



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO DE
FIBROBLASTOS 10, FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS Y SUS
RECEPTORES EN EL ÚTERO DE CERDAS EN GESTACIÓN TEMPRANA

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

LAURA EDITH VICTORES SANTILLAN

TUTOR PRINCIPAL

MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA

FACULTA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR

DAVID ALEJANDRO CARO DEL CASTILLO

FACULTA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

CIUDAD UNIVERSITARIA Cd. Mx.

DICIEMBRE 2019



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

- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ- UNAM).
- Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
- Centro de Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), UNAM.
- Departamento de Fisiología y Farmacología, FMVZ- UNAM.
- Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ- UNAM.
- Departamento de Patología, FMVZ- UNAM.
- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA 208516) “Identificación molecular de vías de señalización en el embrión, membranas extra-embriónicas y útero durante la gestación temprana en ungulados domésticos”.
- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-PAPIIT-205617) “Determinación de la expresión de moléculas que participan en la interacción materno-embriónica y proceso de angiogénesis durante la implantación en cerdos”.
- Asociación IPVS México 2014 donativo otorgado a David Alejandro Contreras Caro del Castillo.
- M. en C. Francisco Javier García Vázquez Especialistas de Laboratorios de Anatomopatología ESLAP SA de CV.

Resumen

La gestación permite el éxito de la supervivencia de una nueva generación mediante la adecuada comunicación entre el producto y la madre. En la cerda, se han reportado pérdidas embrionarias de hasta el 30% alrededor de la implantación. Con la finalidad de prevenir estas pérdidas, se han estudiado diversas moléculas presentes en este periodo, como los factores de crecimiento, los cuales están implicados en procesos de proliferación y diferenciación celular del endometrio, así como en la como en la elongación del trofoblasto. El objetivo de este trabajo se centró en el estudio del útero de cerdas gestantes durante la ventana de implantación (día 12 al 18 de gestación). De inicio se evaluaron los cambios morfológicos en las diferentes capas uterinas y posteriormente se determinó la presencia, localización y nivel de expresión de los factores de crecimiento FGF10, HGF, sus receptores y sus respectivas vías de señalización, PI3K y pERK. Los resultados mostraron que los principales cambios morfológicos fueron observados en los pliegues endometriales. A través de inmunohistoquímica se observó la localización de los factores de crecimiento y sus receptores la cual fue sobresaliente en las células del epitelio de revestimiento y epitelio glandular en todos los días estudiados. PI3K y pERK también estuvieron presentes en el endometrio principalmente en el epitelio de revestimiento, lo cual también sugiere que las vías de señalización están activas y con una posible función de tipo endocrino y paracrino. No se encontraron diferencias significativas a través de qPCR para FGF10, FGFR2 y c-MET en los diferentes días de gestación

estudiados, sin embargo, hay cambios de expresión relativos a lo largo de la gestación y con tendencias similares entre los dos factores de crecimiento. Un incremento en la expresión coincide con los altos valores de estrógenos provocados por el embrión durante el reconocimiento materno al día 12 de gestación. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de HGF en el útero gestante al compararlo con la expresión en la fase folicular del ciclo estral. Lo cual sugiere que la influencia de cambios endocrinos pudiese contribuir en los cambios de expresión de FGF10, HGF y sus receptores en el endometrio, no obstante, para corroborarlo sería necesario llevar a cabo ensayos de tipo funcional.

Palabras clave: Implantación, Reconocimiento materno, Endometrio, Factor de Crecimiento de Fibroblastos, Factor de Crecimiento de Hepatocitos.

Abstract

Pregnancy allows the successful survival of a new generation through coordinated communication between the conceptus and the mother. In the sow there are reports of embryo losses of up to 30% around implantation. To prevent these, several molecules present in this period have been studied, such as growth factors, which are involved in cell proliferation and differentiation processes at the endometrium and the trophoblast elongation process. The objective of this study was to examine the uterus of pregnant sows during the implantation window (day 12 to 18 of gestation). Initially, morphological changes in the different uterine layers were evaluated and subsequently the presence, localization and level expression of growth factors FGF10, HGF, their receptors and their respective signaling pathways, PI3K and pERK. The results showed that the main morphological changes were observed at the endometrial level. Through immunohistochemistry, the localization of the growth factors and their receptors was detected, which was mainly in the cells of the luminal and glandular epithelium in all the days studied. PI3K and pERK were also present at the endometrium especially in the luminal epithelium, which also suggests that the signaling pathways are active and with a possible endocrine and paracrine function. No significant differences were found through qPCR for FGF10, FGFR2 and c-MET on the different days of pregnancy studied, however, there are expression changes throughout pregnancy with similar trends between the two growth factors. Increase in expression coincides with the high estrogen values produced by the embryo during maternal recognition at day

12 of pregnancy. A statistically significant decrease in the expression of HGF in the pregnant uterus was observed when compared with the expression in the follicular phase of the estrous cycle. This suggests that the influence of endocrine changes could contribute to changes in the expression of FGF10, HGF and their receptors in the endometrium, however, to corroborate further work will be necessary including functional analysis.

Keywords: Implantation, Maternal Recognition, Endometrium, Fibroblast Growth Factor, Hepatocyte Growth Factor.

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	I
Resumen.....	II
Abstract.....	IV
1. Introducción.....	8
2. Revisión de la Literatura y Planteamiento del Problema.....	10
2.1 Generalidades reproductivas de la cerda.....	10
2.2 Anatomía uterina y placentación.....	10
2.3 Desarrollo temprano previo a la implantación.....	12
2.4 Reconocimiento materno de la gestación.....	18
2.5 Ventana de Implantación.....	20
2.6 Factores de Crecimiento.....	23
3. Objetivos.....	34
3.1 Objetivo General.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4. Hipótesis.....	35
5. Materiales y Métodos.....	36
5.1 Toma de muestras.....	36
5.2 Procesamiento de las muestras.....	37
5.3 Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E).....	38
5.4 Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN) del tejido uterino.....	38
5.5 Cuantificación y determinación del grado de pureza del ARN.....	39
5.6 Diseño de primers.....	39
5.7 Transcripción reversa (RT).	39
5.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR).	40
5.9 Electroforesis con gel de agarosa.....	40
5.10 Estandarización de la técnica de Inmunohistoquímica.....	41
5.11 Imágenes de fotomicrografía.....	44
5.12 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).....	44
5.13 Análisis estadístico.....	45
6. Resultados.....	46
6.1 Descripción histológica del útero.....	46

6.2 Extracción de ARN cerdas gestantes y ciclando.	52
6.3 RT y PCR punto final.	53
6.4 Inmunohistoquímica.....	55
6.5 Rangos dinámicos	82
6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).....	82
7. Discusión y Conclusiones.....	92
7.1 Adaptaciones histológicas del útero durante la gestación temprana.	92
7.2 Identificación y cuantificación del FGF10, FGFR2, HGF y c-MET.	94
7.3 Identificación de PI3K y ERK.	98
7.4 Conclusión general.	100
8. Referencias	101
9. Lista de Gráficos	115
10. Lista de Tablas	116
11. Lista de Figuras	117
12. Anexos	121

1. Introducción

En los mamíferos el proceso de gestación permite el desarrollo y viabilidad de una nueva generación, con ello se logra la supervivencia de la especie y para el caso de los animales domésticos el éxito de las unidades de producción pecuaria. Sin embargo, para que este proceso sea exitoso es necesario que diversos factores estén presentes e interactúen entre ellos (Raheem, 2017).

Los cerdos pueden proveer un recurso como modelo de investigación, ya que gracias a diversas aproximaciones con los humanos son un modelo adecuado. En el área de biología del desarrollo, podemos destacar cierta similitud en momentos de desarrollo y pérdida embrionaria. Tanto los humanos como los suinos sufren altas tasas de mortalidad durante el periodo de peri-implantación (Eakin y Behringer, 2004; Walters *et al.*, 2012),

Se asume que debe existir una sincronía entre la viabilidad del embrión y la receptividad uterina, mediante señalizaciones parácrinas y autocrinas para un adecuado reconocimiento materno e implantación, sin embargo, no se conocen cuáles son todas las moléculas implicadas en esta comunicación ni la forma en la que interactúan tanto en el útero cómo en el producto en formación (Cha *et al.*, 2015). Los Factores de Crecimiento han despertado interés por su implicación en procesos de proliferación y diferenciación celular y parece ser que participan directamente en proceso de elongación y ciertas modificaciones endometriales

durante la ventana de implantación. Algunos de estos factores de crecimiento se han estudiado en el tracto reproductivo de diversas especies. En el caso del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) los cuales se reportan en implantación de tipo cotiledonaria (Satterfield *et al.*, 2008), No obstante, se desconoce su localización y nivel de expresión en los diferentes tipos celulares del útero porcino (Bazer y Johnson, 2014).

Los porcinos tienen tasas de ovulación que exceden el número de lechones llevados a término de la gestación, las líneas comerciales pueden ovular y fertilizar hasta 27 ovocitos (Foxcroft *et al.*, 2016). Sin embargo, existe pérdida embrionaria de hasta el 30% entre los días 15 y 30 de gestación (Tayade *et al.*, 2006). Debido a esta pérdida embrionaria surgen algunas preguntas acerca del destino de estos embriones: ¿Cuáles son los mecanismos que permitieron que algunos se implantaran y otros sean reabsorbidos? ¿Qué moléculas son importantes para este proceso? ¿Cómo podría hacerse más eficiente el proceso de implantación?, entre otras. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación se centra en determinar la presencia, localización y nivel de expresión de algunos factores de crecimiento como FGF10 y HGF que pudieran estar implicados en el éxito de la implantación embrionaria.

2. Revisión de la Literatura y Planteamiento del Problema

2.1 Generalidades reproductivas de la cerda

Las cerdas alcanzan la pubertad entre los días 150 y 220 de edad, este intervalo es tan espaciado debido principalmente a factores nutricionales, genéticos, ambientales entre otros. El ciclo estral tiene una duración de entre 18 y 24 días con un promedio de 21 días. (Soede y Kemp, 1997; Steverink *et al.*, 1999). En presencia del verraco el estro suele durar de 40 a 60 horas, sin embargo, es un parámetro variable fuertemente influenciado por el manejo. En hembras que no han sido inseminadas o el proceso de fertilización tuvo alguna falla, el cuerpo lúteo sufre regresión en el día 15 debido a la acción de prostaglandinas (Waclawik, 2011). Generalmente las hembras nulíparas son inseminadas en su segundo o tercer celo para asegurar un adecuado desarrollo corporal y de los órganos reproductivos. La gestación dura entre 114 y 116 días y es dónde las concentraciones de progesterona en la cerda son mayores comparándolas con otras especies, estas altas concentraciones se han relacionado directamente con la supervivencia embrionaria. (Foxcroft, 1997).

2.2 Anatomía uterina y placentación

El útero de las cerdas adultas presenta una arquitectura similar al de las demás especies domésticas. Compuesto anatómicamente por tres capas: endometrio, miometrio y perimetrio. Aproximadamente en el día 120 de vida presenta su estructura madura (Bal y Getty, 1970; Bartol *et al.*, 1993).

El endometrio es la túnica mucosa, recubierto comúnmente por epitelio simple columnar, sin embargo, algunas especies domésticas, como en el caso del útero de cerda presenta un epitelio pseudoestratificado o estratificado en algunas zonas (Geneser, 1985). Debajo de dicho epitelio se encuentra la lámina propia submucosa, la cual está compuesta de tejido colágeno laxo hiperplásico en su superficie. El tejido conjuntivo que se encuentra en la periferia de dicha lámina propia presenta menos cantidad de células comparado con el tejido subepitelial conjuntivo. La lamina propia presenta abundante vascularización y un gran número de glándulas simples y ramificadas revestidas por un epitelio de tipo cilíndrico simple, dichas glándulas incrementan su tamaño e incidencia de acuerdo al estado fisiológico, proliferando durante la fase progestacional del ciclo estral (Banks y Martínez, 1996). El miometrio presenta dos porciones; una capa gruesa circular interna y una capa longitudinal externa más delgada que continúa hacia el mesometrio. El perimetrio es la capa serosa más externa del órgano, está constituido por mesotelio, una subserosa conectiva de tejido conjuntivo laxo y una lámina muscular serosa longitudinal (Grau y Walter, 1975).

Se ha reportado que tanto la proporción de las capas tisulares como de la incidencia del epitelio glandular se modifica con el día del ciclo estral (Blackwell *et al.*, 2003), durante la gestación, la túnica muscular incrementa su grosor como resultado de una hipertrofia de los miocitos. En la mucosa es dónde se observan la mayor parte de las modificaciones debido a la aposición del embrión y consecuente placentación (Grau y Walter, 1975). Sin embargo, existen pocos

trabajos que describan la morfología uterina en el momento del reconocimiento materno e implantación basándose en estudios histológicos.

El tipo de placentación en los suinos es de tipo epitelicorial con un aislamiento de los componentes fetales y maternos. La presencia de dos epitelios completos disminuye problemas de incompatibilidad inmune, pero hace a las crías completamente dependientes de la inmunización a través del calostro en la vida neonatal. Durante la gestación existen áreas pequeñas para la absorción de nutrientes llamadas areolas (Carter y Enders, 2004). Otras estructuras presentes durante la gestación temprana son las glándulas endometriales, estas secretan el histotrófo una sustancia que provee nutrición a los embriones previo a la implantación (Spencer *et al.*, 2012).

2.3 Desarrollo temprano previo a la implantación.

2.3.1 Transporte de gametos y fertilización

Posterior a la ovulación los ovocitos son captados por la fimbria del oviducto, cuando se lleva a cabo la cópula o inseminación artificial, la presencia de los espermatozoides y componentes seminales son reconocidos en el oviducto y útero de la hembra, estos son importantes para la síntesis de prostaglandinas con lo cual se favorece el transporte de los gametos para la fertilización (Ziecik *et al.*, 2011). Cuando el gameto femenino y masculino se encuentran, éste último ya ha sufrido una serie de modificaciones que le permitirán penetrar la Zona Pelúcida

(ZP) del ovocito, en este proceso el espermatozoide interactúa con el ovocito en tres capas diferentes. La primera interacción es con las células del cúmulus y el ácido hialurónico de la matriz extracelular, posteriormente con la ZP y al final con la membrana plasmática del ovocito. La unión con la ZP provoca en el espermatozoide la reacción acrosomal, la cual es esencial para llevar a cabo la penetración de la ZP y la fusión de membranas entre ambos gametos para la posterior fusión de los pronúcleos y con ello llevar a cabo en proceso de fertilización (Berger, 1996).

El embrión porcino es fertilizado en el oviducto en la porción del ámpula, seguido de la fusión de membrana se inicia la activación del gameto femenino, la cual se refiere a los cambios que ocurren para dar inicio al desarrollo del embrión, reinicia el ciclo celular, completa la meiosis y entra en el primer ciclo mitótico embrionario. El segundo cambio importante es la prevención de la poliespermia, los ovocitos de los mamíferos establecen dicho bloqueo en dos diferentes niveles: en la cubierta extracelular (ZP) y en la membrana plasmática (Tulsiani, 2003). Al finalizar estos cambios, quedará conformada una célula diploide con el material genético completo característico de cada especie, como el caso del porcino que son 38 cromosomas.

2.3.2 Segmentación

El cigoto continuará con una serie de divisiones celulares denominadas segmentación rotacional, la cual tiene un patrón asincrónico en el cual el número de células aumenta sin modificación del tamaño (Cockburn y Rossant, 2010). Durante este proceso las células terminan el silenciamiento transcripcional gracias a la supresión de distintos tipos de histonas, las cuales propician la remodelación de la cromatina (Hall *et al.*, 2013). El resultado de la división mitótica será la compactación de las células y el comienzo de su polarización lo cual determinará su forma y posición. Con la primera segregación espacial de las células se formará el Trofoblasto (TE) y un grupo denominado Masa Celular Interna (MCI) con carácter pluripotente (White *et al.*, 2017) Las células al exterior de la MCI poseen una superficie apical, por lo tanto estas células están polarizadas y la mayoría de ellas se diferenciarán para formar el TE, que al avanzar la gestación se convertirá en la placenta (White *et al.*, 2018). Posteriormente, en la segunda segregación de líneas celulares, a partir de la MCI se formará el endodermo primitivo y el epiblasto, el cual dará origen a el embrión propiamente dicho. En el día 3.5 post fecundación el cigoto se denomina mórula, la cual ingresa al útero de 2 a 3 días después (Hunter, 1974; Dziuk, 1985) (Figura 1).

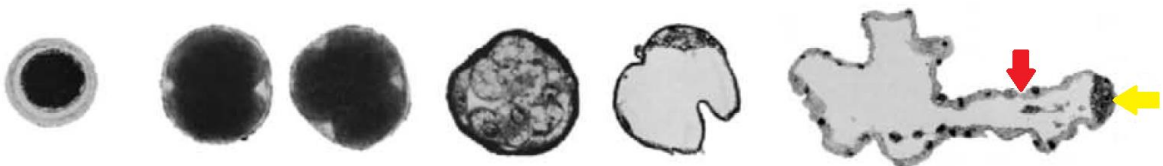


Figura 1. Morfología del embrión porcino durante la segmentación y formación del blastocito. Etapa de mórula, blastocito y eclosión de la zona pelúcida. Masa Celular Interna (flecha amarilla) y Trofoblasto (flecha roja). Modificado de Eakin and Behringer, 2004.

2.3.3 Formación del Blastocito.

Posterior a la delimitación de estos grupos celulares, el embrión está listo para transformarse en un blastocito, el cual se caracteriza por la formación de una cavidad denominada blastocele, dicha área proviene de los espacios intracelulares los cuales fueron formados por exocitosis de vacuolas de la membrana basal de las células externas. Mediante la generación de un gradiente osmótico distinto, principalmente atribuible al Sodio, es posible la acumulación de líquido al interior del embrión aumentando el tamaño del blastocele. Los tiempos de división celular y desarrollo temprano en el cerdo se encuentran descritos en la Tabla 1 (Manejwala *et al.*, 1989).

Tabla 1. Momentos en que se observan etapas de desarrollo posteriores a la fertilización.

	2 células	4 células	8 células	Mórula	Blastocisto	Eclosión
Cerdo	14-16h	1d	2d	3.5d	4-5d	6d

Modificado de (Senger, 2003)

2.3.4 Eclosión del embrión temprano

Para lograr una adecuada receptividad uterina e implantación es necesario que el blastocito lleve a cabo el proceso de eclosión de la zona pelúcida (Chen *et al.*, 2013). Es el resultado de la combinación de la lisis proteolítica de la ZP con la presión mecánica ejercida por la acumulación de líquido en el interior del blastocito, provocando la ruptura de la ZP (Seshagiri *et al.*, 2009). Después de que el blastocito se ha desprendido de la ZP éste se pone en contacto directo con el lumen uterino y el epitelio glandular (Geisert *et al.*, 2012). Este contacto es crucial

para el subsecuente desarrollo y supervivencia del embrión, debido a que el ambiente uterino provee el medio de interacción entre ambos al mismo tiempo que se prepara para la subsecuente formación y desarrollo de la placenta (Aplin, 2008). En el caso de los embriones porcinos ocurre entre el día 6 y 8 de gestación (Senger, 2003; Geisert *et al.*, 2017) y es un evento indispensable para la subsecuente elongación del trofoblasto.

2.3.5 Elongación del embrión

El proceso de elongación se refiere a la capacidad del embrión para modificarse morfológicamente gracias a cambios en el citoesqueleto del blastocito dicho cambio y su movimiento en los cuernos uterinos es esencial para el proceso de implantación y mantenimiento de la gestación (Geisert *et al.*, 2017). La elongación es un acontecimiento clave para especies con placentación epiteliocorial, debido a que el trofoblasto al incrementar su superficie permite establecer interacciones con el ambiente uterino y aumentar la captación de nutrientes (Geisert *et al.*, 2017). La elongación comienza con la migración y agrupamiento de las células del trofoblasto a la región del disco embrionario lo cual forma la zona de elongación. Las células en la zona de elongación son columnares en comparación con las que se encuentran periféricas a esta zona que presentan una morfología cuboidal, esta modificación está asociada con cambios en la longitud y orientación de los microfilamentos a través de los bordes celulares (Perry, 1981; Bazer *et al.*, 2009). Cuando el embrión tiene un diámetro de aproximadamente 10mm las alteraciones

de los microfilamentos y los complejos de unión celular permiten el movimiento y redistribución de las células para desarrollar una forma tubular y posteriormente filamentosa con lo que se disminuye su diámetro, pero aumenta su longitud. (Anderson, 1978; Geisert *et al.*, 1982). Estudios en el cerdo han demostrado que las modificaciones basadas en actina en las células de trofotodermo parecen ser responsables de darles forma para el alargamiento y disminución circunferencial. A medida que se elongan los blastocitos de cerdo, se pierden abundantes microvellosidades en la superficie apical de las células de trofotodermo y se producen cambios en las caras basolaterales de las membranas con F-actina pericelular contigua. Debido a que las regiones restringidas a lo largo del embrión en su forma filamentosa contienen células de trofotodermo polarizadas con un conjunto distinto de F-actina, dichas regiones son más alargadas y polarizadas debido a la actividad contráctil que provee fuerzas que cambian la morfología (Albertini *et al.*, 1987). El embrión porcino que en un principio posee una forma esférica (10-15mm diámetro) se modifica a una forma alargada tubular (15 a 50mm) y posteriormente una filamentosa (100 a 200mm) y alcanza su mayor tamaño (800 a 1000 mm) entre los días 12 a 15 de gestación (Figura 2). Todos estos cambios son indispensables para el reconocimiento materno y la implantación (Bazer, 1992). Se ha sugerido que las prostaglandinas contribuyen en el desarrollo y elongación del embrión debido al aumento en su concentración durante los días en que estos procesos ocurren (Ashworth *et al.*, 2006).



Figura 2. Diferentes grados de elongación del embrión porcino, día 12 de gestación.

2.4 Reconocimiento materno de la gestación

El embrión secreta señales de reconocimiento de la gestación entre los días 10 y 13, cuya función es promover procesos de tipo luteotrófico y anti luteolítico, preservando así la funcionalidad del cuerpo lúteo (Fazleabas *et al.*, 2004). La primera señal está influenciada con la secreción de los estrógenos por parte del embrión y la segunda con la modificación en el patrón y concentración de secreción de las prostaglandinas. (Bazer, Wu, *et al.*, 2009; Waclawik *et al.*, 2017). La cerda es cuerpo lúteo dependiente, por lo tanto es imprescindible su presencia y así asegurar una fuente de progesterona durante los 114 días de gestación (Leymarie y Martal, 1991). Adicionalmente, se ha propuesto que la progesterona estimula la secreción de histotrófo, en el endometrio las cuales son esenciales para el desarrollo del embrión y su posterior implantación (Waclawik *et al.*, 2017).

Mientras el embrión se encuentra en el proceso de elongación, se incrementa la producción de estrógenos provenientes del trofoblasto en los días 11-12 y posteriormente entre los días 15-30 (Blomberg y Zuelke, 2005) Geisert *et al.*, 2014). Se ha demostrado que los estrógenos tienen acciones locales y sistémicas (Ford y Christenson, 1979), y los efectos de tipo luteoprotectores incluyen la estimulación de la secreción de progesterona (Conley y Ford, 1989), incremento de Hormona Luteinizante (LH) y sus receptores (Garverick *et al.*, 1982). En cerdas gestantes por acción estrogénica se modifica el patrón de secreción endócrino a un patrón exocrino de PGF2 α manteniendo esta hormona en el lumen uterino, ya que en condiciones de una cerda ciclando tendría potencial de destruir el cuerpo lúteo existente (Bazer y Thatcher, 1977). Al mismo tiempo, la síntesis de Prostaglandina E₂ (PGE₂) también se modifica, y su concentración se incrementa durante el reconocimiento materno, convirtiéndose en la prostaglandina con mayor abundancia, adicionalmente de que su presencia favorece la protección del cuerpo lúteo (Franczak *et al.*, 2006; Waclawik *et al.*, 2009). Existen evidencias de que los estrógenos tiene interacción con algunas citoquinas, regulando la expresión específica en las células endometriales (Bazer *et al.*, 2008), Además de que los interferones también están implicados en la secreción de PGE₂ por el útero, en el día 15 de gestación el interferón G y el interferón D se encuentran en la membrana perinuclear así como en vesículas citoplasmáticas en algunos grupos celulares del trofodermo que están en contacto con el lumen uterino.

Previo al proceso de implantación las glándulas endometriales secretan su contenido en el lumen uterino esta secreción es denominada histotrofo o leche uterina, dicha secreción incluye moléculas que estimulan el crecimiento y desarrollo del feto, como hormonas, nutrientes, citoquinas, factores de crecimiento, entre otras (Bazer *et al.*, 2012). En el histotrofo también se encuentran moléculas como integrinas, las cuales juegan un papel importante en la adhesión y elongación (Li *et al.*, 2009)

2.5 Ventana de Implantación

Las diferencias existentes alrededor de la implantación dependen del tipo de placentación la cual puede ser invasiva o no invasiva. En la placentación no invasiva, como en el caso de la cerda, el trofotodermo y el lumen uterino mantienen un estrecho contacto, en este tipo de placenta ocurren menos cambios de decidualización con respecto a los animales con placentas más invasivas como en el caso del humano y roedores. (Spencer *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2008; Bazer, Spencer y Johnson, 2009). El término ventana de implantación se refiere al momento en el cual la receptividad en el útero es favorable para comenzar la gestación, el éxito de este proceso depende de determinadas moléculas presentes en el sitio de la implantación en el momento adecuado. Algunas de estas moléculas estudiadas en los animales domésticos son las hormonas, se ha descrito que niveles adecuados de esteroides ováricos como progesterona y estrógenos permiten que se lleve a cabo la implantación (Ma *et al.*, 2003;

Tranguch *et al.*, 2006; Ozturk y Demir, 2010). Un alto nivel de estrógenos en el momento de ovulación aumenta la proliferación de células en el endometrio, cuando la hembra está gestante éstas células detienen su proliferación y comienzan la diferenciación para lograr la receptividad uterina (King y Critchley, 2010).

La implantación representa un proceso complejo y el evento más crucial para lograr en el éxito reproductivo en los animales domésticos. Una vez que el embrión que se ha liberado de la ZP y establece contacto con el epitelio uterino, sucede la fase de aposición. Posteriormente, sigue fase de adhesión, una unión más firme, la cual promueve modificaciones en las paredes uterinas. (Bazer *et al.*, 2009) y cambios funcionales en el epitelio luminal y glandular, los cuales incluyen una disminución del glicocálix apical, la remodelación del citoesquelética del epitelio luminal y pérdida de la polaridad (Burghardt *et al.*, 2009). Las etapas iniciales de adhesión están mediadas por la presencia de moléculas de unión a carbohidratos de baja afinidad como selectinas y galectinas y posiblemente heparán sulfato, proteoglicanos, factores de crecimiento, cadherina, entre otros. Sin embargo, las adhesiones más estables se dan mediante integrinas presentes en el trofoblasto embrionario y el lumen uterino, y por proteínas de matriz extracelular; también implícitas en funciones de migración, invasión, organización de citoesqueleto y señalización recíproca (Johnson *et al.*, 2003; Brayman, Thathiah y Carson, 2004).

Los cambios en la función y secreción del epitelio uterino están regulados por una comunicación entre el epitelio y el estroma, lo cual propicia una reubicación de receptores para progesterona durante la ventana de implantación.(Bazer y Johnson, 2014). Paradójicamente la modificación de los receptores de progesterona propicia un adecuado proceso de elongación e implantación (Spencer y Bazer, 1995; Yelich *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2013), esta modificación en los receptores está asociada con la ausencia de mucina de alto peso molecular, la cual inhibe el proceso de adhesión por parte del trofoblasto (Bowen *et al.*, 1996). La importancia de la remodelación uterina se destaca para adquirir la estructura y funcionalidad, haciendo posible la correcta adhesión del blastocito en el endometrio uterino. (Aplin, 2008).

La implantación embrionaria está relacionada con signos como los que se verían en el proceso de inflamación, acompañados de mediadores de la misma que son producidos por el embrión por ejemplo: lípidos, citoquinas y factores de crecimiento (Waclawik, 2011). Algunas de estas moléculas modulan la acción de las hormonas esteroides para lograr los cambios requeridos en la matriz extracelular uterina (Wang y Dey, 2006). Existen diversos estudios acerca de moléculas de señalización como hormonas, interleucinas, factores de crecimiento entre otras, algunas se han denominado progestamedinas, propician una adecuada restructuración uterina, desarrollo embrionario y fetal, favoreciendo así el proceso de implantación. El modelo por excelencia para el estudio de estos mecanismos moleculares implícitos en la implantación han sido los rumiantes,

especialmente en el ovino, estos conocimientos han sido generalizados para todos los mamíferos, sin embargo, como ya se mencionó anteriormente la implantación entre especies difiere por el tipo de placentación. (Spencer *et al.*, 2004).

2.6 Factores de Crecimiento

Los factores de crecimiento son una clase de citoquinas generalmente de origen peptídico que funcionan como moléculas de comunicación celular, estimulan el crecimiento, migración y proliferación mediante su unión a receptores en su mayoría de membrana. Algunos factores de crecimiento se utilizan como agentes terapéuticos principalmente en terapias de regeneración tisular (Zhao *et al.*, 2015). Actualmente se han identificado diversos factores de crecimiento, sin tener un criterio específico para su clasificación. Podrían ser agrupados por su estructura y organización a nivel molecular, por la naturaleza de los receptores a los que se unen o por las cascadas de señalización que activan. Una forma muy genérica de agruparlos es por la localización de sus ligandos con respecto a la célula: (1) familia de unión a receptores de membrana y (2) familia de unión a receptores intracelulares. Un gran número de estos factores de crecimiento están implicados en vías de desarrollo y diferenciación morfogénica a nivel embrionario (Bloomfield *et al.*, 2013). Los factores de crecimiento no actúan aislados, sino en sincronía tanto espacial como temporal y de concentración en las células (Sherbet, 2011). Las modificaciones morfológicas tanto del endometrio como del embrión son imprescindibles para el desarrollo e implantación y están reguladas por factores de

crecimiento, los cuales son críticos para el desarrollo del embrión temprano y la expansión del trofoblasto dentro del lumen uterino (Corps *et al.*, 1990; Geisert *et al.*, 2012; Bazer y Johnson, 2014; Waclawik *et al.*, 2017). Los genes que codifican para ciertos factores de crecimiento como por ejemplo el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 4 (FGF 4) son de los primeros en activarse en el momento de la segmentación del embrión y el destino celular de los blastómeros. Se ha demostrado que la señalización de FGF4 es necesaria y para la especificación del endodermo primitivo en la Masa Celular Interna (Krawchuk *et al.*, 2013). Algunos de los factores de crecimiento que se han reportado en el útero y que son importantes para el proceso de implantación son: Factor de Crecimiento parecido a la Insulina (IGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Transformante (TGF), entre otros, los cuales en general facilitan la captación de blastocito, aposición, proliferación y diferenciación celular (Viganò *et al.*, 2003). La interacción de algunos factores de crecimiento con hormonas también ha sido postulada, por ejemplo en el caso de los estrógenos secretados por el embrión entre los días 10 y 15 de gestación los cuales propician la expresión del Factor de Crecimiento parecido a la Insulina (IGF) y el Factor de Crecimiento Fibroblástico 7 (FGF 7) en el útero, estos factores actúan de una forma paracrina en el trofotodermo para estimular proliferación y diferenciación celular, así como en la adhesión al lumen uterino y migración celular durante el periodo de preimplantación (Spencer *et al.*, 2004; Ka *et al.*, 2007).

El trofotodermo del embrión en desarrollo presenta algunos de los receptores de estos factores de crecimiento, tal es el caso del Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), el Receptor para el Factor de Crecimiento parecido a la Insulina tipo 1 (IGF1R) y el Receptor 2 de los Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR2). Muchos de estos receptores en el útero pudieran estar activados a través de diversas vías de señalización como son: Fosfatidilinositol 3-Kinasa (PI3K)/AKT1 y la Proteín Kinasa Activadora de Mitógenos ERK1/2MAPK (Geisert *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2016).

2.6.1 Factor de Crecimiento de Fibroblastos

Los Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) constituyen una gran familia de factores de crecimiento de origen polipeptídico que se encuentran en diversos organismos tanto vertebrados como invertebrados, no se han encontrado en organismos unicelulares. Tienen un peso molecular de entre 17 y 34 kDa en vertebrados. Existen 22 miembros de la familia en los mamíferos, agrupados en siete subfamilias y son expresados en diferentes tejidos y momentos de desarrollo (Figura 3). Entre subfamilias de FGF tienen patrones similares de expresión, algunos están presentes desde el desarrollo embrionario como es el caso de FGF3, FGF4, FGF7, FGF15, FGF17 y FGF19. (Ornitz, 2000; Ornitz y Itoh, 2001).

La función biológica de FGF es muy compleja, involucrando múltiples ligandos, receptores y cofactores, cada uno expresado con diferentes patrones

espaciales y temporales y distintas cinéticas. Se ha dedicado un esfuerzo considerable en la creación de diferentes modelos animales para el análisis de la función de FGF in vivo. Estos estudios indican claramente que la señalización de FGF está involucrada en una serie de procesos diversos en distintas etapas de desarrollo (Wilkie *et al.*, 1995), desde desarrollo embrionario temprano, organogénesis y formación de extremidades. (Thisse y Thisse, 2005). En los organismos adultos los FGF juegan un papel importante en mecanismos de reparación y homeostasis en los tejidos, también han sido blanco de investigación en cáncer (Goetz y Mohammadi, 2013; Ornitz y Itoh, 2015).

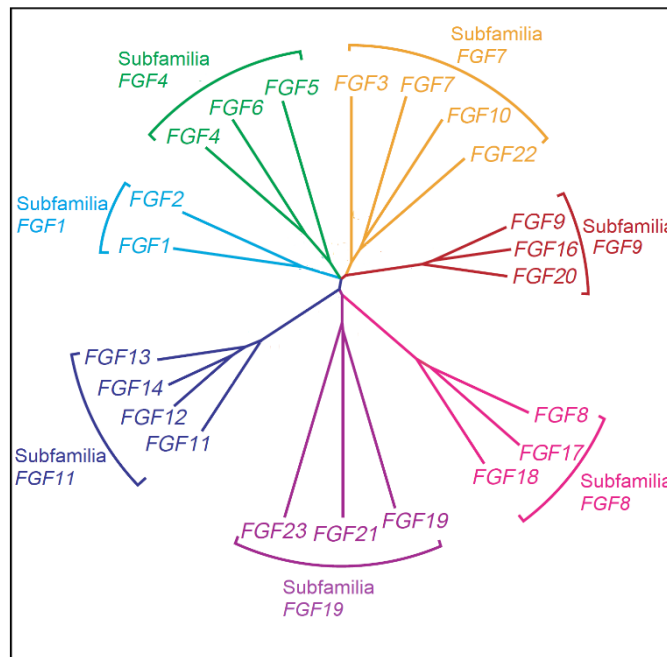


Figura 3. Subfamilias de FGF. Modificados de Itoh & Ornitz, 2004.

Generalmente los FGF señalizan de manera direccional y recíprocamente entre el epitelio y el tejido mesenquimal. La afinidad de estas señalizaciones está relacionada con la actividad propia del FGF y de su acoplamiento a un receptor

específico (Martin, 1998). Los receptores de FGF (FGFR) son de tipo tirosin quinasa, contienen dos o tres dominios de ligando extracelular y una secuencia de unión a heparina (Lee *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1990; McKeehan *et al.*, 1998). Los ligandos específicos de estos receptores pueden plegarse de diversas formas y expresarse en tejidos adyacentes, por ejemplo, el FGFR2b presente en el epitelio puede ser activado por FGF7 o por FGF10 producidos en el tejido mesenquimal (Igarashi *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006). Los típicos genes de *Fgf* contienen tres exones codificantes, con un tamaño que va desde 5 kb (*Fgf3* y *Fgf4*) hasta los 100 kb (*Fgf12*). La organización del gen está ampliamente conservada desde humanos, ratones y hasta el pez cebra, sin embargo, su funcionalidad es poco entendida. Existen diversos números de genes para FGF dispersados a lo largo del genoma, su localización supone que las familias de FGF fueron generadas a partir de duplicaciones y translocaciones dentro del genoma (Kiefer *et al.*, 1994; Arnaud *et al.*, 1999; Ornitz y Itoh, 2001).

Factores de Crecimiento de Fibroblastos en Reproducción

La actividad de algunos Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) han sido reportada en el desarrollo de órganos del sistema reproductivo, por ejemplo: FGF9 en el desarrollo testicular (Chung *et al.*, 2013) y reversión sexual (Colvin *et al.*, 2001).

Estudios más enfocados en el desarrollo embrionario de ungulados domésticos, implican a los FGF, es específico el FGF4, en el proceso de alteración en los microfilamentos y las uniones celulares promoviendo la migración celular en el trofoblasto la cual origina un cambio morfológico durante la elongación (Ornitz y Itoh, 2001; Fujii *et al.*, 2013; Valdez Magaña *et al.*, 2014; Jeong, *et al.*, 2016). Los FGF también podrían contribuir en el desarrollo del embrión debido a que propician una adecuada deposición de matriz extracelular. (Baird y Böhlen, 1991). La producción de FGF por parte del embrión y el endometrio tienen efecto en la diferenciación y proliferación del epiblasto y el trofotodermo (Yamanaka *et al.*, 2010). Investigaciones realizadas en ratones han demostrado que la falta de FGF4 y FGFR2 provoca un nulo desarrollo, y la adición de FGF4 administrado en cultivo puede recuperar el desarrollo (Feldman *et al.*, 1995). El FGF7 es expresado por las glándulas endometriales tanto de cerdas ciclando (días 12 y 15) como de cerdas gestantes, su expresión es mayor en éstas últimas y se asocia al crecimiento y diferenciación del epitelio endometrial (Ka *et al.*, 2007). Otro factor de crecimiento presente en el útero, es el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), sus receptores están activos a través de la vía de señalización de fosfatidilinositol 3 quinasa y la proteína quinasas activadas por mitógeno (Jeong *et al.*, 2013), la actividad del EFG está asociada con estimular la proliferación, migración y diferenciación del trofotodermo (Blitek *et al.*, 2012). Los receptores FGFR1 y FGFR2 han sido localizados en el epitelio luminal, el estroma y glándulas uterinas, así como en vasos sanguíneos del endometrio (Edwards *et al.*, 2011), lo cual sugiere actividad de diversas familias de FGF.

Factor de crecimiento de Fibroblastos 10

El Factor de Crecimiento de Fibroblastos 10 (FGF10) es un típico factor parácrino originalmente identificado en embrión de ratón. El gen *Fgf10* codifica para una proteína de 215 aminoácidos, ha sido identificado en todos los vertebrados en los cuales se ha estudiado (Itoh, 2016). Es un miembro de la subfamilia FGF7, donde también se encuentra el FGF22, posiblemente generados a partir de un gen ancestro común mediante duplicaciones. Las acciones parácrinas del FGF10 están mediadas por la activación del Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR) que consta de aproximadamente 800 aminoácidos con dominios tirosín quinasa extracelular, transmembranal e intracelular. El dominio extracelular del FGFR tiene a su vez tres subdominios similares a inmunoglobulinas (I, II y III). Los subdominios II y III con un sitio de unión a heparán sulfato se unen a los FGF. Siete proteínas FGFR han sido identificadas en humanos y ratones incluyendo FGFR1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c y 4. FGFRs1b, 1c, 2b, 2c, 3b y 3c se generan a partir de los genes FGFR1-FGFR3 mediante corte y empalme alternativo. Este empalme alternativo especifica la secuencia de la mitad carboxi-terminal del subdominio III de tipo inmunoglobulina, que da como resultado la isoforma IIIb o IIIc. Estas isoformas tienen diferente especificidad de unión a ligando y se expresan de manera específica dependiendo del tejido y momento de desarrollo. Se sabe que los exones IIIb y IIIc se expresan principalmente en el epitelio y el mesénquima, respectivamente (Goetz y Mohammadi, 2013; Ornitz y Itoh, 2015).

El FGF10 es esencial para la adecuada morfogénesis, debido a que participa en la formación y desarrollo de diversos órganos en la etapa embrionaria (Itoh, 2016), se ha demostrado su presencia en diversos tejidos y algunas de sus variaciones en procesos patológicos y cancerígenos. Por ejemplo, en pulmón de ratón se demostró que es indispensable para eventos tempranos de morfogénesis, así como en la proliferación de tejido adiposo. (Konishi *et al.*, 2006). Ratones con genotipo *Fgf10*^{-/-} presentaron muerte perinatal principalmente por pérdida de la funcionalidad pulmonar (Min *et al.*, 1998). En tejidos reproductivos, se ha observado que FGF10 es específicamente inducido en las células del estroma uterino por acción del estradiol, mientras que su receptor, *Fgfr2*, se detectó en células epiteliales en co-cultivo, lo cual sugiere que esta comunicación puede estar implicada durante la fase proliferativa, que es influenciada por los estrógenos (Chung *et al.*, 2015).

2.6.2 Factor de Crecimiento de Hepatocitos.

El Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) es una glicoproteína de unión a la heparina derivada del mesénquima, se secreta como una cadena única con un peso molecular de aproximadamente 92 kDa sin actividad biológica, bajo condiciones adecuadas como por ejemplo daño tisular es convertida en su forma activa mediante digestión proteolítica en un sitio específico de la molécula precursora. (Miyazawa y Shimomura, 1995; Naldini *et al.*, 1995). Su forma madura está constituida por un heterodímero. En humanos el gen que codifica para HGF

está compuesto por 18 exones y 17 intrones de aproximadamente 70kb (Fukuyama *et al.*, 1991; Saccone *et al.*, 1992). Es considerado un potente mitógeno estimulando el crecimiento del parénquima hepático, también se ha encontrado en células epiteliales, queratinocitos, melanocitos, túbulos renales, entre otros. (Matsumoto *et al.*, 1991; Zarnegar *et al.*, 1991; Halaban *et al.*, 1993). Se ha demostrado que el HGF induce la morfogénesis, adhesión celular al endotelio y mejora la supervivencia de las neuronas, así como la regeneración celular después de una lesión (Brinkmann *et al.*, 1995; Zarnegar y Michalopoulos, 1995; Stewart, 1996). La actividad biológica es lograda mediante la unión de HGF a su receptor conocido como c-MET. (Bottaro *et al.*, 1991; Weidner *et al.*, 1993). El receptor c-MET es un oligómero de dos cadenas, compuesto de una cadena de disulfuro α de 50 kDa ligada a una cadena β de 145 kDa (Giordano *et al.*, 1989). La cadena α está expuesta al exterior de la célula y la cadena β se extiende por la membrana de ésta; la cadena β contiene un dominio de tirosina quinasa (Gonzatti-Haces *et al.*, 1988) y sitios para la autofosforilación de tirosina (Ferracini *et al.*, 1991). Dicho receptor se encuentra expresado normalmente en diversos epitelios y algunos otros tipos celulares como neuronas, melanocitos, células endoteliales, células de la microglía y hematopoyéticas y también en una gran variedad de células tumorales (Zarnegar y Michalopoulos, 1995) .

Factor de Crecimiento de los Hepatocitos en la reproducción

Un posible rol de señalización entre el mesénquima y el epitelio por parte del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) y su receptor (HGFR c-MET) durante el desarrollo embrionario ha sido demostrado mediante un estudio donde se midió la expresión de genes que codifica para estos productos en la embriogénesis de ratón, suponiendo una señalización paracrina (Sonnenberg *et al.*, 1993). En el útero de hembras ovinas neonatas, se identificó el transcrito para HGF y sus receptores epiteliales (c-MET) los niveles de ARNm de FGF-10 y HGF aumentaron marcadamente después del día 21 de edad, un período caracterizado por morfogénesis y proliferación de las glándulas endometriales (Gray *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001). En el útero humano, los perfiles de expresión de HGF son coincidentes con la fase proliferativa del epitelio en el ciclo menstrual (Koji *et al.*, 1994; Sugawara *et al.*, 1997). La exposición inapropiada de ovejas neonatales a progestágenos o estrógenos desde el nacimiento o durante periodos críticos del desarrollo postnatal inhibe el crecimiento uterino (Gray *et al.*, 2000; Carpenter *et al.*, 2003) observándose patrones anormales de HGF, FGF10 y / o su expresión de receptor en el útero en aquellas ovejas neonatales expuestas a esteroides, lo que indica la importancia de los sistemas HGF y FGF10 en el desarrollo uterino postnatal (Hayashi *et al.*, 2004). Las células de la teca durante el desarrollo folicular en los bovinos producen HGF estimulando la proliferación de las células de la granulosa (Parrott y Skinner, 1998). En humanos, el líquido folicular de los oocitos maduros contiene altas cantidades de HGF, sugiriendo que este tiene una participación importante en los mecanismos de desarrollo folicular y podría ser

usado como un marcador de maduración (Kawano *et al.*, 2003). Posteriormente fue demostrado que al suplementar con HGF en cultivos de ovocitos mejoró la supervivencia y maduración (Wang *et al.*, 2018).

En conclusión, a pesar de la información disponible entorno a los mecanismos que regulan la implantación en especies domésticas, la mortalidad embrionaria temprana sigue ocurriendo de forma importante. La identificación de otros tipos de comunicación a través de diferentes factores de crecimiento que aún no han sido caracterizados es importante para esclarecer el complejo mecanismo de implantación en especies con placentación epiteliocorial como el caso del cerdo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la presencia, localización y nivel de expresión del FGF10, HGF, FGFR2, c-MET y sus vías de señalización (PI3K y ERK), en el útero de cerdas a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y en cerdas en el día 2 del ciclo estral (fase folicular) y día 12 (fase lútea), los cuales pudieran coadyuvar durante la ventana implantación.

3.2 Objetivos Específicos

1. Describir los cambios morfológicos en el tejido uterino de cerdas gestantes con ayuda de la tinción de hematoxilina & eosina y microfotografía.
2. Identificar la localización de FGF10, HGF, FGFR2, c-MET y sus vías de señalización (PI3K y ERK), en el útero de cerdas gestantes y cerdas ciclando a través de inmunohistoquímica.
3. Determinar la presencia del transcrito para los genes del FGF10, HGF, FGFR2, c-MET en útero de cerdas gestantes y cerdas ciclando mediante PCR en punto final y gel de agarosa.
4. Cuantificar el nivel de expresión relativa del transcrito para el FGF10, HGF y sus receptores con ayuda del gen de referencia actina en el útero de cerdas gestantes y cerdas ciclando.

4. Hipótesis

Los niveles de expresión y localización tisular de los factores de crecimiento FGF10 y HGF, sus receptores (FGFR2, c-MET) y sus vías de señalización (PI3K y ERK) en el útero de cerda, son diferentes en los días 12, 14, 16 y 18 de gestación y en la fase lútea y folicular del ciclo estral.

5. Materiales y Métodos

Todos los experimentos fueron llevados a cabo, bajo los lineamientos del Subcomité Institucional Para El Cuidado Y Uso De Animales Experimentales (SICUAE) del Posgrado En Ciencias De La Salud Y La Producción Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se seleccionaron cerdas nulíparas destinadas a la faena que hayan presentado al menos dos ciclos regulares, en el Centro de Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP). Las hembras fueron sincronizadas con un producto progestágeno sintético (Altrenogest-Regumate®) por vía oral a dosis de 20mg cada 24 horas durante 18 días, después de tres días de retiro del producto se evaluó la presentación de celo con apoyo de macho celador. Al dar positivo a las características conductuales de celo, fueron inseminadas artificialmente con concentración de 3000 millones de espermatozoides por dosis a las 0, 12 y 24 horas.

5.1 Toma de muestras

Las hembras fueron sacrificadas de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. (DOF - *Diario Oficial de la Federación*, 2015). Para la recolección del tracto reproductivo en los días 12, 14, 16 y 18 de gestación y de hembras vacías en los días 2 y 12 del ciclo estral (dos animales por cada día de interés), el tracto reproductivo fue extraído para ser transportado al laboratorio. Posteriormente, el útero se incidió longitudinalmente para dejar expuesto el endometrio. Se localizó el

embrión, y se colectaron muestras de útero de los sitios de implantación de acuerdo con la evaluación macroscópica. Con excepción de las hembras del día 12 de gestación, en donde los cuernos uterinos fueron disecados para realizar un lavado con Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) y obtener a los embriones que aún se encuentran flotando en el lumen uterino. En las hembras vacías se colectaron segmentos de la parte proximal, media y distal de los cuernos uterinos.

5.2 Procesamiento de las muestras

Una parte de los tejidos colectados se colocaron en Tubos (Falcon®) previamente llenados con paraformaldehído al 4% en PSB 1X buffer (pH 7.4) y mantenidos a 4°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo los tejidos fueron lavados con PSB 1X buffer (pH 7.4) y cortados para su acomodo en casetes para inclusión los cuales se almacenaron en etanol al 70% hasta su procesamiento en el histoquinate (Anexo 1). Posterior a la inclusión en parafina, las muestras fueron procesadas en laminillas para su utilización en Inmunohistoquímica (IHQ) (Anexo 2)

Otra parte de las muestras se colocó en criotubos (Cryovial®) y se almacenaron en un tanque con nitrógeno líquido para ser transportados hasta su almacenamiento a -80°C para extracción de Ácidos Ribonucleicos (RNA) y estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tanto punto final como tiempo real.

5.3 Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)

Se realizó la tinción H&E en tres cortes distintos por día de gestación para su evaluación morfológica con ayuda de fotomicrografía, se realizaron capturas del epitelio de revestimiento, endometrio y miometrio (Anexo 3).

5.4 Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN) del tejido uterino.

Del total de muestras obtenidas se eligieron cuatro por día de estudio, en las cuales se realizó la extracción de RNA mediante la técnica con TRIzol® y cloroformo con base en las recomendaciones del proveedor (Invitrogen® TRIzol® Reagent) y algunas modificaciones para su optimización (Anexo 4). Todo el material desechable como puntas y tubos fueron nuevos, estériles y libres de DNAsas y RNAsas. Otros instrumentos como mortero, pinzas y tijeras se esterilizaron en autoclave y fueron tratados con la solución ARNasa RNaseZap® la cual también se utilizó para limpieza del equipo y superficies posterior a su desinfección con etanol al 70%. Todo lo anterior se manipuló con guantes estériles. Al finalizar la extracción se disolvió el pellet de RNA agregando desde 35µl y hasta 50µl de agua con DEPC dependiendo del tamaño macroscópico del pellet, se pipeteó en repetidas ocasiones y se almacenó por duplicado a -80°C (Anexo 4).

5.5 Cuantificación y determinación del grado de pureza del ARN

Una vez que se resuspendió el pellet se procedió a cuantificar la concentración, lo cual se realizó en el equipo NanoDrop® (ND-1000), así como en el programa ND-1000 V3.3.0. El equipo se calibró con 1µl de agua DEPC previo a la medición. Para la lectura se colocó de igual manera 1µl por muestra. Para determinar el grado de pureza se evaluó la relación 260/280 en la cual se consideró una pureza aceptable un valor entre 1.8 y 2.01.

5.6 Diseño de primers

Los primers fueron diseñados con el programa en línea Primer BLAST. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Las secuencias fueron obtenidas del genoma reportado para *sus scrofa* en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Anexo 5).

5.7 Transcripción reversa (RT).

Todas las reacciones se realizaron con el kit Omniscript® Reverse Transcription, los componentes de la reacción se detallan en el Anexo 6 para una reacción en un volumen final de 10µl. Las condiciones fueron programadas en el termociclador para punto final a 37°C por 60 minutos y a 4°C por 5 minutos. El resultado de la reacción fue almacenado a -20°C.

5.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR).

La reacción se realizó con el kit comercial Taq PCR Master Mix a un volumen final de 10 μ l. Los componentes se detallan en el Anexo 7. El protocolo de las condiciones fue programado en el termociclador Eppendorf Mastercycler gradient®. De la siguiente manera: Desnaturalización inicial 94°C por 2:30 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación 52.1-56.5°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Se utilizó como control positivo cDNA proveniente de riñón de cerdo amplificado para el gen de interés, así como con el gen de referencia actina y como control negativo se sustituyó el cDNA por agua molecular.

5.9 Electroforesis con gel de agarosa.

El gel fue preparado al 2% con TAE 1x, previo a su solidificación se agregó 0.8 μ l de GelRed para su tinción. Se colocó 7 μ l del producto de amplificación de la PCR punto final más 1.3 μ l de buffer de carga por pozo, así como 2 μ l de marcador de peso molecular de 100 pb. Se corrió por 90 minutos a 84 volts protegiendo la cámara de la luz. La imagen se capturó en el equipo Gel Logic 200 Imaging System® y optimizada con el programa Molecular Imaging Software.

5.10 Estandarización de la técnica de Inmunohistoquímica

Previo a la realización de la inmunohistoquímica con los anticuerpos de interés, se verifico la viabilidad del tejido uterino utilizando un anticuerpo de proliferación PCNA, el cual se expresa en los núcleos de las células estromales y en el trofoblasto (Figura 4). Posteriormente, se verificó que los anticuerpos a estudiar funcionaran correctamente, y para esto se utilizó riñón porcino como control positivo (Figura 5). Finalmente, las proteínas de interés fueron buscadas en cortes histológicos de útero de cerdas gestantes en los días 12, 14,16 y 18, así como en útero de cerdas en los días 2 y 12 del ciclo estral. Se efectuó la validación de los anticuerpos en tejido de hígado y riñón de cerda con el protocolo descrito en el Anexo 8, como control negativo se omitió el uso de anticuerpo primario (Figura 6). Los anticuerpos utilizados, así como sus diluciones se detallan en la Tabla 2.

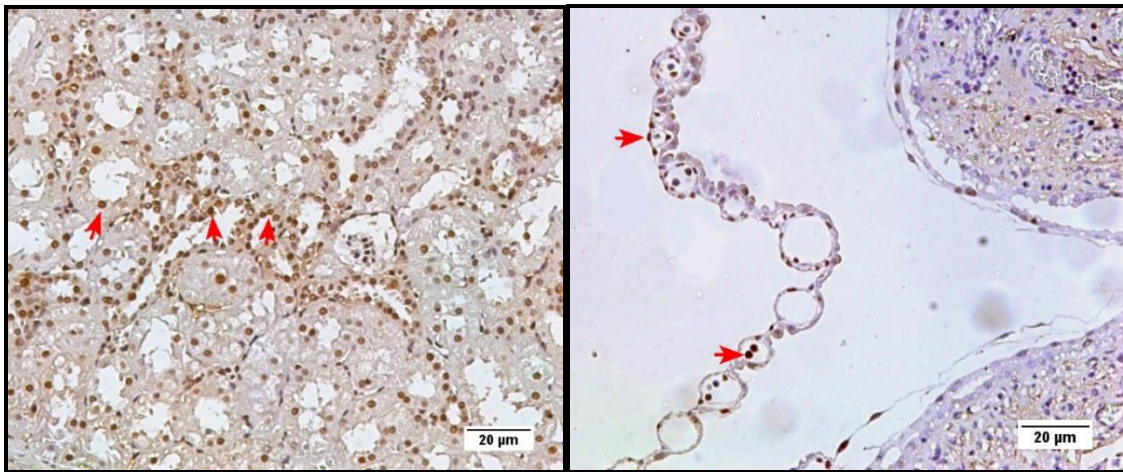


Figura 4. Control positivo de inmunohistoquímica con el anticuerpo PCNA.200X

Izquierda: riñón de cerdo las flechas señalan marca positiva en los núcleos de las células de los túbulos colectores. Derecha: útero gestante y trofoblasto, las flechas indican la marca positiva en los núcleos de las células en proliferación.

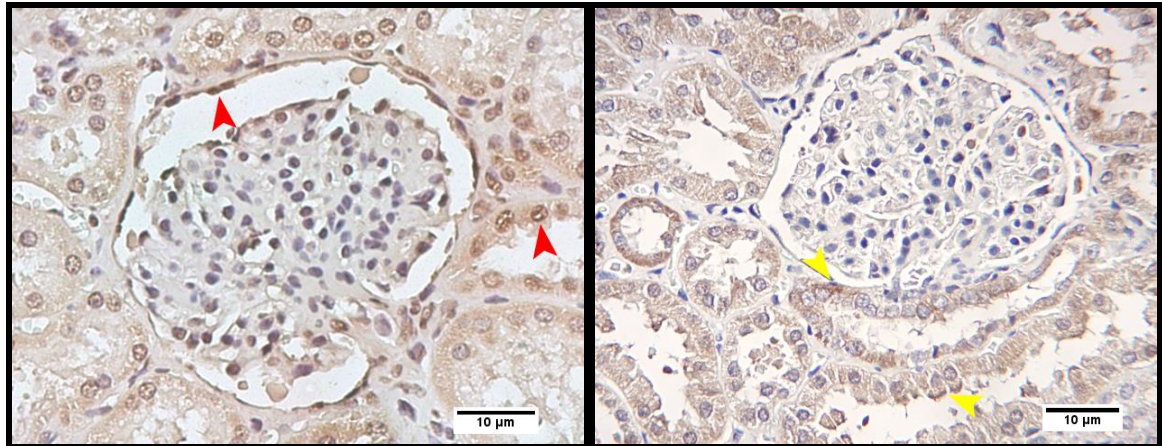


Figura 5. Control de FGF10 y HGF en riñón porcino.

Derecha: riñón con el Ac FGF10, marca en el núcleo de algunas células de los túbulos colectores, así como en la periferia del glomérulo (flechas amarillas). Izquierda: riñón de cerdo las flechas rojas señalan marca positiva en el citoplasma perinuclear de los túbulos colectores.

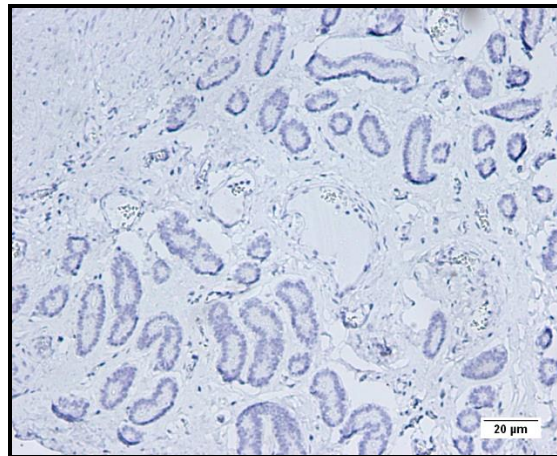


Figura 6. Control negativo de inmunohistoquímica en muestra de útero. 200X

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios, número de catálogo y diluciones utilizadas

Anticuerpo primario	Número de catálogo	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Factor de Crecimiento de Fibroblastos 10 (FGF10)	Polyclonal antibody MBS551017	1:50	Biotinylated anti-rabbit IgG Vector Laboratories	1:100
Receptor para el Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo2. (FGFR2/Bek C-8)	Monoclonal antibody sc-6930	1:100	Biotinylated anti-mouse IgG Vector Laboratories	1:100
Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF)	Polyclonal antibody ab24865	1:50	Biotinylated anti-rabbit IgG Vector Laboratories	1:100
Receptor para Factor el de Crecimiento de Hepatocitos (c-MET)	Polyclonal antibody H9786	1:100	Biotinylated anti-goat IgG Vector Laboratories	1:100
p-ERK	Monoclonal antibody sc-7383	1:100	Biotinylated anti-mouse IgG Vector Laboratories	1:100
PCNA (PC10)	Monoclonal antibody sc-56	1:200	Biotinylated anti-mouse IgG Vector Laboratories	1:100
Vimentina (C-V9)	Monoclonal Mouse M0725	1:100	Biotinylated anti-mouse IgG Vector Laboratories	1:100
Fosfatidil Inositol 3 quinasa. (PI3-K) (A8)	Monoclonal antibody sc-55589	1:100	Biotinylated anti-mouse IgG Vector Laboratories	

5.11 Imágenes de fotomicrografía.

Se obtuvieron capturas del epitelio luminal, estroma, miometrio y epitelio glandular de los cortes teñidos con H y E, así como de los cortes procesados por IHQ para los días de gestación y ciclo estral. Las imágenes se tomaron en cuatro diferentes aumentos 25X, 100X, 200X y 400X en el microscopio Axioskop 2 plus adaptado a la cámara Axiocam 506 color y manipuladas por el programa ZEISS ZEN Microscope. Posteriormente la medición y edición se realizó con el programa ImageJ.

5.12 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).

Previo a la evaluación individual en las muestras de interés se realizó el rango dinámico para cada uno de los genes a partir de un concentrado del cDNA de todas muestras. Se evaluaron 4 puntos en una dilución 1:4 a partir de 150 ng y hasta 2.34 ng. Con los valores del Ciclo umbral (Ct) y el logaritmo de las concentraciones evaluadas se corrió una prueba de regresión lineal. También fue evaluada la curva de disociación (Anexo 9). Se realizaron tres repeticiones para cada día del ciclo estral y de gestación evaluado. Cada muestra fue cuantificada por duplicado, para determinar el nivel de expresión relativa se utilizó el gen de referencia β -Actina. Las reacciones fueron analizadas con el kit QuantiNova® SYBR® Green PCR (Qiagen), utilizando el equipo MyGo Pro® en un volumen final de 10 μ l por reacción, los componentes de protocolo se detallan en el Anexo 10.

5.13 Análisis estadístico

Los resultados de la Reacción de Cadena de la Polimerasa en tiempo real fueron analizados con el programa SAS en el cual los resultados de la relación con el gen de referencia se analizaron bajo un modelo de efectos mixtos y el método de máxima verosimilitud residual, para determinar diferencia entre los días estudiados se evaluaron los resultados de la prueba post hoc de Tukey. Se consideró diferencia estadísticamente significativa valores de $P < 0.05$.

6. Resultados

6.1 Descripción histológica del útero.

El útero de las cerdas en gestación temprana presenta las tres capas características del órgano: endometrio, miometrio y perimetrio (Figura 7). A continuación, se describen algunas diferencias en la proporción de estas capas en los diferentes días de gestación.

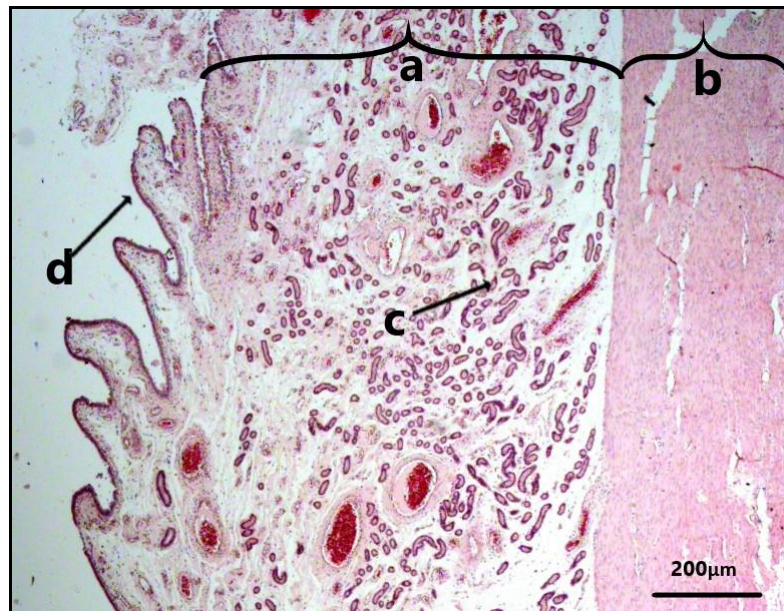


Figura 7. Corte transversal de la pared uterina de cerda.
a, mucosa; b, muscular (MI); c, glándulas uterinas (GE); d, pliegues endometriales. Tinción Hematoxilina y Eosina. 25X

6.1.1 Útero día 12 de gestación.

Los pliegues endometriales no son comunes en esta etapa de la gestación, la proporción de endometrio-miometrio es prácticamente 1:1, esta proporción se conserva entre la capa muscular circular interna con respecto a la longitudinal

externa. La mayoría de las glándulas se encuentran cercanas al miometrio, tienen un diámetro estrecho. Los vasos sanguíneos a pesar de estar distribuidos en todo el endometrio e incluso en el miometrio tienden a agruparse en la mitad más cercana al lumen uterino (Figura 8). El epitelio de revestimiento es pseudoestratificado. Hay mayor incidencia de núcleos en la porción subepitelial, estos con intensa basofilia. El calibre del endotelio vascular es muy delgado (Figura 9).

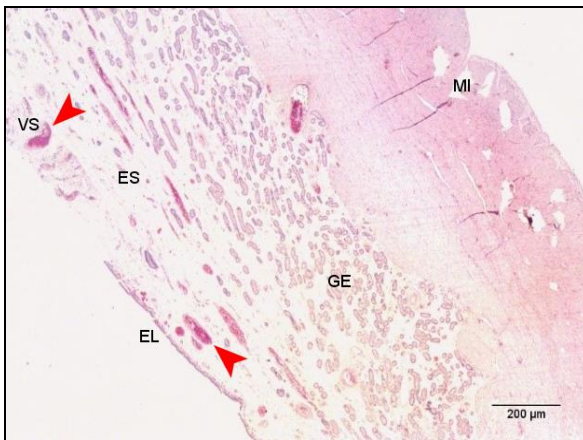


Figura 8. Corte transversal de la pared uterina de cerda en el día 12 de gestación. Tinción Hematoxilina y Eosina 25X. Vaso Sanguíneo (VS), Estroma (ES), Epitelio Luminal (EL), Glándulas Endometriales (GE), Miometrio (MI).

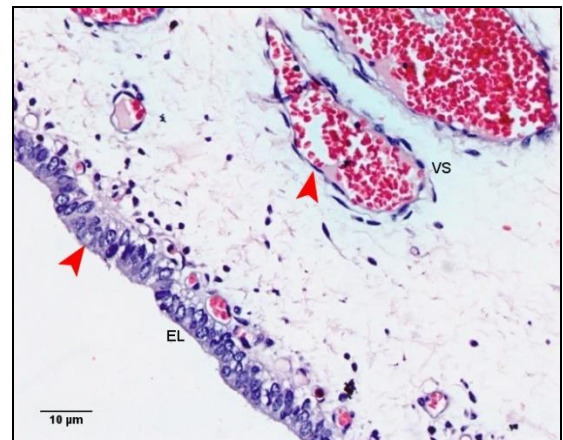


Figura 9. Epitelio de revestimiento y endometrio de cerda en el día 12 de gestación. Tinción Hematoxilina y Eosina 400X. Vaso Sanguíneo (VS), Epitelio Luminal (EL).

6.1.2 Útero día 14 de gestación.

La incidencia y altura de los pliegues es mayor con respecto al día 12 de gestación. El grosor del miometrio incrementa principalmente de la capa circular interna, al igual que el diámetro de los vasos sanguíneos y grosor de la pared del endotelio (Figura 10). La presencia de epitelio de revestimiento pseudoestratificado y zonas de transición a epitelio de revestimiento estratificado

son más abundantes (Figura 11). Existencia de glándulas endometriales de diferentes calibres con contenido acidófilo, son muy evidentes en la región del endometrio cercana a la capa muscular (Figura 12).

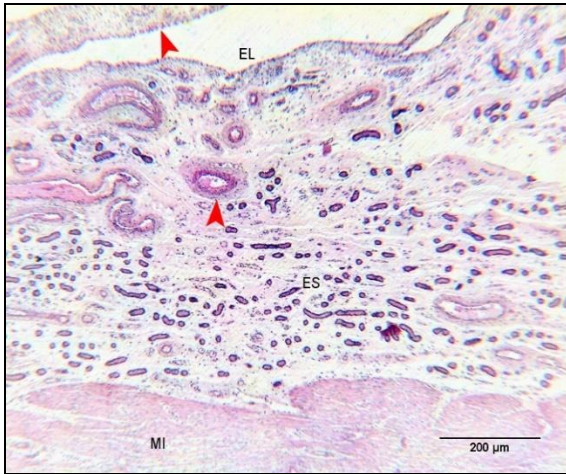


Figura 10. Corte transversal de la pared uterina de cerda en el día 14 de gestación. Tinción Hematoxilina y Eosina. 40X. Epitelio Luminal (EL), Miometrio (MI).

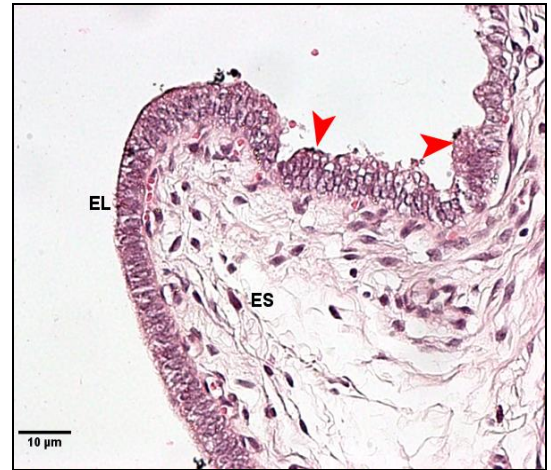


Figura 11. Epitelio de revestimiento y endometrio de cerda en el día 14 de gestación. Tinción Hematoxilina y Eosina 400X. Estroma (ES), Epitelio Luminal (EL).

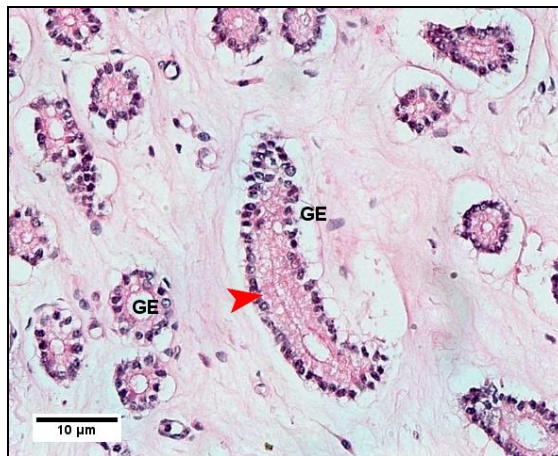


Figura 12. Glándulas endometriales de cerda en el día 14 de gestación. Tinción Hematoxilina y Eosina 400X. Glándulas Endometriales (GE).

6.1.3 Útero día 16 de gestación.

Para el día 16 de gestación, los pliegues endometriales se vuelven más largos, el miometrio incrementa su grosor y aparecen vasos sanguíneos de gran calibre entre las capas musculares del miometrio (Figura 13). El epitelio de revestimiento es cúbico simple y los vasos sanguíneos se localizan cerca del epitelio. En cambio, las glándulas endometriales tienen una disposición predominantemente cerca del miometrio y con un diámetro estrecho, el tamaño de la luz en estas es muy pequeño y en algunas parece inexistente (Figura 14).

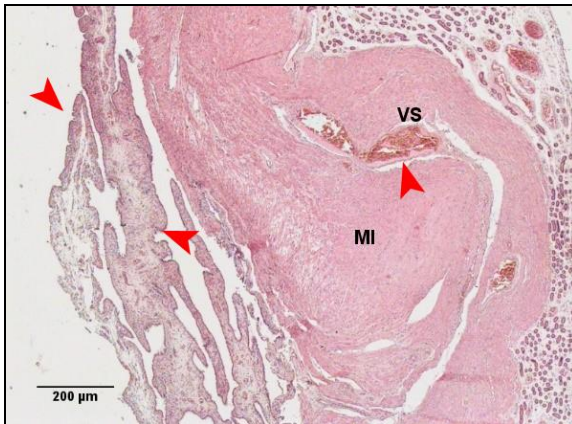


Figura 13. Corte transversal de la pared uterina de cerda en el día 16 de gestación. Tinción Hematoxilina y Eosina. 25X. Vaso Sanguíneo (VS), Miometrio (MI).

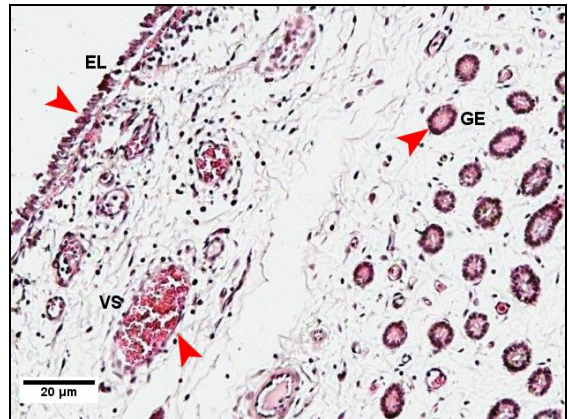


Figura 14. Epitelio de revestimiento y endometrio de cerda en el día 16 de gestación. Hematoxilina y Eosina 200X. Vaso Sanguíneo (VS), Epitelio Luminal (EL), Glándulas Endometriales (GE).

6.1.4 Útero día 18 de gestación.

Los pliegues endometriales son cada vez más grandes y con mayor cantidad de vasos sanguíneos, la proporción de endometrio ha rebasado a la proporción del miometrio. Aparecen glándulas con aspecto ondulatorio contrario a las que se habían observado con anterioridad en el día 12 y 14, las cuales, en su mayoría

eran circulares o ligeramente alargadas (Figura 15). El epitelio de revestimiento es de tipo pseudoestratificado con vasos sanguíneos muy cercanos.

En la Figura 16, se puede observar una imagen con la presencia de una sección del trofoblasto en la fase de aposición durante el proceso de implantación. Las glándulas endometriales son de gran tamaño y el epitelio glandular puede llegar a tener varias capas celulares, lo cual no se ha observado en otros días de gestación estudiados (Figura 17).

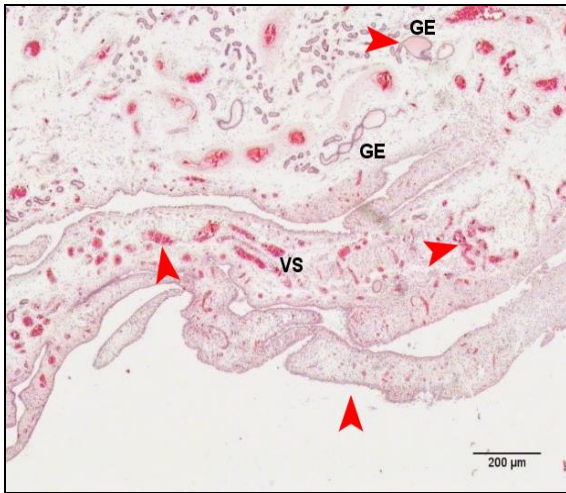


Figura 15. Corte transversal de la pared uterina de cerda en el día 18 de gestación. Tinción Hematoxilina y Eosina. 25X. Vaso Sanguíneo (VS), Glándulas Endometriales (GE).

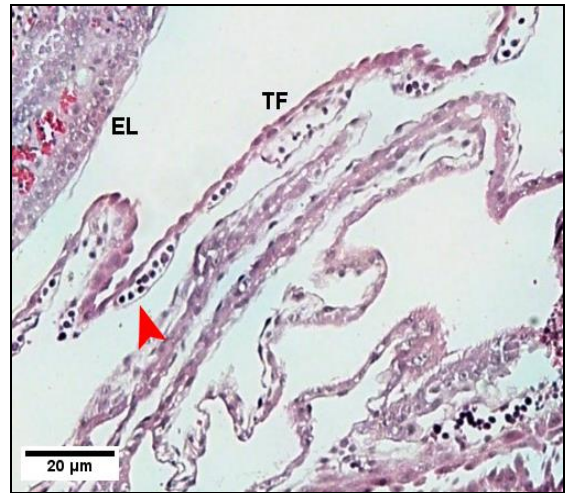


Figura 16. Epitelio de revestimiento y embrión elongado en el día 18 de gestación. Hematoxilina y Eosina. 200X. Epitelio Luminal (EL), Trofoblasto (TF).

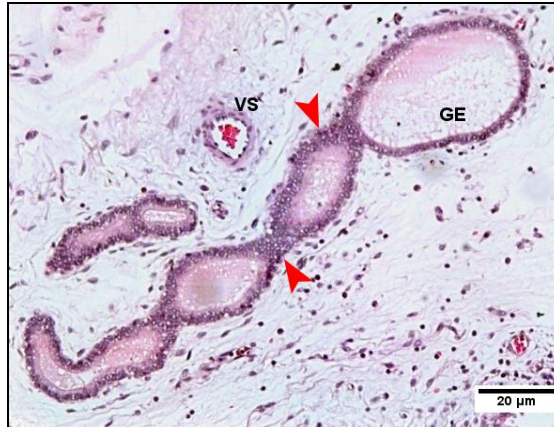


Figura 17. Glándulas endometriales de cerda en el día 18 de gestación.
Tinción Hematoxilina y Eosina. 200X Vaso Sanguíneo (VS), Glándulas Endometriales (GE).

6.2 Extracción de ARN cerdas gestantes y ciclando.

El grado de pureza del ARN extraído mostró calidad aceptable en la relación 260/280, este fue utilizado en reacciones de PCR en punto final y tiempo real. En la siguiente tabla se muestran las concentraciones ARN (ng/μl) obtenido de tejido de útero en diferentes días de gestación y ciclo estral. (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración (ng/ μl) y grado de pureza del RNA

Día de estudio	Identificación de la muestra	Concentración (ng/ μl)	Relación 260/280
Gestación 12	134	798	1.99
	206	2524	2.03
	124	897	2.01
	207	2916	2.01
Gestación 14	431	3444	1.98
	116	419	1.9
	435	3922	1.86
	117	804	2.0
Gestación 16	278	1224	2.01
	470	1397	2.03
	280	2317	2.02
	467	2186	2.09
Gestación 18	J-4	3688	1.93
	260	2357	2.04
	J-2	1555	2.03
	257	2468	2.03
Ciclo estral 2	704	3082	2.01
	673	2664	2.04
	703	2120	2.08
	675	1706	2.03
Ciclo estral 12	543	3167	2.02
	545	3920	1.91

6.3 RT y PCR punto final.

La expresión para el gen de referencia β -Actina fue exitosa en todas las muestras y correspondiente al peso molecular esperado (Figura 18).

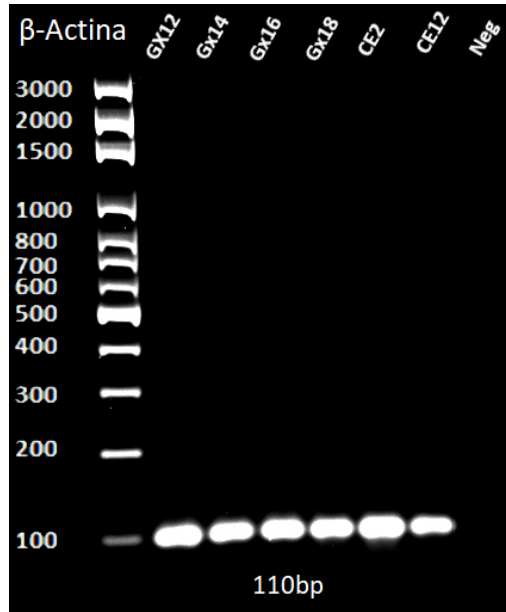


Figura 18. Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa para β -Actina.

La expresión del FGF10 y su receptor FGFR-2 estuvo presente en todas las muestras de útero analizadas: días 12, 14, 16 y 18 de gestación y días 2 y 12 del ciclo estral (Figura 19) con un tamaño de 107 bp y 74 bp respectivamente, la cual concuerda con las secuencias diseñadas para estos genes. La expresión del HGF y su receptor c-MET estuvo presente en todas las muestras de útero analizadas: días 12, 14, 16 y 18 de gestación y días 2 y 12 del ciclo estral con un peso de 181bp y 180 bp respectivamente, correspondiente al tamaño esperado (Figura 20).

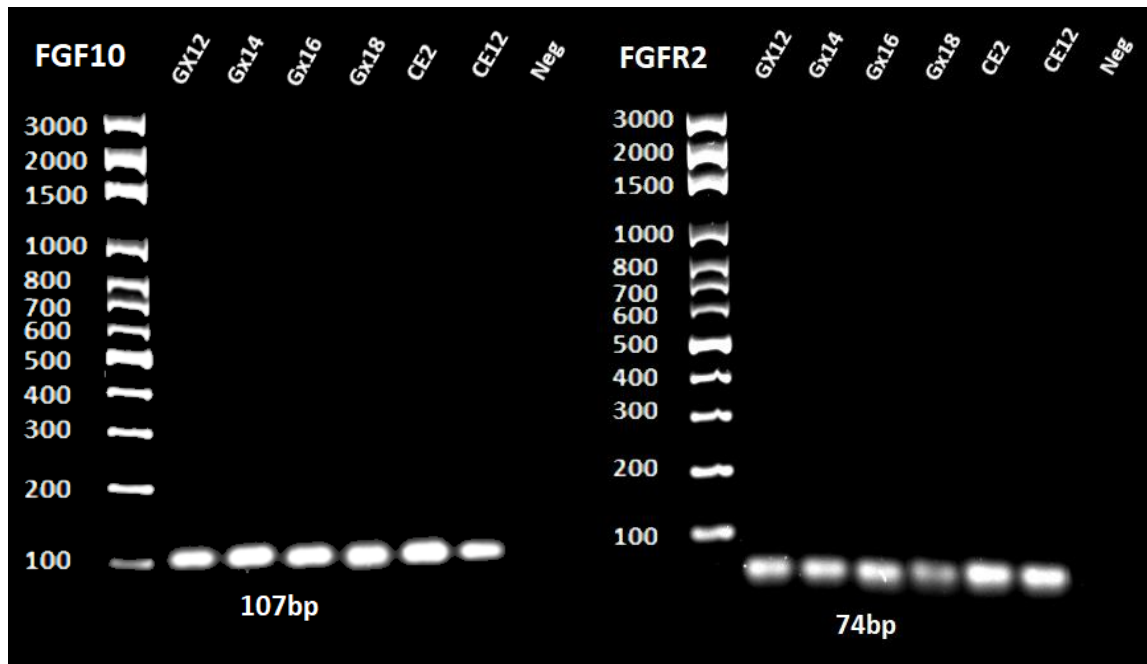


Figura 19. Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa. FGF10 y FGFR2 respectivamente

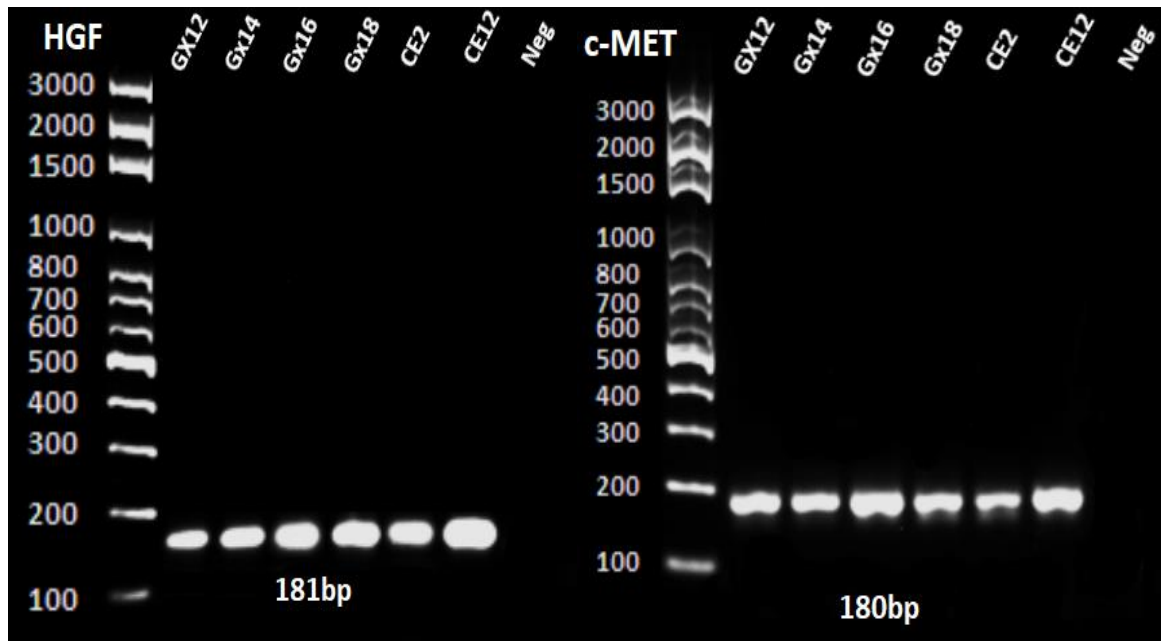


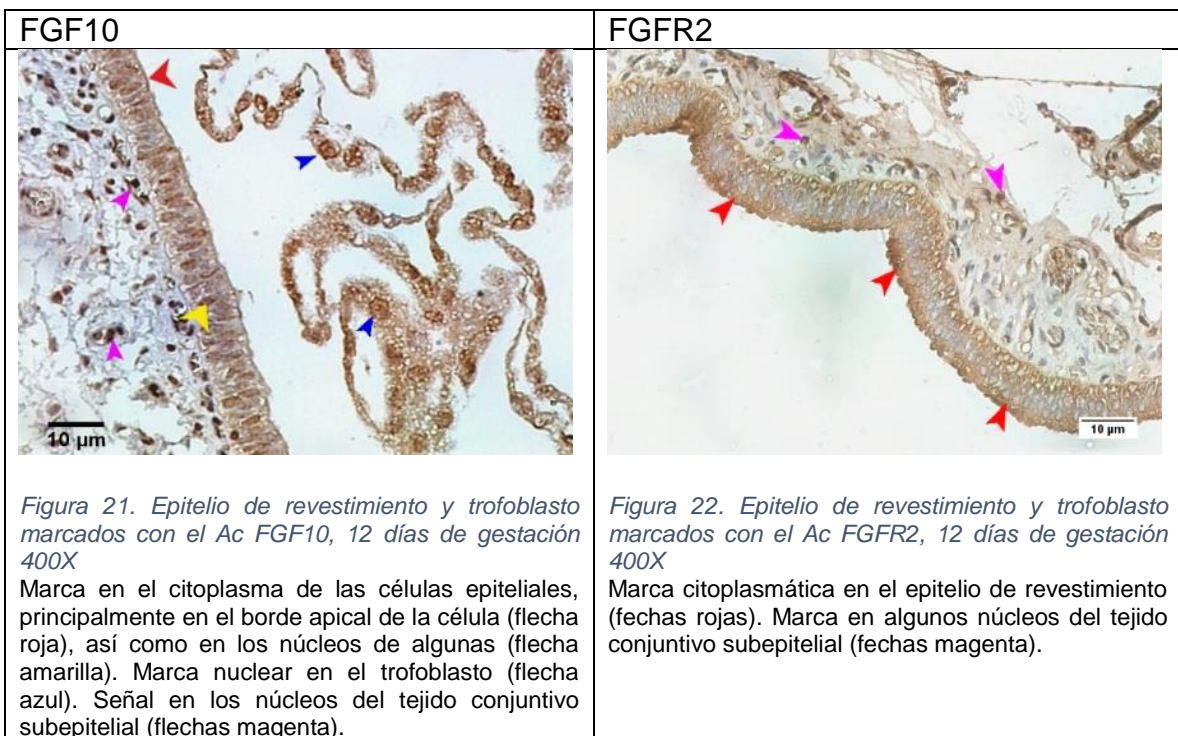
Figura 20. Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa. HGF Y c-MET respectivamente.

6.4 Inmunohistoquímica

6.4.1 Factor de Crecimiento de Fibroblastos 10 y su receptor (FGFR2) en gestantes.

FGF10 y FGFR 2 en día 12 de gestación.

El FGF10 presenta marca nuclear y citoplasmática con reforzamiento en el borde apical del epitelio de revestimiento (Figura 21). Mientras que su receptor, FGFR2, se restringe a al borde apical de este tipo celular (Figura 22). Algunos núcleos del tejido conjuntivo subepitelial presentan marca tanto para FGF10 como FGFR2. Y para el caso del miometrio, es exclusivamente señal nuclear de FGF10 (Figura 23 y Figura 24). El epitelio glandular presencia señal nuclear del FGF10 y citoplasmática del FGFR2 (Figura 25 y Figura 26).



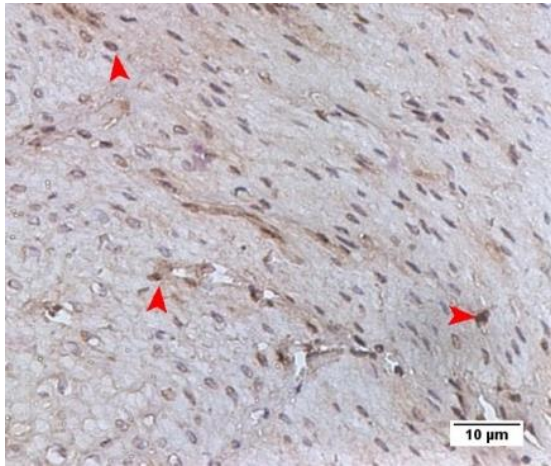


Figura 23. Miometrio marcado con el Ac FGF10, 12 días de gestación 400X. La señal se observa en los núcleos de algunas células musculares (flecha roja).

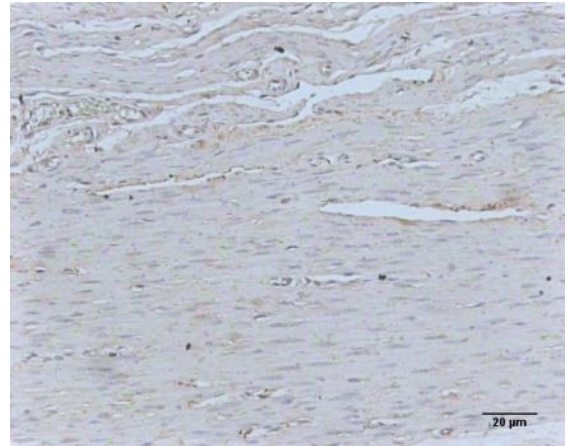


Figura 24. Miometrio con el Ac FGFR2, 12 días de gestación. 200X. Sin marca.

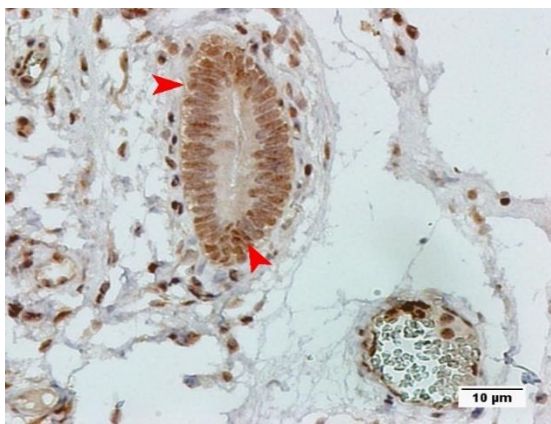


Figura 25. Glándula y vaso sanguíneo marcados con Ac FGF10, 12 días de gestación 400X. Las flechas rojas indican la señal nuclear en todas las células del epitelio glandular. En la esquina inferior derecha se puede observar la marca en algunas células del endotelio vascular.

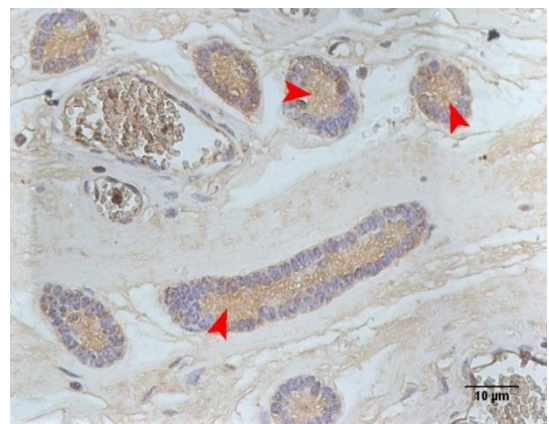


Figura 26. Glándulas endometriales marcadas con el Ac FGFR2, 12 días de gestación. 400X. Marca citoplasmática granular en el epitelio glandular.

FGF10 y FGFR 2 en día 14 de gestación.

La disposición de la señal de FGF10 continúa siendo nuclear tanto para el epitelio de revestimiento como glandular, así como en algunas células estromales (Figura 27 y Figura 31) y en el miometrio (Figura 29). El FGFR2 está presente únicamente en el borde celular en contacto con la luz uterina y en el epitelio glandular (Figura 28 y Figura 32).

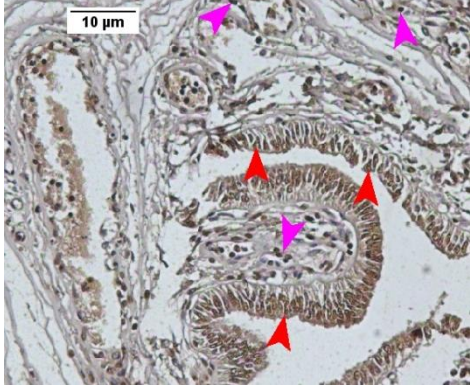
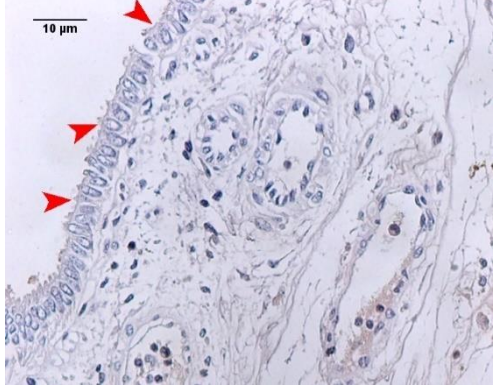
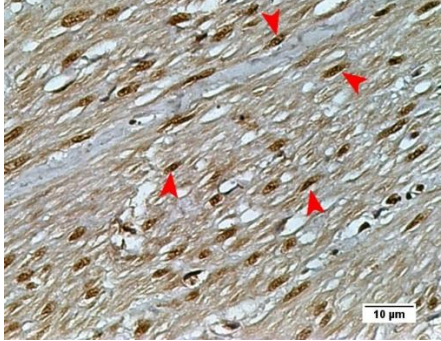
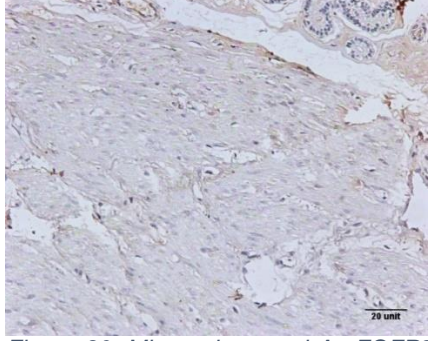
FGF10	FGFR2
 <p data-bbox="297 1129 865 1285"><i>Figura 27. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGF10, día 14 de gestación 400X</i> Marca nuclear en el epitelio de revestimiento (flechas rojas), también algunos núcleos de las células subepiteliales presentan señal (flechas magenta).</p>	 <p data-bbox="885 1129 1453 1241"><i>Figura 28. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 14 de gestación 400X.</i> Marca en el borde apical de las células del epitelio de revestimiento (flechas rojas).</p>
 <p data-bbox="297 1638 865 1734"><i>Figura 29. Miometrio marcado con el Ac FGF10, 14 días de gestación 400X.</i> Los núcleos de los miocitos presentan marca (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="885 1633 1453 1709"><i>Figura 30. Miometrio con el Ac FGFR2, 14 días de gestación 200X.</i> Sin marca.</p>



Figura 31. Glándulas marcadas con Ac FGF10, 14 días de gestación 400X.

El epitelio glandular presenta una señal nuclear (flechas rojas). Los núcleos de las células del tejido conjuntivo también se marcaron (flechas magenta).

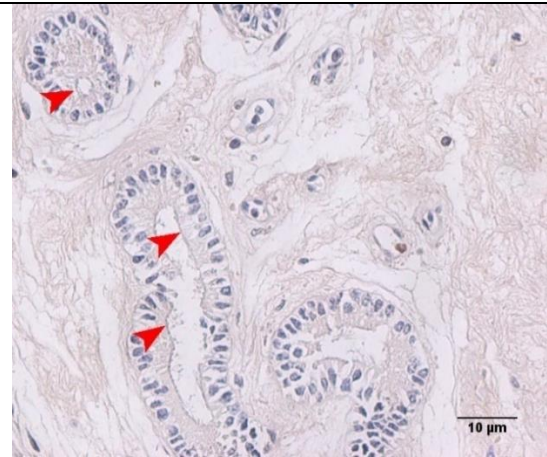

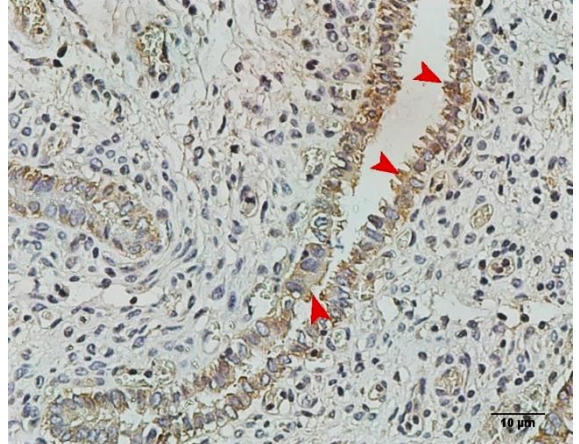
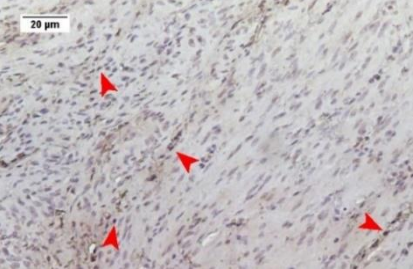

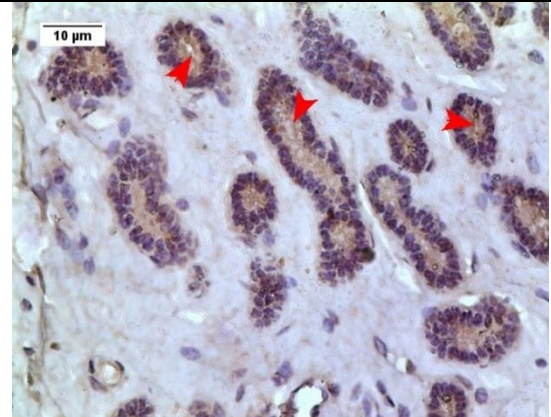
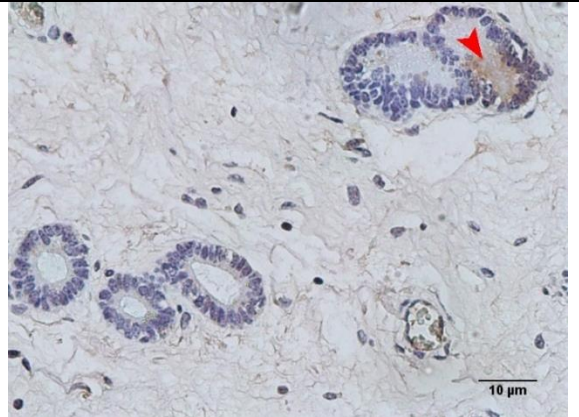


Figura 32. Glándulas marcadas con Ac FGFR2, 14 días de gestación 400X.

Marca en la membrana celular en contacto con la luz de la glándula (flechas rojas).

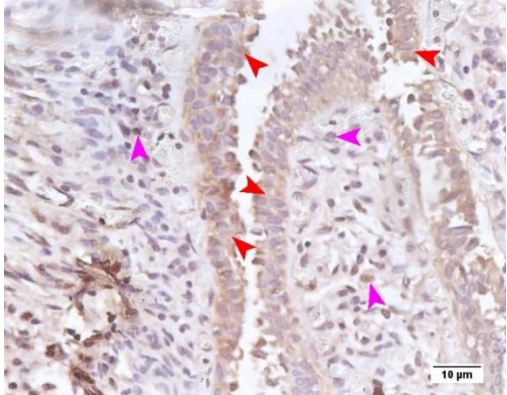
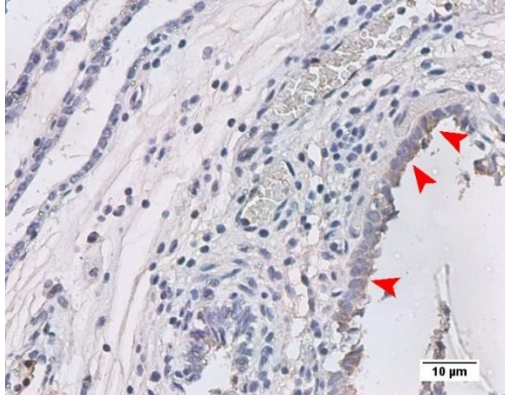
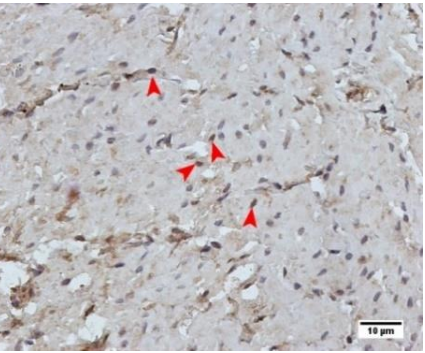
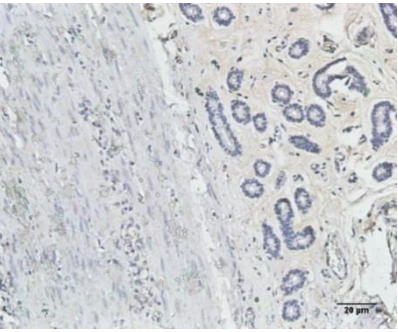
FGF10 y FGFR 2 en día 16 de gestación.

FGF10 continúa presentando señalización nuclear en células estromales en la zona subepitelial (Figura 33), en miocitos y epitelio de revestimiento (Figura 35). En este día de gestación también es citoplasmática en las glándulas endometriales (Figura 37). Su receptor sólo se encuentra en citoplasma de las células del epitelio de revestimiento y en el interior de las glándulas (Figura 34 y Figura 38).

FGF10	FGFR2
 <p data-bbox="298 825 862 982"><i>Figura 33. Epitelio de revestimiento marcado con Ac FGF10, 16 días de gestación 400X.</i> Marca citoplasmática y nuclear en el epitelio de revestimiento (flechas rojas), algunos núcleos de las células del tejido conjuntivo subepitelial también presentan señal (flechas magenta).</p>	 <p data-bbox="888 825 1451 982"><i>Figura 34. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 16 de gestación 400X.</i> Marca citoplasmática del epitelio de revestimiento (flechas rojas).</p>
 <p data-bbox="719 1024 857 1245"><i>Figura 35. Miometrio marcado con el Ac FGF10, 16 días de gestación 200X.</i></p> <p data-bbox="298 1270 857 1325">Marca de algunos núcleos de los miocitos (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="1323 1024 1451 1245"><i>Figura 36. Miometrio con el Ac FGFR2, 16 días de gestación 200X.</i> Sin señal.</p>
 <p data-bbox="298 1745 862 1848"><i>Figura 37. Glándulas marcadas con Ac FGF10, 16 días de gestación 400X.</i> Marca granular en el citoplasma de las células del epitelio glandular (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="888 1745 1451 1848"><i>Figura 38. Glándulas marcadas con Ac FGFR2, 16 días de gestación 400X.</i> Marca granular en el citoplasma y luz de las glándulas endometriales (flecha roja).</p>

FGF10 y FGFR 2 en día Gestación 18.

La señal tanto de FGF10 y FGFR2 se limita a la localización citoplasmática en el epitelio de revestimiento (Figura 39 y Figura 40), a excepción de algunos núcleos de los miocitos y de glándulas endometriales que presentan marca para FGF10 (Figura 41 y Figura 43). Sin embargo, la señal del FGFR2 desaparece de las glándulas endometriales para este día de gestación (Figura 44).

FGF10	FGFR2
 <p data-bbox="297 1220 862 1375"><i>Figura 39. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGF10, día 18 de gestación 400X.</i> Marca citoplasmática generalizada del epitelio de revestimiento (flechas rojas). Núcleos con marca de las células del tejido conjuntivo subepitelial (flechas magenta).</p>	 <p data-bbox="881 1220 1446 1325"><i>Figura 40. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 18 de gestación 400X.</i> Marca citoplasmática en el borde apical del epitelio de revestimiento (flechas rojas).</p>
 <p data-bbox="735 1419 862 1633"><i>Figura 41. Miometrio marcado con el Ac FGF10, 18 días de gestación 400X.</i></p> <p data-bbox="297 1749 862 1797">Algunos núcleos de las células musculares presentan marca (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="1292 1419 1419 1608"><i>Figura 42. Miometrio con el Ac FGFR2, 18 días de gestación 200X.</i></p> <p data-bbox="881 1749 1000 1797">Sin marca.</p>

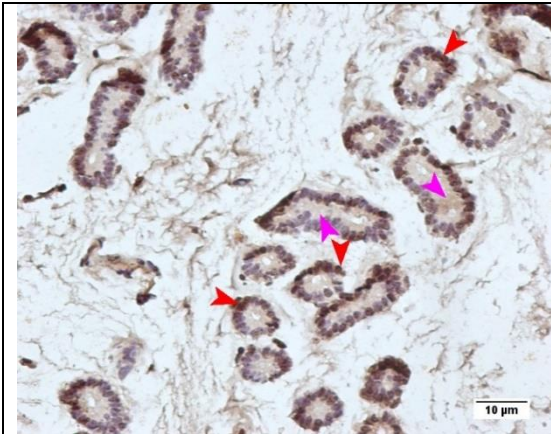


Figura 43. Glándulas marcadas con Ac FGF10, 18 días de gestación 400X. Epitelio glandular con marca nuclear (flechas rojas), también se encontró señal hacia la luz de las glándulas (flechas magenta).

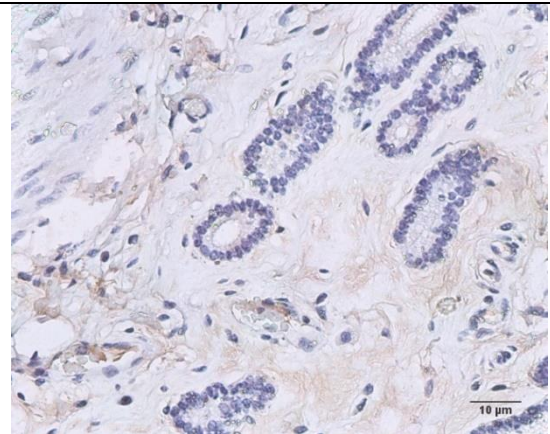
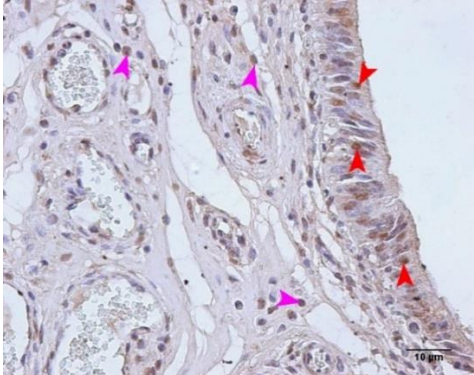
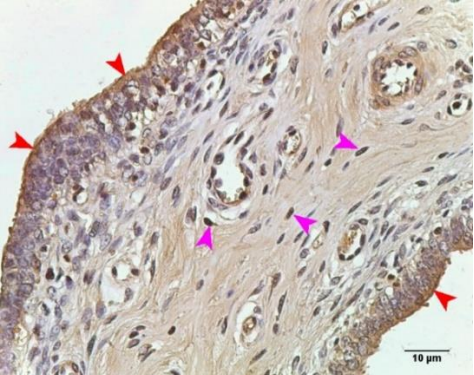
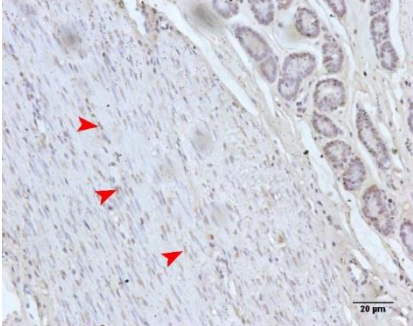
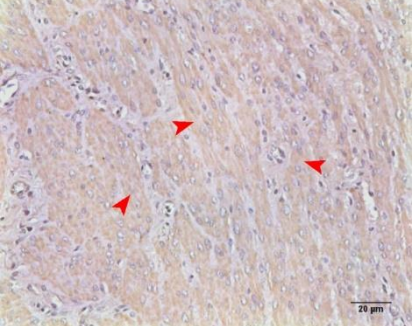
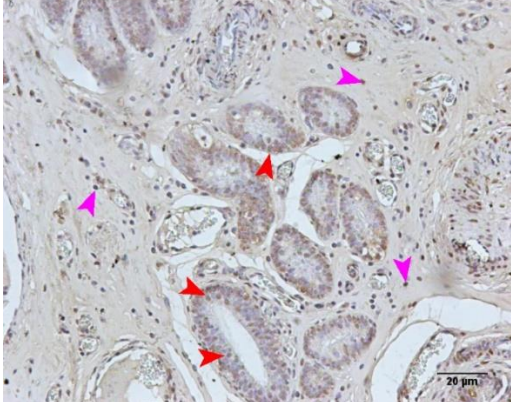
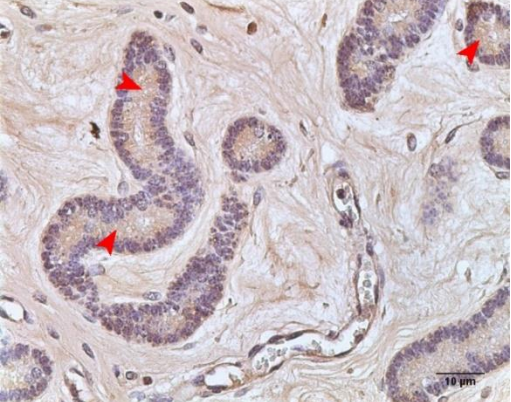


Figura 44. Glándulas con Ac FGFR2, 1 días de gestación 400X. Sin marca.

6.4.2 Factor de Crecimiento de Fibroblastos 10 y su receptor (FGFR2) en ciclo estral.

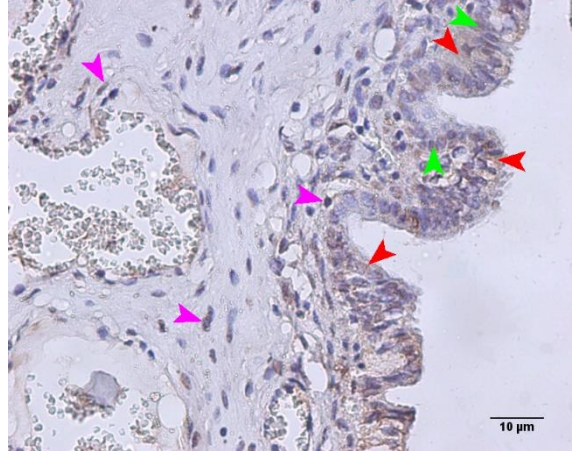
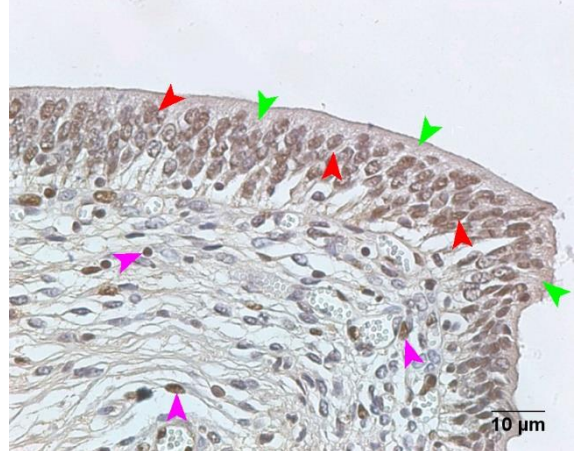
FGF10 y FGFR 2 en día 2 del ciclo estral.

FGF10 está presente en algunos núcleos de las células epiteliales y de células estromales localizadas en la porción subepitelial (Figura 45). Mientras que su receptor, FGFR2, se limita al borde en contacto con la luz uterina (Figura 46). El miometrio expresa FGF10 en algunos núcleos (Figura 47), mientras que el FGFR2 se distribuyó en las fibras musculares de manera homogénea (Figura 48). Con respecto al epitelio glandular los núcleos están marcados por el FGF10 (Figura 49), mientras que hacía la luz de la glándula señaló el FGFR2 (Figura 50).

FGF10	FGFR2
 <p data-bbox="298 680 857 842"><i>Figura 45. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGF10, día 2 del ciclo estral 400X.</i> Epitelio de revestimiento con marca citoplasmática en el borde apical, algunos núcleos de estas células presentan señal nuclear (flechas rojas), núcleos de las células estromales con señal (flechas magenta).</p>	 <p data-bbox="886 680 1445 842"><i>Figura 46. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 2 del ciclo estral 400X.</i> Marca citoplasmática en el borde apical de las células epiteliales (flechas rojas). Algunos núcleos de las células estromales presentan señal (flechas magenta).</p>
 <p data-bbox="729 875 857 1087"><i>Figura 47. Miometrio marcado con el Ac FGF10, día 2 del ciclo estral 200X.</i></p> <p data-bbox="298 1203 857 1255">Señal en algunos de los núcleos de los miocitos (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="1317 875 1445 1087"><i>Figura 48. Miometrio marcado con el Ac FGFR2, día 2 del ciclo estral 200X.</i></p> <p data-bbox="886 1203 1445 1255">Señal generalizada en las fibras musculares (Flechas rojas).</p>
 <p data-bbox="298 1667 857 1824"><i>Figura 49. Glándulas marcadas con Ac FGF10, día 2 del ciclo estral 200X.</i> Se observa en las células del epitelio glandular marca nuclear. (flechas rojas), así como en los núcleos de las células estromales (flechas magenta).</p>	 <p data-bbox="886 1667 1445 1824"><i>Figura 50. Glándulas marcadas con Ac FGFR2, día 2 del ciclo estral 400X.</i> Señal citoplasmática de las células del epitelio glandular. (flechas rojas).</p>

FGF10 y FGFR 2 en día 12 del ciclo estral.

Tanto FGF10 como FGFR2 presentaron marca en citoplasma como en núcleo, siendo más evidente para el receptor en las células del epitelio de revestimiento (Figura 51 y Figura 52). Algunos segmentos del miometrio presentan marca para FGF10 (Figura 53), mientras que FGFR2 se localizó en los núcleos de algunos miocitos (Figura 54). En las células del epitelio glandular los núcleos de algunas de ellas se marcaron con ambos anticuerpos, con mayor incidencia para el receptor (Figura 55 y Figura 56).

FGF10	FGFR2
	
<p>Figura 51. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGF10, día 12 del ciclo estral 400X. Las células epiteliales presentan señalización nuclear (flechas verdes) y citoplasmática (flechas rojas). En el estroma algunas células presentan marca nuclear (flechas magenta).</p>	<p>Figura 52. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 12 del ciclo estral 400X. El epitelio de revestimiento es estratificado con marca nuclear (flechas rojas) y citoplasmática en el borde apical de las células próximas a la luz del órgano (flechas verdes). En el estroma hay núcleos con señalización (flechas magenta).</p>

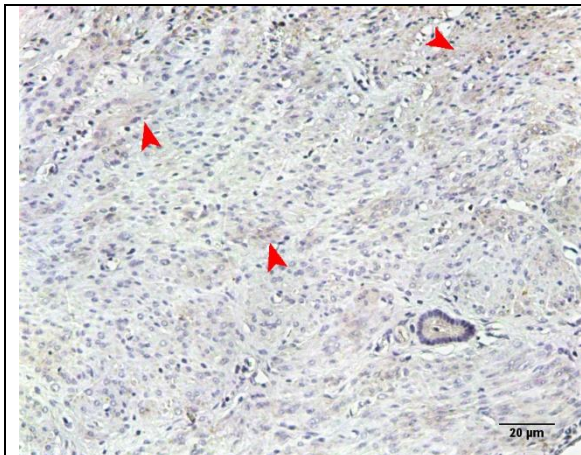


Figura 53. Miometrio marcado con el Ac FGF10, día 12 del ciclo estral 200X. Marca citoplasmática con un patrón aislado en los miocitos (flechas rojas).

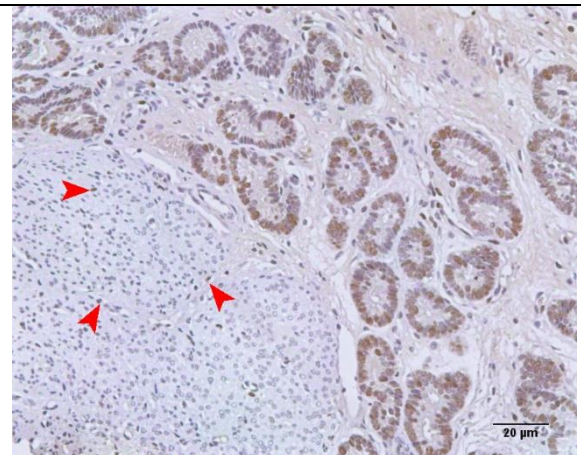


Figura 54. Miometrio marcado con el Ac FGFR2, día 12 del ciclo estral 200X. Señal en algunos núcleos de los miocitos (flechas rojas).

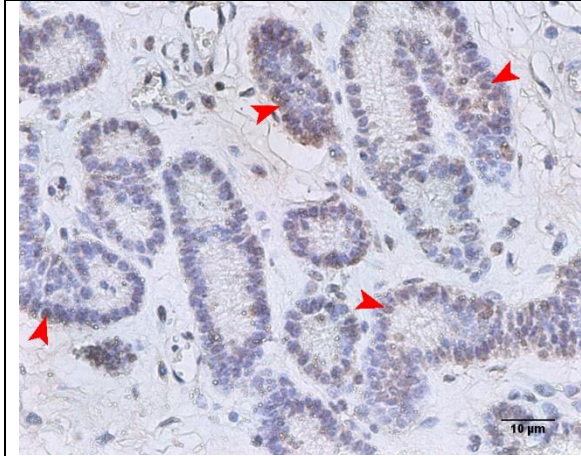


Figura 55. Glándulas marcadas con Ac FGF10, día 12 del ciclo estral 400X. Marca en algunos núcleos de las células del epitelio glandular (flechas rojas).

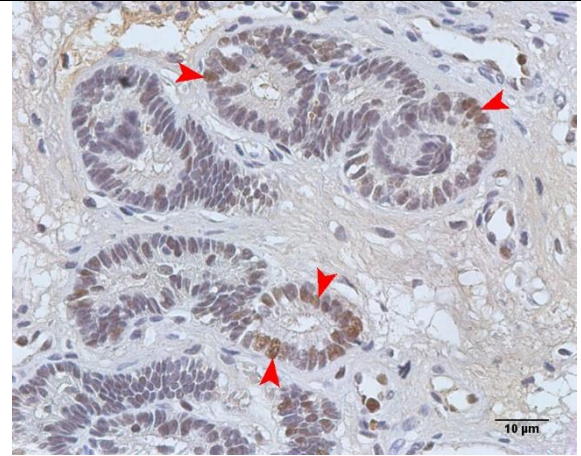


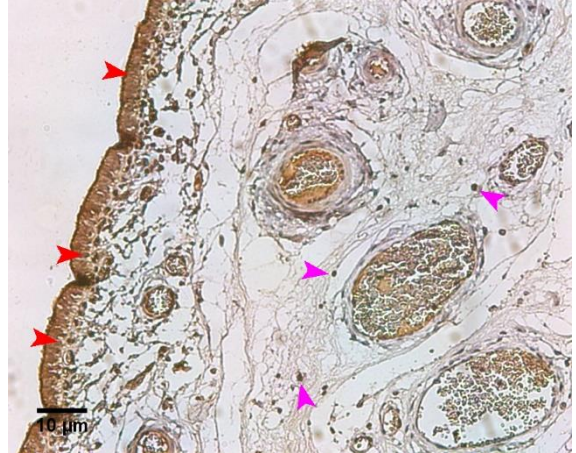
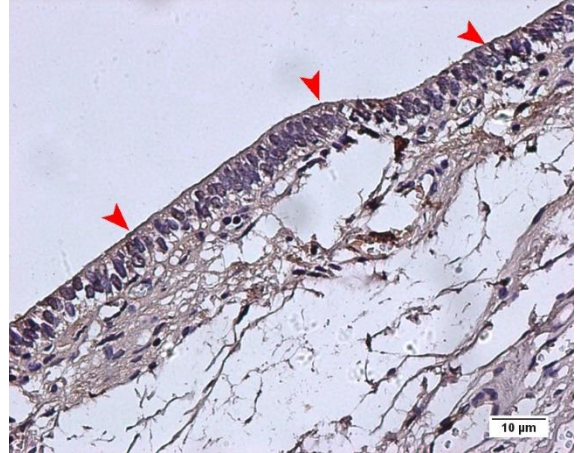
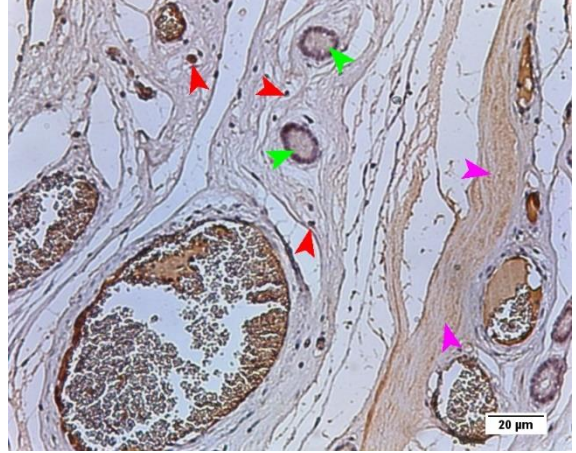
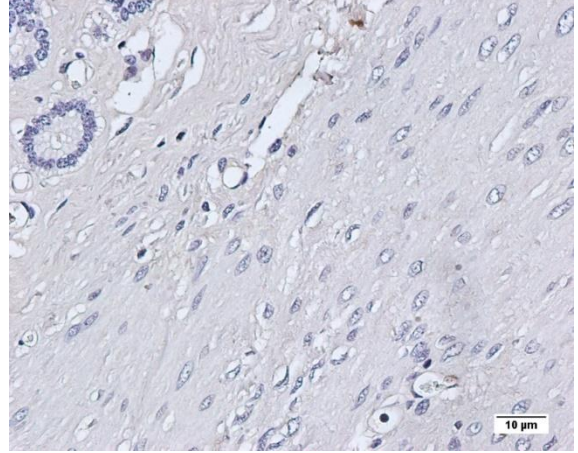
Figura 56. Glándulas marcadas con Ac FGFR2, día 12 del ciclo estral 400X. Señalización de los núcleos de algunas células del epitelio glandular.

6.4.3 Factor de Crecimiento de Hepatocitos y su receptor (c-MET) en gestantes.

HGF y c-MET en el día de gestación 12.

El HGF señaló en citoplasma y núcleos del epitelio de revestimiento (Figura 57), mientras que su receptor c-MET se limitó al borde apical de este tipo celular (Figura 58). En el miometrio sólo se encontró marca del HGF de manera generalizada en las fibras musculares (Figura 59) y en algunos núcleos de células

estromales, tanto de la parte subepitelial como glandular del endometrio (Figura 61). Las glándulas presentaron señalización citoplasmática para ambos anticuerpos, sin embargo, esta es muy tenue (Figura 62).

HGF	c-MET
 <p data-bbox="293 1045 865 1209">Figura 57. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 12 de gestación 400X. Señalización en los núcleos y citoplasma de las células del epitelio de revestimiento (flechas rojas). También se observó marca de los núcleos del tejido conjuntivo subepitelial (flechas magenta).</p>	 <p data-bbox="881 1045 1455 1209">Figura 58. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 12 de gestación 400X. Marca del citoplasma de las células del epitelio de revestimiento (flechas rojas).</p>
 <p data-bbox="293 1665 865 1850">Figura 59. Miometrio, glándulas y estroma marcado con el Ac HGF, 12 días de gestación 200X. Señalización generalizada de las fibras musculares (flechas magenta). También se observó marca nuclear de las células del estroma (flechas rojas) y en el citoplasma del epitelio glandular (flechas verdes).</p>	 <p data-bbox="881 1665 1455 1850">Figura 60. Miometrio con el Ac c-MET, 12 días de gestación 400X. Sin señal</p>

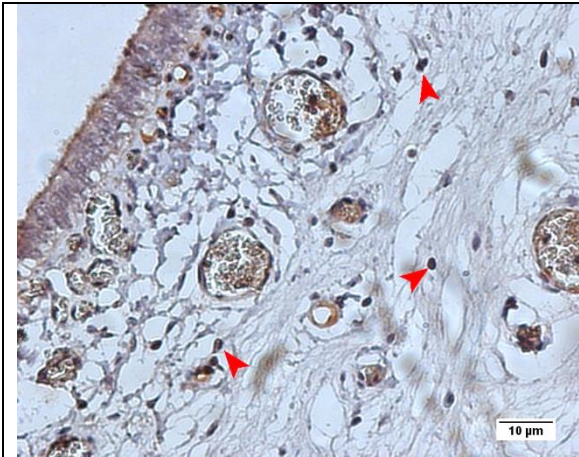


Figura 61. Estroma marcado con el Ac HGF, 12 días de gestación. 400X.
 Marca de los núcleos del tejido conjuntivo subepitelial (flechas rojas).

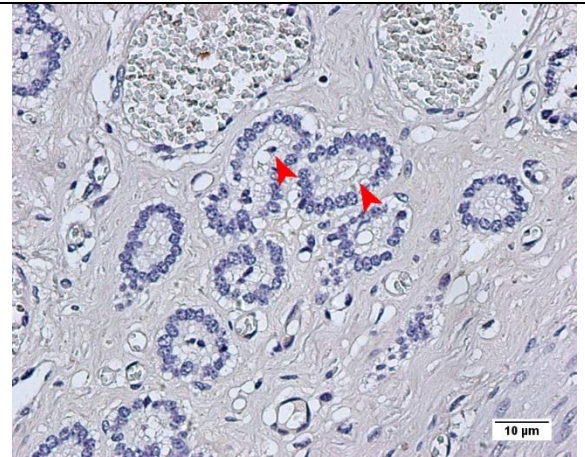
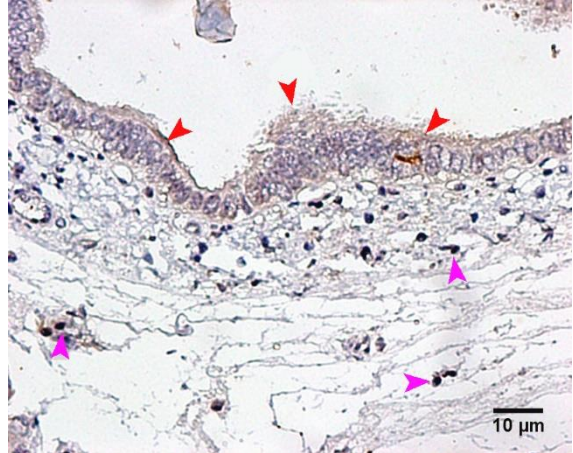
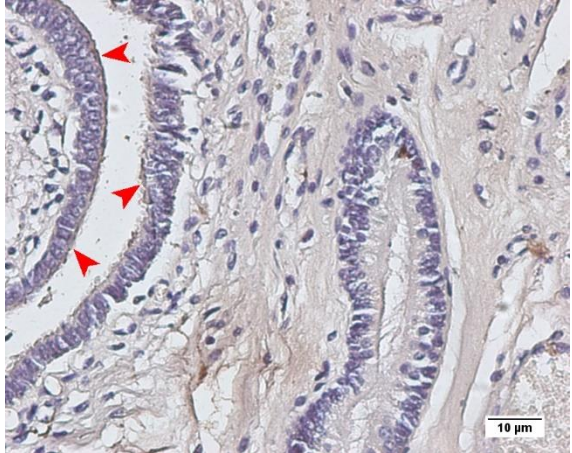
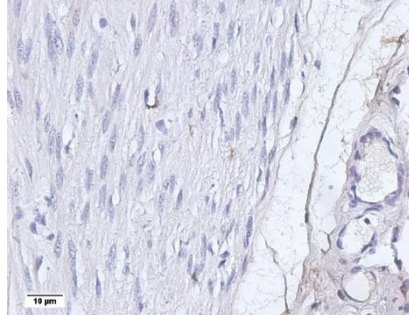
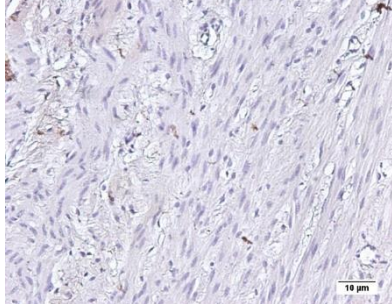
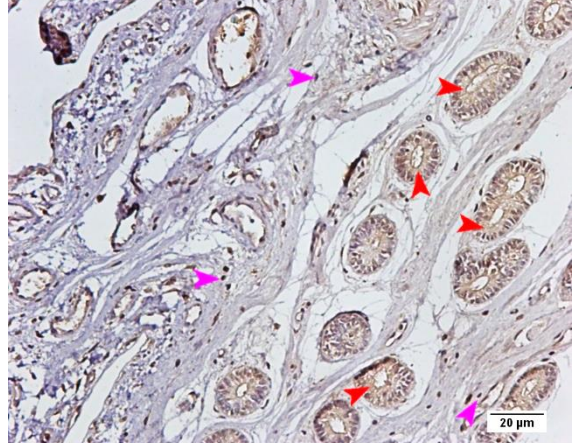
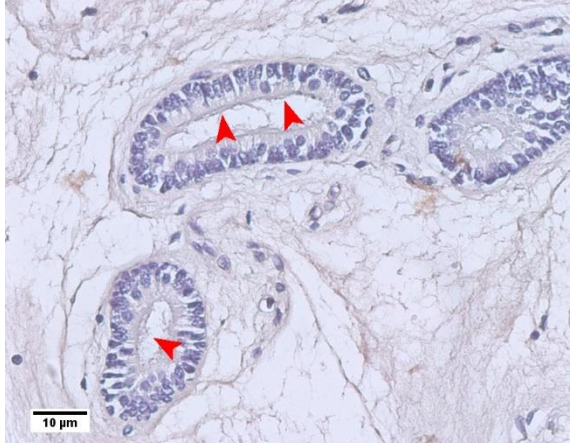


Figura 62. Glándulas endometriales marcadas con el Ac c-MET, 12 días de gestación. 400X.
 Señal granular en el citoplasma de las células del epitelio glandular (flechas rojas).

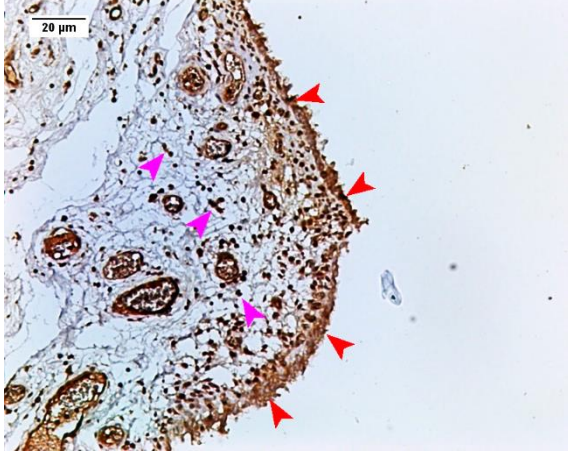
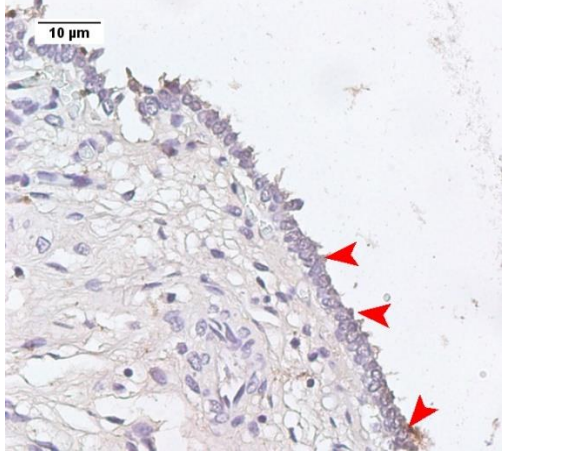
HGF y c-MET en el día de gestación 14

El epitelio de revestimiento presentó marca para HGF y su receptor que se limita al borde en contacto con la luz uterina (Figura 63 y Figura 64). Para este día de gestación no existe marca en el miometrio (Figura 65 y Figura 66). Con respecto a las glándulas la marca se presentó en el citoplasma, con reforzamiento en el borde en contacto con la luz de esta (Figura 67 y Figura 68).

HGF	c-MET
 <p data-bbox="293 751 862 919"><i>Figura 63. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 14 de gestación 400X.</i> Marca en el citoplasma del epitelio de revestimiento, principalmente en el borde en contacto con la luz uterina (flechas rojas). Señalización de los núcleos de las células estromales próximas al epitelio.</p>	 <p data-bbox="885 751 1453 919"><i>Figura 64. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 14 de gestación 400X.</i> Marca de la región apical de epitelio de revestimiento (flechas rojas).</p>
 <p data-bbox="722 947 846 1165"><i>Figura 65. Miometrio con el Ac HGF, 14 días de gestación 400X.</i> Sin marca</p>	 <p data-bbox="1297 955 1446 1144"><i>Figura 66. Miometrio con el Ac c-MET, 14 días de gestación 400X.</i> Sin marca.</p>
 <p data-bbox="293 1696 862 1858"><i>Figura 67. Glándulas endometriales y estroma marcado con el Ac HGF, 14 días de gestación. 200X.</i> Señalización citoplasmática hacia la luz de las glándulas endometriales (flechas rojas). Marca en los núcleos de las células del tejido conjuntivo.</p>	 <p data-bbox="885 1696 1453 1808"><i>Figura 68. Glándulas endometriales marcadas con el Ac c-MET, 14 días de gestación. 400X.</i> Marca en el borde del epitelio glandular en contacto con la luz (flechas rojas).</p>

HGF y c-MET en el día de gestación 16

HGF señaló en el epitelio de revestimiento tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células (Figura 69), su receptor se encontró menos evidente en el borde en contacto con la luz uterina (Figura 70). En el miometrio sólo se encontró señalización del receptor (Figura 72), caso contrario se observó en las glándulas endometriales, en las cuales HGF fue el único que señaló, tanto en el citoplasma como en el núcleo de estas células (Figura 73 y Figura 74).

HGF	c-MET
 <p data-bbox="297 1339 862 1499"><i>Figura 69. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 16 de gestación 200X.</i> Marca citoplasmática y nuclear de las células de epitelio de revestimiento (flechas rojas). También se observó señalización en los núcleos de tejido conjuntivo subepitelial.</p>	 <p data-bbox="885 1339 1448 1499"><i>Figura 70. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 16 de gestación 400X.</i> Señalización citoplasmática en la región apical de las células del epitelio de revestimiento (flechas rojas).</p>

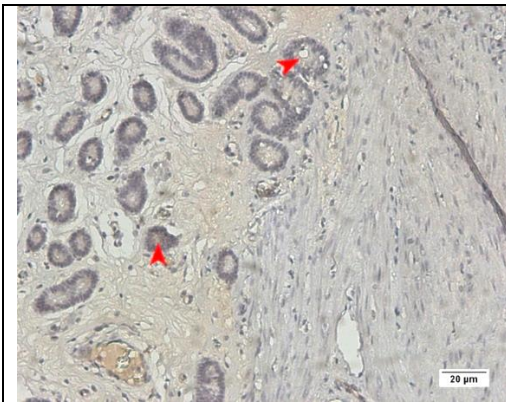


Figura 71. Miometrio y glándulas con el Ac HGF, 16 días de gestación 200X.
Señalización en el citoplasma de las células del epitelio glandular (flechas rojas).

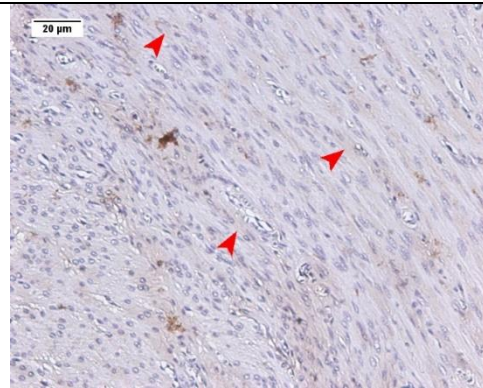


Figura 72. Miometrio marcado con el Ac c-MET, 16 días de gestación 200X.
Marca en algunas regiones de las fibras musculares (flechas rojas).

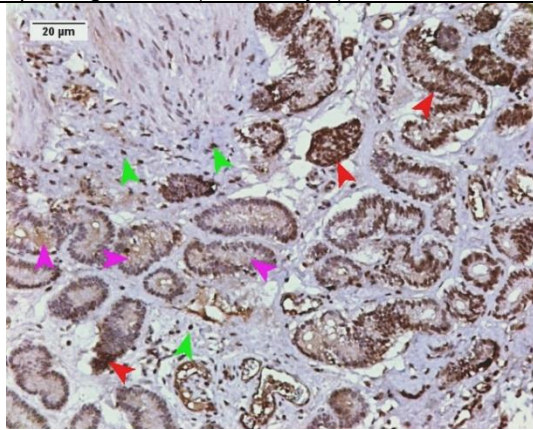


Figura 73. Glándulas endometriales marcadas con el Ac HGF, 16 días de gestación. 200X.
Marca en los núcleos del epitelio glandular (flechas rojas), así como en el citoplasma y luz de estas (flechas magenta). Los núcleos de las células estromales presentan señalización.

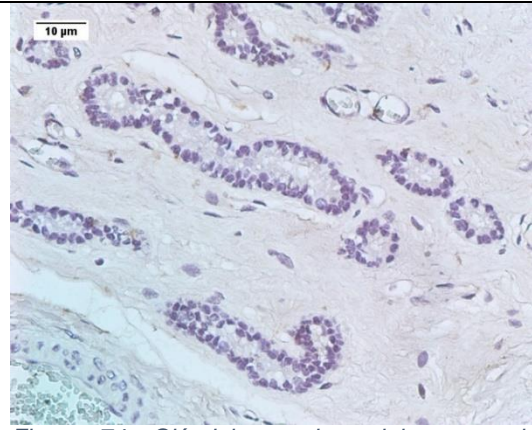
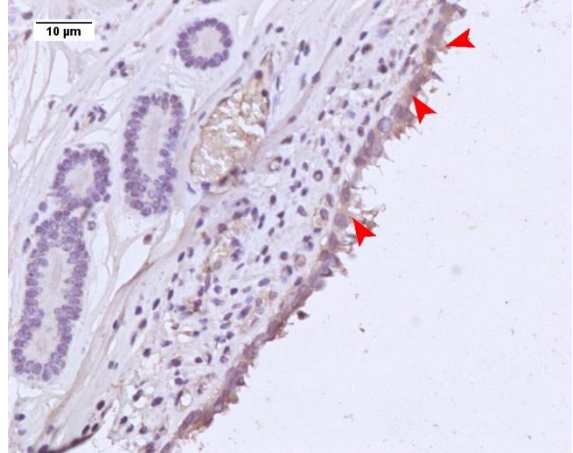
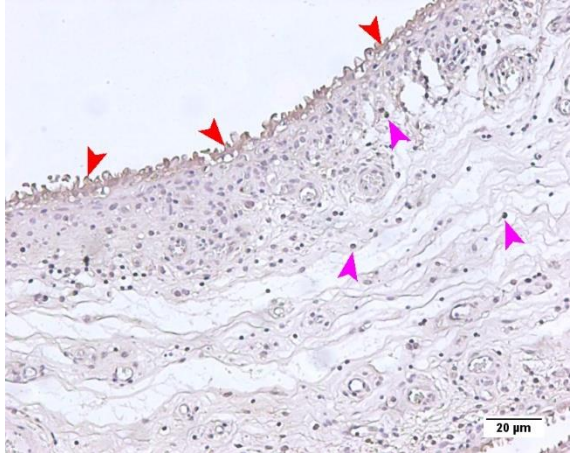
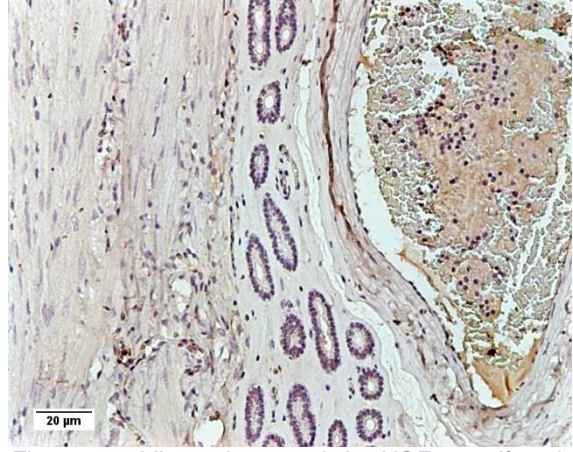
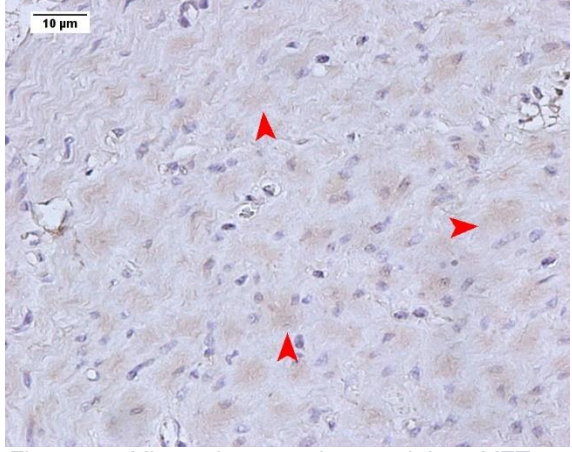


Figura 74. Glándulas endometriales con el Ac c-MET, 16 días de gestación. 400X.
Sin marca.

HGF y c-MET en el día de gestación 18 de gestación.

En el citoplasma del epitelio de revestimiento se encontró señalización del HGF y de su receptor (Figura 75 y Figura 76). c-MET también marcó los núcleos de algunas células estromales de la porción subepitelial, así como segmentos de las fibras musculares, principalmente en la porción perinuclear (Figura 78). Con respecto a las células del epitelio glandular, éstas presentan marca citoplasmática del HGF (Figura 79) y marca nuclear para c-MET (Figura 80).

HGF	c-MET
 <p data-bbox="293 751 862 919"><i>Figura 75. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 18 de gestación 400X. Señalización citoplasmática de las células del epitelio de revestimiento (flechas rojas).</i></p>	 <p data-bbox="885 751 1453 919"><i>Figura 76. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 18 de gestación 200X. Marca en el citoplasma de las células cúbicas del epitelio de revestimiento (flechas rojas). Marca de algunos núcleos del tejido conjuntivo subepitelial (flechas magenta).</i></p>
 <p data-bbox="293 1375 862 1476"><i>Figura 77. Miometrio con el Ac HGF, 18 días de gestación 200X. Sin marca.</i></p>	 <p data-bbox="885 1375 1453 1476"><i>Figura 78. Miometrio marcado con el Ac c-MET, 18 días de gestación 400X. Señalización en algunos segmentos del músculo (flechas rojas).</i></p>

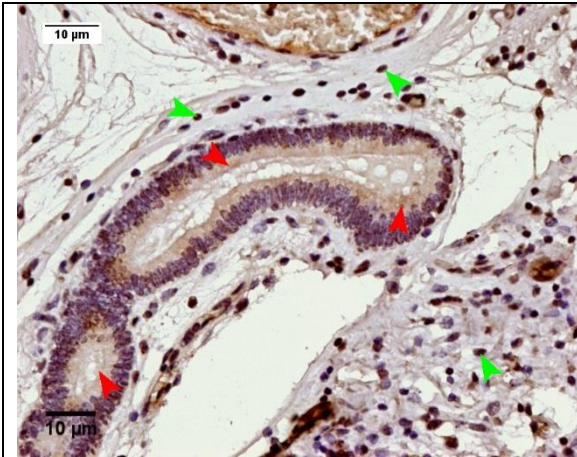


Figura 79. Glándulas endometriales marcadas con el Ac HGF, 18 días de gestación. 400X. Marca citoplasmática en el borde celular en contacto con la luz, así como en el interior de la glándula (flechas rojas). Señalización de los núcleos de las células estromales (flechas verdes).

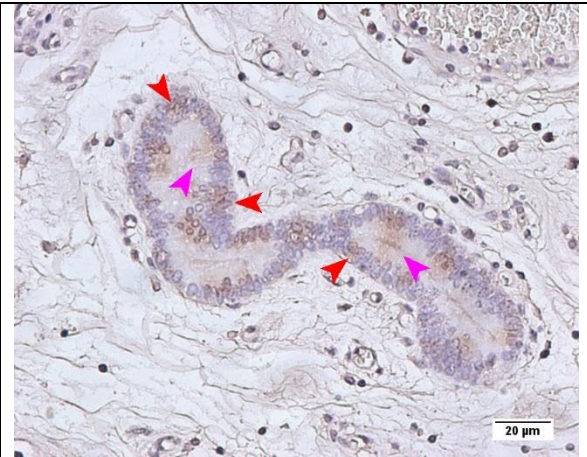
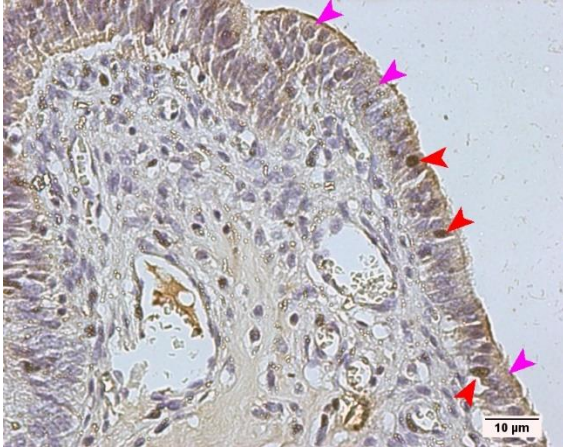
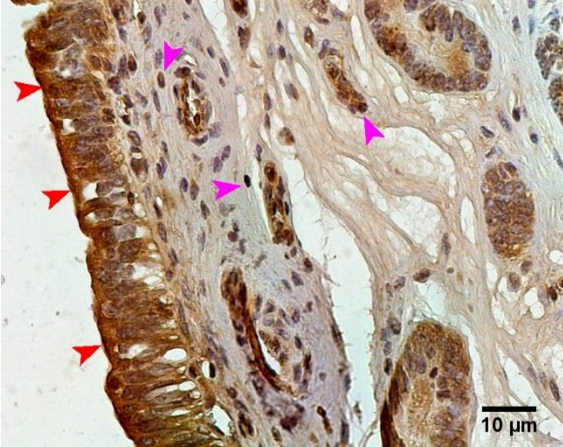
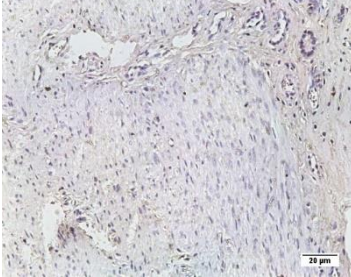

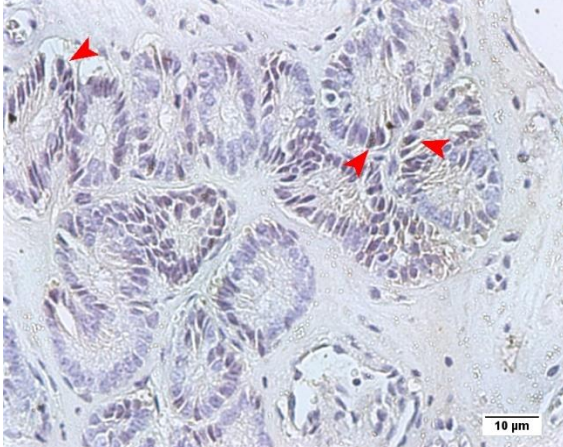
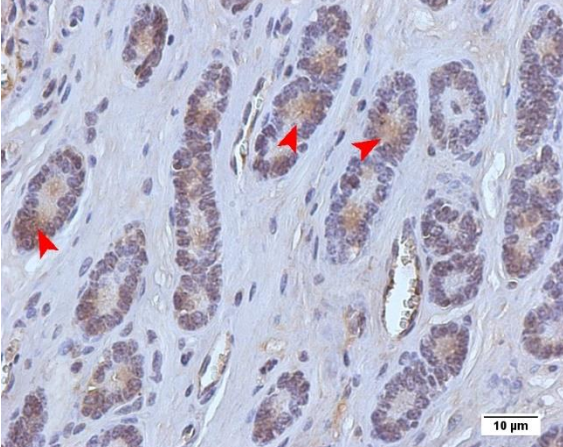


Figura 80. Glándulas endometriales marcadas con el Ac c-MET, 18 días de gestación. 400X. Marca citoplasmática hacia la luz de la glándula (flechas magenta). Señal en algunos núcleos del epitelio glandular (flechas rojas).

6.4.4 Factor de Crecimiento de Hepatocitos y su receptor (c-MET) en ciclo estral.

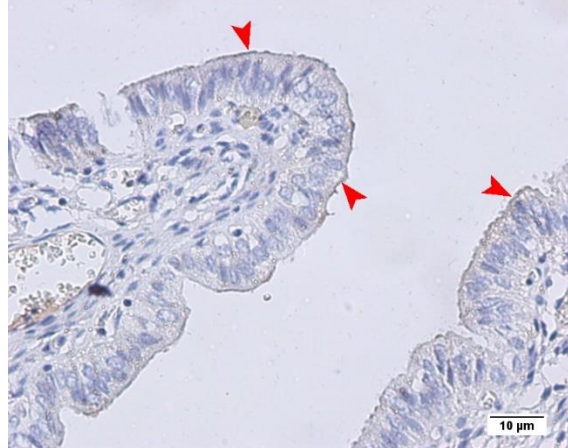
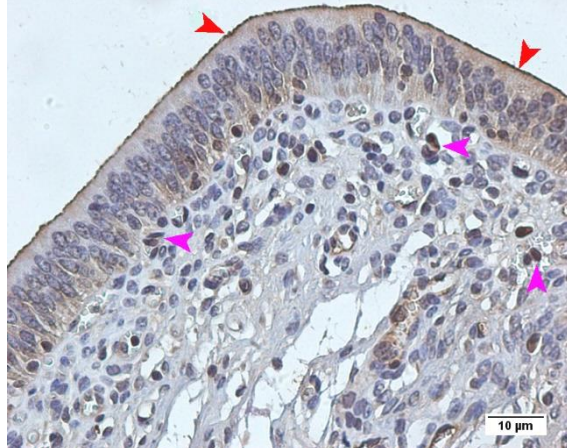
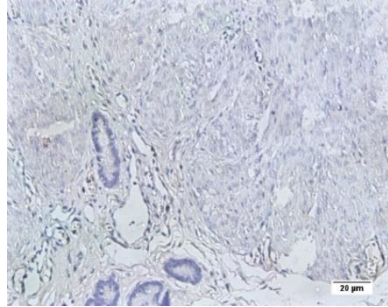
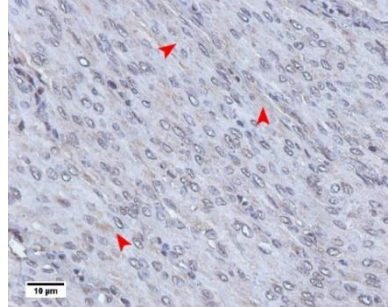
HGF y c-MET en el día 2 del ciclo estral.

HGF muestra marca citoplasmática con reforzamiento en el borde apical y en algunos núcleos de las células que conforman el epitelio de revestimiento (Figura 81), para el caso de c-MET, se extiende por todo el citoplasma de este tipo celular (Figura 82). En la porción subepitelial se encuentra señalización del receptor en algunos núcleos de las células estromales y en algunos miocitos (Figura 84). El epitelio glandular presenta marca nuclear tanto para HGF como para su receptor (Figura 85 y Figura 86).

HGF	c-MET
	
<p>Figura 81. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 2 del ciclo estral 400X. Señalización citoplasmática (flechas magenta), así como de algunos núcleos (flechas rojas) del epitelio de revestimiento de tipo cilíndrico pseudoestratificado.</p>	<p>Figura 82. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 2 del ciclo estral 400X. Epitelio de revestimiento tipo cilíndrico pseudoestratificado. Marca citoplasmática principalmente hacia la luz del útero (flechas rojas). Núcleos del tejido conjuntivo subepitelial con señalización</p>
 <p>Figura 83. Miometrio con el Ac HGF, día 2 del ciclo estral 200X. Sin marca.</p>	 <p>Figura 84. Miometrio marcado con el Ac c-MET, día 2 del ciclo estral 200X. Señal en algunos núcleos de los miocitos (flechas rojas).</p>
 <p>Figura 85. Glándulas marcadas con Ac HGF, día 2 del ciclo estral 400X. Marca de los algunos núcleos de las células del epitelio glandular (flechas rojas).</p>	 <p>Figura 86. Glándulas marcadas con Ac c-MET, día 2 del ciclo estral 400X. Marca citoplasmática granular en algunas glándulas, así como marca nuclear en algunas otras (flechas rojas).</p>

HGF y c-MET en el día 12 del ciclo estral.

El epitelio de revestimiento muestra señalización del HGF que se localiza principalmente al borde en contacto con la luz uterina (Figura 87) al igual que su receptor, pero con mayor intensidad (Figura 88). c-MET presentó señal en algunas fibras del miometrio y en los núcleos del epitelio glandular (Figura 90 y Figura 92).

HGF	c-MET
 <p data-bbox="293 1192 857 1329"><i>Figura 87. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 12 del ciclo estral 400X. De tipo cilíndrico pseudoestratificado con marca citoplasmática en el borde apical de la célula (flechas rojas).</i></p>	 <p data-bbox="883 1192 1446 1381"><i>Figura 88. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 12 del ciclo estral 400X. De tipo pseudoestratificado. Marca citoplasmática principalmente en el borde apical de las células (flechas rojas), así como en los núcleos de algunas células del tejido conjuntivo subepitelial (flechas magenta).</i></p>
 <p data-bbox="695 1423 857 1587"><i>Figura 89. Miometrio con el Ac HGF, día 12 del ciclo estral 200X. Sin marca</i></p>	 <p data-bbox="1284 1423 1446 1719"><i>Figura 90. Miometrio marcado con el Ac c-MET, día 12 del ciclo estral 400X. Señalización en algunos segmentos de las fibras musculares (flechas rojas).</i></p>

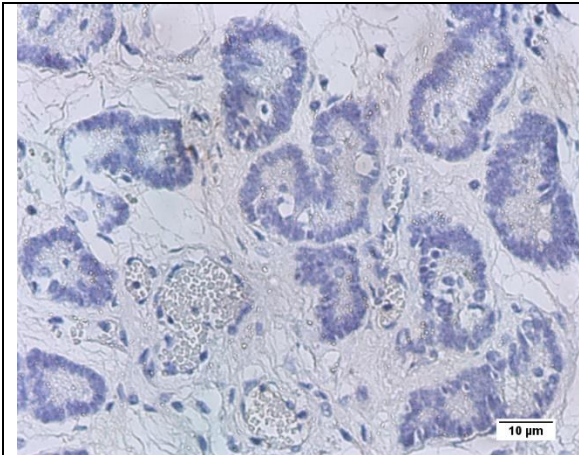


Figura 91. Glándulas con Ac HGF, día 12 del ciclo estral 400X.
Sin marca.

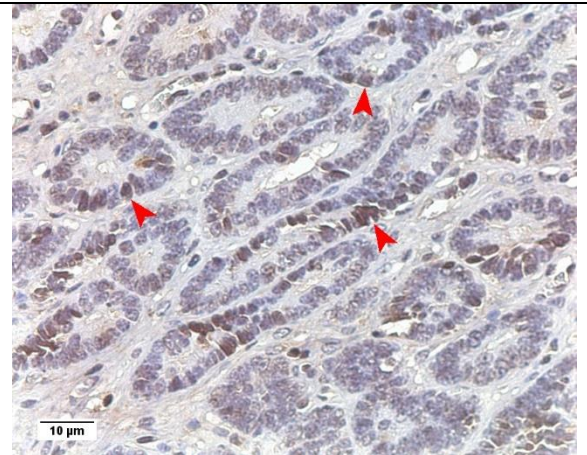
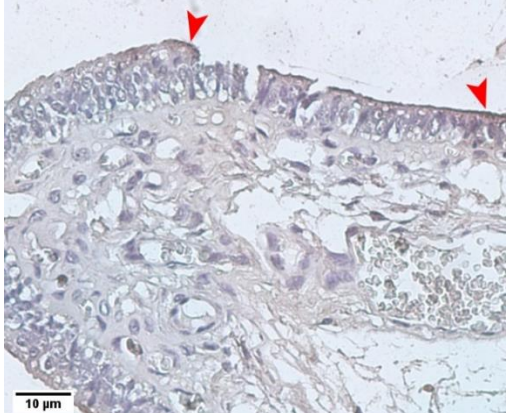
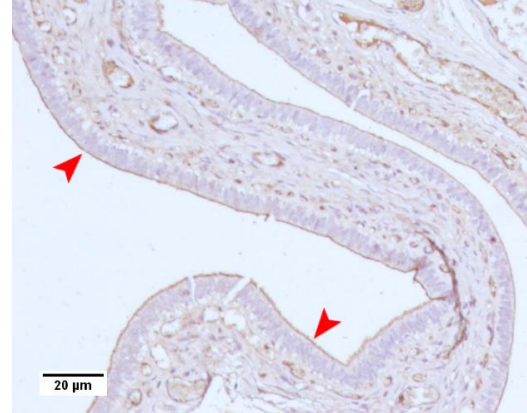
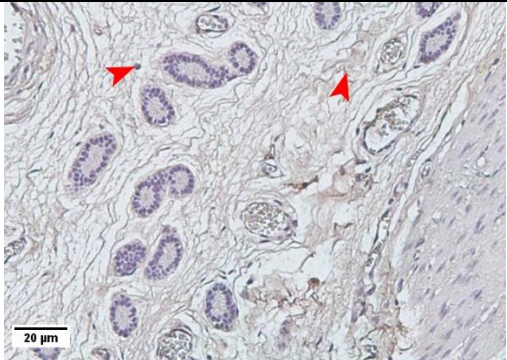
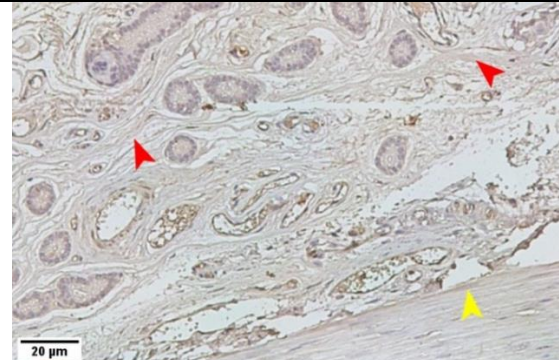


Figura 92. Glándulas marcadas con Ac c-MET, día 12 del ciclo estral 400X.
Núcleos de algunas células del epitelio glandular con marca (flechas rojas).

6.4.5 Fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y Proteín Quinasa activadora de mitógenos (ERK) en gestantes.

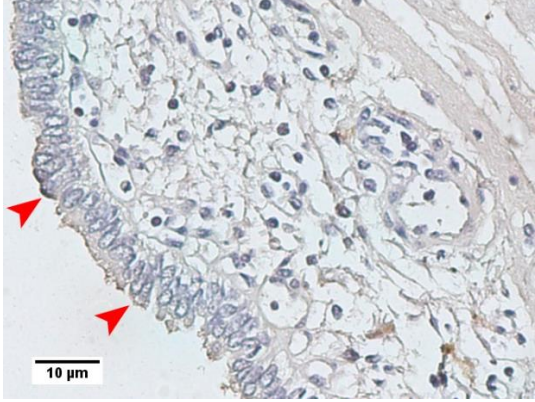
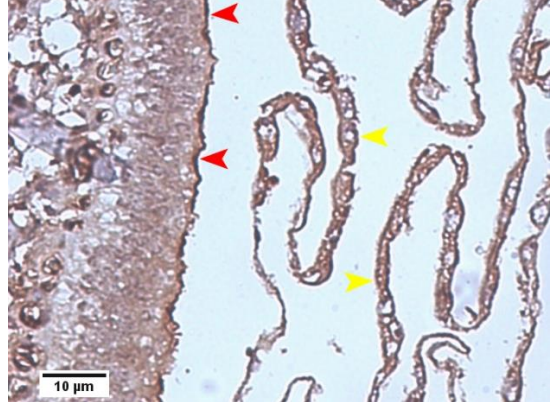
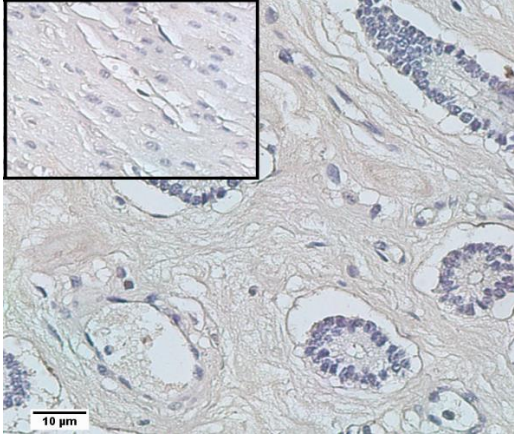
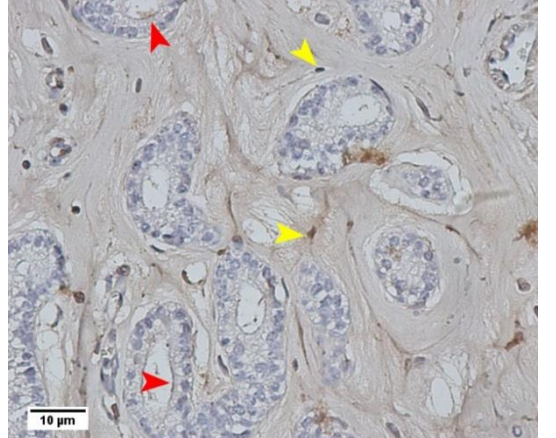
PI3K y ERK en día Gestación 12.

El epitelio de revestimiento presentó señal en el borde en contacto con la luz uterina para PI3K y ERK (Figura 93 y Figura 94). El endometrio tiene algunos núcleos con señal de PI3K (Figura 95). Para ERK se encontró señal generalizada en el estroma y en el miometrio se restringe al borde en contacto con el estroma (Figura 96).

PI3K	ERK
 <p data-bbox="297 678 837 842"><i>Figura 93. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 12 de gestación 400X.</i> De tipo cilíndrico pseudoestratificado. Con marca citoplasmática que se intensifica en el borde apical de la célula formando una línea hacia la luz del útero (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="854 678 1450 842"><i>Figura 94. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 12 de gestación 200X.</i> De tipo cilíndrico pseudoestratificado. Marca citoplasmática en la parte apical de la célula, la cual parece formar una línea a lo largo del epitelio.</p>
 <p data-bbox="297 1203 837 1369"><i>Figura 95. Endometrio, glándulas y miometrio marcado con el Ac PI3K, día 12 de gestación 200X.</i> Marca generalizada en el estroma con algunos núcleos que muestran mayor intensidad. Miometrio y glándulas sin marca (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="854 1203 1450 1369"><i>Figura 96. Endometrio, glándulas y miometrio marcadas con el Ac ERK, día 12 de gestación 200X.</i> Marca generalizada en el estroma (flechas rojas) y el miometrio, con segmentos más evidentes en las fibras en contacto con el endometrio (flechas amarillas).</p>

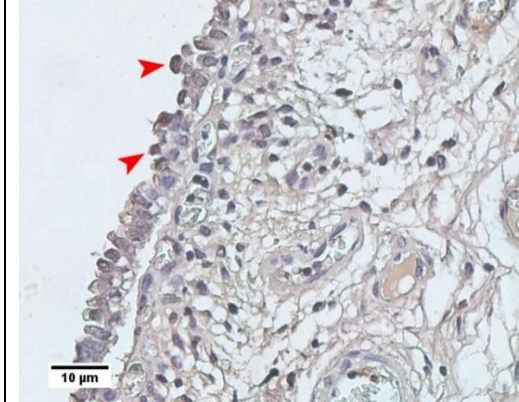
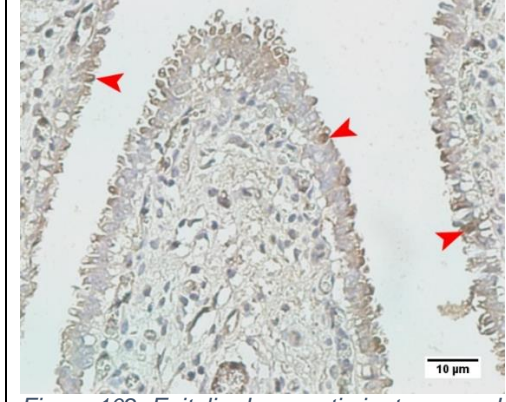
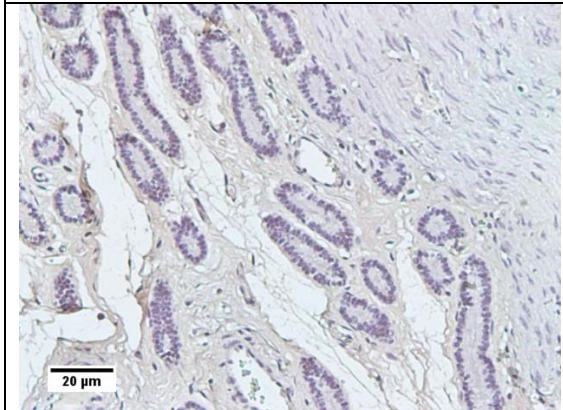
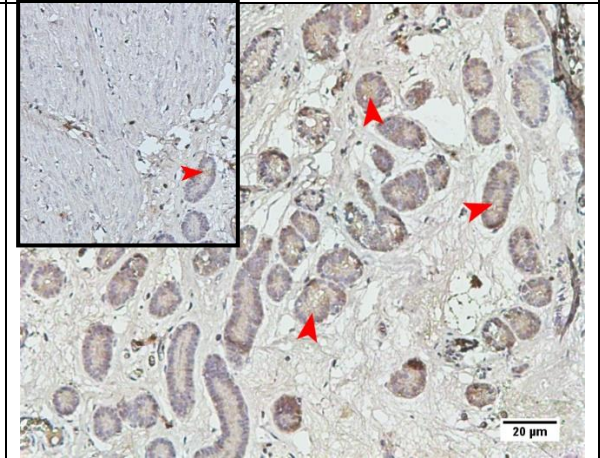
PI3K y ERK en día Gestación 14.

Epitelio luminal con señal citoplasmática en el borde apical para PI3K (Figura 97) y en todo el citoplasma de este tipo celular con reforzamiento membranal para ERK (Figura 98). El estroma y miometrio no presenta señal de PI3K (Figura 99), sin embargo, con ERK los núcleos de algunas células endometriales, así como el interior de las glándulas tiene señal (Figura 100).

PI3K	ERK
 <p data-bbox="298 667 829 804"><i>Figura 97. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 14 de gestación 400X.</i> De tipo cilíndrico pseudoestratificado. Marca en la membrana celular en contacto con el lumen uterino (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="878 667 1430 856"><i>Figura 98. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 14 de gestación 400X.</i> De tipo cilíndrico pseudoestratificado. Fuerte marca citoplasmática con mayor tendencia en la parte apical de la célula (flechas rojas). Se encontró marca en el citoplasma de células del trofoblasto (flechas amarillas).</p>
 <p data-bbox="298 1297 808 1465"><i>Figura 99. Endometrio, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 14 de gestación 400X.</i> Sin marca.</p>	 <p data-bbox="878 1297 1430 1470"><i>Figura 100. Endometrio, glándulas y miometrio marcadas con el Ac ERK, día 14 de gestación 400X.</i> Marca generalizada en estroma, así como de algunos núcleos de células presentes en éste (flechas amarillas). El interior de las glándulas presenta señal (flechas rojas).</p>

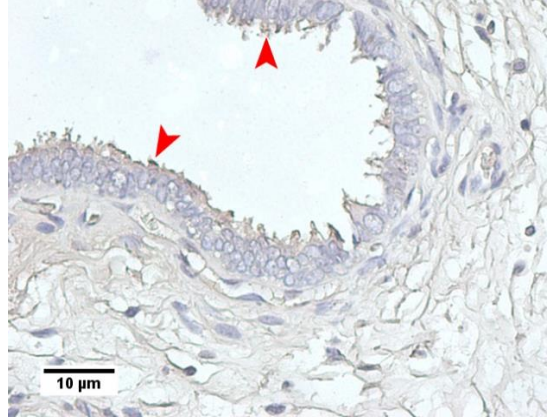
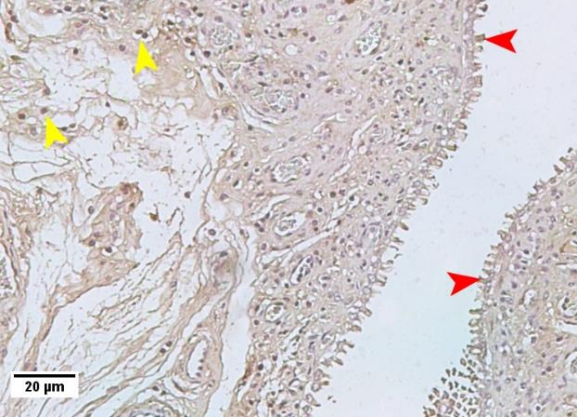
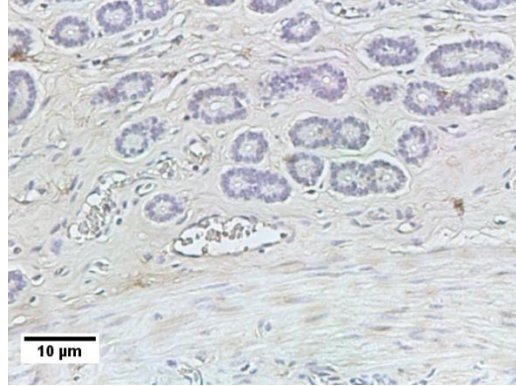
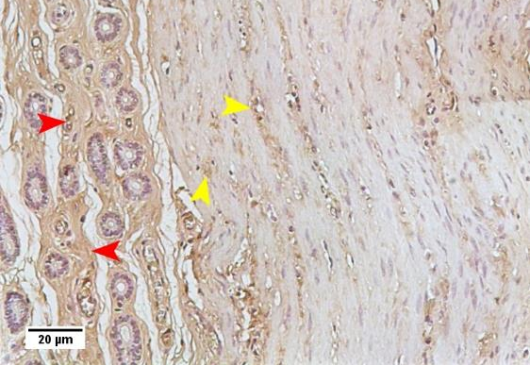
PI3K y ERK en día Gestación 16.

El epitelio de revestimiento presenta señal citoplasmática y en algunas células también nuclear para ambas proteínas (Figura 101 y Figura 102). En el endometrio no se presenta señal de PI3K (Figura 103) y para ERK se limita a señalar en el citoplasma de las glándulas (Figura 104).

PI3K	ERK
	
<p><i>Figura 101. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 16 de gestación 400X.</i> De tipo cúbico y cilíndrico simple. Marca citoplasmática y en algunas células también muestra marca nuclear (flechas rojas).</p>	<p><i>Figura 102. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 16 de gestación 400X.</i> De tipo cúbico y cilíndrico pseudoestratificado. Marca citoplasmática, en las porciones donde las capas celulares son más abundantes, la marca se intensifica en el citoplasma de las células más superficiales.</p>
 <p><i>Figura 103. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 16 de gestación 200X.</i> Sin marca.</p>	 <p><i>Figura 104. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac ERK, día 16 de gestación 200X.</i> Marca de tipo citoplasmática en el epitelio glandular con mayor intensidad con respecto a la marca generalizada del estroma (flechas rojas).</p>

PI3K y ERK en día Gestación 18.

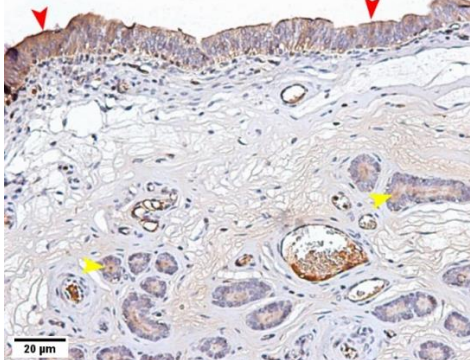
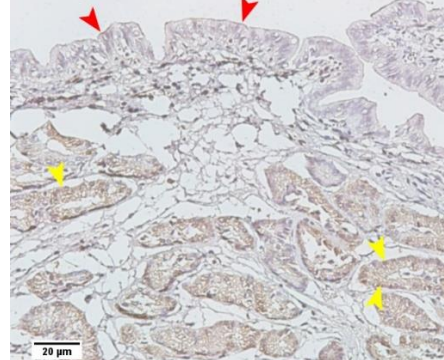
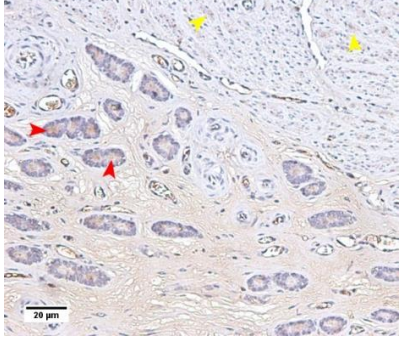
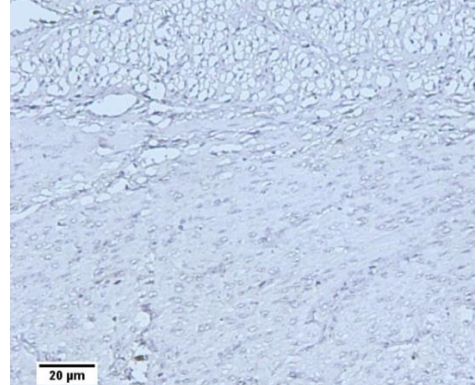
Se presenta señal en el borde membranal en contacto con la luz uterina para PI3K (Figura 105), en cambio, la señal de ERK se presenta en todo el citoplasma de la célula del epitelio de revestimiento, fibras musculares, así como en estroma y algunos núcleos de células pertenecientes a este (Figura 106 y Figura 108). Estroma, miometrio y glándulas sin marca de PI3K (Figura 107).

PI3K	ERK
 <p data-bbox="293 1119 837 1283"><i>Figura 105. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 18 de gestación 400X.</i> De tipo columnar pseudoestratificado. Con marca citoplasmática que se hace más intensa en contacto con el lumen uterino (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="870 1119 1450 1283"><i>Figura 106. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 18 de gestación 200X.</i> De tipo cúbico simple con marca en todo el citoplasma (flechas rojas). Algunas células del estroma presentan sus núcleos con señal (flechas amarillas)</p>
 <p data-bbox="293 1671 846 1785"><i>Figura 107. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 18 de gestación 400X</i> Sin marca.</p>	 <p data-bbox="870 1650 1458 1785"><i>Figura 108. Estroma, glándulas y miometrio marcado con el Ac ERK, día 18 de gestación 200X.</i> Marca generalizada en el estroma (flechas rojas), así como en algunos segmentos de las fibras musculares (flechas amarillas).</p>

6.4.6 Fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y Proteín Quinasa activadora de mitógenos (ERK) en ciclo estral.


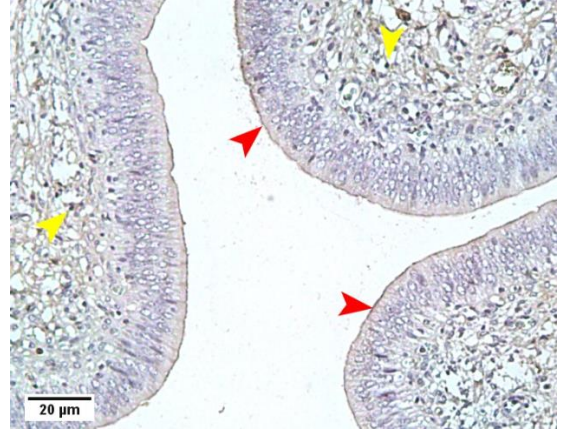
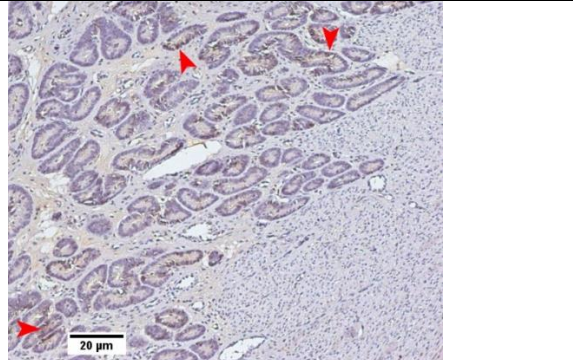
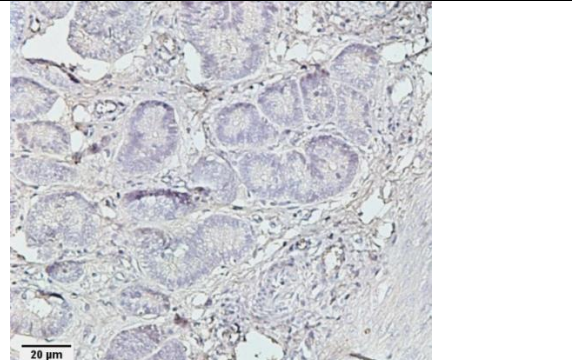
PI3K y ERK en el día 2 del ciclo estral.

Epitelio con señal citoplasmática para PI3K (Figura 109) y en la membrana apical con ERK (Figura 110). Las glándulas presentan marca de tipo granular, así como algunos segmentos del miometrio para PI3K (Figura 111). Estroma, miometrio y glándulas son negativas para ERK (Figura 112).

PI3K	ERK
 <p data-bbox="297 1140 860 1325"><i>Figura 109. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 2 del ciclo estral 200X.</i> De tipo cilíndrico pseudoestratificado. Marca citoplasmática más intensa en la membrana contacto con el lumen uterino (flechas rojas). Interior de las glándulas con marca de tipo granular (flechas amarillas).</p>	 <p data-bbox="876 1140 1445 1304"><i>Figura 110. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 2 del ciclo estral 200X.</i> De tipo cilíndrico pseudoestratificado, señal en el borde en contacto con el lumen uterino (flechas rojas). Marca de tipo granular en el citoplasma de las glándulas (flechas amarillas).</p>
 <p data-bbox="297 1675 860 1829"><i>Figura 111. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 2 del ciclo estral 200X.</i> Estroma con marca generalizada, interior de las glándulas con señal (flechas rojas) y miometrio con algunas células con señal perinuclear (flechas amarillas).</p>	 <p data-bbox="876 1722 1445 1801"><i>Figura 112. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac ERK, día 2 del ciclo estral 200X.</i> Sin señal.</p>

PI3K y ERK en el día 12 del ciclo estral.

Epitelio de revestimiento con señal en la membrana en contacto con el lumen uterino para PI3K y ERK (Figura 113 y Figura 114). Señal en el citoplasma de las glándulas para PI3K (Figura 115). Núcleos de algunas células estromales con señal, músculo y estroma negativos para ERK (Figura 116).

PI3K	ERK
 <p data-bbox="293 1060 862 1228"><i>Figura 113. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 12 del ciclo estral 400X.</i> De tipo estratificado. Marca citoplasmática más intensa en el borde apical (flechas rojas). Núcleos de algunas células estromales con señal (flechas amarillas).</p>	 <p data-bbox="878 1060 1446 1228"><i>Figura 114. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 12 del ciclo estral 200X</i> De tipo cilíndrico pseudoestratificado. Marca ligera en el borde apical de las células la cual forma una línea delgada (flechas rojas). Señal en algunos núcleos de células estromales.</p>
 <p data-bbox="293 1585 862 1694"><i>Figura 115. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 12 del ciclo estral 200X</i> Interior de las glándulas y algunos núcleos con marca (flechas rojas).</p>	 <p data-bbox="878 1585 1446 1694"><i>Figura 116. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac ERK, día 12 del ciclo estral 200X.</i> Sin señal en glándulas ni miometrio.</p>

6.4.7 Resumen de la expresión y localización de FGF10 y FGFR2.

Tabla 4. Localización Inmunohistoquímica de FGF10 Y FGFR2

		Cerdas Ciclando		Cerdas Gestantes			
		CE 2	CE 12	Gx12	Gx14	Gx16	Gx18
Epitelio	FGF10	++	+	++	++	++	++
	FGFR2	++	++	+	+	++	+
Estroma	FGF10	++	+	+	+	++	+
	FGFR2	++	++	++	++	+	++
Músculo	FGF10	+	-	++	++	+	-
	FGFR2	++	++	-	-	-	-
Glándulas	FGF10	++	+	++	++	+	++
	FGFR2	++	++	++	+	+	+

Como una guía de intensidad de señal subjetiva se utilizó. - negativo; + marcaje débil; ++ marcaje fuerte. CE: Ciclo Estral. Gx: Gestación.

6.4.8 Resumen de la expresión y localización de HGF y c-MET.

Tabla 5. Localización Inmunohistoquímica de HGF y c-MET

		Cerdas Ciclando		Cerdas Gestantes			
		CE 2	CE 12	Gx12	Gx14	Gx16	Gx18
Epitelio	HGF	++	+	++	+	++	++
	c-MET	++	++	+	+	+	++
Estroma	HGF	+	-	++	+	+	+
	c-MET	-	-	+	++	+	+
Músculo	HGF	-	-	-	-	-	-
	c-MET	+	++	+	-	+	+
Glándulas	HGF	+	-	+	++	++	++
	c-MET	++	+	+	++	-	++

Como una guía de intensidad de señal subjetiva se utilizó. - negativo; + marcaje débil; ++ marcaje fuerte. CE: Ciclo Estral. Gx: Gestación.

6.4.9 Resumen de la señalización encontrada en gestantes y ciclando para PI3K y ERK.

Tabla 6. Localización Inmunohistoquímica de PI3K y ERK

		Cerdas Ciclando		Cerdas Gestantes			
		CE 2	CE 12	Gx12	Gx14	Gx16	Gx18
Epitelio	PI3K	++	+	+	+	+	+
	ERK	+	+	+	++	++	++
Estroma	PI3K	+	+	+	-	-	-
	ERK	-	+	+	+	+	++
Músculo	PI3K	+	-	-	-	-	-
	ERK	-	-	+	-	-	+
Glándulas	PI3K	+	+	-	-	-	-
	ERK	+	-	-	+	++	-

Como una guía de intensidad de señal subjetiva se utilizó. - negativo; + marcaje débil; ++ marcaje fuerte. CE: Ciclo Estral. Gx: Gestación.

6.5 Rangos dinámicos

Los productos para todos los genes tuvieron una amplificación exitosa desde una dilución de 2.43ng/μl y hasta 150ng/μl, por lo cual se decidió utilizar una dilución intermedia en las reacciones de qPCR para la cuantificación de expresión en cada una de las muestras la cual fue de 37ng para cada reacción.

6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).

6.6.1 PCR en tiempo real de FGF10 y FGFR2

En la Tabla 7 se muestran los valores de Ct para las tres repeticiones de la evaluación de FGF10 y su receptor, así como el promedio de los valores

resultantes de la cuantificación relativa con el gen de referencia (β -Actina). El Gráfico 1 y Gráfico 2 muestran la media y el error estándar de la media de la cuantificación de expresión del FGF10 Y FGFR2 en cada uno de los días del experimento. No se muestran diferencias estadísticamente significativas al comparar entre los distintos días de gestación o ciclo estral ($P>0.05$).

Tabla 7. Valor del Ct para FGF10 y FGFR2 y promedio de la relación con β -Actina.

		Cerdas Ciclando		Cerdas Gestantes			
		CE 2	CE 12	Gx12	Gx14	Gx16	Gx18
Valor Ct	FGF10	31.74	32.66	30.19	31.11	31.28	30.12
		31.53	30.76	32.14	32.70	28.31	26.72
		27.36	26.61	27.37	26.93	27.76	26.71
	FGFR2	26.81	28.91	27.55	24.08	26.74	27.22
		28.46	30.78	29.11	25.49	26.57	26.78
		29.44	29.28	27.56	21.97	26.54	27.41
Promedio Relación	FGF10	1.36	0.83	1.06	0.83	0.38	0.66
	FGFR2	1.27	0.29	0.80	1.09	1.15	0.86

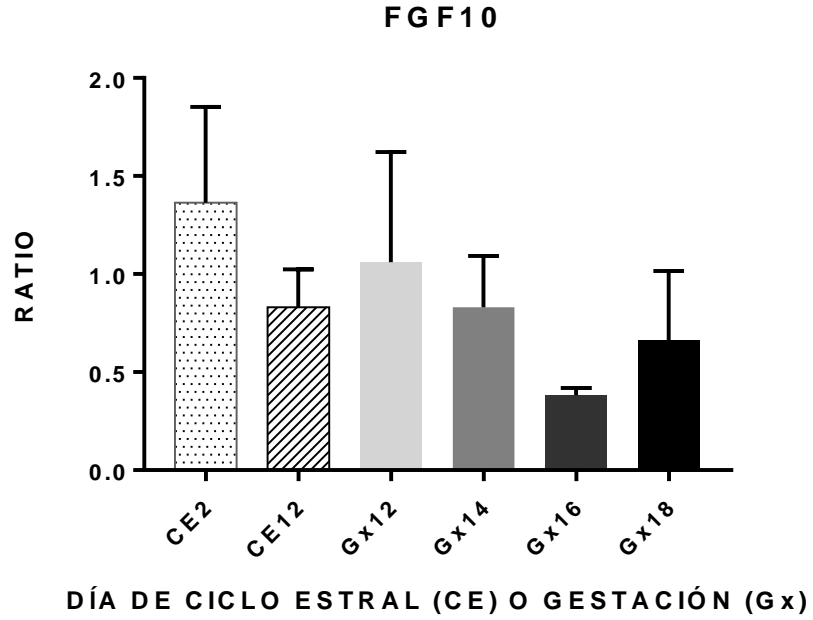


Gráfico 1. Expresión relativa de FGF10 en los diferentes días de estudio.

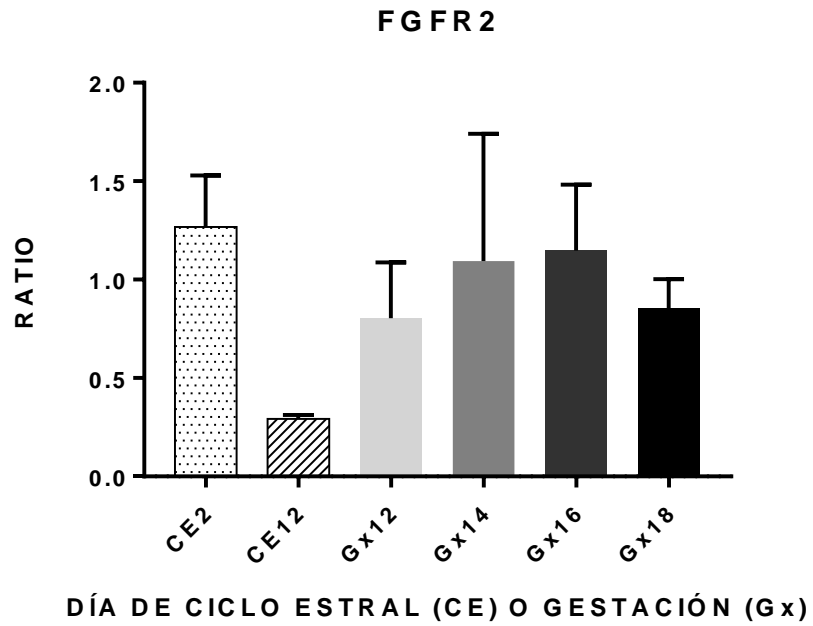


Gráfico 2. Expresión relativa de FGFR2 en los diferentes días de estudio.

Al graficar a través del tiempo es posible observar una tendencia decreciente conforme avanza la gestación, con un ligero repunte en el día 18 (Gráfico 3), esta tendencia coincide con el patrón de señalización en las glándulas endometriales, en las cuales la señal nuclear desaparece en el día 16 y para el día 18 reincide.

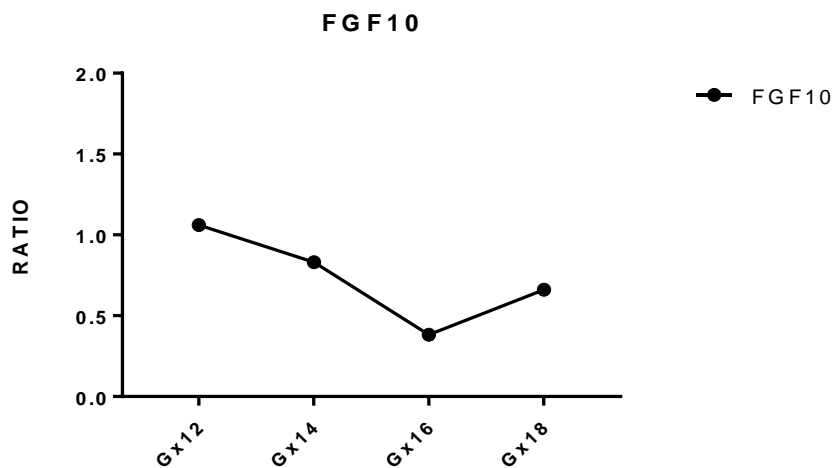


Gráfico 3. Tendencia de expresión de FGF10 a través de la gestación temprana.

En el Gráfico 4 se observa la tendencia de expresión del transcrito de FGFR2, la cual tiende a incrementar ligeramente conforme avanza la gestación, alcanzado su valor máximo en el día 16, momento en el cual el receptor se encontró en todo el citoplasma del epitelio de revestimiento. En el día 18, los niveles de expresión vuelven a descender y FGFR2 se localiza principalmente en el estroma y en el borde celular en contacto con la luz uterina.

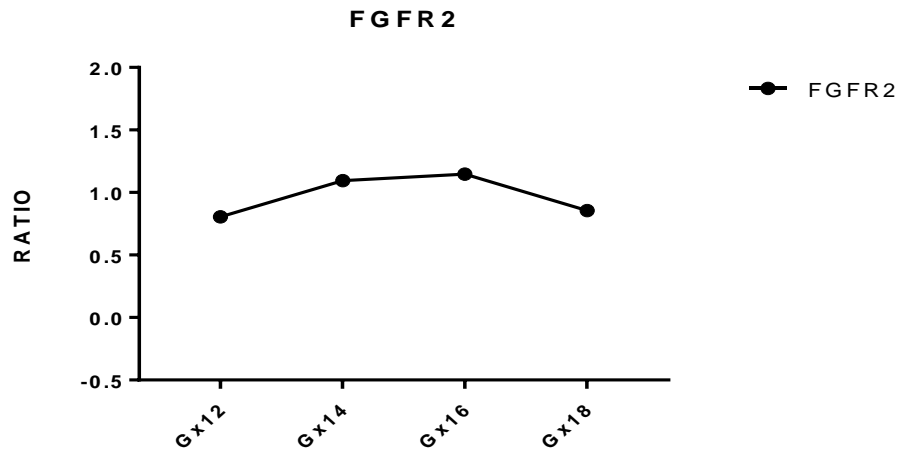


Gráfico 4. Tendencia de expresión de FGFR2 a través de la gestación temprana.

6.6.2 PCR en tiempo real de HGF y c-MET

La Tabla 8 muestra los valores de Ct para la expresión de los genes HGF y c-MET de las tres repeticiones en cada día del estudio, así como el valor promedio de la relación con la expresión del gen de referencia. El Gráfico 5 y Gráfico 6 muestran la media y el error estándar de la media de la cuantificación de expresión del HGF y c-MET respectivamente. HGF muestra diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.01$) cuando se compara el día 2 del ciclo estral con la gestación 16 y 18, al igual que con los días de gestación 12 y 14 y el ciclo estral en el día 12 con la gestación del día 16 ($P \leq 0.05$). Con respecto a su receptor se encontró diferencia en día de gestación 16 cuando se observa su mayor expresión comparado con el día 12 del ciclo estral y 18 de gestación ($P \leq 0.05$).

Tabla 8. Valor del Ciclo umbral (Ct) para HGF y c-MET y promedio de la relación con β -Actina.

		Cerdas Ciclando			Cerdas Gestantes		
		CE 2	CE 12	Gx12	Gx14	Gx16	Gx18
Valor Ct	HGH	28.48	30.50	30.16	31.70	30.60	30.27
		31.48	30.81	32.32	31.87	28.45	28.14
		28.24	27.45	25.40	25.44	27.77	29.82
	c-MET	31.50	38.42	29.05	30.36	30.02	30.29
		31.88	32.61	29.19	24.33	26.70	26.04
		27.99	26.99	26.44	29.55	23.69	27.34
Promedio Relación	HGF	1.95	1.17	0.73	0.72	0.22	0.42
	c-MET	1.25	0.66	1.62	1.20	2.78	0.60

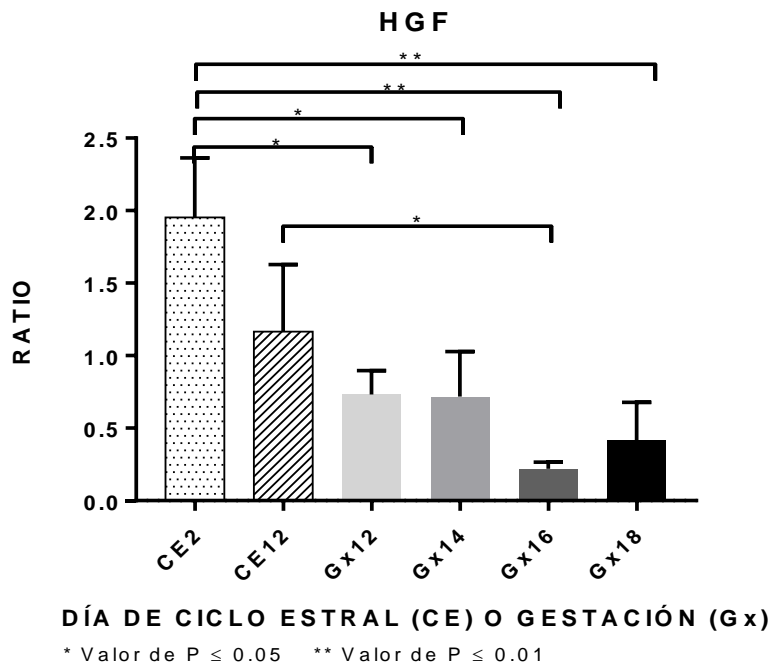


Gráfico 5. Expresión relativa de HGF en los diferentes días de estudio.

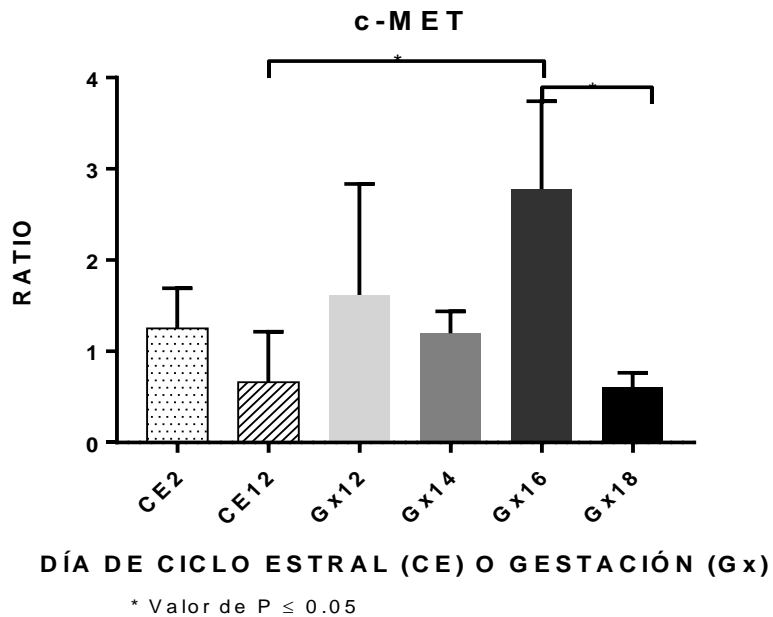


Gráfico 6 Expresión relativa de c-MET en los diferentes días de estudio

En el Gráfico 7 se observa que la expresión de HGF tiende a mantenerse en el día 12 y 14, con una bajada en el día 16 y un ligero repunte en el día 18 de gestación. Con respecto a c-MET en el día 18 la expresión disminuye con diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) sin embargo, la proteína puede ser encontrada en los núcleos de algunas glándulas endometriales, así como en células del estroma. El Gráfico 8 muestra la tendencia de expresión del receptor para hepatocitos en los cual es muy evidente un pico al día 16.

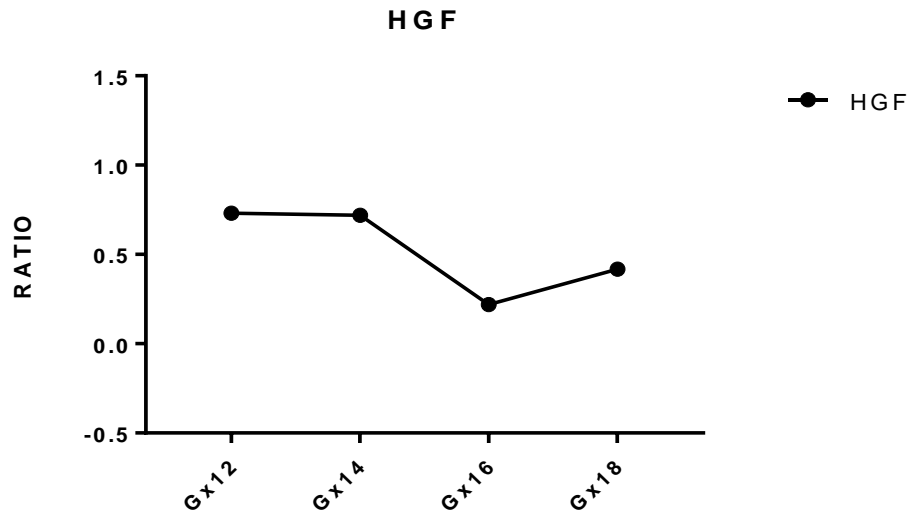


Gráfico 7. Tendencia de expresión de HGF a través de la gestación temprana.

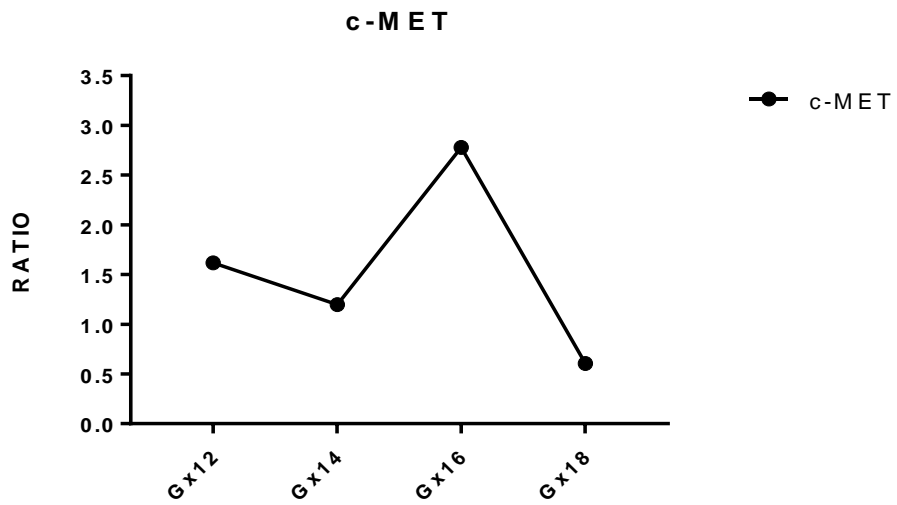


Gráfico 8. Tendencia de expresión de c-MET a través de la gestación temprana.

Al representar en el Gráfico 9 todas tendencias de expresión y sus interacciones, resulta interesante mostrar que los cambios principales se observan en el día 16 de gestación, en los cuales tanto el FGF10 como el HGF muestran una expresión similar, sin embargo, los receptores se comportan completamente diferentes, pues FGFR2 aumenta ligeramente y c-MET tiene la mayor expresión registrada.

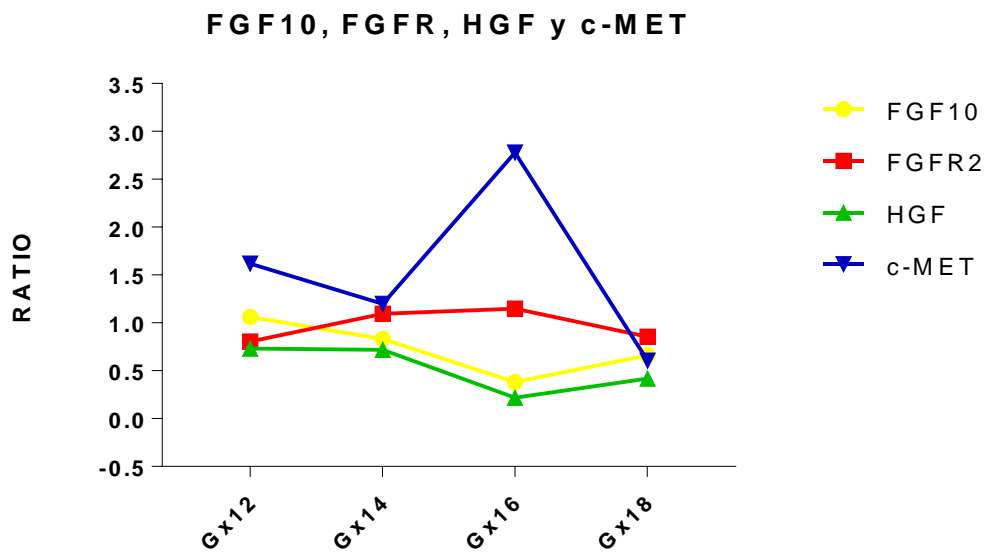


Gráfico 9. Tendencia de expresión de los genes evaluados a través de la gestación temprana.

6.6.3 Valor promedio de la relación de expresión entre el gen de referencia y los genes evaluados.

En la Tabla 9 se resumen los valores de la relación de expresión de los genes de interés normalizados con el gen de referencia β -actina para cada uno de los días evaluados.

Tabla 9. Valor promedio de la cuantificación relativa de todos los genes.

Día de evaluación	FGF10	FGFR2	HGF	c-MET
Gestación 12	1.06	0.80	0.73	1.61
Gestación 14	0.83	1.09	0.72	1.20
Gestación 16	0.38	1.15	0.22	2.78
Gestación 18	0.66	0.86	0.42	0.60
Ciclo estral 2	1.36	1.27	1.95	1.25
Ciclo estral 12	0.83	0.29	1.17	0.66

7. Discusión y Conclusiones

7.1 Adaptaciones histológicas del útero durante la gestación temprana.

La principal modificación encontrada deriva del incremento de grosor del endometrio, consecuencia de la aparición de pliegues, aumentando su tamaño e incidencia del día 12 al día 18 de gestación. El grosor del miometrio también incrementa, sin embargo, a partir del día 18 fue superado en proporción por el endometrio, que como lo reporta Ross y Pawlina (2016) se puede atribuir al efecto estrogénico al cual el tejido estuvo expuesto durante la fase de reconocimiento materno

El epitelio luminal conservó su estructura de tipo cilíndrico pseudoestratificado correspondiente al tipo de epitelio encontrado en tejidos altamente proliferativos (Norden, 2017) en los cuales se puede observar que los núcleos se posicionan hacia el borde apical previo a la mitosis (Lee y Norden, 2013). Sin embargo, en el día 16 de gestación, se observa un epitelio de revestimiento de tipo cúbico simple, que a pesar de cumplir la función de absorción y secreción también tiene cualidades como barrera de protección (Ross y Pawlina, 2016). Esta función, pudiera coadyuvar en la mínima invasión que tiene el embrión porcino en esta etapa de desarrollo en las capas uterinas. No obstante, algunas modificaciones del epitelio de revestimiento, en este día de gestación, se han atribuido a que el embrión ya comenzó la fase de adherencia con el tejido

materno, y el útero disminuye la necesidad de seguir proliferando y da prioridad al desarrollo de estructuras maternas como la formación de nuevos vasos sanguíneos importantes para la irrigación durante toda la gestación (Geisert *et al.*, 2014; Waclawik *et al.*, 2017).

En el día 18 se encontró una sección de trofotodermo con células cúbicas y aplanadas coincidentes a la zona adyacente al sitio de elongación, este tipo celular se ha reportado una vez que el embrión ha alcanzado su máxima longitud (Bazer *et al.*, 2012; Geisert *et al.*, 2017).

Los vasos sanguíneos durante el reconocimiento materno se localizan en la porción del endometrio cercana al músculo, durante el proceso de implantación se movilizan hacia la luz del útero, aumentan su incidencia y diámetro, así como el grosor de la túnica adventicia y media. Las glándulas endometriales permanecen principalmente en la porción del endometrio en contacto con la capa muscular, la mayoría de ellas son pequeñas con luz estrecha durante los días 12 y 14. Sin embargo, para el día 18 de gestación éstas ya han incrementado su diámetro y el número de capas celulares, además de que la mayor cantidad de glándulas se desplazan a la porción luminal. No se encontraron glándulas en las proyecciones endometriales en ningún día de la gestación.

7.2 Identificación y cuantificación del FGF10, FGFR2, HGF y c-MET.

La presencia de FGF10 y su receptor específico, FGFR2, se encontraron en todas las muestras de estudio analizadas, tanto en estudios de localización de la proteína a través de inmunohistoquímica como a nivel de expresión del gen por PCR y qPCR. Los detalles se discuten a continuación.

En ovinos, se había reportado la presencia de FGF10 Y FGFR2 del día 11 al 19 de la gestación (Che *et al.*, 2000; Satterfield *et al.*, 2008) y con estudios de transcriptómica el FGFR2 a los días 12 y 14 de gestación (Samborski *et al.*, 2013), gracias a este estudio se pudo determinar la presencia del transcrito y la proteína FGF10 y su receptor también el útero de cerdas durante la ventana de implantación.

Con relación a la localización de la proteína, el FGF10 y su receptor se encontraron en el estroma, epitelio glandular y epitelio de revestimiento en el útero gestante, con menor relevancia en el miometrio, en donde desaparece la expresión al día 18 y sin la presencia de su receptor, estos resultados coinciden con lo reportado en el útero de bovinos dónde no se identificó FGF10 en miometrio y si estuvo presente en estroma, glándulas y epitelio (Okumu *et al.*, 2014). El principal tipo celular que mostró señalización a estos factores fue el epitelio, tanto en el luminal como glandular, con un patrón predominantemente nuclear. Se ha descrito el papel de FGF10 como mitógeno específico de las células epiteliales,

similar a la acción que ejerce el FGF7 (Igarashi *et al.*, 1998; Bagai *et al.*, 2002). La función de regular la transcripción para otros genes que propician proliferación celular durante el desarrollo (Huang *et al.*, 2005) nos sugiere que se esté llevando a cabo esta regulación en las células del epitelio glandular y coadyuvé a la síntesis de diversas moléculas que son secretadas por estas glándulas en el histotrófo. En las células estromales también se presentan tanto el factor como su receptor, recordemos que este receptor también es activado por otros factores de la misma familia como son FGF22 y FGF7, este último si ha sido identificado en epitelio luminal durante el periodo peri-implantación en el cerdo (Welter *et al.*, 2004). El FGF10 y su receptor posiblemente tengan una actividad quimioatrayente entre las células del trofotodermo y del útero en las fases aposición y adhesión durante la implantación. Esta actividad se ha descrito en otros modelos de vertebrados durante el proceso de gastrulación (Böttcher y Niehrs, 2005).

Algo notable, fue la expresión de FGF10 en el trofotodermo embrionario a los 12 días de gestación, este mostró un patrón de señalización tanto nuclear como citoplasmático, lo cual nos da la idea de una posible señalización paracrina con el tejido uterino y/o histotrofo, ya que útero presenta a su receptor en el citoplasma de las células del epitelio de revestimiento, similar a lo reportado con otro miembro de la familia de FGF, el FGF7 (Ka *et al.*, 2007).

La expresión de FGF10 y FGFR2 en útero de cerdas ciclando se localizó principalmente en las glándulas al día 12 del ciclo estral, no obstante, fue más evidente en el útero de hembras gestantes. Un evento importante en este día de gestación es el reconocimiento materno de la gestación, en donde existe una elevada concentración de estradiol producida por el trofoblasto embrionario. Por lo tanto, estas altas concentraciones, pudieran estar favoreciendo la presencia y actividad del FGF10.

Al no encontrar diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) en la expresión cuantitativa de FGF10 entre los diferentes días de gestación (12, 14, 16 y 18) ni con la fase folicular (día 2) o lútea (día 12) del ciclo estral, es posible que coincida con la expresión constante a lo largo de toda la gestación como se ha reportado en la placenta y decidua de humanos (Anteby *et al.*, 2005).

El patrón de señalización de FGFR2 se limita a permanecer citoplasmático, este no es un receptor exclusivo para la señalización de FGF10, por lo tanto, su activación pudiera no tener una correlación exacta con la expresión encontrada para FGF10 como la que se reporta para FGF9 en ratones (Šučurović *et al.*, 2017)

Mediante la PCR punto final se logró evidenciar la presencia del transcrito para HGF y c-MET, estas moléculas habían sido descritas en el útero porcino durante el proceso de reconocimiento materno mediante estudios de transcriptómica (Samborski *et al.*, 2013) La proteína había sido descrita en tejido

uterino de ovinos, yeguas y humanas (Chen *et al.*, 2000; Sch, 2003; de Ruijter-Villani *et al.*, 2013). En este estudio se localizó la proteína HGF y su receptor en el útero gestante porcino. Contrario a lo reportado (Samborski *et al.*, 2013) encontramos menor expresión del HGF en la gestación con respecto a las cerdas en ciclo estral, principalmente en los días de gestación más avanzados, para los cuales no había sido cuantificada su expresión (gestación 16 y 18).

Se ha establecido que el HGF mediante la unión a c-MET es un potente regulador en el desarrollo y proliferación de células epiteliales (Brinkmann *et al.*, 1995) la disminución de HGF en el día 16 pudiera ser la razón por la cual la morfología celular se modifica de ser pseudoestratificada (caracterizada por su alta proliferación) en el día 12 y 14 a un tipo cúbico simple. En el día 18 vuelve a ser un epitelio pseudoestratificado, lo cual coincide con el incremento en la transcripción de HGF.

El receptor c-MET mostró una relación directa entre su expresión y el fin del movimiento del embrión dentro del lumen uterino. Previamente sólo se había descrito su presencia en células epiteliales del útero ovino (Spencer *et al.*, 2004). Se encontró mayor expresión del transcrito en el día 16 en el cual la proteína señaló en el tejido con un patrón exclusivamente citoplasmático, se ha asociado la expresión de c-MET en complejos de adhesión celular (Organ y Tsao, 2011), lo cual sucede en el cerdo en este día cuando el embrión deja de moverse dentro del útero para comenzar con la aposición y adhesión al endometrio

FGF10 y HGF muestran una expresión similar, sugiriendo que estos factores podrían tener un efecto complementario o sinérgico como se ha reportado para otros factores (Gupta *et al.*, 1997), sin embargo, los receptores se comportan completamente diferentes, pues c-MET presenta la mayor expresión registrada cuando HGF está más bajo, podría suponerse que mientras menor es la expresión del ligando el receptor aumenta compensando esta falta de sustrato.

Bazer y colaboradores (2012) tienen la teoría de que la expresión de progesterona aumenta cuando los receptores para progesterona se encuentran en las células estromales lo cual sucede en el día 12 de gestación, esto podría explicar la mayor transcripción de nuestros factores de crecimiento en este día de gestación.

7.3 Identificación de PI3K y ERK.

Se determinó la presencia de las proteínas de señalización PI3K y ERK en todos los días de gestación y ciclo estral evaluados, con menor relevancia en el miometrio, esto sugiere su activación para la vía de señalización canónica de los factores de crecimiento descrita en otros tejidos que ejercen su efecto mediante receptores tipo tirosín quinasa como es el caso de FGF10 y HGF (Rosário y Birchmeier, 2003; Lemmon y Schlessinger, 2010; Ornitz y Itoh, 2015; Sandra *et al.*, 2017).

Las quinasas activadoras de mitógenos (ERK/MAPK) se han descrito como componentes primordiales de las vías de señalización de procesos como: embriogénesis, diferenciación, proliferación y muerte celular (Pearson *et al.*, 2001). Por su parte la vía PI3K/Akt/mTOR está relacionada a procesos de equilibrio celular, favoreciendo migración y metabolismo celular al igual que proliferación (Ségaliny *et al.*, 2015), estos procesos se llevan a cabo en el embrión en elongación, así como en la especialización celular necesaria por parte del útero para asegurar su receptividad. La localización principalmente en el endometrio nos sugiere su activación paracrina por parte de factores de crecimiento como los que se describieron anteriormente, así como por la influencia de algunos otros que pudieran estar presentes en el momento de peri-implantación.

7.4 Conclusión general.

Se acepta la hipótesis de la investigación debido a que los factores de crecimiento FGF10 y HGF, sus receptores FRFR2 c-MET y sus respectivas vías de señalización PI3K y ERK, están presentes en el útero de cerda gestante para los días estudiados. pudieran tener una participación en la proliferación celular durante la ventana de implantación. La presencia de los receptores en diferentes tipos celulares nos da la idea de una comunicación paracrina que promueve la proliferación del epitelio luminal y glandular, cumpliendo su actividad biológica mediante la unión a sus ligandos presentes también en el tejido endometrial.

Se requiere de estudios funcionales como cultivo celular, inhibición directa de la proteína, así como de sus receptores e incluso delección génica para esclarecer su repercusión directa en este proceso, así como su participación en la comunicación con el trofoblasto embrionario

8. Referencias

Albertini, D. F., E. W. Overstrom, and K. M. Ebert. 1987. "Changes in the Organization of the Actin Cytoskeleton during Preimplantation Development of the Pig Embryo." *Biology of Reproduction* 37(2):441–51.

Anderson, L. L. 1978. "Growth, Protein Content and Distribution of Early Pig Embryos." *The Anatomical Record* 190(1):143–53.

Anteby, Eyal Y., Shira Natanson-Yaron, Yaron Hamani, Yael Sciaki, Debra Goldman-Wohl, Caryn Greenfield, Ilana Ariel, and Simcha Yagel. 2005. "Fibroblast Growth Factor-10 and Fibroblast Growth Factor Receptors 1-4: Expression and Peptide Localization in Human Decidua and Placenta." *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 119(1):27–35.

Aplin, John Dalzell. 2008. *The Endometrium: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives*. Informa Healthcare. U.K.

Arnaud, E., C. Touriol, C. Boutonnet, M. C. Gensac, S. Vagner, H. Prats, and A. C. Prats. 1999. "A New 34-Kilodalton Isoform of Human Fibroblast Growth Factor 2 Is Cap Dependently Synthesized by Using a Non-AUG Start Codon and Behaves as a Survival Factor." *Molecular and Cellular Biology* 19(1):505–14.

Ashworth, Morgan D., Jason W. Ross, Jianbo Hu, Frankie J. White, Daniel R. Stein, Udaya DeSilva, Gregory A. Johnson, Thomas E. Spencer, and Rodney D. Geisert. 2006. "Expression of Porcine Endometrial Prostaglandin Synthase During the Estrous Cycle & Early Pregnancy and Following Endocrine Disruption of Pregnancy¹." *Biology of Reproduction* 74(6):1007–15.

Bagai, Shelly, Eric Rubio, Jang-Fang Cheng, Robert Sweet, Regi Thomas, Elaine Fuchs, Richard Grady, Michael Mitchell, and James A. Bassuk. 2002. "Fibroblast Growth Factor-10 Is a Mitogen for Urothelial Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 277(26):23828–37.

Baird, A. and P. Böhlen. 1991. "Fibroblast Growth Factors." Pp. 369–418 in *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*. New York, NY: Springer New York.

Bal, H. S. and R. Getty. 1970. "Postnatal Growth of the Swine Uterus from Birth to Six Months." *Growth* 34(1):15–30.

Banks, William J. and Ana Martínez Haro. 1996. *Histología Veterinaria Aplicada. El Manual Moderno*.

Bartol, F. F., A. A. Wiley, T. E. Spencer, J. L. Vallet, and R. K. Christenson. 1993. "Early Uterine Development in Pigs." *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 48:99–116.

Bazer, F. W. 1992. "Mediators of Maternal Recognition of Pregnancy in Mammals." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 199(4):373–84.

Bazer, F. W., G. W. Song, J. Y. Kim, K. A. Dunlap, M. C. Satterfield, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, and G. Wu. 2012. "Uterine Biology in Sheep and Pigs." *J Anim Sci Biotechnol* 3(1):1.

Bazer, Fuller, Thomas Spencer, and Gregory Johnson. 2009. "Interferons and Uterine Receptivity." *Seminars in Reproductive Medicine* 27(01):090-102.

Bazer, Fuller W., Robert C. Burghardt, Greg A. Johnson, Thomas E. Spencer, and Guoyao Wu. 2008. "Interferons and Progesterone for Establishment and Maintenance of Pregnancy: Interactions among Novel Cell Signaling Pathways." *Reproductive Biology* 8(3):179–211.

Bazer, Fuller W. and Gregory A. Johnson. 2014. "Pig Blastocyst-Uterine Interactions." *Differentiation* 87(1–2):52–65.

Bazer, Fuller W., Thomas E. Spencer, Greg A. Johnson, Robert C. Burghardt, and Guoyao Wu. 2009. "Comparative Aspects of Implantation." *Reproduction* 138(2):195–209.

Bazer, Fuller W. and W. W. Thatcher. 1977. "Theory of Maternal Recognition of Pregnancy in Swine Based on Estrogen Controlled Endocrine versus Exocrine Secretion of Prostaglandin F₂α by the Uterine Endometrium." *Prostaglandins* 14(2):397–401.

Bazer, Fuller W., Guoyao Wu, Thomas E. Spencer, Greg A. Johnson, Robert C. Burghardt, and Kayla Bayless. 2009. "Novel Pathways for Implantation and Establishment and Maintenance of Pregnancy in Mammals." *Molecular Human Reproduction* 16(3):135–52.

Berger, Trish. 1996. "Fertilization in Ungulates." *Animal Reproduction Science* 42(1–4):351–60.

Blackwell, Dianna M., Robert C. Speth, and Mark A. Mirando. 2003. "Morphometric Analysis of the Uterine Endometrium of Swine on Days 12 and 16 Postestrus." *The Anatomical Record* 270A(1):59–66.

Blitek, A., E. Morawska, and A. J. Ziecik. 2012. "Regulation of Expression and Role of Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6 in the Uterus of Early Pregnant Pigs." *Theriogenology* 78(5):951–64.

Blomberg, Le Ann and Kurt A. Zuelke. 2005. "Expression Analysis of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (STAR) Gene in Developing Porcine Conceptuses." *Molecular Reproduction and Development* 72(4):419–29.

Bloomfield, F. H., Ana Mishel Spiroski, and J. E. Harding. 2013. "Fetal Growth Factors and Fetal Nutrition." *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 18(3):118–23.

Bottaro, D. P., J. S. Rubin, D. L. Faletto, A. M. Chan, T. E. Kmiecik, G. F. Vande Woude, and S. A. Aaronson. 1991. "Identification of the Hepatocyte Growth Factor Receptor as the C-Met Proto-Oncogene Product." *Science (New York, N.Y.)* 251(4995):802–4.

Böttcher, Ralph T. and Christof Niehrs. 2005. "Fibroblast Growth Factor Signaling during Early Vertebrate Development." *Endocrine Reviews* 26(1):63–77.

Bowen, Jeffery A., Fuller W. Bazer, and Robert C. Burghardt. 1996. "Spatial and Temporal Analyses of Integrin and Muc-1 Expression in Porcine Uterine Epithelium and Trophoctoderm In Vivo'." *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 55:1098–1106.

Brayman, Melissa, Amantha Thathiah, and Daniel D. Carson. 2004. "MUC1: A Multifunctional Cell Surface Component of Reproductive Tissue Epithelia." *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 2:4.

Brinkmann, V., H. Foroutan, M. Sachs, K. M. Weidner, and W. Birchmeier. 1995. "Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Induces a Variety of Tissue-Specific Morphogenic Programs in Epithelial Cells." *The Journal of Cell Biology* 131(6 Pt 1):1573–86.

Burghardt, Robert C., James R. Burghardt, James D. Taylor, Adele T. Reeder, Bar T. Nguen, Thomas E. Spencer, Kayla J. Bayless, and Greg A. Johnson. 2009. "Enhanced Focal Adhesion Assembly Reflects Increased Mechanosensation and Mechanotransduction at Maternal-Conceptus Interface and Uterine Wall during Ovine Pregnancy." *Reproduction* 137(3):567–82.

Carpenter, Karen D., C. Allison Gray, Tina M. Bryan, Thomas H. Welsh, and Thomas E. Spencer. 2003. "Estrogen and Antiestrogen Effects on Neonatal Ovine Uterine Development1." *Biology of Reproduction* 69(2):708–17.

Carter, Anthony M. and Allen C. Enders. 2004. "Comparative Aspects of Trophoblast Development and Placentation." *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:1–15.

Cha, Jeeyeon, Sudhansu K. Dey, and Hyunjung (Jade) Lim. 2015. "Embryo Implantation." Pp. 1697–1739 in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier.

Chen, Chen, Thomas E. Spencer, and Fuller W. Bazer. 2000. Expression of Hepatocyte Growth Factor and Its Receptor C-Met in the Ovine Uterus 1. Vol. 62.

Chen, Chen, Thomas E. Spencer, and Fuller W. Bazer. 2000. "Fibroblast Growth Factor-10: A Stromal Mediator of Epithelial Function in the Ovine Uterus." *Biology of Reproduction* 63(3):959–66.

Chen, Qi, Ying Zhang, David Elad, Ariel J. Jaffa, Yujing Cao, Xiaoqin Ye, and Enkui Duan. 2013. "Navigating the Site for Embryo Implantation: Biomechanical and Molecular Regulation of Intrauterine Embryo Distribution." *Molecular Aspects of Medicine* 34(5):1024–42.

Chung, Chia-Ling, Chun-Wun Lu, Yu-Sheng Cheng, Ching-Yi Lin, H. Sunny Sun, and Yung-Ming Lin. 2013. "Association of Aberrant Expression of Sex-Determining Gene Fibroblast Growth Factor 9 with Sertoli Cell-only Syndrome." *Fertility and Sterility* 100(6):1547–1554.e4.

Chung, Daesuk, Fei Gao, Anil G. Jegga, and Sanjoy K. Das. 2015. "Estrogen Mediated Epithelial Proliferation in the Uterus Is Directed by Stromal Fgf10 and Bmp8a." *Molecular and Cellular Endocrinology* 400:48–60.

Cockburn, Katie and Janet Rossant. 2010. "Making the Blastocyst: Lessons from the Mouse." *The Journal of Clinical Investigation* 120(4):995–1003.

Colvin, J. S., R. P. Green, J. Schmahl, B. Capel, and D. M. Ornitz. 2001. "Male-to-Female Sex Reversal in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor 9." *Cell* 104(6):875–89.

Conley, A. J. and S. P. Ford. 1989. "Direct Luteotropic Effect of Oestradiol-17B on Pig Corpora Lutea." *J.Reprod.Fertil.* 87(October):125–31.

Corps, A. N., D. R. Brigstock, C. J. Littlewood, and K. D. Brown. 1990. "Receptors for Epidermal Growth Factor and Insulin-like Growth Factor-I on Preimplantation Trophoderm of the Pig." 227:221–27.

Dziuk, P. 1985. "Effect of Migration, Distribution and Spacing of Pig Embryos on Pregnancy and Fetal Survival." *Journal of Reproduction and Fertility*.33:57–63.

Eakin, Guy S. and Richard R. Behringer. 2004. "Diversity of Germ Layer and Axis Formation among Mammals." 15:619–29.

Edwards, Andrew K., Marianne J. van den Heuvel, Jocelyn M. Wessels, Jonathan LaMarre, B. Anne Croy, and Chandrakant Tayade. 2011. "Expression of Angiogenic Basic Fibroblast Growth Factor, Platelet Derived Growth Factor, Thrombospondin-1 and Their Receptors at the Porcine Maternal-Fetal Interface." *Reproductive Biology and Endocrinology* 9(1):5.

Fazleabas, A. T., J. J. Kim, and Z. Strakova. 2004. "Implantation: Embryonic Signals and the Modulation of the Uterine Environment - A Review." *Placenta* 25(SUPPL. A):26–31.

Feldman, B., W. Poueymirou, V. E. Papaioannou, T. M. DeChiara, and M. Goldfarb. 1995. "Requirement of FGF-4 for Postimplantation Mouse Development." *Science (New York, N.Y.)* 267(5195):246–49.

Ferracinis, Riccardo, Paola Longati, Luigi Naldini, Elisa Vigna, and Paolo M. Comoglio. 1991. "Identification of the Major Autophosphorylation Site of the Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase;" 266(28):19558–64.

Ford, S. P. and R. K. Christenson. 1979. "Blood Flow to Uteri of Sows during the Estrous Cycle and Early Pregnancy: Local Effect of the Conceptus on the Uterine Blood Supply." *Biology of Reproduction* 21(3):617–24.

Foxcroft, G. R. 1997. "Mechanisms Mediating Nutritional Effects on Embryonic Survival in Pigs." *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 52:47–61.

Foxcroft, G. R., P. V. Silva, and F. Paradis. 2016. "Application of Transcriptomic Analyses to Reproductive Studies in Contemporary Commercial Sows." *Theriogenology* 85(1):145–51.

Franczak, A., G. Kotwica, B. Kurowicka, A. Oponowicz, I. Wocławek-Potocka, and B. K. Petroff. 2006. "Expression of Enzymes of Cyclooxygenase Pathway and Secretion of Prostaglandin E2 and F2 α by Porcine Myometrium during Luteolysis and Early Pregnancy." *Theriogenology* 66(5):1049–56.

Fujii, Takashi, Nobuyuki Sakurai, Tsubasa Osaki, Gentaro Iwagami, Hiroki Hirayama, Akira Minamihashi, Tsutomu Hashizume, and Ken Sawai. 2013. "Segregation and Function of Inner Cell Mass and Trophectoderm." *Journal of Reproduction and Development* 59(2).

Fukuyama, Ryuichi, Yuuka Ichijoh, Shinsei Minoshima, Naomi Kitamura, and Nobuyoshi Shimizu. 1991. "Regional Localization of the Hepatocyte Growth Factor (HGF) Gene to Human Chromosome 7 Band Q21.1." *Genomics* 11(2):410–15.

Garverick, H. A., C. Polge, and A. P. Flint. 1982. "Oestradiol Administration Raises Luteal LH Receptor Levels in Intact and Hysterectomized Pigs." *Journal of Reproduction and Fertility* 66(1):371–77.

Geisert, R. D., J. W. Brookbank, R. M. Roberts, and F. W. Bazer. 1982. "Establishment of Pregnancy in the Pig: II. Cellular Remodeling of the Porcine Blastocyst During Elongation on Day 12 of Pregnancy." *Biology of Reproduction* 27(July):941–55.

Geisert, Rodney D., Matthew C. Lucy, Jeffrey J. Whyte, Jason W. Ross, and Daniel J. Mathew. 2014. "Cytokines from the Pig Conceptus: Roles in Conceptus Development in Pigs." *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5(1):51.

Geisert, Rodney D., Jeffrey J. Whyte, Ashley E. Meyer, Daniel J. Mathew, María R. Juárez, Matthew C. Lucy, Randall S. Prather, and Thomas E. Spencer. 2017. "Rapid Conceptus Elongation in the Pig: An Interleukin 1 Beta 2 and Estrogen-Regulated Phenomenon." *Molecular Reproduction and Development* 84(9):760–74.

Geisert, Rodney, Asgerally Fazleabas, Mathew Lucy, and Daniel Mathew. 2012. "Interaction of the Conceptus and Endometrium to Establish Pregnancy in Mammals: Role of Interleukin 1 β ." *Cell and Tissue Research* 349(3):825–38.

Geneser, Finn. 1985. *Color Atlas of Histology*. 1st ed. España.

Giordano, S., C. Ponzetto, M. F. Di Renzo, C. S. Cooper, and P. M. Comoglio. 1989. "Tyrosine Kinase Receptor Indistinguishable from the C-Met Protein." *Nature* 339(6220):155–56.

Goetz, Regina and Moosa Mohammadi. 2013. "Exploring Mechanisms of FGF Signalling through the Lens of Structural Biology." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(3):166–80.

Gonzatti-Haces, M., A. Seth, M. Park, T. Copeland, S. Oroszlan, and G. F. Vande Woude. 1988. "Characterization of the TPR-MET Oncogene P65 and the MET Protooncogene P140 Protein-Tyrosine Kinases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(1):21–25.

Grau, Hugo and Peter Walter. 1975. *Histología y Anatomía Microscópica Comparada de Los Mamíferos Domésticos*. España.

Gray, C. Allison, Kristin M. Taylor, Fuller W. Bazer, and Thomas E. Spencer. 2000. "Mechanisms Regulating Norgestomet Inhibition of Endometrial Gland Morphogenesis in the Neonatal Ovine Uterus." *Molecular Reproduction and Development* 57(1):67–78.

Gupta, Anupma, Fuller W. Bazer, and Laurie A. Jaeger. 1997. "Immunolocalization of Acidic and Basic Fibroblast Growth Factors in Porcine Uterine and Conceptus Tissues1." *Biology of Reproduction* 56(6):1527–36.

Halaban, R., J. S. Rubin, and W. White. 1993. "Met and HGF-SF in Normal Melanocytes and Melanoma Cells." *EXS* 65:329–39.

Hall, V., K. Hinrichs, G. Lazzari, D. H. Betts, and P. Hyttel. 2013. "Early Embryonic Development, Assisted Reproductive Technologies, and Pluripotent Stem Cell Biology in Domestic Mammals." *Veterinary Journal* 197(2):128–42.

Hayashi, Kanako, Karen D. Carpenter, and Thomas E. Spencer. 2004. "Neonatal Estrogen Exposure Disrupts Uterine Development in the Postnatal Sheep." *Endocrinology* 145(7):3247–57.

Huang, Liwei, Yongbing Pu, Shumyle Alam, Lynn Birch, and Gail S. Prins. 2005. "The Role of Fgf10 Signaling in Branching Morphogenesis and Gene Expression of the Rat Prostate Gland: Lobe-Specific Suppression by Neonatal Estrogens." *Developmental Biology* 278(2):396–414.

Hunter, R. H. F. 1974. "Chronological and Cytological Details of Fertilization and Early Embryonic Development in the Domestic Pig, *Sus Scrofa*." *The Anatomical Record* 178(2):169–85.

Igarashi, M., P. W. Finch, and S. A. Aaronson. 1998. "Characterization of Recombinant Human Fibroblast Growth Factor (FGF)-10 Reveals Functional Similarities with Keratinocyte Growth Factor (FGF-7)." *J.Biol.Chem.* 273(21):13230–35.

Itoh, Nobuyuki. 2016. "FGF10: A Multifunctional Mesenchymal-Epithelial Signaling Growth Factor in Development, Health, and Disease." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 28:63–69.

Jeong, Wooyoung, Jinhyeon Kim, Fuller W. Bazer, Gwonhwa Song, and Jinyoung Kim. 2016. "Stimulatory Effects of Interleukin-1 Beta on Development of Porcine Uterine Epithelial Cell Are Mediated by Activation of the ERK1/2 MAPK Cell Signaling Cascade." *Molecular and Cellular Endocrinology* 419:225–34.

Jeong, Wooyoung, Jinyoung Kim, Fuller W. Bazer, and Gwonhwa Song. 2013. "Epidermal Growth Factor Stimulates Proliferation and Migration of Porcine Trophectoderm Cells through Protooncogenic Protein Kinase 1 and Extracellular-Signal-Regulated Kinases 1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Cascades during Early." *Molecular and Cellular Endocrinology* 381(1–2):302–11.

Jeong, Wooyoung, Jieun Lee, Fuller W. Bazer, Gwonhwa Song, and Jinyoung Kim. 2016. "Fibroblast Growth Factor 4-Induced Migration of Porcine Trophectoderm Cells Is Mediated via the AKT Cell Signaling Pathway." *Molecular and Cellular Endocrinology* 419:208–16.

Jeong, Wooyoung, Gwonhwa Song, Fuller W. Bazer, and Jinyoung Kim. 2014. "Insulin-like Growth Factor I Induces Proliferation and Migration of Porcine Trophectoderm Cells through Multiple Cell Signaling Pathways, Including Protooncogenic Protein Kinase 1 and Mitogen-Activated Protein Kinase." *Molecular and Cellular Endocrinology* 384(1–2):175–84.

Johnson, D. E., P. L. Lee, J. Lu, and L. T. Williams. 1990. "Diverse Forms of a Receptor for Acidic and Basic Fibroblast Growth Factors." *Mol Cell Biol* 10(9):4728–36.

Johnson, Greg A., Robert C. Burghardt, Fuller W. Bazer, and Thomas E. Spencer. 2003. "Osteopontin: Roles in Implantation and Placentation¹." *Biology of Reproduction* 69(5):1458–71.

Ka, Hakhyun, Saeed Al-Ramadan, David W. Erikson, Greg A. Johnson, Robert C. Burghardt, Thomas E. Spencer, Laurie A. Jaeger, and Fuller W. Bazer. 2007. "Regulation of Expression of Fibroblast Growth Factor 7 in the Pig Uterus by Progesterone and Estradiol¹." *Biology of Reproduction* 77(1):172–80.

Kawano, Yasushi, Kosay Zeineh Hasan, Junichiro Fukuda, Shinichiro Mine, and Isao Miyakawa. 2003. "Production of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenic Factor in Human Follicular Fluid." *Molecular and Cellular Endocrinology* 202(1–2):19–23.

Kiefer, P., P. Acland, D. Pappin, G. Peters, and C. Dickson. 1994. "Competition between Nuclear Localization and Secretory Signals Determines the Subcellular Fate of a Single CUG-Initiated Form of FGF3." *The EMBO Journal* 13(17):4126–36.

King, Anne E. and Hilary O. D. Critchley. 2010. "Oestrogen and Progesterone Regulation of Inflammatory Processes in the Human Endometrium." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 120(2–3):116–26.

Koji, T., M. Chedid, J. S. Rubin, O. D. Slayden, K. G. Csaky, S. A. Aaronson, and R. M. Brenner. 1994. "Progesterone-Dependent Expression of Keratinocyte Growth Factor mRNA in Stromal Cells of the Primate Endometrium: Keratinocyte Growth Factor as a Progestomedin." *The Journal of Cell Biology* 125(2):393–401.

Konishi, Morichika, Toshiyuki Asaki, Naomi Koike, Hiroyuki Miwa, Ayumi Miyake, and Nobuyuki Itoh. 2006. "Role of Fgf10 in Cell Proliferation in White Adipose Tissue." *Molecular and Cellular Endocrinology* 249(1–2):71–77.

Krawchuk, Dayana, Nobuko Honma-Yamanaka, Shihadeh Anani, and Yojiro Yamanaka. 2013. "FGF4 Is a Limiting Factor Controlling the Proportions of Primitive Endoderm and Epiblast in the ICM of the Mouse Blastocyst." *Developmental Biology* 384(1):65–71.

Lee, Hyun O. and Caren Norden. 2013. "Mechanisms Controlling Arrangements and Movements of Nuclei in Pseudostratified Epithelia." *Trends in Cell Biology* 23(3):141–50.

Lee, P. L., D. E. Johnson, L. S. Cousens, V. A. Fried, and L. T. Williams. 1989. "Purification and Complementary DNA Cloning of a Receptor for Basic Fibroblast Growth Factor." *Science (New York, N.Y.)* 245(4913):57–60.

Lemmon, Mark A. and Joseph Schlessinger. 2010. "Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases." *Cell* 141(7):1117–34.

Leymarie, P. and J. Martal. 1991. "The Corpus Luteum from Cycle to Gestation." Pp. 413–33 in *Reproduction in Mammals and Man*, edited by R. H. F. Thibault, C.; Levasseur, M. C.; Hunter. Paris Francia.

Li, Yunping, Maya Reznichenko, Rachel M. Tribe, Philip E. Hess, Michael Taggart, Hak Rim Kim, Jon P. DeGnore, Samudra Gangopadhyay, and Kathleen G. Morgan. 2009. "Stretch Activates Human Myometrium via ERK, Caldesmon and Focal Adhesion Signaling." *PLoS ONE* 4(10).

Ma, W. -g., H. Song, S. K. Das, B. C. Paria, and S. K. Dey. 2003. "Estrogen Is a Critical Determinant That Specifies the Duration of the Window of Uterine Receptivity for Implantation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(5):2963–68.

Manejwala, Fazal M., Edward J. Cragoe, and Richard M. Schultz. 1989. Blastocoel Expansion in the Preimplantation Mouse Embryo: Role of Extracellular Sodium and Chloride and Possible Apical Routes of Their Entry. Vol. 133.

Martin, Gail R. 1998. "The Roles of FGFs in the Early Development of Vertebrate Limbs." *Genes and Development* 12(11):1571–86.

Matsumoto, K., K. Hashimoto, K. Yoshikawa, and T. Nakamura. 1991. "Marked Stimulation of Growth and Motility of Human Keratinocytes by Hepatocyte Growth Factor." *Experimental Cell Research* 196(1):114–20.

McKeehan, W. L., F. Wang, and M. Kan. 1998. "The Heparan Sulfate-Fibroblast Growth Factor Family: Diversity of Structure and Function." *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 59:135–76.

Min, H., D. M. Danilenko, S. A. Scully, B. Bolon, B. D. Ring, J. E. Tarpley, M. DeRose, and W. S. Simonet. 1998. "Fgf-10 Is Required for Both Limb and Lung Development and Exhibits Striking Functional Similarity to *Drosophila* Branchless." *Genes & Development* 12(20):3156–61.

Miyazawa, K. and T. Shimomura. 1995. "Proteolytic Cascade for Activation of Hepatocyte Growth Factor in Response to Tissue Injury." *Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society* 67(5):381–85.

Naldini, Luigi, Elisa Vigna, Alberto Bardelli, Antonia Follenzi, Francesco Galimi, and Paolo M. Comoglio. 1995. "Biological Activation of Pro-HGF (Hepatocyte Growth Factor) by Urokinase Is Controlled by a Stoichiometric Reaction." *Journal of Biological Chemistry* 270(2):603–11.

Norden, Caren. 2017. "Pseudostratified Epithelia - Cell Biology, Diversity and Roles in Organ Formation at a Glance." *Journal of Cell Science* 130(11):1859–63.

NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014. 2015. "DOF - Diario Oficial de La Federación." *Métodos Para Dar Muerte a Los Animales Domésticos y Silvestres*. Retrieved July 22, 2018 (http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015).

Okumu, L. A., N. Forde, S. Mamo, P. McGettigan, J. P. Mehta, J. F. Roche, and P. Lonergan. 2014. "Temporal Regulation of Fibroblast Growth Factors and Their Receptors in the Endometrium and Conceptus during the Pre-Implantation Period of Pregnancy in Cattle." *Reproduction* 147(6):825–34.

Organ, Shawna Leslie and Ming Sound Tsao. 2011. "An Overview of the C-MET Signaling Pathway." *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 3(1): 7–19.

Ornitz, David M. 2000. "FGFs, Heparan Sulfate and FGFRs: Complex Interactions Essential for Development." *BioEssays* 22(2):108–12.

Ornitz, David M. and Nobuyuki Itoh. 2001. "Fibroblast Growth Factors." *Genome Biology* 2(3).

Ornitz, David M. and Nobuyuki Itoh. 2015. "The Fibroblast Growth Factor Signaling Pathway." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4(3):215–66.

Ozturk, Saffet and Ramazan Demir. 2010. "Particular Functions of Estrogen and Progesterone in Establishment of Uterine Receptivity and Embryo Implantation." *Histology and Histopathology* 25(9):1215–28.

Parrott, J. A. and M. K. Skinner. 1998. "Developmental and Hormonal Regulation of Hepatocyte Growth Factor Expression and Action in the Bovine Ovarian Follicle." *Biology of Reproduction* 59(3):553–60.

Pearson, Gray, Fred Robinson, Tara Beers Gibson, Bing-e Xu, Mahesh Karandikar, Kevin Berman, and Melanie H. Cobb. 2001. "Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions 1." *Endocrine Reviews* 22(2):153–83.

Perry, J. S. 1981. "The Mammalian Fetal Membranes." *Reproduction* 62(2):321–35.

Raheem, Kabir Ayobami. 2017. "An Insight into Maternal Recognition of Pregnancy in Mammalian Species." *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 16(1):1–6.

Rosário, Marta and Walter Birchmeier. 2003. "How to Make Tubes: Signaling by the Met Receptor Tyrosine Kinase." *Trends in Cell Biology* 13(6):328–35.

Ross, Michael H. and Wojciech Pawlina. 2016. *Histology: A Text and Atlas : With Correlated Cell and Molecular Biology*. Seventh.

de Ruijter-Villani, Marta, Paula R. M. van Boxtel, and Tom A. E. Stout. 2013. "Fibroblast Growth Factor-2 Expression in the Preimplantation Equine Conceptus and Endometrium of Pregnant and Cyclic Mares." *Theriogenology* 80(9):979–89.

Saccone, Salvatore, Radha P. Narsimhan, Giovanni Gaudino, Leda Dalpra, Paolo M. Comoglio, and Giuliano Della Valle. 1992. "Regional Mapping of the Human Hepatocyte Growth Factor (HGF)-Scatter Factor Gene to Chromosome 7q21.1." *Genomics* 13(3):912–14.

Samborski, Anastazia, Alexander Graf, Stefan Krebs, Barbara Kessler, Myriam Reichenbach, Horst-Dieter Reichenbach, Susanne E. Ulbrich, and Stefan Bauersachs. 2013. "Transcriptome Changes in the Porcine Endometrium During the Preattachment Phase 1." *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 89(6):1–16.

Sandra, Olivier, Gilles Charpigny, Laurent Galio, and Isabelle Hue. 2017. "Preattachment Embryos of Domestic Animals: Insights into Development and Paracrine Secretions." *Annual Review of Animal Biosciences* 5:205–28.

Satterfield, M. Carey, Kanako Hayashi, Gwonhwa Song, Sarah G. Black, Fuller W. Bazer, and Thomas E. Spencer. 2008. "Progesterone Regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the Endometrium of the Ovine Uterus 1." *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 79:1226–36.

Sch, S. 2003. "Cytokines during Early Pregnancy of Mammals : A Review." *Animal Reproduction Science* 75:73–94.

Ségaligny, Aude I., Marta Tellez-Gabriel, Marie Françoise Heymann, and Dominique Heymann. 2015. "Receptor Tyrosine Kinases: Characterisation, Mechanism of Action and Therapeutic Interests for Bone Cancers." *Journal of Bone Oncology* 4(1):1–12.

Senger, PL. 2003. "Early Embryogenesis and Maternal Recognition of Pregnancy." Pp. 284–303 in *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Moscow: Current Conceptions, Inc.

Seshagiri, Polani B., Sen Roy, Garimella Sireesha, and Rajnish P. Rao. 2009. "Cellular and Molecular Regulation of Mammalian Blastocyst Hatching." *Journal of Reproductive Immunology* 83:79–84.

Sherbet, G. V. 2011. *Growth Factors in Differentiation and Morphogenesis*.

Soede, N. M. and B. Kemp. 1997. "Expression of Oestrus and Timing of Ovulation in Pigs." *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 52:91–103.

Sonnenberg, E., D. Meyer, K. M. Weidner, and C. Birchmeier. 1993. "Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor and Its Receptor, the c-Met Tyrosine Kinase, Can Mediate a Signal Exchange between Mesenchyme and Epithelia during Mouse Development." *Journal of Cell Biology* 123(1):223–35.

Spencer, T. E. and F. W. Bazer. 1995. "Temporal and Spatial Alterations in Uterine Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression during the Estrous Cycle and Early Pregnancy in the Ewe." *Biology of Reproduction* 53(6):1527–43.

Spencer, T. E., G. A. Johnson, F. W. Bazer, and R. C. Burghardt. 2007. "Fetal-Maternal Interactions during the Establishment of Pregnancy in Ruminants." *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 64:379–96.

Spencer, Thomas E., Kathrin A. Dunlap, and Justyna Filant. 2012. "Comparative Developmental Biology of the Uterus: Insights into Mechanisms and Developmental Disruption Q."

Spencer, Thomas E., Greg A. Johnson, Fuller W. Bazer, and Robert C. Burghardt. 2004. "Implantation Mechanisms: Insights from the Sheep." *Reproduction* 128(6):657–68.

Spencer, Thomas E., Greg A. Johnson, Robert C. Burghardt, and Fuller W. Bazer. 2004. "Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus: Insights from Domestic Animals 1." *Biology of Reproduction* 71(1):2–10.

Steverink, D. W., N. M. Soede, G. J. Groenland, F. W. van Schie, J. P. Noordhuizen, and B. Kemp. 1999. "Duration of Estrus in Relation to Reproduction Results in Pigs on Commercial Farms." *Journal of Animal Science* 77(4):801–9.

Stewart, Francesca. 1996. "Roles of Mesenchymal-Epithelial Interactions and Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor (HGF-SF) in Placental Development." *Reviews of Reproduction* 1(3):144–48.

Sugawara, J., T. Fukaya, T. Murakami, H. Yoshida, and A. Yajima. 1997. "Hepatocyte Growth Factor Stimulated Proliferation, Migration, and Lumen Formation of Human Endometrial Epithelial Cells in Vitro." *Biology of Reproduction* 57(4):936–42.

Tayade, C., G. P. Black, Y. Fang, and B. A. Croy. 2006. "Differential Gene Expression in Endometrium, Endometrial Lymphocytes, and Trophoblasts during Successful and Abortive Embryo Implantation." *The Journal of Immunology* 176(1):148–56.

Taylor, K. M., C. Chen, C. A. Gray, F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2001. "Expression of Messenger Ribonucleic Acids for Fibroblast Growth Factors 7 and 10, Hepatocyte Growth Factor, and Insulin-like Growth Factors and Their Receptors in the Neonatal Ovine Uterus." *Biology of Reproduction* 64(4):1236–46.

Thisse, Bernard and Christine Thisse. 2005. "Functions and Regulations of Fibroblast Growth Factor Signaling during Embryonic Development." *Developmental Biology* 287(2):390–402.

Tranguch, Susanne, David F. Smith, and Sudhansu K. Dey. 2006. "Progesterone Receptor Requires a Co-Chaperone for Signalling in Uterine Biology and Implantation." *Reproductive BioMedicine Online* 13(5):651–60.

Tulsiani, Daulat R. P. 2003. *Introduction to Mammalian Reproduction*. edited by D. R. P. Tulsiani. Boston, MA: Springer US.

Valdez Magaña, Griselda, Aida Rodríguez, Haixin Zhang, Robert Webb, and Ramiro Alberio. 2014. "Paracrine Effects of Embryo-Derived FGF4 and BMP4 during Pig Trophoblast Elongation." *Developmental Biology* 387(1):15–27.

Viganò, Paola, S. Mangioni, F. Pompei, and I. Chiodo. 2003. "Maternal-Conceptus Cross Talk - A Review." *Placenta* 24(SUPPL. B):56–61.

Waclawik, Agnieszka. 2011. "Novel Insights into the Mechanisms of Pregnancy Establishment: Regulation of Prostaglandin Synthesis and Signaling in the Pig." *Reproduction* 142(3):389–99.

Waclawik, Agnieszka, Henry N. Jabbour, Agnieszka Blitek, and Adam J. Ziecik. 2009. "Estradiol-17 β , Prostaglandin E2 (PGE2), and the PGE2 Receptor Are Involved in PGE2 Positive Feedback Loop in the Porcine Endometrium." *Endocrinology* 150(8):3823–32.

Waclawik, Agnieszka, Monika M. Kaczmarek, Agnieszka Blitek, Piotr Kaczynski, and Adam J. Ziecik. 2017. "Embryo-Maternal Dialogue during Pregnancy Establishment and Implantation in the Pig." *Molecular Reproduction and Development* 84(9):842–55.

Walters, Eric M., Eckhard Wolf, Jeffery J. Whyte, Jiude Mao, Simone Renner, Hiroshi Nagashima, Eiji Kobayashi, Jianguo Zhao, Kevin D. Wells, John K. Critser, Lela K. Riley, and Randall S. Prather. 2012. "Completion of the Swine Genome Will Simplify the Production of Swine as a Large Animal Biomedical Model." *BMC Medical Genomics* 5:1–11.

Wang, D. H., J. Ren, C. J. Zhou, Z. Han, L. Wang, and C. G. Liang. 2018. "Supplementation with CTGF, SDF1, NGF, and HGF Promotes Ovine in Vitro Oocyte Maturation and Early Embryo Development." *Domestic Animal Endocrinology* 65:38–48.

Wang, Haibin and Sudhansu K. Dey. 2006. "Roadmap to Embryo Implantation: Clues from Mouse Models." *Nature Reviews Genetics* 7(3):185–99.

Wang, Haibin, Shuang Zhang, Haiyan Lin, Shuangbo Kong, Shumin Wang, Hongmei Wang, and D. Randall Armant. 2013. "Physiological and Molecular Determinants of Embryo Implantation." *Molecular Aspects of Medicine* 34(5):939–80.

Weidner, K. M., M. Sachs, and W. Birchmeier. 1993. "The Met Receptor Tyrosine Kinase Transduces Motility, Proliferation, and Morphogenic Signals of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor in Epithelial Cells." *Journal of Cell Biology* 121(1):145–54.

Welter, H., K. Wollenhaupt, and R. Einspanier. 2004. "Developmental and Hormonal Regulated Gene Expression of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) and Its Receptors in Porcine Endometrium." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 88(3):295–304.

White, Melanie D., Jennifer Zenker, Stephanie Bissiere, and Nicolas Plachta. 2017. "How Cells Change Shape and Position in the Early Mammalian Embryo." *Current Opinion in Cell Biology* 44:7–13.

White, Melanie D., Jennifer Zenker, Stephanie Bissiere, and Nicolas Plachta. 2018. "Instructions for Assembling the Early Mammalian Embryo." *Developmental Cell* 45(6):667–79.

Wilkie, Andrew O. M., Gillian M. Morriss-Kay, E. Yvonne Jones, and John K. Heath. 1995. "Functions of Fibroblast Growth Factors and Their Receptors." *Current Biology* 5(5):500–507.

Yamanaka, Y., F. Lanner, and J. Rossant. 2010. "FGF Signal-Dependent Segregation of Primitive Endoderm and Epiblast in the Mouse Blastocyst." *Development* 137(5):715–24.

Yelich, J. V, D. Pomp, and R. D. Geisert. 1997. "Ontogeny of Elongation and Gene Expression in the Early Developing Porcine Conceptus." *Biology of Reproduction* 57(5):1256–65.

Zarnegar, R., M. C. DeFrances, D. P. Kost, P. Lindroos, and G. K. Michalopoulos. 1991. "Expression of Hepatocyte Growth Factor mRNA in Regenerating Rat Liver after Partial Hepatectomy." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 177(1):559–65.

Zarnegar, Reza and George K. Michalopoulos. 1995. "The Many Faces of Hepatocyte Growth Factor: From Hepatopoiesis to Hematopoiesis." *Journal of Cell Biology* 129(5):1177–80.

Zhang, Xiuqin, Omar A. Ibrahimi, Shaun K. Olsen, Hisashi Umemori, Moosa Mohammadi, and David M. Ornitz. 2006. "Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family: The Complete Mammalian FGF Family." *Journal of Biological Chemistry* 281(23):15694–700.

Zhao, Hai Yang, Jiang Wu, Jing Jing Zhu, Ze Cong Xiao, Chao Chao He, Hong Xue Shi, Xiao Kun Li, Shu Lin Yang, and Jian Xiao. 2015. "Research Advances in Tissue Engineering Materials for Sustained Release of Growth Factors." *BioMed Research International* 2015.

Ziecik, Aj, A. Waclawik, Mm Kaczmarek, A. Blitek, B. Moza Jalali, and A. Andronowska. 2011. "Mechanisms for the Establishment of Pregnancy in the Pig." *Reproduction in Domestic Animals* 46(SUPPL. 3):31–41.

9. Lista de Gráficos

Gráfico 1. Expresión relativa de FGF10 en los diferentes días de estudio.	84
Gráfico 2. Expresión relativa de FGFR2 en los diferentes días de estudio.	84
Gráfico 3. Tendencia de expresión de FGF10 a través de la gestación temprana.	85
Gráfico 4. Tendencia de expresión de FGFR2 a través de la gestación temprana.	86
Gráfico 5. Expresión relativa de HGF en los diferentes días de estudio.	87
Gráfico 6 Expresión relativa de c-MET en los diferentes días de estudio.	88
Gráfico 7. Tendencia de expresión de HGF a través de la gestación temprana.	89
Gráfico 8. Tendencia de expresión de c-MET a través de la gestación temprana.	89
Gráfico 9. Tendencia de expresión de los genes evaluados a través de la gestación temprana. ...	90
Gráfico 10. Regresión lineal del rango dinámico para β -actina.	127
Gráfico 11. Regresión lineal del rango dinámico para FGF10.	128
Gráfico 12. Regresión lineal del rango dinámico para FGFR2.	129
Gráfico 13. Regresión lineal del rango dinámico para HGF.	131
Gráfico 14. Regresión lineal del rango dinámico para c-MET.	132

10. Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Momentos en que se observan etapas de desarrollo posteriores a la fertilización.</i>	15
<i>Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios, número de catálogo y diluciones utilizadas</i>	43
<i>Tabla 3. Concentración (ng/ μl) y grado de pureza del RNA</i>	52
<i>Tabla 4. Localización Inmunohistoquímica de FGF10 Y FGFR2</i>	81
<i>Tabla 5. Localización Inmunohistoquímica de HGF y c-MET</i>	81
<i>Tabla 6. Localización Inmunohistoquímica de PI3K y ERK</i>	82
<i>Tabla 7. Valor del Ct para FGF10 y FGFR2 y promedio de la relación con β-Actina.</i>	83
<i>Tabla 8. Valor del Ciclo umbral (Ct) para HGF y c-MET y promedio de la relación con β-Actina.</i>	87
<i>Tabla 9. Valor promedio de la cuantificación relativa de todos los genes.</i>	91

11. Lista de Figuras

<i>Figura 1. Morfología del embrión porcino durante la segmentación y formación del blastocito.</i>	14
<i>Figura 2. Diferentes grados de elongación del embrión porcino, día 12 de gestación.</i>	18
<i>Figura 3. Subfamilias de FGF. Modificados de Itoh & Ornitz, 2004.</i>	26
<i>Figura 4. Control positivo de inmunohistoquímica con el anticuerpo PCNA.200X.</i>	41
<i>Figura 5. Control de FGF10 y HGF en riñón porcino.</i>	42
<i>Figura 6. Control negativo de inmunohistoquímica en muestra de útero. 200X</i>	42
<i>Figura 7. Corte transversal de la pared uterina de cerda.</i>	46
<i>Figura 8. Corte transversal de la pared uterina de cerda en el día 12 de gestación.</i>	47
<i>Figura 9. Epitelio de revestimiento y endometrio de cerda en el día 12 de gestación.</i>	47
<i>Figura 10. Corte transversal de la pared uterina de cerda en el día 14 de gestación.</i>	48
<i>Figura 11. Epitelio de revestimiento y endometrio de cerda en el día 14 de gestación.</i>	48
<i>Figura 12. Glándulas endometriales de cerda en el día 14 de gestación.</i>	48
<i>Figura 13. Corte transversal de la pared uterina de cerda en el día 16 de gestación.</i>	49
<i>Figura 14. Epitelio de revestimiento y endometrio de cerda en el día 16 de gestación.</i>	49
<i>Figura 15. Corte transversal de la pared uterina de cerda en el día 18 de gestación.</i>	50
<i>Figura 16. Epitelio de revestimiento y embrión elongado en el día 18 de gestación.</i>	50
<i>Figura 17. Glándulas endometriales de cerda en el día 18 de gestación.</i>	51
<i>Figura 18. Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa para β-Actina.</i>	53
<i>Figura 19. Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa. FGF10 y FGFR2 respectivamente.</i>	54
<i>Figura 20. Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa. HGF Y c-MET respectivamente.</i>	54
<i>Figura 21. Epitelio de revestimiento y trofoblasto marcados con el Ac FGF10, 12 días de gestación 400X</i>	55
<i>Figura 22. Epitelio de revestimiento y trofoblasto marcados con el Ac FGFR2, 12 días de gestación 400X.</i>	55
<i>Figura 23. Miometrio marcado con el Ac FGF10, 12 días de gestación 400X.</i>	56
<i>Figura 24. Miometrio con el Ac FGFR2, 12 días de gestación. 200X.</i>	56
<i>Figura 25. Glándula y vaso sanguíneo marcados con Ac FGF10, 12 días de gestación 400X.</i>	56
<i>Figura 26. Glándulas endometriales marcadas con el Ac FGFR2, 12 días de gestación. 400X.</i>	56
<i>Figura 27. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGF10, día 14 de gestación 400X</i>	57
<i>Figura 28. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 14 de gestación 400X.</i>	57
<i>Figura 29. Miometrio marcado con el Ac FGF10, 14 días de gestación 400X.</i>	57
<i>Figura 30. Miometrio con el Ac FGFR2, 14 días de gestación 200X.</i>	57
<i>Figura 31. Glándulas marcadas con Ac FGF10, 14 días de gestación 400X.</i>	58
<i>Figura 32. Glándulas marcadas con Ac FGFR2, 14 días de gestación 400X.</i>	58
<i>Figura 33. Epitelio de revestimiento marcado con Ac FGF10, 16 días de gestación 400X.</i>	59
<i>Figura 34. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 16 de gestación 400X.</i>	59
<i>Figura 35. Miometrio marcado con el Ac FGF10, 16 días de gestación 200X.</i>	59
<i>Figura 36. Miometrio con el Ac FGFR2, 16 días de gestación 200X.</i>	59
<i>Figura 37. Glándulas marcadas con Ac FGF10, 16 días de gestación 400X.</i>	59

Figura 38. Glándulas marcadas con Ac FGFR2, 16 días de gestación 400X.....	59
Figura 39. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGF10, día 18 de gestación 400X.	60
Figura 40. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 18 de gestación 400X.....	60
Figura 41. Miometrio marcado con el Ac FGF10, 18 días de gestación 400X.....	60
Figura 42. Miometrio con el Ac FGFR2, 18 días de gestación 200X.	60
Figura 43. Glándulas marcadas con Ac FGF10, 18 días de gestación 400X.	61
Figura 44. Glándulas con Ac FGFR2, 1 días de gestación 400X.	61
Figura 45. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGF10, día 2 del ciclo estral 400X.....	62
Figura 46. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 2 del ciclo estral 400X.	62
Figura 47. Miometrio marcado con el Ac FGF10, día 2 del ciclo estral 200X.	62
Figura 48. Miometrio marcado con el Ac FGFR2, día 2 del ciclo estral 200X.....	62
Figura 49. Glándulas marcadas con Ac FGF10, día 2 del ciclo estral 200X.....	62
Figura 50. Glándulas marcadas con Ac FGFR2, día 2 del ciclo estral 400X.	62
Figura 51. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGF10, día 12 del ciclo estral 400X.	63
Figura 52. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac FGFR2, día 12 del ciclo estral 400X.	63
Figura 53. Miometrio marcado con el Ac FGF10, día 12 del ciclo estral 200X.	64
Figura 54. Miometrio marcado con el Ac FGFR2, día 12 del ciclo estral 200X.....	64
Figura 55. Glándulas marcadas con Ac FGF10, día 12 del ciclo estral 400X.....	64
Figura 56. Glándulas marcadas con Ac FGFR2, día 12 del ciclo estral 400X.	64
Figura 57. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 12 de gestación 400X.	65
Figura 58. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 12 de gestación 400X.	65
Figura 59. Miometrio, glándulas y estroma marcado con el Ac HGF, 12 días de gestación 200X.	65
Figura 60. Miometrio con el Ac c-MET, 12 días de gestación 400X.	65
Figura 61. Estroma marcado con el Ac HGF, 12 días de gestación. 400X.....	66
Figura 62. Glándulas endometriales marcadas con el Ac c-MET, 12 días de gestación. 400X.....	66
Figura 63. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 14 de gestación 400X.	67
Figura 64. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 14 de gestación 400X.	67
Figura 65. Miometrio con el Ac HGF, 14 días de gestación 400X.	67
Figura 66. Miometrio con el Ac c-MET, 14 días de gestación 400X.	67
Figura 67. Glándulas endometriales y estroma marcado con el Ac HGF, 14 días de gestación. 200X.	67
Figura 68. Glándulas endometriales marcadas con el Ac c-MET, 14 días de gestación. 400X.....	67
Figura 69. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 16 de gestación 200X.	68
Figura 70. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 16 de gestación 400X.	68
Figura 71. Miometrio y glándulas con el Ac HGF, 16 días de gestación 200X.	69
Figura 72. Miometrio marcado con el Ac c-MET, 16 días de gestación 200X.	69
Figura 73. Glándulas endometriales marcadas con el Ac HGF, 16 días de gestación. 200X.....	69
Figura 74. Glándulas endometriales con el Ac c-MET, 16 días de gestación. 400X.....	69
Figura 75. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 18 de gestación 400X.	70
Figura 76. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 18 de gestación 200X.	70
Figura 77. Miometrio con el Ac HGF, 18 días de gestación 200X.	70

<i>Figura 78. Miometrio marcado con el Ac c-MET, 18 días de gestación 400X.</i>	<i>70</i>
<i>Figura 79. Glándulas endometriales marcadas con el Ac HGF, 18 días de gestación. 400X.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 80. Glándulas endometriales marcadas con el Ac c-MET, 18 días de gestación. 400X.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 81. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 2 del ciclo estral 400X.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 82. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 2 del ciclo estral 400X.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 83. Miometrio con el Ac HGF, día 2 del ciclo estral 200X.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 84. Miometrio marcado con el Ac c-MET, día 2 del ciclo estral 200X.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 85. Glándulas marcadas con Ac HGF, día 2 del ciclo estral 400X.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 86. Glándulas marcadas con Ac c-MET, día 2 del ciclo estral 400X.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 87. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac HGF, día 12 del ciclo estral 400X.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 88. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac c-MET, día 12 del ciclo estral 400X.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 89. Miometrio con el Ac HGF, día 12 del ciclo estral 200X.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 90. Miometrio marcado con el Ac c-MET, día 12 del ciclo estral 400X.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 91. Glándulas con Ac HGF, día 12 del ciclo estral 400X.</i>	<i>74</i>
<i>Figura 92. Glándulas marcadas con Ac c-MET, día 12 del ciclo estral 400X.</i>	<i>74</i>
<i>Figura 93. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 12 de gestación 400X.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 94. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 12 de gestación 200X.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 95. Endometrio, glándulas y miometrio marcado con el Ac PI3K, día 12 de gestación 200X.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 96. Endometrio, glándulas y miometrio marcadas con el Ac ERK, día 12 de gestación 200X.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 97. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 14 de gestación 400X.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 98. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 14 de gestación 400X.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 99. Endometrio, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 14 de gestación 400X.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 100. Endometrio, glándulas y miometrio marcadas con el Ac ERK, día 14 de gestación 400X.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 101. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 16 de gestación 400X.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 102. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 16 de gestación 400X.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 103. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 16 de gestación 200X.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 104. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac ERK, día 16 de gestación 200X.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 105. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 18 de gestación 400X.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 106. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 18 de gestación 200X.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 107. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 18 de gestación 400X.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 108. Estroma, glándulas y miometrio marcado con el Ac ERK, día 18 de gestación 200X.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 109. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 2 del ciclo estral 200X.</i>	<i>79</i>
<i>Figura 110. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 2 del ciclo estral 200X.</i>	<i>79</i>
<i>Figura 111. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 2 del ciclo estral 200X.</i>	<i>79</i>
<i>Figura 112. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac ERK, día 2 del ciclo estral 200X.</i>	<i>79</i>
<i>Figura 113. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac PI3K, día 12 del ciclo estral 400X.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 114. Epitelio de revestimiento marcado con el Ac ERK, día 12 del ciclo estral 200X.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 115. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac PI3K, día 12 del ciclo estral 200X.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 116. Estroma, glándulas y miometrio con el Ac ERK, día 12 del ciclo estral 200X.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 117. Curvas de amplificación en rango dinámico para β-actina.</i>	<i>127</i>

<i>Figura 118. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de β-actina</i>	<i>127</i>
<i>Figura 119. Curvas de amplificación en rango dinámico para FGF10.</i>	<i>128</i>
<i>Figura 120. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de FGF10.</i>	<i>128</i>
<i>Figura 121. Curvas de amplificación en rango dinámico para FGFR2.</i>	<i>129</i>
<i>Figura 122. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de FGFR2.</i>	<i>129</i>
<i>Figura 123. Curvas de amplificación en rango dinámico para HGF.</i>	<i>130</i>
<i>Figura 124. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de HGF.</i>	<i>131</i>
<i>Figura 125. Curvas de amplificación en rango dinámico para c-MET.</i>	<i>132</i>
<i>Figura 126. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de c-MET.</i>	<i>132</i>

12. Anexos

Anexo 1 Protocolo de procesamiento en el histoquinete automático.

Las muestras se deshidrataron en pases de concentraciones crecientes de alcohol, comenzando dos horas en alcohol al 70%, dos horas en alcohol al 80%, tres pases de dos horas cada uno de alcohol al 96% y finalmente dos horas en alcohol absoluto. Posteriormente se prosiguió con el aclaramiento y deshidratación durante dos horas en una solución de 1:1 de Xilol y alcohol absoluto, el aclaramiento continuó con dos pases más de dos horas cada uno en Xileno y culminó con la infiltración en dos pases de parafina a 56°C durante dos horas cada uno.

Anexo 2. Protocolo de montaje de muestras para histología e IHQ.

Posterior al procesamiento en el histoquinete los casetes se colocaron en moldes con la ayuda de parafina líquida. Una vez solidificados los bloques se almacenaron a temperatura ambiente. Para realizar los cortes en un microtomo (Microm HM355 S[®]), los bloques fueron colocaron 10 minutos en congelador, se realizaron cortes a 2.5µm, se colocaron y extendieron en un baño de flotación con agua a una temperatura de entre 45-50°C, posteriormente se montaron en portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisin para ser utilizados en IHQ y en portaobjetos no tratados para teñir con (H&E) ambos fueron identificados. Se dejaron secar del exceso de agua sobre una platina térmica a 40°C y almacenados a temperatura ambiente.

Anexo 3. Protocolo de tinción H&E.

Las laminillas se colocaron dentro de la estufa a 60°C para desparafinar el tejido por un tiempo aproximado de 20 minutos, una vez eliminada la parafina se procedió a sumergir en sustituto de Xilol previamente calentado a 60-65°C por 5 minutos, se realizaron dos lavados con agua corriente. Posteriormente las laminillas fueron colocadas en el tren de tinción dónde se agregaron tres gotas de hematoxilina por pozo y se dejó incubar por 8 minutos, procediendo con dos lavados de agua destilada (llenando el pozo), se colocaron tres gotas de hidróxido de amonio durante 10 segundos para un mejor contraste de la hematoxilina, se realizó un lavado y al vaciarse el pozo se procedió a incubar con tres gotas de eosina por 10 a 12 segundos. Para finalizar se realizó un lavado con isopropanol al 70% y las laminillas fueron deshidratadas nuevamente con etanol en concentraciones crecientes desde 70%, 80 y 96%. Se desmontaron del rack para su secado a temperatura ambiente. Para su montaje se utilizó resina comercial (Cytoseal® 60).

Anexo 4. Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN).

Se utilizó un homogeneizador automático y tubos de 2ml con rosca en los cuales se colocó la muestra congelada más 800ml de TRIzol® y una esfera de cristal. La homogenización se realizó por 5 segundos aproximadamente 30 veces o hasta observar que el tejido se macerará y el TRIzol® adquiriera un aspecto turbio. Se realizó la incubación por 10 minutos en hielo. Finalizado el tiempo de incubación

se agregó 200 μ l de cloroformo frío a cada muestra, se agitó con ayuda del vórtex por 10 segundos y se incubó por 5 minutos en hielo, posteriormente se centrifugó a 12,000G durante 15 minutos en la centrífuga previamente enfriada a 4°C. Al finalizar la centrifugación se evaluó la correcta separación de fases en el tubo, evidenciando una fase acuosa en la porción superior en la cual se encuentra el ARN de nuestro interés. Dicha fase se transfirió a un nuevo tubo teniendo extremo cuidado de no tomar la fase intermedia ya que esta puede contaminar el ARN para colocarse en un tubo cónico nuevo de 1.5ml en el cual se añadió 500 μ l de isopropanol grado molecular se homogenizó con el vórtex, sin calentar el tubo. Incubación por 10 en hielo. Se centrifugó por segunda ocasión a 12,000G por 10 minutos a 4°C, terminando este tiempo se evaluó la formación del pellet de ARN, se eliminó el isopropanol por decantación. Se continuó con el lavado del pellet de ARN resuspendiéndolo en 1ml de etanol al 75% frío se mezcló en el vortex para fragmentar el pellet, posteriormente se centrifugó a 7 500G por 5 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado igualmente con etanol al 75% y se repitió el proceso de centrifugación y decantación del etanol. Se dejó secar el pellet por 5 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar se disolvió el pellet agregando desde 35 μ l y hasta 50 μ l de agua con DEPC dependiendo del tamaño macroscópico del pellet y se pipeteó en repetidas ocasiones. Se transfirió la mitad del contenido a otro tubo y ambos fueron almacenados a -80°C.

Anexo 5. Secuencias y características de los primers diseñados.

Gen	Secuencia	Tamaño del amplicón	Temperatura de alineación. (°C)
FGF10	Fw: GGAAAGCTCTATGGCTCAAAG Rv: CCATTGTGCTGCCAGTTGAA	107	56.5
FGFR2	Fw: AACACGTGGAAAAGAACGGC Rv: CCCTGAGTGCTTCAGAACCTT	74	55
HGF	Fw: CATGAACACAGCTTTTTGCCTT Rv: AGCGTACCTCTGGATTGCTT	181	54.5
c-MET	Fw: GTATTTGCACAAAGCAAGCCA Rv: CTCAAAAGTGTCTGTTGAAGC	180	52.1
β-Actina	Fw: TCCATCATGAAGTGTGAYGT Rv: ACAGAGTACTTGCGCTCAGG	110	54

Anexo 6. Reactivos y volumen utilizado en la reacción de RT.

Reactivo	Volumen en la reacción (µl)
10x Buffer RT	1
dNTP Mix	1
Random Primers 10µM	1
RNase inhibitor	0.25
Omniscript	0.5
RNA (ajustar a 2000ng)	Variable (dependerá de cada muestra).
Agua libre de RNasas	Cbp 10µl
Volumen Total	10µl

Anexo 7. Reactivos y volumen utilizado en la reacción de PCR punto final

Reactivo	Volumen en la reacción (μ l)
Taq PCR Master Mix, 2x	5
Primer Forward	0.25
Primer Reverse	0.25
Agua	3.5
cDNA	1
Volumen final	10

Anexo 8. Protocolo optimizado para inmunohistoquímica

Proceso	Procedimiento, Soluciones	Tiempo
Desparafinación	Colocar las laminillas en platina térmica a 50°C.	5 minutos
hidratación	Sumergir en: Xilol 1 Xilol 2 Alcohol 96%-xilol 1:1 Alcohol 96% Alcohol 80% Alcohol 70%	10 minutos 5 minutos 5 minutos 5 minutos 5 minutos
Lavado	PBS 1X	10 minutos
Desenmascaramiento	Mediante solución 1X Immuno/DNA retriever with citrate® en olla para microondas.	Citrato previamente calentado 3 minutos/ 80°C Laminillas en citrato 15m / 85°C
Lavado	PBS 1X	10 minutos
Bloqueo de peroxidasa	Peróxido de Hidrógeno al 0.9%	5 minutos
Lavado	PBST 0.1% PBS 1x	10 minutos 10 minutos
Bloqueo de proteínas inespecíficas.	Albúmina sérica bovina (BSA) 1%	30 minutos
Anticuerpo primario	En la dilución específica para cada uno con BSA1%	Toda la noche
Lavado	PBST 0.1% PBS 1x	10 minutos 10 minutos
Anticuerpo secundario	Específico para la especie en la cual está hecho el primario 1:100	60 minutos
Lavado	PBST 0.1% PBS 1x	10 minutos 10 minutos
Sistema de detección	Solución de avidina-biotina (preparar 30 minutos antes de su uso)	30 minutos
Lavado	PBST 0.1% PBS 1x	10 minutos 10 minutos
Revelado	Diaminobencidina	2 a 4 minutos monitorear la tinción bajo el microscopio.
Contraste	Hematoxilina Hidróxido de amonio	30 segundos 10 segundos

Anexo 9. Resultados de rangos dinámicos para los genes cuantificados.

Gen de referencia β -Actina

En la Figura 117 se muestran las curvas de amplificación de las diluciones de cDNA las cuales mostraron valores del ciclo umbral (Ct) de 24 a 29. En el Gráfico 10 se puede observar la correlación y el valor de R^2 el cual se consideró excelente. Las curvas de disociación evidencian especificidad de los productos (Figura 118).

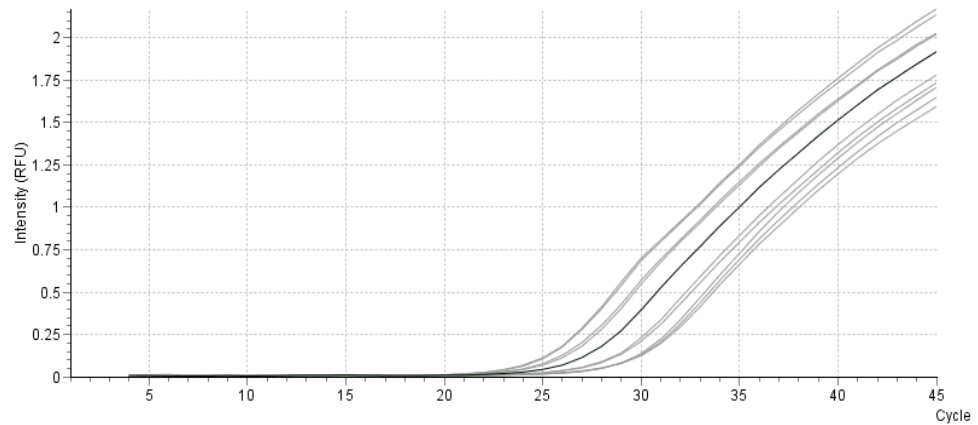


Figura 117. Curvas de amplificación en rango dinámico para β -actina.

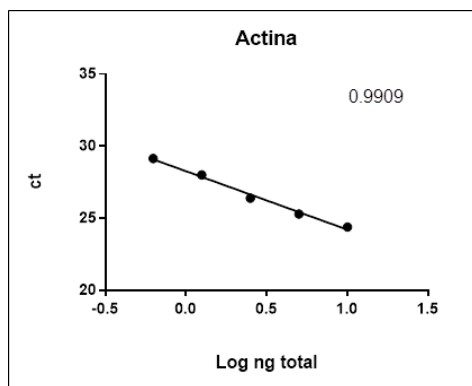


Gráfico 10. Regresión lineal del rango dinámico para β -actina.

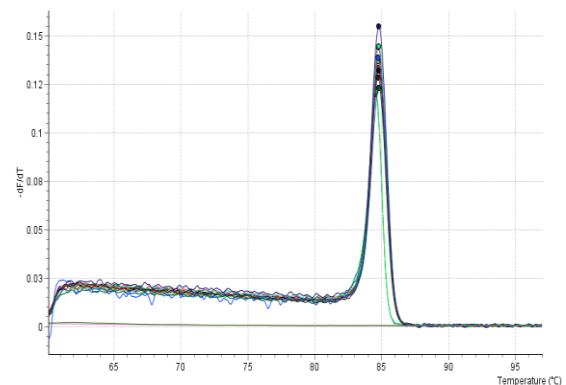


Figura 118. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de β -actina

Factor de Crecimiento de Fibroblastos 10

Curvas de amplificación observadas con valores Ct desde 28 y hasta 32 (Figura 119). El Gráfico 11 de correlación muestra un par de observaciones alejadas de la pendiente, por lo cual el valor de la R^2 es considerado bajo. La curva de disociación muestra especificidad de los productos en un único pico (Figura 120).

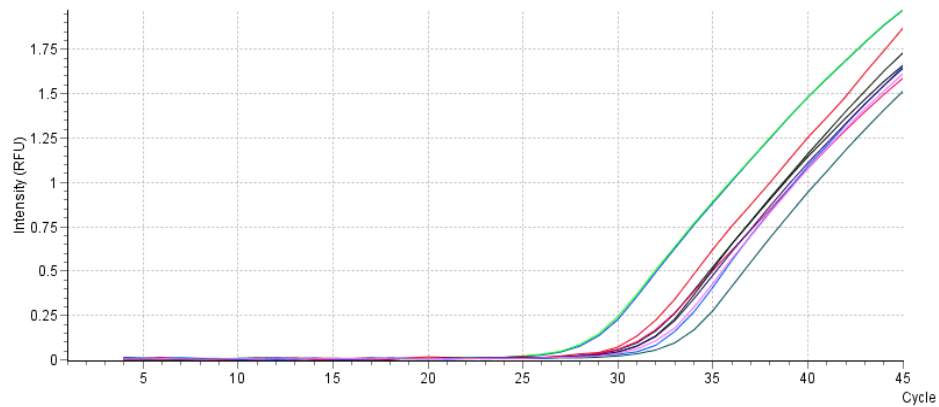


Figura 119. Curvas de amplificación en rango dinámico para FGF10.

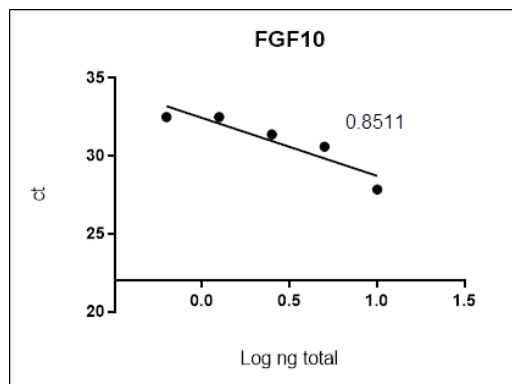


Gráfico 11. Regresión lineal del rango dinámico para FGF10.

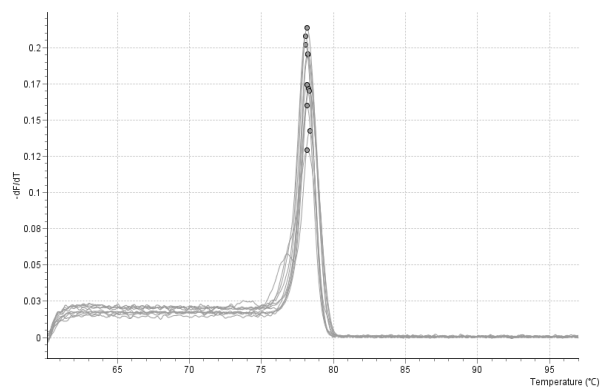


Figura 120. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de FGF10.

Receptor 2 para el Factor de Crecimiento de Fibroblastos

Las curvas de amplificación mostraron una excelente separación y coincidencia con sus duplicados los valores Ct van de 24 hasta 30 en la mayor dilución (Figura 121). Las observaciones presentan una correlación alta, el valor de R^2 es ideal (Gráfico 12). El pico en la curva de disociación muestra alta especificidad del amplicón (Figura 122).

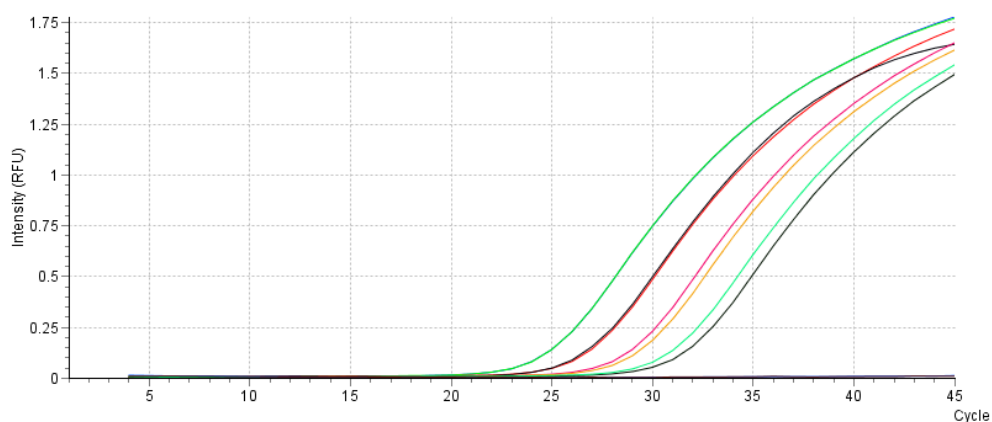


Figura 121. Curvas de amplificación en rango dinámico para FGFR2.

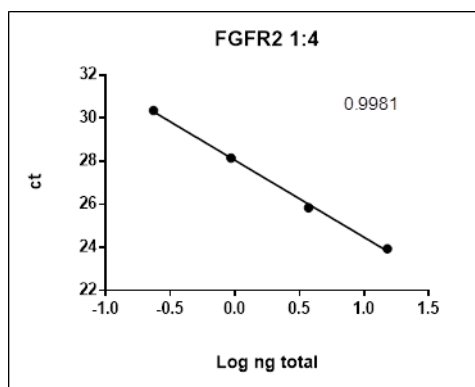


Gráfico 12. Regresión lineal del rango dinámico para FGFR2.

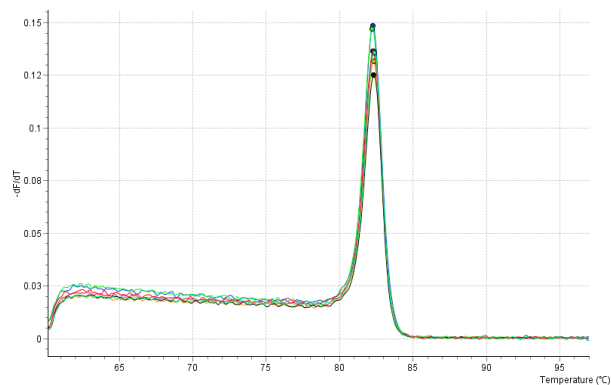


Figura 122. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de FGFR2.

Factor de Crecimiento de Hepatocitos

Las curvas de amplificación con buena separación y coincidentes con sus duplicados, lo valor Ct van desde 28 y hasta 33 (Figura 123). Los valores de la dilución mínima y máxima se alejan ligeramente de la pendiente formada en la correlación, sin embargo, el valor de la R^2 está en el límite para considerarse apropiado para el estudio (Gráfico 13). La curva de disociación muestra una elevación previa en un par de muestras, la cual se considera insignificante, el pico principal es coincidente en todas las muestras por lo cual se considera una amplificación específica (Figura 124).

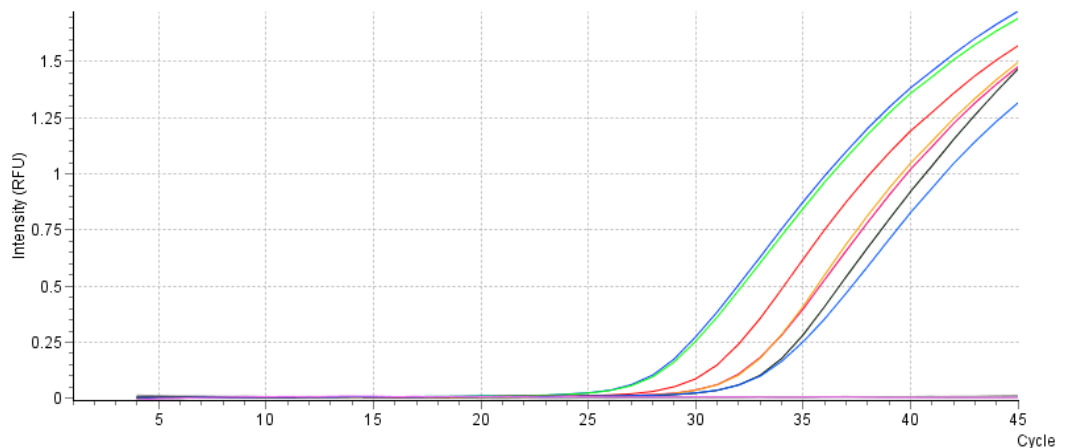


Figura 123. Curvas de amplificación en rango dinámico para HGF.

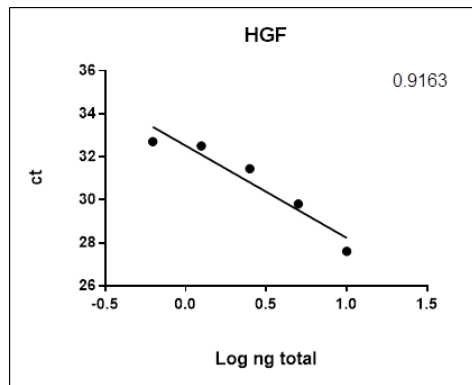


Gráfico 13. Regresión lineal del rango dinámico para HGF.

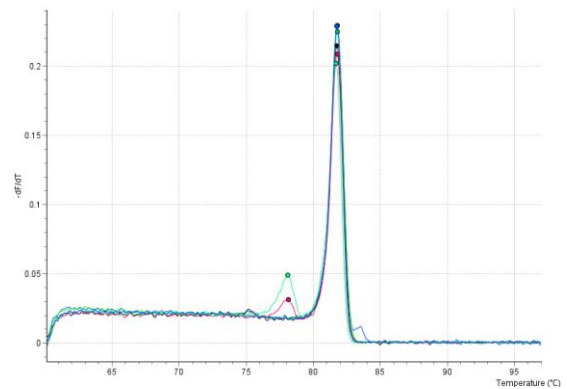


Figura 124. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de HGF.

Receptor para el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (c-MET).

Pese a mostrar una separación apropiada de las curvas de amplificación, sus duplicados mostraron valores ligeramente distintos y con patrones de elevación diferente, los valores Ct van desde 24 y hasta 32, se esperaría que en la dilución más alta el valor Ct resultara igualmente el más elevado, sin embargo, no fue así (Figura 125). Debido a que el valor Ct de la penúltima dilución fue más elevado esta observación se aleja de la pendiente formada por la correlación, el valor de R^2 se considera en el límite para utilizar estas diluciones en el estudio (Gráfico 14). El pico en la curva de disociación muestra una especificidad ideal del amplicón

Figura 126. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de c-MET.(Figura 126).

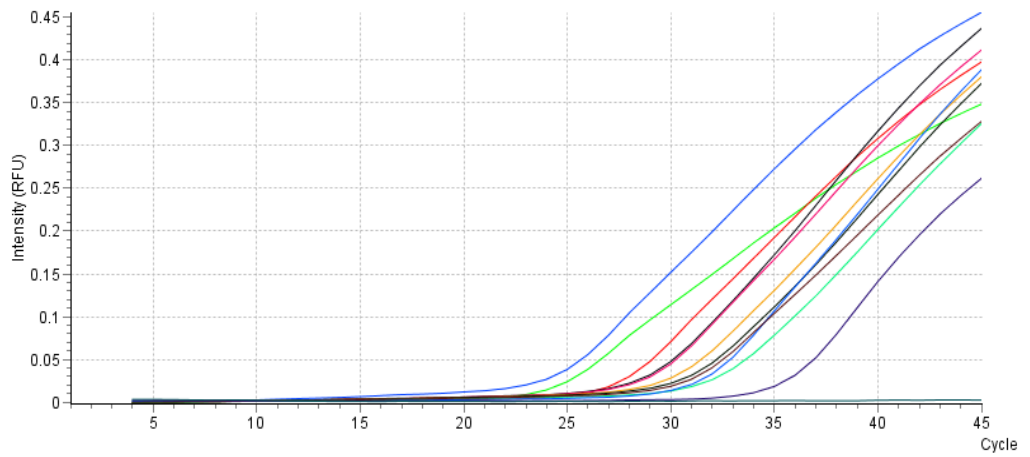


Figura 125. Curvas de amplificación en rango dinámico para c-MET.

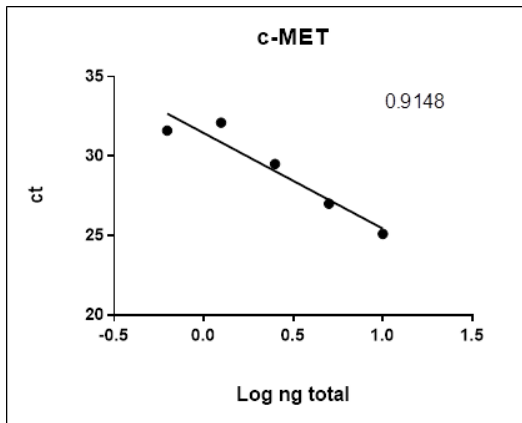


Gráfico 14. Regresión lineal del rango dinámico para c-MET.

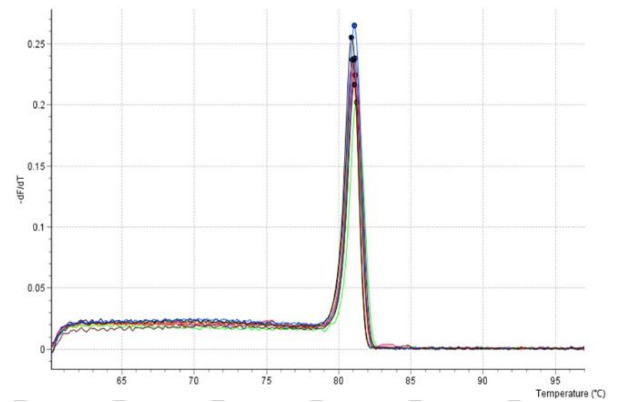


Figura 126. Curva de disociación del rango dinámico para los productos de c-MET.

Anexo 10. Reactivos y volumen utilizado en la reacción de qPCR

Reactivo	Volumen en la reacción (μ l)
2x QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix	5
Primer Forward 1 μ M	0.7
Primer Reverse 1 μ M	0.7
Agua libre de ARNasas	2.6
Muestra de cDNA	1