glándulas endometriales de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 15 días de gestación.

	Arginina (n= 3)	Rango	Testigo (n= 5)	Rango	P
Densidad Glandular/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	15 $\pm$ 1	14 - 16	18 $\pm$ 6	9 - 25	0.5
Superficie Glandular ( $\mu\text{m}$ )/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	2,260 $\pm$ 357	1,850 - 2,495	2,759 $\pm$ 943	1,739 - 4,065	0.4
Área Glandular (%)	8.6 $\pm$ 2	6 - 10	11 $\pm$ 5	7 - 18	0.5
Área Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}^2$ )	1,634 $\pm$ 569	1,028 - 2,156	1,715 $\pm$ 731	962 - 2,526	0.9
Perímetro Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}$ )	156 $\pm$ 30	124 - 182	170 $\pm$ 41	122 - 228	0.6
Diámetro Mayor Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}$ )	58 $\pm$ 11	46 - 68	63 $\pm$ 16	46 - 87	0.7
Diámetro Menor Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}$ )	34 $\pm$ 5	28 - 39	35 $\pm$ 5	27 - 42	0.8

Cuadro 16. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en las glándulas endometriales de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 35 días de gestación.

	Arginina (n= 2)	Rango	Testigo (n= 5)	Rango	P
Densidad Glandular/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	7 $\pm$ 3	6 - 11	10 $\pm$ 3	5 - 13	0.3
Superficie Glandular ( $\mu\text{m}$ )/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	2,017 $\pm$ 374	1,694 - 2,426	1,964 $\pm$ 676	1,293 - 3,267	0.9
Área Glandular (%)	13 $\pm$ 2	10 - 15	10 $\pm$ 4	6 - 15	0.4
Área Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}^2$ )	4,666 $\pm$ 1,911	3,110 - 6,799	3,128 $\pm$ 1,477	1,610 - 5,927	0.2
Perímetro Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}$ )	290 $\pm$ 58	224 - 331	221 $\pm$ 74	152 - 362	0.2
Diámetro Mayor Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}$ )	102 $\pm$ 19	81 - 117	79 $\pm$ 25	56 - 126	0.2
Diámetro Menor Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}$ )	65 $\pm$ 13	50 - 76	49 $\pm$ 15	35 - 78	0.1

Cuadro 17. Promedios  $\pm$  EE y rango de las variables evaluadas en las glándulas endometriales de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) a los 90 días de gestación.

	Arginina (n= 3)	Rango	Testigo (n= 2)	Rango	P
Densidad Glandular/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	6 $\pm$ 3	3 - 9	7 $\pm$ 4	4 - 10	0.7
Superficie Glandular ( $\mu\text{m}$ )/ 200,000 $\mu\text{m}^2$	2,058 $\pm$ 838	1,170 - 2,835	3,130 $\pm$ 883	2,506 - 3,754	0.2
Área Glandular (%)	17 $\pm$ 8	8 - 23	16 $\pm$ 10	9 - 23	0.9
Área Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}^2$ )	9,295 $\pm$ 3,147	8,071 - 12,870	5,401 $\pm$ 55	5,362 - 5,440	0.2
Perímetro Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}$ )	363 $\pm$ 96	302 - 474	420 $\pm$ 62	376 - 463	0.5
Diámetro Mayor Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}$ )	134 $\pm$ 37	112 - 176	160 $\pm$ 24	144 - 177	0.4
Diámetro Menor Promedio por Glándula ( $\mu\text{m}$ )	77 $\pm$ 20	65 - 99	86 $\pm$ 17	74 - 99	0.6

**Efecto de la arginina en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor 2 (VEGFR2) en el endometrio a los 15, 35 y 90 días de gestación.**

A los 35 días de gestación (Cuadro 18) el útero de las ovejas del grupo Arginina presentó una tendencia a tener una mayor expresión de VEGF (P=0.07) en comparación con las ovejas del grupo Testigo. En el grupo arginina hubo un aumento entre los días 15 y 35 (P= 0.03), con un descenso en el día 90; este patrón no se observó en el grupo testigo (P=0.12). El patrón de expresión de VEGF que se observó en el grupo Arginina, también se observó en la expresión de VEGFR2 (P= 0.01) y en el Testigo (P= 0.02).

Cuadro 18. Promedios  $\pm$  EE del Número de copias del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y su Receptor (VEGFR2) en el útero de ovejas Pelibuey y su cruce con Blackbelly, tratadas con Arginina o con solución salina fisiológica (Testigo) evaluados a los 15, 35 y 90 días de gestación.

Gen	15 días		35 días		90 días	
	Arginina	Testigo	Arginina	Testigo	Arginina	Testigo
VEGF	82,275 $\pm$ 41,137	36,018 $\pm$ 14,704	**516,459 $\pm$ 258,230†	26,320 $\pm$ 13,160	73,606 $\pm$ 36,803	29,201 $\pm$ 14,601
VEGF R2	614 $\pm$ 820	571 $\pm$ 498	4,093 $\pm$ 502*	3,311 $\pm$ 521*	2,341 $\pm$ 2,458	2,871 $\pm$ 461

\*\* Indica diferencia respecto al mismo grupo con las otras edades (P $\leq$ 0.03).

\* Indica diferencia respecto al mismo grupo con la edad 15 (P $\leq$ 0.02).

† Indica diferencia respecto al grupo testigo dentro de la misma edad (P=0.007).

## VII. DISCUSIÓN

### • Efecto de la arginina durante el desarrollo pre-implantacional embrionario

A los 6 y 9 días de gestación a nivel embrionario, en primera instancia se observó que no existieron diferencias significativas en el número de embriones por oveja entre el grupo arginina y testigo, lo que indica que en promedio existió el mismo número de embriones en los dos grupos, sin embargo pese a esta condición a los 6 días de gestación en el grupo arginina se observó que del promedio de embriones por oveja existió un mayor número de embriones que presentaban una calidad buena- excelente ( $P=0.05$ ) y que tendían a corresponder a la edad esperada ( $P=0.08$ ), en otras palabras el efecto que tuvo la arginina a nivel embrionario a los 6 días de gestación fue el de aumentar su calidad y por lo tanto su viabilidad. Este efecto pudo deberse a la acción de la arginina de 2 formas diferentes: 1) A través de su metabolismo al óxido nítrico y poliaminas, metabolitos importantes en la embriogénesis, proliferación, migración y diferenciación celular (Lassala et al, 2009; Kim et al., 2011a, b, c; Bazer et al., 2012a; Chacher et al., 2013), y 2) Mejorando el ambiente intrauterino al mantener la funcionalidad de los CL's a través del ON, y de esta forma aumentar la producción de progesterona, la cual al tener efectos sobre las glándulas endometriales para la secreción del histotrófo (Bazer et al., 2011), se pudo apoyar el desarrollo embrionario en la etapa pre-implantacional. Colectivamente, estas acciones pudieron mejorar las condiciones para el desarrollo embrionario y que, finalmente repercutió en la obtención de embriones de 6 días con una mejor calidad y mayor viabilidad en las ovejas tratadas con arginina. Además como se mencionó en la sección de resultados, las ovejas del grupo arginina tuvieron más embriones en forma individual (entre 2 y 3) en comparación con las ovejas del grupo testigo, que tuvieron principalmente 1 y como máximo 2 embriones, evidenciando que pese a la mayor carga uterina y por lo tanto a la mayor necesidad de nutrientes para mantener la gestación en las ovejas del grupo arginina, no se vio afectada la calidad y viabilidad embrionaria.

Por otro lado, en esta etapa evaluada (6 y 9 días de gestación) se presentó un mayor número de CL's en las ovejas del grupo arginina, efecto que pudo deberse o no a la participación del óxido nítrico (derivado de la arginina administrada) al favorecer el desarrollo, función y esperanza de vida de los cuerpos lúteos (Reynolds et al., 2000), ya que se ha encontrado que la exposición crónica de ON estimula a la producción de glutatión en el CL (en la etapa temprana e intermedia de su desarrollo) (Motta et al.,

2001), lo que contribuye con la protección de las células contra la citotoxicidad de los oxidantes (Wink et al., 1998), además favorece la producción de progesterona, lo que propicia el mantenimiento del CL, y junto con las prostaglandinas tipo E (PGE), mejora los procesos proteolíticos y de vascularización del CL (Hurwitz et al., 1997, 2002), teniendo un efecto anti-luteolítico (Weems et al., 2005). Sin embargo también existe la posibilidad que el mayor número de CL's en el grupo arginina se tratara de una coincidencia, es decir que aunque se realizó una distribución aleatoria de las ovejas entre los dos grupos, cabe la posibilidad que en el grupo arginina de 6 y 9 de gestación se encontraran ovejas con tendencia a múltiples ovulaciones y por lo tanto a un mayor número de cuerpos lúteos en comparación con las ovejas del grupo testigo, siendo esta la razón del mayor número de CL's en el grupo arginina de estas edades gestacionales. Esta teoría puede tomar validez al observar que en el grupo arginina de las siguientes edades gestacionales (15, 35 y 90 días de gestación), al tratarse de diferentes ovejas no se mantuvo este efecto, sin embargo también existe la posibilidad que la falta de diferencias significativas entre los grupos arginina y testigo de estas edades gestacionales, se tratara nuevamente por la participación del óxido nítrico ya que se le ha atribuido un efecto luteolítico en el CL (Costa et al., 2008) y apoptótico (Vega et al., 2000), efectos que van a depender de la etapa de desarrollo del CL; en etapas tempranas e intermedias, el ON tiene un efecto positivo en el desarrollo y la esperanza de vida del CL, mientras que en etapas tardías, el ON tendrá un efecto pro-apoptótico (Motta et al., 1999; Tamanini et al., 2003; Wu et al., 2009). Con estas evidencias y los resultados obtenidos en este trabajo, podemos suponer que el efecto observado en el número de CL's a los 6 y 9 días de gestación en las ovejas del grupo arginina, pudo deberse al efecto del ON en la intervención del adecuado desarrollo de los CL's y evitar su luteolisis en etapas tempranas de su desarrollo, y que el efecto del ON en los CL's a los 15, 35 y 90 días de gestación fuese luteolítico y apoptótico, igualando de esta manera el número de CL's entre el grupo arginina y testigo. Sin embargo aún cabe la posibilidad que únicamente se tratara de una coincidencia en el grupo arginina a los 6 y 9 días de gestación, por lo que para asumir la hipótesis del ON-arginina se necesitarían de futuros estudios, con el objetivo de llevar un seguimiento del desarrollo y mantenimiento de los CL's de un solo grupo de ovejas arginina a lo largo de su gestación.

- **Efecto de la arginina a los 15 días de la gestación**

Se ha demostrado que la arginina, a través del ON y las poliaminas es esencial para la angiogénesis (Wu et al., 2004a), el crecimiento placentario (Wu et al., 2007b) y para los embriones tempranos, tanto para su desarrollo como para su implantación en el útero (Ayling et al., 2006; Harris et al., 2008), por lo que nos planteamos la hipótesis que al administrar arginina en la circulación materna, aumentaría las concentraciones de ON y poliaminas, los cuales favorecerían el desarrollo vascular endometrial para incrementar el flujo de nutrientes, apoyando así la implantación y el desarrollo embrionario, con lo que obtendríamos diferencias en el número de embriones o en el número de embriones de una buena a excelente calidad.

En el presente trabajo a los 15 días de gestación la arginina mejoró el desarrollo vascular endometrial sin un efecto en el tamaño de los vasos, sin embargo se ha reportado que un mayor número de vasos (aunque sean pequeños) permiten una mayor eficiencia de intercambio trans-vascular en comparación con sólo unos pocos vasos grandes (Smith et al., 1994; Reynolds et al., 2005b), por lo que se esperaba que el aumento del número de vasos en el grupo arginina podría haber favorecido el intercambio y flujo trans-vascular de nutrientes para apoyar la supervivencia y el desarrollo embrionario, sin embargo la administración de arginina durante esta etapa embrionaria, no tuvo un efecto a nivel embrionario. Seguramente se necesitó de otros factores importantes para que la arginina administrada tuviera el efecto esperado, como el aumentar la expresión de transportadores de aminoácidos catiónicos en el útero, los cuales contribuirían con el aumento de las tasas de transporte de arginina en el ambiente intra-uterino para satisfacer la necesidad del rápido crecimiento y elongación del conceptus durante el periodo de peri-implantación en la gestación de las ovejas (Gao et al., 2009a). Así la expresión de estos transportadores, tendría que ocurrir para asegurar que la arginina administrada llegara al ambiente intrauterino, y obtener así un efecto en el desarrollo del conceptus.

Por otro lado, para comprobar el efecto de la administración de arginina sobre la angiogénesis del endometrio, se determinó la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y de su receptor 2 (VEGFR-2) en el útero, ya que se ha demostrado que el ON puede interactuar con agentes vasoactivos y angiogénicos, entre los cuales se encuentra el VEGF. Sin embargo, pese a las diferencias significativas

observadas en la vasculatura endometrial en esta edad gestacional, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de VEGF y VEGFR-2, probablemente porque se ha reportado que la expresión de VEGF es mayor en los cotiledones al inicio y a finales de la gestación, en comparación con los tejidos endometriales (Reynolds y Redmer, 2001).

- **Efecto de la arginina a los 35 días de la gestación**

Se ha demostrado que los factores que influyen en el crecimiento de la placenta y el desarrollo vascular tienen un impacto dramático en el crecimiento fetal, y por lo tanto, en la mortalidad y morbilidad fetal y neonatal (Reynolds et al., 2005b; Luther et al., 2005; Wallace et al., 2006). Así se ha sugerido que la acción vasodilatadora del ON (Michel, 2006) aumenta la tasa de transferencia de nutrientes esenciales y de oxígeno de la circulación materna a los fetos (Reynolds et al., 2006; Mateo et al., 2007; Wu et al., 2008, 2013), y con ello se ve favorecido el crecimiento y el desarrollo fetal (Wu et al., 2008; Gao et al., 2009a). A los 35 días de gestación, la arginina aumentó el área vascular y el tamaño de los vasos endometriales. Es posible que esto aumentara el flujo sanguíneo, ya que el área vascular en gran medida puede determinar la capacidad de flujo de sangre, independientemente si el área vascular está representada por unos pocos vasos grandes o muchos vasos pequeños (Smith et al., 1994; Reynolds et al., 2005b). Asimismo, el transporte de nutrientes de la madre al feto podría haberse incrementado, porque el área vascular y el tamaño de los vasos están estrechamente relacionados con la capacidad de transporte, la cual está dictada por la demanda metabólica (Adair et al., 1990), con lo cual se apoyaría el crecimiento fetal durante esta etapa de la gestación. De esta forma a los 35 días de gestación también se observó una diferencia significativa en el crecimiento fetal del grupo arginina, al presentar un mayor peso y tamaño que los fetos del grupo testigo, lo que también reafirma la importancia de la arginina transportada al ambiente uterino, donde además de ser un precursor de moléculas biológicamente activas, puede estimular la secreción de insulina, hormona de crecimiento y del glucagón en los fetos ovinos (Carver et al., 1997), por lo que el mantenimiento de las concentraciones de arginina en el suministro fetal, potencialmente mejoran el crecimiento fetal.

En cuanto la expresión de VEGF y VEGFR2 en el útero, se observó que a los 35 días de gestación se presentó la mayor expresión en el útero de las ovejas del grupo arginina en comparación con las ovejas arginina de las otras edades gestacionales, además de que

esta expresión fue superior al grupo testigo, explicando que la arginina favoreció la expresión de este factor angiogénico para su participación en el desarrollo vascular endometrial. Diversos reportes han demostrado el efecto de la arginina al aumentar la expresión de este factor en cerdos (Liu et al., 2011; Yao et al., 2011) y ratas (Suzuki, 2006; Fiorito et al., 2008), y que además esta expresión favorece la angiogénesis. En el presente estudio, la mayor expresión de VEGF que se observó a los 35 días de gestación en el grupo arginina, podría dar una explicación del aumento en el desarrollo vascular endometrial observado en esta edad gestacional, indicando la regulación que ofreció la administración de arginina en los procesos angiogénicos del endometrio, ya que se ha visto que en cerdos el VEGF aumenta el número de vasos sanguíneos en la interfase placentaria endometrial (Wu et al., 2012). Por otro lado, también existen evidencias que al favorecerse la angiogénesis de la placenta se mejora la difusión de oxígeno transplacentario (Bottomley et al., 2000; Ahmed et al., 2000; Regnault et al., 2003; Jensen et al., 2007), se aumenta la capacidad para la transferencia de nutrientes de la madre al feto y se facilita el flujo sanguíneo (Wu et al., 2012). Vonnahme et al., (2001) encontraron que la expresión de VEGF en la placenta se correlacionaba positivamente con el peso fetal y la eficiencia de la placenta, por lo que probablemente el efecto de la arginina en la expresión de VEGF observado en el presente trabajo, también se reflejó en el crecimiento fetal, indicando que al aumentar el desarrollo vascular endometrial posiblemente se mejoró el flujo útero-placentario y el transporte/transferencia de nutrientes de la madre al feto, y por lo tanto el crecimiento fetal.

- **Efecto de la arginina a los 90 días de la gestación**

A los 90 días de gestación, no se observó un efecto marcado de la arginina en el crecimiento fetal, ni en el desarrollo vascular endometrial. Se esperaba que la arginina administrada desde el día 0 hasta el 35 de la gestación, mejorara la angiogénesis del endometrio y placenta, promoviendo así un ambiente intrauterino óptimo durante toda la gestación y por lo tanto favorecer el crecimiento fetal al término de la misma, ya que en ovinos, la primera mitad de la gestación es fundamental para la organogénesis fetal adecuada y para el crecimiento y vascularización de la placenta (Reynolds y Redmer, 1995). Porque de hecho, se ha caracterizado que el crecimiento de la placenta precede al crecimiento fetal, ya que el feto requiere una placenta funcional para la obtención de nutrientes y gases necesarios para su crecimiento y desarrollo (Bazer et al., 2011), y este

aumento en las funciones de la placenta se asocia con los aumentos en la vasodilatación y la angiogénesis de los placentomas conforme avanza la gestación (Reynolds et al., 2010).

Sin embargo, los resultados no fueron los esperados, con lo que probablemente la acción de arginina para favorecer el crecimiento fetal tardío sea a través de su administración durante la etapa de mayor desarrollo placentario, en lugar o además del primer mes de la gestación. En relación a esto, se ha descrito que la administración de arginina durante la gestación tardía en ovejas (entre el día 100 y 121 de gestación), puede reducir la muerte fetal y mejorar la supervivencia de los fetos en las ovejas que llevan 2 y 4 fetos, además de mejorar el crecimiento fetal de cuatrillizos sin afectar el peso corporal materno (Lassala et al., 2011), así como aumentar el transporte de nutrientes al cordero neonato (Thureen et al., 2002) y la síntesis de proteínas en los fetos y el peso al nacer de los corderos (De Boo et al., 2005). O bien, la administración de arginina entre el día 60 de la gestación y el parto (Lassala et al., 2010), mejora el peso al nacimiento de los corderos en un 21% e impide el retraso en el crecimiento intrauterino, sin afectar el peso corporal de la madre.

Estos trabajos, sugieren que la arginina juega un papel importante en el crecimiento fetal durante la gestación tardía, entre los efectos observados en esta etapa de la gestación se ha propuesto que la administración de arginina; 1) Aumenta la disponibilidad de aminoácidos condicionalmente esenciales al feto para apoyar su crecimiento (Wu et al., 2008; Lassala et al., 2010), 2) Mejora el flujo de sangre útero-placentario (Wu et al., 2007b), lo que promueve la transferencia de oxígeno y nutrientes apoyando al metabolismo y crecimiento óptimo durante el periodo de mayor crecimiento fetal, y 3) Mejora el entorno intrauterino (Luther et al., 2010), incluyendo el estado metabólico y el suministro de oxígeno para el desarrollo fetal (Lassala et al., 2011). Por lo que probablemente, para observar un efecto en el crecimiento fetal, se necesita una administración continua durante toda la gestación o sólo durante el final de la misma.

Además, en relación a la falta de diferencias significativas en el desarrollo vascular del endometrio entre los tratamientos, se ha observado que durante la última mitad de la gestación, el gran aumento en el intercambio transplacentario, que apoya el aumento exponencial en el crecimiento fetal, depende principalmente del crecimiento de la vascularización de los cotiledones y de los aumentos en el flujo sanguíneo uterino y umbilicales (Reynolds y Redmer, 1995; Espinosa, 2011). Por lo que existen cambios

moderados en la superficie vascular y en el número de vasos sanguíneos en el endometrio durante la última mitad de la gestación, resultando en un aumento modesto del área capilar (Reynolds et al., 2005b; Borowicz et al., 2007). Es decir, durante la última mitad de la gestación, el mayor crecimiento fetal ocurre por el espectacular crecimiento de ramificación de los lechos vasculares cotiledonarios fetales, lo que permite simultáneamente aumentar el flujo de sangre umbilical y que el intercambio transplacentario sea más eficiente, y así se cubran las crecientes demandas metabólicas del crecimiento fetal. De hecho en las vacas, la tasa de flujo de sangre aumenta desde la mitad a finales de la gestación en los cotiledones, mientras que en las carúnculas se mantiene constante, lo que indica que existe un aumento en la vascularización de los cotiledones, pero no de las carúnculas (Reynolds y Redmer, 1995). En conclusión, al no continuar la administración de arginina después de los 35 días de gestación, las diferencias entre tratamientos en el crecimiento fetal y en la vasculatura del endometrio a los 35 días, no siguieron observándose a los 90 días de gestación, por lo que se plantea que el momento y el tiempo de la administración de arginina son decisivos para observar efectos positivos en la gestación.

En cuanto a la expresión de VEGF y VEGFR-2 tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Como ya se mencionó, la expresión de VEGF es mayor en los cotiledones al inicio y a finales de la gestación, en comparación con los tejidos endometriales (Reynolds y Redmer, 2001). De hecho, la duplicación de capilares por unidad de tejido en la carúncula entre los días 50 y 70 coincide con un pico inicial de la producción de ON, mientras que los niveles de VEGF están disminuyendo (Kwon et al., 2004; Vonnahme et al, 2005). En el trabajo de Borowicz et al., (2007) todas las medidas de vascularización que reportaron, se correlacionaron positivamente con la expresión de VEGF en el cotiledón pero no con el endometrio, por lo que parece que la concentración de VEGF es mayor en el lado fetal que en el lado materno a lo largo de los últimos dos tercios de la gestación, lo que podría explicar la mayor tasa de crecimiento vascular y ramificación que se observa en el cotiledón en comparación con el endometrio (Borowicz et al., 2007). Además, es factible que con el avance de la gestación y en virtud de que los procesos de desarrollo vascular uterino continúan después del día 35, el aumento de la densidad vascular dependa de la acción de otras moléculas, tales como las ciclooxigenasas-2 (Matsumoto et al., 2002), el factor de crecimiento epidérmico, el factor

de crecimiento placentario (Athanassiades y Lala, 1998) y el factor estimulador de la formación de colonias.

- **Efecto de la arginina en el desarrollo glandular del endometrio a los 15, 35 y 90 días de gestación**

Se ha establecido que la hiperplasia e hipertrofia que sufren las glándulas endometriales durante la gestación, parecen ser dependientes de acciones temporales y espaciales de las hormonas del ovario (como la progesterona) y de la placenta (el lactógeno placentario y la hormona de crecimiento) (Bazer et al., 2010). Por lo que se esperaba que al incrementar las concentraciones de arginina en la circulación materna, se incrementara la síntesis de ON y poliaminas, los cuales se han asociado con el aumento de las concentraciones de progesterona (Bastida et al., 2002), por acciones directas en el ovario y en la función y esperanza de vida del CL (Reynolds et al., 2000), favoreciendo así la hiperplasia y/o hipertrofia de las glándulas endometriales. Sin embargo, tras analizar morfológicamente las dimensiones de las glándulas a los 15, 35 y 90 días de gestación, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que concluimos que la arginina si bien pudo favorecer la vida útil del CL y/o la producción de progesterona, este efecto no se reflejó en el desarrollo glandular del endometrio.

## VIII. CONCLUSIONES

- La arginina durante la gestación temprana generó mejores condiciones para el desarrollo embrionario, lo que en base al número promedio de embriones por oveja incrementó la obtención de embriones de 6 días de gestación con una mejor calidad y mayor viabilidad embrionaria.
- A los 15 días de gestación, la arginina incrementó la densidad vascular del endometrio, pero no tuvo un efecto a nivel embrionario, lo que indica que para mejorar la calidad embrionaria se necesita la participación de otros diversos elementos, y no únicamente del incremento de la densidad vascular a pesar de que ésta favorecería el intercambio de nutrientes de la madre al feto.
- A los 35 días de gestación, la arginina incrementó la expresión del VEGF y VEGFR2, y aumentó el área vascular y el tamaño de los vasos endometriales. Efectos que se podrían traducir en el mayor peso y tamaño fetal observado, porque al incrementar el tamaño y el área vascular del endometrio probablemente se favoreció el flujo sanguíneo y el transporte de nutrientes, apoyando así el crecimiento fetal.
- A los 90 días de gestación, la arginina administrada hasta los 35 días de gestación, no tuvo un efecto en ninguna de las variables evaluadas, por lo que parece que la acción de la arginina para favorecer el crecimiento fetal tardío que ha sido informada por otros autores, es a través de su administración durante la etapa de mayor desarrollo placentario o al final de la gestación, en lugar o además del primer mes de la gestación. Así el momento y el tiempo de la administración de arginina son decisivos para observar sus efectos beneficiosos en la gestación.

## IX. REFERENCIAS

1. Adair, T. H, W. J. Gray, J. P. Montani. 1990. Growth regulation of the vascular system: Evidence for a metabolic hypothesis. *Am. J. Physiol.* 259:R393-R404.
2. Ahmad, S., P. W. Hewett, P. Wang, B. Al-Ani, M. Cudmore, T. Fujisawa. 2006. Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ. Res.* 99:715-22.
3. Ahmed, A., Dunk, C., Ahmad, S., Khaliq, A., 2000. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen—a review. *Placenta* 21 (Suppl. A), S16–S24.
4. Arroyo, J. A., and V. D. Winn. 2008. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta. *Semin. Perinatol.* 32(3):172–177.
5. Athanassiades, A., and P. Lala. 1998. Role of placenta growth factor (PIGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta.* 17:545-555.
6. Ayling, L. J., G. S. Whitley, J. D. Aplin, J. E. Cartwright. 2006. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) regulates trophoblast invasion and motility through effects on nitric oxide. *Hum Reprod.* 21:2530-2537.
7. Bartol, F. F., A. A. Wiley, C. A. Bagnell. 2006. Uterine development and endometrial programming. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 62:113–130.
8. Bastida, C. M., F. Tejada, A. Cremades. 2002. The preovulatory rise of ovarian ornithine decarboxylase is required for progesterone secretion by the corpus luteum. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:106–111
9. Bazer, F. W., G. Song, J. Kim, D. W. Erikson, G. A Johnson, R. C Burghardt, H. Gao, M. C. Satterfield, T. E. Spencer, G. Wu. 2012c. Mechanistic mammalian target of rapamycin (MTOR) cell signaling: effects of select nutrients and secreted phosphoprotein 1 on development of mammalian conceptuses. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354:22-33.
10. Bazer, F. W., G. Wu, T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, K. Bayless. 2010. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol. Hum. Reprod.* 16:135-152.
11. Bazer, F. W., J. Kim, G. Song, M. C. Satterfield, G. A. Johnson, R. C. Burgardt, G. Wu. 2012b. Uterine environment and conceptus development in ruminants. *Anim. Reprod.* 3:297-304.
12. Bazer, F. W., J. Kim, H. KA, G. A Johnson, G. Wu, G. Song. 2012a. Select nutrients in the uterine lumen of sheep and pigs affect conceptus development. *J. Reprod. Dev.* 58:180-188.
13. Bazer, F. W., T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, G. Wu. 2009b. Comparative aspects of implantation. *Reproduction.* 138:195–209.
14. Bazer, F. W., T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt. 2011. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. *Frontiers in Bioscience.* 3:745-767.
15. Bazer, F. W., T. E. Spencer, G. A. Johnson. 2009a. Interferons and uterine receptivity. *Semin. Reprod. Med.* 27:90-102.

16. Bird, I. M., L. B. Zhang, R. R. Magness. 2003. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *Am. J. Physiol.* 284:R245–R258.
17. Borowczyk, E., J. S. Caton, D. A. Redmer, J. J. Bilski, R. M. Weigl, K. A. Vonnahme, P. P. Borowicz, J. D. Kirsch, K. C. Kraft, L. P. Reynolds, A. T. Grazul-Bilska. 2006. Effects of plane of nutrition on in vitro fertilization and early embryonic development in sheep. *J. Anim. Sci.* 84:1593–1599.
18. Borowicz, P. P., D. R. Arnold, A. T. Grazul-Bilska, D. A. Redmer, L. P. Reynolds. 2003. Modeling vascular growth in the sheep placentome. *Biol. Reprod.* 68(Suppl 1):150.
19. Borowicz, P. P., D. R. Arnold, M. L. Johnson, A. T. Grazul-Bilska, D. A. Redmer, L. P. Reynolds. 2007. Placental growth throughout the last two thirds of pregnancy in sheep: vascular development and angiogenic factor expression. *Biol. Reprod.* 76:259–267.
20. Bottomley, M.J., Webb, N.J., Watson, C.J., Holt, L., Bukhari, M., Denton, J., Freemont, A.J., Brenchley, P.E., 2000. Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin. Exp. Immunol.* 119, 182–188.
21. Brayman, M., A. Thathiah, D. D. Carson. 2004. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2:4.
22. Burghardt, R. C., G. A. Johnson, L. A. Jaeger, H. Ka, J. E. Garlow, T. E. Spencer, F. W. Bazer. 2002. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells. Tissues. Organs.* 172:202–217.
23. Carson, D. D., I. Bagchi, S. K. Dey, A. C. Enders, A. T. Fazleabas, B. A. Lessey, K. Yoshinaga. 2000. Embryo implantation. *Develop. Biol.* 223:217–237.
24. Carson, D. D., J. Julian, B. A. Lessey, A. Prakobphol, S. J. Fisher. 2006. MUC1 is a scaffold for selectin ligands in the human uterus. *Front. Biosci.* 11:2903–2908.
25. Carver, T. D., A. A. Quick, C. C. Teng, A. W. Pike, P. V. Fennessey, W. W. Hay. 1997. Leucine metabolism in chronically hypoglycemic hypoinsulinemic growth-restricted fetal sheep. *American Journal of Physiology.* 272(1 Pt 1):E107-E117.
26. Chacher, B., H. Liu, D. Wang, J. Liu. 2013. Potential role of N-carbamoyl glutamate in biosynthesis of arginine and its significance in production of ruminant animals. *J. Anim. Sci. Biotech.* 4:16.
27. Charnock D. S., P. Kaufmann, T. M. Mayhew. 2004. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta.* 25:103-113.
28. Chen, H. W., W. S. Jiang, C. R. Tzeng. 2001. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil. Steril.* 75:1163–1171.
29. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry.* 162:56-159.
30. Chwalisz, K. and R. E. Garfield. 2000. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Human Reproduction.* 15:96-111.
31. Costa, R. P., A. S. Costa, A. J. Korzekwa. 2008. Actions of a nitric oxide donor on prostaglandin production and angiogenic activity in the equine endometrium. *Reprod Fertil Dev.* 20:674–683

32. Davis, C. J., P. J. Fisher, D. H. Schlafer. 2000. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. *Placenta*. 21:194–202.
33. De Boo, H., P. Van, D. Smith, W. Kulik, H. Lafeber, J. Harding. 2005. Arginine and mixed amino acids increase protein accretion in the growth-restricted and normal ovine fetus by different mechanisms. *Pediatric Research*. 58(2):272-277.
34. Demir R., Y. Seval, B. Huppertz. 2007. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta. Histochemica*. 109:257–265.
35. Dey, S. K., H. Lim, S. K. Das, J. Reese, B. C. Paria, T. Daikoku, H. Wang. 2004. Molecular cues to implantation. *Endocr. Rev.* 25:341–373.
36. Di Renzo, G. C., G. Clerici, I. Neri, F. Facchinetti, G. Caserta, A. Alberti. 2005. Potential effects of nutrients on placental function and fetal growth. *Nestle Nutr workshop ser pediatr program*. 55:73-81.
37. Doyle, K. L. 2009. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in granulosa cell function: Involvement of heterotrimeric G-protein signalling pathways. Tesis de Doctorado. The University of Edinburgh.
38. Duarte, M., R. Espinosa, M. Díaz, R. Sánchez, E. C Lee Eng, C. Mijangos, G. Barragán. 2008. Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. *Medicina Interna de México*. 24:397-406.
39. Espinosa, C. R. 2011. Angiogénesis en la placenta de los animales domésticos. *Rev. vet.* 22(2):131-138.
40. Espinosa, C. R., and G. A. Rosado. 2002. Angiogénesis en la fisiología reproductiva. Desarrollo folicular, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. *Ginecol. Obstetr. Méx.* 70:17-27.
41. Ferguson, J. E., R. W. Kelley, C. Patterson. 2005. Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:2246-2254.
42. Ferrara, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*. 25:581-611.
43. Ferrara, N. 2009. History of discovery: vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 108:1796-63.
44. Ferrara, N., and T. Davis. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*. 18:4-25.
45. Ferrero, B. R. 2001. Estudio de la regulación de la guanilato ciclasa soluble en células neurales. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
46. Fiorito, C., Balestrieri, M.L., Crimi, E., Giovane, A., Grimaldi, V., Minucci, P.B., Servillo, L., D'Armiento, F.P., Farzati, B., Napoli, C., 2008. Effect of L-arginine on circulating endothelial progenitor cells and VEGF after moderate physical training in mice. *Int. J. Cardiol.* 126, 421–423.
47. Flynn, N. E., C. J. Meininger, T. E. Haynes, G. Wu. 2002. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother.* 56:427- 438.
48. Gao, H., G. Wu, T. E. Spencer, G. A. Johnson, F. W. Bazer. 2009a. Select nutrients in the ovine uterine lumen: II. Glucose transporters in the uterus and peri-implantation conceptuses. *Biol Reprod*. 80:94-104.
49. Gao, H., G. Wu, T. E. Spencer, G. A. Johnson, F. W. Bazer. 2009b. Select nutrients in the ovine uterine lumen: III Cationic amino acid transporters in the ovine uterus and peri-implantation conceptuses. *Biol Reprod*. 80:602-609.
50. Gao, H., G. Wu, T. E. Spencer, G. A. Johnson, F. W. Bazer. 2009c. Select nutrients in the ovine uterine lumen: IV. Expression of neutral and acidic

- amino acid transporters in ovine uteri and peri-implantation conceptuses. *Biol Reprod.* 80:1196-1208.
51. Garlow, J. E., H. Ka, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, L. A. Jaeger, F. W. Bazer. 2002. Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biology of Reproduction.* 66:718-725.
  52. Gerber, H. P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B. A. Keyt, V. Dixit, N. Ferrara. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 273:30336-43.
  53. Geva, E. and R. Jaffe. 2000. Role of angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. *Obstet. Gynecol. Surv.* 55:511-519.
  54. Gluckman, P. D., and M. A. Hanson. 2004. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 9(5):419-425.
  55. Gootwine, E., T. E. Spencer, F. W. Bazer. 2007. Litter-size-dependent intrauterine growth restriction in sheep. *Animal.* 547-564.
  56. Gray, C. A., D. L. Adelson, F. W. Bazer, R. C. Burghardt, E. N. Meeusen, T. E. Spencer. 2004. Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in the trophectoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:7982-7987.
  57. Gray, C. A., K. M. Taylor, W. S. Ramsey, J. R. Hill, F. W. Bazer, F. F. Bartol, T. E. Spencer. 2001. Endometrial glands are required for pre-implantation conceptus elongation and survival. *Biol. Reprod.* 64:1608-1613.
  58. Grazul, A. T., P. P. Borowicz, M. L. Johnson, M. A. Minten, J. J. Bilski, R. Wroblewski, D. A. Redmer, L. P. Reynolds. 2010. Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. *Reproduction.* 140:165-174.
  59. Green, S. J. 1995. Nitric oxide in mucosal immunity. *Nature Med.*, 1:515-517.
  60. Greenaway, J., K. Connor, H. G. Pedersen, B. L. Coomber, J. Lamarre, J. Petrik. 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology.* 145:2896-2905.
  61. Gregg, A. R. 2003. Mouse models and the role of nitric oxide in reproduction. *Curr. Pharm. Des.* 9:391-398.
  62. Guillomot M. 1995. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod. Fertil.* 49:39-51.
  63. Guillomot, M., J. E. Flechon, F. Leroy. 1993. Blastocyst development and implantation. In: C. Thibault, M. C. Levasseur y R. H. F. Hunter (Eds). *Reproduction in Mammals and Man.* Paris: Ellipses. 387-411.
  64. Harris, L.K., J. McCormick, J. E. Cartwright, G. S. Whitley, P. R. Dash. 2008. S-nitrosylation of proteins at the leading edge of migrating trophoblasts by inducible nitric oxide synthase promotes trophoblast invasion. *Exp. Cell Res.* 314:1765-1776.
  65. Hoozemans, D. A., R. Schats, C. B. Lambalk, R. Homburg, P. G. Hompes. 2004. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online.* 9:692-715.
  66. Hurwitz, A., Z. Finci-Yeheskel, S. Yagel, S. Shimonowitz, N. Laufer, E. Y. Adashi, M. Mayer. 1997. Interleukin-1 $\beta$  inhibits progesterone accumulation in rat corpora luteal cell cultures in a mechanism dissociated from its effects on nitric oxide and prostaglandinE accumulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 133:41-48.

67. Hurwitz, H., S. Holden, S. Eckhardt, M. Rosenthal, R. Boer, D. Rischin, M. Green, R. Basser. 2002. Clinical evaluation of ZD6474, an orally active inhibitor of VEGF signaling, in patients with solid tumors. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21:82a.
68. Igarashi, K., and K. Kashiwagi. 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000:271:559–564.
69. Ignarro, L. J., G. M. Buga, L. H. Wei, P. M. Bauer, G. Wu, P. del Soldato, 2001. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:4202-8.
70. Igwebuike, U. M. 2009. A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Animal Reproduction Science.* 112:1-7.
71. Ishida, M., Y. Hiramatsu, H. Masuyama, Y. Mizutani, T. Kudo. 2002. Inhibition of placental ornithine decarboxylase by DL-alpha-difluoro-methyl ornithine causes fetal growth restriction in rat. *Life Sci.* 70:1395–1405.
72. Jensen, E., Wood, C.E., Keller-Wood, M., 2007. Reduction of maternal adrenal steroids results in increased VEGF protein without increased eNOS in the ovine placenta. *Placenta* 28, 658–667.
73. Jia, H., A. Bagherzadeh, R. Bicknell, M. R. Duchon, D. Liu, I. Zachary. 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and VEGF-A differentially regulate KDR-mediated signaling and biological function in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279:36148-36157.
74. Johnson, G. A., F.W. Bazer, L. A. Jaeger, H. Ka, J. E. Garlow, C. Pfarrer, T. E. Spencer, R. C. Burghardt. 2001. Muc-1, integrin and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol Reprod.* 65:820-828.
75. Johnson, G. A., R. C. Burghardt, F. W. Bazer, T. E. Spencer. 2003a. Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod.* 69:1458-1471.
76. Johnson, G. A., R. C. Burghardt, M. M. Joyce, T. E. Spencer, F. W. Bazer, C. A. Gray, C. Pfarrer. 2003b. Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45-kDa cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. *Biol Reprod.* 69:92–98.
77. Johnson, G., K. Dunlap, D. Erikson, K. Reed, F. White, R. Burghardt, K. Bayless. 2007. The sheep conceptus differentially regulates uterine secreted phosphoprotein 1 that correlates with increased histotrophic and hematrophic support of pregnancy. *Biol. Reprod.* 77:103.
78. Johnson, M. L., A. T. Grazul-Bilska, D. A. Redmer, L. P. Reynolds. 2006. Effects of estradiol-17b on expression of mRNA for seven angiogenic factors and their receptors in the endometrium of ovariectomized (OVX) ewes. *Endocrine.* 30:333–342.
79. Joyce, M. M., F. J. White, R. C. Burghardt, J. J. Muniz, T. E. Spencer, F. W. Bazer, G. A. Johnson. 2005. Interferon stimulated gene 15 conjugates to endometrial cytosolic proteins and is expressed at the uterine-placental interface throughout pregnancy in sheep. *Endocrinology.* 146:675–684.
80. Jussila, L., and K. Alitalo. 2002. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol. Rev.* 82:673-700.
81. Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D. M. Sabatini. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* 110:163-175.
82. Kim, J., D. W. Erikson, R. C. Burghardt, T. E. Spencer, G. Wu, K. J. Bayless, G. A. Johnson, F. W. Bazer. 2010. Secreted phosphoprotein 1 binds integrins to initiate multiple cell signaling pathways, including

- FRAP1/mTOR, to support attachment and forcegenerated migration of trophoctoderm cells. *Matrix Biol.* 29:369-382.
83. Kim, J., G. Song, H. Gao, J. L. Farmer, M. C. Satterfield, R. C. Burghardt, G. Wu, G. A. Johnson, T. E. Spencer, F. W. Bazer. 2008. Insulin-like growth factor 2 (IGF2) activates PI3K-AKT1 and MAPK cell signaling pathways and stimulates proliferation and migration of ovine trophoctoderm cells. *Endocrinology.* 149:3085- 3094.
  84. Kim, J., R. C. Burghardt, G. Wu, G. A. Johnson, T. E. Spencer, F. W. Bazer. 2011a. Select nutrients in the ovine uterine lumen: VII. Effects of arginine, leucine, glutamine and glucose on trophoctodem cell signaling, proliferation and migration. *Biol Reprod.* 84:62-78.
  85. Kim, J., R. C. Burghardt, G. Wu, G. A. Johnson, T. E. Spencer, F. W. Bazer. 2011b. Select nutrients in the ovine uterine lumen. VIII. Arginine stimulates proliferation of ovine trophoctoderm cells through MTOR-RPS6K-RPS6 signaling cascade and synthesis of nitric oxide and polyamines. *Biol Reprod.* 84:70-78.
  86. Kim, J., R. C. Burghardt, G. Wu, G. A. Johnson, T. E. Spencer, F. W. Bazer. 2011c. Select nutrients in the ovine uterine lumen. IX. Differential effects of arginine, leucine, glutamine, and glucose on interferon tau, ornithine decarboxylase, and nitric oxide synthase in the ovine conceptus. *Biol Reprod.* 84:1139-1147.
  87. Kim, S. W., R. D. Mateo, Y. L. Yin, G. Wu. 2007. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20:295–306.
  88. Kimball, S. R., L. M. Shantz, R. L. Horetsky, L. S. Jefferson. 1999. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem.* 274:11647-11652.
  89. Kong, X., B. Tan, Y. Yin, H. Gao, X. Li, L. A. Jaeger, F. W. Bazer, G. Wu. 2012. L-Arginine stimulates the mTOR signaling pathway and protein synthesis in porcine trophoctoderm cells. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 23:1178-1183.
  90. Krause, B. J., M. A. Hanson, P. Casanello. 2011. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta.* 32:797-805.
  91. Kwon, H., G. Wu, F. W. Bazer, T. E. Spencer. 2003a. Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus. *Biol Reprod.* 69:1626-1634.
  92. Kwon, H., S. P. Ford, F. W. Bazer, T. E. Spencer, P. W. Nathanielsz, M. J. Nijland, B. W. Hess, G. Wu. 2004. Maternal nutrient restriction reduces concentrations of amino acids and polyamines in ovine maternal and fetal plasma and fetal fluids. *Biol Reprod.* 71:901-908.
  93. Kwon, H., T. E. Spencer, F. W. Bazer, G. Wu. 2003b. Developmental changes of amino acids in ovine fetal fluids. *Biol Reprod.* 68:1813–1820.
  94. Larue, L., M. Ohsugi, J. Hirchenhain, R. Kemler. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoctoderm epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 91:8263–8267.
  95. Lassala, A. 2008. Arginine and fetal growth in ovine models of intrauterine growth restriction (Tesis de Doctorado). College Station (TX): Texas A&M University.
  96. Lassala, A., F. W. Bazer, T. A. Cudd, P. Li, X. Li, M. C. Satterfield, T. E. Spencer, G. Wu. 2009. Intravenous Administration of L-Citrulline to Pregnant Ewes Is More Effective Than L-Arginine for Increasing Arginine Availability in the Fetus. *J. Nutr.* 139:660–665.

97. Lassala, A., F. W. Bazer, T. A. Cudd, S. Datta, D. H. Keislet, M. C. Satterfield, T. E. Spencer, G. Wu. 2010. Parenteral administration of L-arginine prevents fetal growth restriction in undernourished ewes. *J Nutr.* 140:1242-1248.
98. Lassala, A., F. W. Bazer, T. A. Cudd, S. Datta, D. H. Keislet, M. C. Satterfield, T. E. Spencer, G. Wu. 2011. Parenteral administration of L-arginine enhances fetal survival and growth in sheep carrying multiple fetuses. *J Nutr.* 141:849-855.
99. Lefevre, P. L., M. F. Palin, D. Beaudry, M. Dobias-Goff, J. A. Desmarais, V. E. LLerena, B. D. Murphy. 2011b. Uterine signaling at the emergence of the embryo from obligate diapause. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300:E800-E808.
100. Lefevre, P. L., M. F. Palin, G. Chen, G. Turecki, B. D. Murphy. 2011a. Polyamines are implicated in the emergence of the embryo from obligate diapause. *Endocr.* 52:1627-1639.
101. Lei, X. Q., C. P. Feng, C. Liu C. 2011. Regulation of protein expression by L-arginine in endothelial cells. *Front Biosci.* S3:655–661
102. Lewis, S. K., J. L. Farmer, R. C. Burghardt, G. R. Newton, G. A. Johnson, D. L. Adelson, F. W. Bazer, T. E. Spencer. 2007b. Galectin 15 (LGALS15): a gene uniquely expressed in the uteri of sheep and goats that functions in trophoblast attachment. *Biol. Reprod.* 77:1027–1036.
103. Liu, X.D., Wu, X., Yin, Y.L., Liu, Y.Q., Geng, M.M., Yang, H.S., Blachier, F., Wu, G.Y., 2011. Effects of dietary L-arginine or N-carbamylglutamate supplementation during late gestation of sows on the miR-15b/16, miR-221/222, VEGFA and eNOS expression in umbilical vein. *Amino Acids.*
104. Luther, J. S., D. A. Redmer, L. P. Reynolds, J. M. Wallace. 2005. Nutritional paradigms of ovine fetal growth restriction: implications for human pregnancy. *Hum Fertil.* 8:179 - 187.
105. Luther, J. S., E. J. Windorski, C. S. Schauer, J. D. Kirsch, K. A. Vonnahme, L. P. Reynolds, J. S. Caton, G. Wu. 2008. Impacts of L-arginine on ovarian function and reproductive performance in ewes. *J. Anim. Sci.* 86(E-Suppl 2):LB5.
106. Luther, J. S., E. J. Windorski, G. Wu, J. D. Kirsch, K. A. Vonnahme, L. P. Reynolds. 2010. Effects of arginine supplementation on reproductive performance in Rambouillet ewes. *Sheep research report.* 50:11-13.
107. Martal, J., N. Chene, S. Camous, L. Huynh, F. Lantier, P. Hermier, R. L'Haridon. 1997. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:355–380.
108. Martin, P. M., A. E. Sutherland, L. J. Van Winkle. 2003. Amino acid transport regulates blastocyst implantation. *Biol Reprod.* 69:1101-1108.
109. Martin, P. M., and A. E. Sutherland. 2001. Exogenous amino acids regulate trophoblast differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. *Dev Biol.* 240:182-193.
110. Martínez D., and L. Herrera. 2006. Angiogenesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología.* 1:83-96.
111. Mata E., W. X. Liao, J. Zheng, D. B. Chen. 2008. Differential activation of multiple signalling pathways dictates eNOS upregulation by FGF2 but not VEGF in placental artery endothelial cells. *Placenta.* 29:708–717.
112. Mateo, R. D., G. Wu, F. W. Bazer, J. C. Park, I. Shinzato, S. W. Kim. 2007. Dietary L-arginine supplementation enhances the reproductive performance of gilts. *J Nutr.* 137:652–656.

113. Matousek, M., C. Carati, B. Gannon, K. Mitsube, M. Brannstrom. 2001. Changes in intrafollicular pressure in the rat ovary by nitric oxide and by alteration of systemic blood pressure. *Eur. J. Obst. Gynec. Reprod. Biol.* 98:46–52.
114. Matsumoto H., W. Ma, T. Daikoku, X. Zhao, B. Paria. 2002. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *J Biol Chem.* 277:29260-29267.
115. Maul, H., M. Longo, G. R. Saade, R. E. Garfield. 2003. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des.* 9:359–80.
116. Mehta, V. 2011. The Effects of VEGF Over-expression on the Utero-placental Circulation. (Tesis de Doctorado). University College London.
117. Michel, T. 2006. Treatment of myocardial ischemia. In: L. L. Brunton, J. S. Lazo y K. L. Parker (Eds). *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th edn. McGraw-Hill, New York. 823–844.
118. Montiel, O. L. 2010. Desarrollo endocrino del eje reproductivo en ovinos de pelo (Tesis de maestría). México, DF. Universidad Nacional Autónoma de México.
119. Morris, D. G., M. G. Diskin, J. M. Sreenan. 2000. Protein synthesis and phosphorylation by elongating 13–15 day-old cattle blastocysts. *Reprod Fertil. Dev.* 12:39–44.
120. Morris, S. M. Jr. 2002. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 22:87-105.
121. Morris, S. M. Jr. 2004. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr.* 134:2743S-2747S.
122. Morris, S. M. Jr. 2009. Recent advance in arginine metabolism: roles and regulation of arginases. *Br. J. Phar.* 157(6):922–930.
123. Motta, A. B., A. Estevez, M. A. F. Gimeno. 1999. The involvement of nitric oxide in corpus luteum regression in the rat: feedback mechanism between prostaglandin F<sub>2</sub> alpha and nitric oxide. *Mol. Human Reprod.* 5:1011-1016.
124. Motta, A. B., A. Estevez, T. Tognetti, M. A. F. Gimeno, A. M. Franchi. 2001. Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Molecular Human Reproduction.* 7(1):43-47.
125. Murphy, V. E., R. Smith, W. B. Giles, V. L. Clifton. 2006. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev.* 27:141-169.
126. Nancarrow, C. D. 1994. Embryonic mortality in the ewe and doe. In: M. T. Zavy y R. D. Geisert RD (Eds.). *Embryonic Mortality in Domestic Species*. CRC Press. 79-97.
127. Nielsen, F. C., L. Ostergaard, J. Nielsen, J. Christiansen. 1995. Growth-dependent translation of IGF-II mRNA by a rapamycin-sensitive pathway. *Nature.* 377:358-362.
128. Noel, S., A. Herman, C. A. Johnson, C. A. Gray, M. D. Stewart, F. W. Bazer, A. Gertler, T. E. Spencer. 2003. Ovine placental lactogen specifically binds to endometrial glands of the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 68:772-780.
129. Noriega, R., S. Martínez, R. Flores. 1995. Técnica de búsqueda, manipulación y evaluación embrionaria. En: *Técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 32-45.
130. Novaro, V., A. Colman-Lerner, F. V. Ortega, A. Jawerbaum, D. Paz, F. Lo Nostro, C. Pustovrh, M. F. Gimeno, E. Gonzalez. 2001. Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture. *Reprod Fertil Develop.* 13:411-420.

131. Nowak, G., J. Woolard, M. Amin, O. Konopatskaya, A. Saleem, J. Churchill, R. Ladomery, J. Harper, O. Bates. 2008. Expression of pro-and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of Cell Science*. 121:3487-3495.
132. Olsson, A. K., A. Dimberg, J. Kreuger, C. L. Welsh. 2000. VEGF receptor signaling- in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7:359-371.
133. Osnaya, G. F. 2008. Gestación. En: Soto y Medrano (Eds). *Reproducción de ovejas y cabras*. UNAM CUAUTITLAN. Edo. México. 119-129.
134. Paria, B. C., J. Reese, S. K. Das, S. K. Dey. 2002. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science*. 296:2185–2188.
135. Ray, R. M, A. Patel, M. J. Viar, S. A. McCormack, Y. Zheng, G. Tigyi, L. R. Johnson. 2002. RhoA inactivation inhibits cell migration but does not mediate the effects of polyamine depletion. *Gastroenterology*. 123:196–205.
136. Redmer, D. A., R. P. Aitken, J. S. Milne, L. P. Reynolds, J. M. Wallace. 2005. Influence of maternal nutrition on messenger RNA expression of placental angiogenic factors and their receptors at mid-gestation in adolescent sheep. *Biol Reprod*. 72:1004–1009.
137. Regnault, T.R., de Vrijer, B., Galan, H.L., Davidsen, M.L., Trembler, K.A., Battaglia, F.C., Wilkening, R.B., Anthony, R.V., 2003. The relationship between transplacental O<sub>2</sub> diffusion and placental expression of PIGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. *J. Physiol*. 550, 641–656.
138. Regnault, T.R., Orbus, R.J., de Vrijer, B., Davidsen, M.L., Galan, H.L., Wilkening, R.B., Anthony, R.V., 2002. Placental expression of VEGF, PIGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta* 23, 132–144.
139. Reynolds L. P., P. P. Borowicz, K. A. Vonnahme, M. L. Johnson, A. T. Grazul-Bilska, D. A. Redmer, J. S. Caton. 2005a. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *Journal Physiological*. 565.1:43-58.
140. Reynolds, L. P., A. T. Grazul-Bilska, D. A. Redmer. 2000. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine*. 12:1–9.
141. Reynolds, L. P., and D. A. Redmer. 1992. Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod*. 47:698–708.
142. Reynolds, L. P., and D. A. Redmer. 1995. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci*. 73:1839–1851.
143. Reynolds, L. P., and D. A. Redmer. 2001. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod*. 64:1033–40.
144. Reynolds, L. P., J. S. Caton, D. A. Redmer, A. T. Grazul-Bilska, K. A. Vonnahme, P. P. Borowicz, J. S. Luther, J. M. Wallace, G. Wu, T. E. Spencer. 2006. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *Journal of Physiology*. 572:51–58.
145. Reynolds, L. P., P. P. Borowicz, J. S. Caton, K. A. Vonnahme, J. S. Luther, D. S. Buchanan, S. A. Hafez, A. T. Grazul-Bilska, D. A. Redmer. 2010. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *International Journal of Developmental Biology*. 54:355–366.
146. Reynolds, L. P., P. P. Borowicz, K. A. Vonnahme, M. L. Johnson, A. T. Grazul-Bilska, J. M. Wallace, J. S. Caton, D. A. Redmer. 2005b. *Animal Models of Placental Angiogenesis*. *Placenta*. 26:689-708.
147. Reynolds, L. P., R. R. Magness, S. P. Ford. 1984. Uterine blood flow during early pregnancy in ewes: interaction between the conceptus and the ovary bearing the corpus luteum. *J. Anim. Sci*. 58:423–429.

148. Robertson, I. and R. Nelson. 1998. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow, D.A., Seidel, S.M. (Eds), Manual of the International Embryo Transfer Society. 3<sup>rd</sup> ed., Illinois, USA. 103–116.
149. Robinson, C. J., and S. E. Stringer. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*, 114:853-65.
150. Sallinen, H., M. Anttila, J. Narvainen, J. Koponen, K. Hamalainen, I. Kholova, T. Heikura. 2009. Antiangiogenic gene therapy with soluble VEGFR-1, -2, and -3 reduces the growth of solid human ovarian carcinoma in mice. *Mol. Ther.* 17:278-284.
151. Satterfield, M. C., F. W. Bazer, T. E. Spencer. 2006. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod.* 75:289-296.
152. Satterfield, M. C., H. Gao, X. Li, G. Wu, G. A. Johnson, T. E. Spencer, F. W. Bazer. 2010. Select nutrients and their associated transporters are increased in the ovine uterus following early progesterone administration. *Biol Reprod.* 82:224-231.
153. Satterfield, M. C., K. A. Dunlap, D. H. Keisler, F. W. Bazer, G. Wu. 2012. Arginine nutrition and fetal brown adipose tissue development in diet-induced obese sheep. *Amino Acids.* 43(43):1593–1603.
154. Satterfield, M. C., K. A. Dunlap, D. H. Keisler. 2013 Arginine nutrition and fetal brown adipose tissue development in nutrient restricted sheep. *Amino Acids.* 43:1593–1603
155. Satterfield, M. C., K. Hayashi, G. Song, S. G. Black, F. W. Bazer, T. E. Spencer. 2008. Progesterone regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the endometrium of the ovine uterus. *Biol Reprod.* 79:1226-1236.
156. Schiewe, M. C., J. G. Howard, K. L. Goodrowe, L. D. Stuart, D. E. Wildt. 1990. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F<sub>2</sub>α synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology* 34:469-486
157. Sengoku, K., N. Takuma, M. Horikawa, K. Tsuchiya, H. Komori, D. Sharifa, K. Tamate, M. Ishikawa. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol. Reprod Dev.* 58:262-268.
158. Smith, M. F., E. W. McIntush, G. W. Smith. 1994. Mechanisms Associated with Corpus Luteum Development. *Journal Animal Science.* 72:1857-1872.
159. Song, G., M. C. Satterfield, J. Kim, F. W. Bazer, T. E. Spencer. 2008. Gastrin-releasing peptide (GRP) in the ovine uterus: regulation by interferon tau and progesterone. *Biol Reprod.* 79:376-386.
160. Song, G., M. C. Satterfield, J. Kim, F. W. Bazer, T. E. Spencer. 2009. Progesterone and interferon tau regulate leukemia inhibitory factor receptor and IL6ST in the ovine uterus during early pregnancy. *Reproduction.* 137:553–565.
161. Spencer, T. E., and F. W. Bazer. 2004. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim. Sci.* 82(E-suppl):E4-E13.
162. Spencer, T. E., G. A. Johnson, F. W. Bazer, R. C. Burghardt, M. Palmarini. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility, and Development.* 19:65–78.
163. Spencer, T. E., G. A. Johnson, F. W. Bazer, R. C. Burghardt. 2004a. Implantation mechanisms: Insights from the sheep. *Reproduction.* 128:657-668.

164. Spencer, T. E., G. A. Johnson, R. C. Burghardt, F. W. Bazer. 2004b. Progesterone and placenta hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod.* 71:2-10.
165. Spencer, T. E., O. Sandra, E. Wolf. 2008. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction.* 135:165-179.
166. Stewart, M. D., G. A. Johnson, C. A. Gray, F. W. Bazer, T. E. Spencer. 2000. Prolactin receptor and UTRP expression in the ovine endometrium during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod.* 62:1779-1789.
167. Suzuki, J., 2006. L-Arginine supplementation causes additional effects on exercise-induced angiogenesis and VEGF expression in the heart and hind-leg muscles of middle-aged rats. *J. Physiol. Sci.* 56, 39-44.
168. Tamanini, C., G. Basini, F. Grasselli, M. Tirelli. 2003. Nitric oxide and the ovary. *Journal of Animal Science.* 81:E1-E7.
169. Thomas, T., and T. J. Thomas. 2001. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci.* 58:244-258.
170. Thureen, P. J., K. A. Baron, P. V. Fennessey, W. W. Hay Jr. 2002. Ovine placental and fetal arginine metabolism at normal and increased maternal plasma arginine concentrations. *Pediatr Res.* 51:464-71.
171. Tranguch, S., N. Steuerwald, Y. Huet-Hudson. 2003. Nitric Oxide Synthase Production and Nitric Oxide Regulation of Preimplantation Embryo Development. *Biology of Reproduction.* 68:1538-1544.
172. Van Winkle, L. J. 2001. Amino Acid Transport Regulation and Early Embryo Development. *Biology of Reproduction.* 64:1-12.
173. Vega, M., L. Urrutia, G. Iñiguez, F. Gabler, L. Devoto, M. C. Johnson. 2000. Nitric oxide induces apoptosis in the human corpus luteum in vitro. *Molecular Human Reproduction.* 6(8):681-687.
174. Vejlsted, M., Y. Du, G. Vajta, P. Maddox-Hyttel. 2006. Post-hatching development of the porcine and bovine embryo-defining criteria for expected development in vivo and in vitro. *Theriogenology.* 65:153-165.
175. Vonnahme, K.A., Wilson, M.E., Ford, S.P., 2001. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biol. Reprod.* 64, 1821-1825.
176. Vonnahme, K. A., M. E. Wilson, Y. Li, H. L. Rupnow, T. M. Phernetton, S. P. Ford, R. R. Magness. 2005. Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. *Journal Physiology.* 565(1):101-109.
177. Vonnahme, K. A., M. J. Zhu, P. P. Borowicz, T. W. Geary, B. W. Hess, L. P. Reynolds, J. S. Caton, W. J. Means, S. P. Ford. 2007. Effect of early gestational undernutrition on angiogenic factor expression and vascularity in the bovine placentome. *J Anim. Sci.* 85:2464-2472.
178. Wallace, J. M., J. S. Luther, J. S. Milne, R. P. Aitken, D. A. Redmer, L. P. Reynolds. 2006. Nutritional modulation of adolescent pregnancy outcome: a review. *Placenta.* 27(Suppl. A):S61-S68.
179. Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, C. H. Heldin. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 269:26988-95.
180. Wang, J., L. Mayernik, D. R. Armant. 2002. Integrin signaling regulates blastocyst adhesion to fibronectin at implantation: intracellular calcium transients and vesicle trafficking in primary trophoblast cells. *Dev. Biol.* 245:270-279.

181. Weems, Y. S., E. Lennon, T. Uchima, A. Raney, K. Goto, A. Ong, H. Zaleski, C. W. Weems. 2005. Is nitric oxide luteolytic or antiluteolytic?. *Prostaglandins y other Lipid Mediators*. 78:129-138.
182. Wink, D. A., Y. Vodovotz, J. Laval, F. Laval, M. W. Dewhirst, J. B. Mitchell. 1998. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*. 19(5):711-721.
183. Wu, G., and C. J. Meininger. 2002. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu Rev Nutr*. 22:61-86.
184. Wu, G., and C. J. Meininger. 2009. Nitric oxide and vascular insulin resistance. *Biofactors*. 35:21-27.
185. Wu, G., and S. M. Morris. 1998. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *J. Biochem*. 336:1-17.
186. Wu, G., F. W. Bazer, J. M. Wallace, T. E. Spencer. 2006. Intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *J Anim. Sci*. 84:2316-37.
187. Wu, G., F. W. Bazer, M. C. Satterfield, X. Li, X. Wang, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, Z. Dai, J. Wang, Z. Wu. 2013. Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. *Amino Acids*. 45:241-256.
188. Wu, G., F. W. Bazer, S. Datta, G. A. Johnson, P. Li, M. C. Satterfield, T. E. Spencer. 2008. Proline metabolism in the conceptus: Implications for fetal growth and development. *Amino Acids*. 35:691-702.
189. Wu, G., F. W. Bazer, T. A. Cudd, C. J. Meininger, T. E. Spencer. 2004a. Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr*. 134:2169-72.
190. Wu, G., F. W. Bazer, T. A. Cudd, W. S. Jobgen, S. W. Kim, A. Lassala, P. Li, J. H. Matis, C. J. Meininger, T. E. Spencer. 2007a. Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. *The Journal of Nutrition*. 137:1673S-1680S.
191. Wu, G., F. W. Bazer, T. A. Davis, L. A. Jaeger, G. A. Johnson, S. W. Kim, D. A. Knabe, C. J. Meininger, T. E. Spencer, Y. L. Yin. 2007b. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livestock Science*, 112:8-22.
192. Wu, G., F. W. Bazer, T. A. Davis, S. W. Kim, P. Li, J. M. Rhoads, M. C. Satterfield, S. B. Smith, T. E. Spencer, Y. Yin. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 37:153-168.
193. Wu, G., L. A. Jaeger, F. W. Bazer, J. M. Rhoads. 2004b. Arginine deficiency in premature infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *J Nutr Biochem*. 15:442-51.
194. Xiao, X. M. and L. P. Li. 2005. L-Arginine treatment for asymmetric fetal growth restriction. *Int J Gynaecol Obstet*. 88:15-8.
195. Yao, K., Guan, S., Li, T., Huang, R., Wu, G., Ruan, Z., Yin, Y., 2011. Dietary L-arginine supplementation enhances intestinal development and expression of vascular endothelial growth factor in weanling piglets. *Br. J. Nutr*. 105, 703-709.
196. Yao, K., S. Guan, T. Li, R. Huang, G. Wu, Z. Ruan, Y. Yin. 2011. Dietary L-Arginine supplementation enhances intestinal development and expression of vascular endothelial growth factor in weanling piglets. *British Journal of Nutrition*. 105:703-709.
197. Zamora, G. A. 2013. Expresión de VEGF y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en ovarios de ovejas suplementadas con L-arginina previo a la ovulación (Tesis de maestría). México, DF. Universidad Autónoma Metropolitana.
198. Zeng, H., H. F. Dvorak, D. Mukhopadhyay. 2001. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but

- not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem.* 276:26969-26979.
199. Zeng, X., F. Wang, X. Fan, W. Yang, B. Zhou, P. Li, Y. Yin, G. Wu, J. Wang. 2008. Dietary arginine supplementation during early pregnancy enhances embryonic survival in rats. *J. Nutr.* 138:1304-1309.
200. Zhang, X., and C. Zhu. 2002. Nitric oxide in female reproductive system. *Chinese Science Bulletin.* 47:1321-1324.
201. Zhang, Z., D. Yin, Z. Wang. 2011. Contribution of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  to transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in bovine developing luteal cells. *Animal Science Journal.* 82:244-250.
202. Zhao, Y. C., Y. J. Chi, Y. S. Yu, J. L. Liu, R. W. Su, X. H. Ma, C. H. Shan, Z. M. Yang. 2008. Polyamines are essential in embryo implantation: expression and function of polyamine-related genes in mouse uterus during periimplantation period. *Endocrinology.* 149:2325–32.
203. Zheng, J., Y. Lib, A. R. Weiss, I. M. Bird, R. R. Magness. 2000. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthases and nitric oxide production in ovine placental and uterine tissues during late pregnancy. *Placenta.* 21:516–524.
204. Zheng, J., Y. X. Wen, J. L. Austin, D. B. Chen. 2006. Exogenous nitric oxide stimulates cell proliferation via activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod.* 74:375-382.
205. Zygalki, E., A. Stathopoulou, C. Kroupis, L. Kaklamanis, Z. Kyriakides, D. Kremastinos, E. S. Lianidou. 2005. Real-time reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor splice variants. *Clinical Chemistry.* 51:1518-1520.

## X. ANEXOS

### ANEXO 1. PREPARACIÓN DE PBS 10x

Para preparar un litro de stock PBS (Buffer Fosfato Salino) a una concentración 10x con un pH de 7.4, se pesan:

1. 80 g de NaCl (Cloruro de sodio; J.T. Baker Cat. 3624)
2. 2 g de KCl (Cloruro de potasio; J.T. Baker Cat. 3040)
3. 14.4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fosfato de sodio bibásico; J.T. Baker Cat. 3828)
4. 2.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fosfato de potasio monobásico; J.T. Baker Cat. 3245)

Los cuales se disuelven en 800 ml de agua destilada, para después aforarlo a un litro con agua destilada.

Se mide el pH y se ajusta a 7.4 con NaOH o HCl

Se puede almacenar a 4°C por máximo 7 días.

### PBS 1X

Para preparar un litro de PBS (Buffer Fosfato Salino) a una concentración 10x con un pH de 7.4, se toman 100 ml del stock PBS 10x y se disuelven con 900 ml de agua destilada. Esta concentración de PBS también se puede almacenar a 4°C por máximo 7 días.

## **ANEXO 2. PREPARACIÓN DE PFA 4%**

Por cada litro de PBS 1x se le agregan y disuelven 40 g de Paraformaldehído (J.T. Baker Cat. S898), así obtenemos un litro de PFA (paraformaldehido) al 4%, el cual se puede almacenar a 4°C.

Para disolver el PFA en el PBS 1x, se colocó el litro de PBS 1x en un agitador magnético con parrilla, y se agregó lentamente el PFA. Las condiciones del agitador fueron: 80°C con una velocidad aproximada de 1,000 rpm.

### ANEXO 3. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

Para el procesamiento de las muestras, éstas fueron transferidas a casetes individuales previamente rotulados con la identificación de la muestra para ser colocadas en un procesador automático de tejidos (marca Microm, modelo STP 120-1) con el siguiente programa:

- Vaso 1: Vacío\*
- Vaso 2: Vacío\*
- Vaso 3: Etanol al 70% por 2 h.
- Vaso 4: Etanol al 70% por 2 h.
- Vaso 5: Etanol al 90% por 2 h.
- Vaso 6: Etanol al 90% por 2 h.
- Vaso 7: Etanol al 100% por 2 h.
- Vaso 8: Etanol al 100% por 2 h.
- Vaso 9: Xyleno por 2 h.
- Vaso 10: Xyleno por 2 h.
- Vaso 11: Parafina por 2 h.
- Vaso 12: Parafina por 2 h.

\*Vacío: Se refiere a que en este programa no se utilizaron los vasos 1 y 2, por lo que el proceso empezó a partir del vaso 3.

El procesador de tejidos utilizado tiene como funciones la agitación espiral a 60 y 70 rpm y la transportación de la canastilla de los casetes, por lo que en las condiciones del programa incluyó la agitación de las muestras. Al finalizar el programa se colectó un casete a la vez para evitar solidificación de la parafina. Se precalentó una platina a 40°C donde se colocó el tejido en moldes metálicos en la posición deseada y llenando el molde con parafina. Después se transfirieron los moldes a una charola con hielo hasta su solidificación. Finalmente el bloque se sacó del molde de metal y quedó listo para ser seccionado en el micrótopo.

#### **ANEXO 4. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA**

Los portaobjetos con los cortes del tejido, se colocaron en los siguientes recipientes:

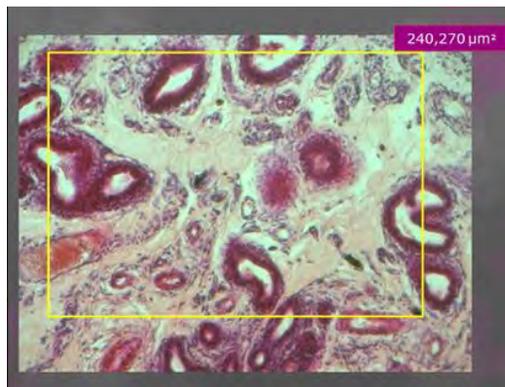
- Recipiente 1 y 2: Tolueno (J.T. Baker Cat. 9460), por 5 minutos cada uno (=10 min).
- Recipiente 3 y 4: Etanol al 100%, por 2.5 minutos cada uno (=5 min).
- Recipiente 5 y 6: Etanol al 90%, por 2.5 minutos cada uno (=5 min).
- Recipiente 7 y 8: Etanol al 70%, por 2.5 minutos cada uno (=5 min).
- Recipiente 9: Agua, por 3 minutos.
- Recipiente 10: Hematoxilina Harris (Hycel Cat. 738), por 2 minutos.
- Se lleva a la tarja el recipiente 10 con los portaobjetos y se deja tirar agua sobre él hasta que el agua salga clara.
- Recipiente 11: 1% de alcohol ácido (J.T. Baker Cat. 9507-05), solo dos sumergidas.
- Se lleva a la tarja el recipiente 11 con los portaobjetos y se deja tirar agua sobre él hasta que el agua salga clara.
- Recipiente 12: Agua amoniada, solo dos sumergidas.
- Se lleva a la tarja el recipiente 12 con los portaobjetos y se deja tirar agua sobre él hasta que el agua salga clara.
- Recipiente 13: Eosina (J.T. Baker Cat. L083-03), por 3 minutos.
- Se lleva a la tarja el recipiente 13 con los portaobjetos y se deja tirar agua sobre él hasta que el agua salga clara.
- Recipiente 14: Etanol al 70%, por 2 minutos.
- Recipiente 15: Etanol al 90%, por 2 minutos.
- Recipiente 16: Etanol al 100%, por 2 minutos.
- Recipiente 17 y 18: Tolueno, por 5 minutos cada uno (=10 min).

Después de sacar los portaobjetos del último recipiente de Tolueno, se montaron los portaobjetos colocándoles una gota de Entellan sobre el tejido y un cubreobjetos, presionando para evitar burbujas.

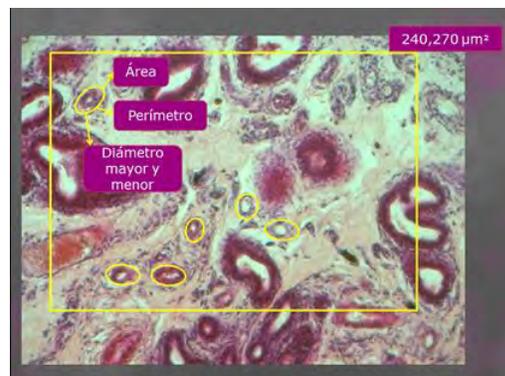
### ANEXO 5. Metodología utilizada para Morfometría

Se dispuso a cuantificar la vasculatura y glándulas endometriales mediante técnicas de morfometría citados en Borowicz et al. (2003) y Reynolds et al. (2005a). Se utilizó el software “Analysis optibasic” y se siguió la siguiente metodología:

1. Se tomaron 4 fotografías del endometrio de cada oveja con un aumento de 200x.
2. Con el software se delimito un cuadrado de dimensiones conocidas (240, 270  $\mu\text{m}^2$ )



3. Con las funciones del programa se delimitaron todos los vasos o glándulas presentes en el cuadrado de dimensiones conocidas. Automáticamente el programa calcula el área, perímetro, diámetro mayor y menor de cada vaso o glándula, con lo que se generó una base de datos y se calcularon las variables de interés.



Nota: Cabe señalar que únicamente se contabilizaron los vasos o glándulas que se encontraban dentro del cuadrado y los que tocaban el lado superior y derecho del cuadrado.

## **ANEXO 6. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA AL 1.2%**

1. Se pesaron 0.6 g de Agarosa (Invitrogen, 15510-019) y se disolvieron en 50 ml de TAE al 1X (Ultrapure Buffer, Invitrogen, R44262).
2. Se calentó la solución en un microondas hasta que se disolviera completamente la agarosa.
3. A la solución caliente se le agregó 5  $\mu$ l de Syber Safe DNA gel Stain (Life technologies Cat. S33102).
4. La solución se vertió en un molde para 8 pocillos y se esperó hasta que se solidificó.
5. Se desmontó el gel y se coloca en una cámara de electroforesis que contiene aproximadamente 100 ml de TAE al 1X.
6. Al primer pocillo se le colocó 5  $\mu$ l de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Cat.10488-058, Conc. 0.1  $\mu$ g/  $\mu$ l).
7. Las muestras de RNA a analizar se descongelaron a temperatura ambiente y 2  $\mu$ l de la muestra se colocó en un tubo estéril con 5  $\mu$ l de agua molecular (Sigma, Cat. W4502), se disolvió colocando los tubos con las muestras por unos segundos en una mini-centrífuga (Eppendorf mini Spin), finalmente se les colocó 3  $\mu$ l de Buffer de marcaje (Gel loading Buffer) y se colocaron los 10  $\mu$ l totales en los pocillos consecutivos al del peso molecular.
8. Se colocó la cámara de electroforesis a 100V por 50 min.
9. Finalmente se observó el gel con las muestras en un foto documentador.