



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
ENDOTELIO VASCULAR Y SUS RECEPTORES EN EL ÚTERO DE CERDO
DURANTE LA PERI-IMPLANTACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO *IN*
VITRO DEL INHIBIDOR DE LA ANGIOGÉNESIS SU5416 SOBRE LA
EXPRESIÓN DEL SISTEMA VEGF

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
RODRIGO GONZÁLEZ LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL
MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR
ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FRANCISCO ERNESTO MARTÍNEZ CASTAÑEDA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RURALES

CIUDAD UNIVERSITARIA Cd. Mx, JUNIO 2023



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 de la 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 Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) 2018-000068-02NACF-22484.
- Centro de Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), UNAM.
- Departamento de Microbiología e Inmunología, Laboratorio de Virología FMVZ-UNAM.
- Departamento de Fisiología y Farmacología, FMVZ-UNAM.
- Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes, Laboratorio de enseñanza e investigación FMVZ-UNAM.
- Departamento de Patología, FMVZ-UNAM.
- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-PAPIIT-IA205617) “Determinación de moléculas que participan en la interacción materno-embionaria y proceso de angiogénesis durante la implantación en cerdos”. Resp. Doc. Alejandro Contreras Caro del Castillo.
- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA 208516) “Identificación molecular de vías de señalización en el embrión, membranas extra-embionarias y útero durante la gestación temprana en ungulados domésticos”. Resp. Dra. Griselda Valdez Magaña.
- The international Pig Veterinary Society (IPVS 2014), Resp. Dr. Alejandro Contreras Caro del Castillo.
- Biol. Omar Cortez Hernández por su gran apoyo técnico de laboratorio.
- Rastro Frigorífico “La Paz”, S.A. de C.V.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión del ARNm endometrial y la localización de proteínas uterinas del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 durante el ciclo estral y el período de peri-implantación en cerdas. Se recogieron tejidos uterinos de cerdas gestantes en los días 12, 14, 16 y 18 después de la inseminación artificial y de animales no gestantes en los días 2 y 12 del ciclo estral (día 0 = día del estro). Mediante inmunohistoquímica, en todos los días evaluados se encontró reacción positiva para VEGF y su receptor VEGFR-2 en células epiteliales luminales, glándulas endometriales, estroma, vasos sanguíneos y miometrio. Con respecto a VEGFR-1, solo se encontró señalización en el estroma y vasos sanguíneos presentes en el endometrio y miometrio. Para el día 18 de gestación, los niveles de expresión del ARNm de VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 fueron más altos que los observados en los días 2 y 12 del ciclo estral y en los días 12, 14 y 16 de gestación. Luego, se estableció un cultivo primario de células epiteliales endometriales de cerdas, para definir el potencial de inhibición selectiva de VEGFR-2 después del tratamiento con el inhibidor SU5416 y determinar el efecto sobre el patrón de expresión del sistema VEGF. Las células epiteliales del endometrio tratadas con SU5416 mostraron una disminución dependiente de la dosis en la expresión del ARNm de VEGFR-1 y VEGFR-2. Este estudio proporciona evidencia adicional en los patrones de localización de la proteína y la expresión del ARNm, los cuales podrían indicar que VEGF y sus receptores juegan un papel en la proliferación, permeabilidad y viabilidad de las células endoteliales, en apoyo a la implantación y supervivencia de los embriones. Además, respalda por primera vez a SU5416 como un inhibidor específico de la actividad de la tirosina quinasa de los receptores de VEGF en células no endoteliales a nivel *in vitro*, lo que propone que podría influir en la señalización parácrina para la formación de nuevos vasos sanguíneos o en la permeabilidad vascular.

Palabras clave: VEGF; angiogénesis; peri-implantación; SU5416; cerda.

Abstract

The aim of this work was to determine endometrial mRNA expression and uterine protein localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 during the estrous cycle and peri-implantation period in sows. Uterine tissues were collected from pregnant sows on days 12, 14, 16, and 18 after artificial insemination and from non-pregnant animals on days 2 and 12 of the estrous cycle (day 0 = day of estrus). By immunohistochemistry, a positive reaction for VEGF and its receptor VEGFR-2 was found in luminal epithelial cells, endometrial glands, stroma, blood vessels, and myometrium on all evaluated days. With respect to VEGFR-1, signaling was only found in endometrial and myometrial blood vessels and stroma. By day 18 of gestation, the mRNA expression levels of VEGF, VEGFR1, and VEGFR-2 were higher than those observed on days 2 and 12 of the estrous cycle and on days 12, 14, and 16 of gestation. Then, a primary culture of sow endometrial epithelial cells was established to define the potential of the selective inhibition of VEGFR-2 after treatment with inhibitor SU5416 and determine its effects on the expression pattern of the VEGF system. The endometrial epithelial cells treated with SU5416 showed a dose-dependent decrease in VEGFR-1 and VEGFR-2 mRNA expression. The present study provides additional evidence on the patterns of protein localization and mRNA expression, which may indicate that VEGF and its receptors play a role in endothelial cell proliferation, permeability, and viability in order to support of embryo implantation and survival. Furthermore, it supports for the first time SU5416 as a specific inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity in non-endothelial cells at the *in vitro* level, proposing that it could influence paracrine signaling for new blood vessels formation or vascular permeability.

Key Words: VEGF; angiogenesis; peri-implantation; SU5416; pig.

Trabajo generado de esta tesis

Publicado:

Theriogenology 207 (2023) 49-60

González López R, Contreras Caro del Castillo DA, Valdez Magaña G, Sarmiento Silva RE, Martínez Castañeda FE, Trujillo Ortega ME. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the pig uterus during peri-implantation and determination of the *in vitro* effect of the angiogenesis inhibitor SU5416 on VEGF system expression. Theriogenology. el 19 de mayo de 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.05.017>

Índice

<i>Agradecimientos</i>	<i>I</i>
<i>Resumen</i>	<i>II</i>
<i>Abstract</i>	<i>III</i>
<i>Trabajo generado de esta tesis</i>	<i>IV</i>
1 <i>Introducción</i>	1
2 <i>Revisión de la Literatura y Planteamiento del Problema</i>	5
2.1 Características reproductivas de la cerda	5
2.2 Anatomía uterina de la cerda	6
2.3 Tipo de placentación	8
2.4 Establecimiento temprano de la gestación	9
2.5 Reconocimiento materno de la gestación	18
2.6 Ventana de receptividad	20
2.7 Angiogénesis endometrial	23
2.8 Factores angiogénicos	27
2.9 Inhibición de la actividad tirosina quinasa	44
3 <i>Objetivos</i>	48
3.1 Objetivo general	48
3.2 Objetivos específicos	48
4 <i>Hipótesis</i>	49
5 <i>Material y métodos</i>	50
5.1 Características de los animales utilizados	50
5.2 Toma de muestras	50
5.3 Procesamiento de las muestras	51
5.4 Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN)	52
5.5 Cuantificación y determinación del grado de pureza del ARN	52
5.6 Diseño de primers	53
5.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcriptasa Reversa (RT-PCR)	53
5.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final (PCR)	54
5.9 Electroforesis en gel de agarosa	54
5.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)	55
5.11 Inmunohistoquímica (IHQ)	56

5.12	Captura de microfotografías	57
5.13	Aislamiento y cultivo primario de células endometriales	58
5.14	Tratamiento de células con el inhibidor SU5416	63
5.15	Desprendimiento y recolección de las células	64
5.16	Extracción de ARN de células epiteliales endometriales	65
5.17	Cuantificación y determinación del grado de pureza del ARN de células	65
5.18	Diseño de primers	65
5.19	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcriptasa Reversa	66
5.20	Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final (PCR)	66
5.21	Electroforesis en gel de agarosa	66
5.22	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)	67
5.23	Análisis estadístico	67
6	<i>Resultados</i>	69
6.1	Inmunohistoquímica	69
6.2	ARN de muestras de tejido uterino de cerdas gestantes y vacías	83
6.3	PCR de punto final	84
6.4	Rangos dinámicos	85
6.5	Reacción en Cadena de la Polimerasa de tiempo real (qPCR)	90
6.6	Cultivo primario de células epiteliales endometriales de cerda	96
6.7	Inmunocitoquímica de células epiteliales endometriales	98
6.8	ARN de muestras de cultivo de células epiteliales endometriales	98
6.9	PCR de punto final	99
6.10	qPCR de células tratadas con el inhibidor SU5416	100
7	<i>Discusión</i>	119
7.1	Conclusiones	126
8	<i>Referencias</i>	127
9	<i>Abreviaturas y siglas usadas</i>	145
10	<i>Lista de Tablas</i>	147
11	<i>Lista de Gráficos</i>	148
12	<i>Lista de Figuras</i>	149
13	<i>Anexos</i>	153

1 Introducción

La gestación en los mamíferos abarca todos los eventos que ocurren desde la fertilización de un ovocito viable hasta el nacimiento de una nueva cría, lo que implica una comunicación eficiente entre el blastocito y el tejido endometrial materno, a fin de regular los mecanismos que permitan un desarrollo exitoso (Abbot y Rokas, 2017).

Las especies domésticas han proporcionado a la investigación biomédica modelos convincentes, que han permitido generar conocimientos sobre los mecanismos que subyacen a la fertilidad y el desarrollo embrionario en los mamíferos. Pese a ello, los modelos animales pueden tener algunas limitantes al intentar representar al humano; sin embargo, el cerdo ha mostrado ser un modelo excelente para transpolar eventos fisiológicos y patológicos humanos, debido a las similitudes anatómicas y genéticas. Un ejemplo destacable ha sido el uso de cerdas gestantes para la comprensión de la biología reproductiva, incluidos la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo embrionario/fetal, la placentación, el intercambio materno fetal, y la endocrinología, entre otros (Bazer y Johnson, 2014a).

La implantación del embrión y el desarrollo de una red de conexiones hacia la circulación materna, son ventajas evolutivas de los mamíferos euterios. En el caso de la cerda esta presenta una placenta difusa, mutuamente plegada, epiteliocorial, sujeta a un proceso de angiogénesis considerable, donde no hay invasión de tejido fetal en el endometrio materno, por lo que el concepto permanece dentro del lumen uterino a lo largo de la gestación (Almeida y Dias, 2022). El desarrollo de cada placenta en sincronía con los sitios de unión, forman una interfaz entre los sistemas microcirculatorios maternos y embrionarios, para el intercambio eficiente, sostenido y de alto rendimiento de nutrientes, metabolitos y gases respiratorios (Carter y Enders, 2013). Durante la peri-implantación, el epitelio luminal uterino (EL) y el trofoblasto del concepto, desarrollan competencia de adhesión simultánea, para iniciar la señalización hacia la implantación dentro de un período restringido del ciclo uterino denominado “ventana de receptividad”, la cual está modulada por la

secreción de progesterona y estrógenos, que regulan la expresión de citocinas, factores de crecimiento, glicoproteínas de superficie celular, moléculas de adhesión y proteínas de la matriz extracelular clave para la supervivencia y desarrollo (Bazer *et al.*, 2011; Bazer y Johnson, 2014b).

Los cerdos de líneas comerciales poseen un rango de ovulación de 15 a 26 ovocitos por ciclo estral (CE), con un 95% de fertilización (Youngs *et al.*, 1994); sin embargo, durante el transcurso de la gestación se reporta una tasa de mortalidad del 30 a 40%, dando un promedio de 12 crías por gestación (Tayade *et al.*, 2006; Foxcroft *et al.*, 2016). Estas pérdidas espontáneas se han identificado distribuidas en dos períodos; durante la peri-implantación (10 a 30 días de gestación) y a mediados de la gestación (50 – 70 días) (Tayade *et al.*, 2006; Linton *et al.*, 2010). Aunque aún se están investigando los posibles mecanismos que intervienen en la supervivencia embrionaria, la angiogénesis, proceso que inicia alrededor del día 15 de gestación (Winther *et al.*, 1999), parece ser crucial en el desarrollo exitoso de los conceptos durante la gestación (Edwards *et al.*, 2011), es decir, un suministro deficientes de sangre uterina, como resultado de un subdesarrollo de la interfaz materno-embrionaria, por inhibición en angiogénesis, podría estar asociada con la pérdida de embriones durante la peri-implantación.

La angiogénesis es un proceso complejo, estrictamente regulado que lleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, la cual depende de una regulación entre factores angiogénicos promotores e inhibidores (Kuwano *et al.*, 1994). Entre las moléculas que participan en la angiogénesis, el factor de crecimiento de endotelio vascular (por sus siglas en inglés VEGF) y sus receptores de membrana, componen uno de los sistemas ligando-receptor más importantes involucrados en el inicio de la cascada de transducción de señales de la angiogénesis (Yancopoulos *et al.*, 2000).

La familia de proteínas que componen los factores de crecimiento de endotelio vascular (VEGFs) incluye al VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y al factor de crecimiento placentario (por sus siglas en inglés PlGF) (Ferrara y Adamis, 2016; Shibuya, 2003). Las vías de señalización activadas por esta familia,

desempeñan funciones fundamentales en la vasculogénesis, angiogénesis, permeabilidad vascular y linfangiogénesis (Girling y Rogers, 2009a).

Las funciones biológicas de VEGF-A están mediadas por su unión específica a dos receptores tirosina quinasa (RTK), VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1) (Cébe-Suarez *et al.*, 2006). VEGF-A, tiene la capacidad de estimular la migración, proliferación y permeabilidad vascular de las células endoteliales (CE's), en condiciones fisiológicas y patológicas (Ferrara, 2004). La importancia de VEGF durante el desarrollo embrionario se ha demostrado, mediante la inactivación de un solo alelo de dicho gen, lo cual desencadena un desarrollo vascular defectuoso y letalidad embrionaria (Ferrara *et al.*, 1996; Sakurai *et al.*, 2005). VEGFR-2 parece ser el principal receptor de señalización en CE's de vasos sanguíneos, cuya activación promueve vías de transducción de señales intracelulares implicadas en proliferación y migración de CE's y en mayor supervivencia y permeabilidad vascular (Ferrara *et al.*, 2003; Simons *et al.*, 2016). Además, se ha reportado una capacidad de autofosforilación al menos 10 veces mayor a la de VEGFR-1, lo que podría indicar una mejor capacidad en la transducción de señal de VEGF (Zeng *et al.*, 2001a). Por otro lado, a VEGFR-1 también se le han atribuido efectos quimiotácticos y diferenciación de CE's; aunque por su limitada capacidad de señalización en comparación con VEGFR-2, este parece estar actuando como un receptor "señuelo", el cual se une a VEGF para que este se encuentre menos disponible y así regular la angiogénesis (Dvorak *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1994).

Durante la implantación en mamíferos como primates (Graubert *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003), roedores (Cullinan-Bove y Koos, 1993a; Rabbani y Rogers, 2001), cerdos (Kaczmarek *et al.*, 2008a; Welter *et al.*, 2003a; Winther *et al.*, 1999a) y bovinos (Hayashi *et al.*, 2019), VEGF parece ser uno de varios elementos angiogénicos críticos. En el caso del endometrio porcino, este exhibe un rápido crecimiento cíclico y regresión a lo largo de su vida reproductiva; donde, se ha informado un aumento en la expresión del sistema VEGF durante la gestación (Winther *et al.*, 1999a).

Se han utilizado enfoques genéticos (Millauer *et al.*, 1994), uso de anticuerpos neutralizantes (Rockwell *et al.*, 1995) e inhibidores sintéticos de la actividad de tirosina quinasa (Mendel *et al.*, 2000b), para demostrar que la suspensión de la señalización de VEGF vía VEGFR-2 promueve la inhibición de la mitogénesis de la CE's. Por lo tanto, la inhibición de la vía RTK mediada por VEGFR-2, podría dar como resultado interrupción en la angiogénesis. SU5416 es un inhibidor sintético de RTK de bajo peso molecular, altamente ligado a proteínas de VEGFR-2 (Sukbuntherng *et al.*, 2001). SU5416 actúa selectivamente como un inhibidor competitivo que se incorpora al sitio catalítico de unión de adenosina trifosfato (ATP), dentro del dominio quinasa del receptor, lo que promueve un bloqueo de la señalización de VEGFR-2, inhibiendo la proliferación de CE's dependientes de VEGF en modelos animales e *in vitro* (Fong *et al.*, 1999; Sukbuntherng *et al.*, 2001).

Aunque el proceso de neovascularización endometrial involucrado en el establecimiento de la gestación ha sido objeto de varios estudios en los últimos años, aún queda mucho por esclarecer respecto a este fenómeno (Ka *et al.*, 2018), dada la limitada información disponible sobre los procesos que dan lugar a altos niveles de mortalidad durante la gestación, así como la expresión y localización de moléculas asociadas a la angiogénesis uterina en las etapas iniciales de la gestación en la cerda.

2 Revisión de la Literatura y Planteamiento del Problema

2.1 Características reproductivas de la cerda

La cerda doméstica se clasifica como un animal poliéstrico no estacional, que en condiciones favorables manifiesta su actividad sexual a lo largo de todo el año, con ciclos de aproximadamente 18 y 24 (promedio 21) días. La pubertad en cerdas primerizas da inicio a su capacidad reproductiva alcanzándose entre los 150 y 220 días de nacidas. La edad de la pubertad está regulada por factores internos (raza, peso vivo y profundidad de grasa dorsal) y de manejo (nutrición, exposición al verraco y factores ambientales), los cuales están mediados por un eje endocrino (Evans y O'Doherty, 2001; Soede *et al.*, 2011). El desarrollo del aparato reproductor femenino, incluido el útero, comienza desde antes del nacimiento y se completa después de este. En el cerdo doméstico, la maduración completa del útero se alcanza el día 120 desde el nacimiento. Esta serie de eventos incluye procesos de desarrollo comunes como: organización y estratificación del estroma endometrial, diferenciación y crecimiento del miometrio, y desarrollo coordinado de las glándulas (Okrasa *et al.*, 2014). Cuando las hembras han alcanzado una madurez desde el punto de vista anatómico y fisiológico, se lleva a cabo el primer servicio, es decir cuando haya presentado su segundo o tercer celo (Evans y O'Doherty, 2001; Soede *et al.*, 2011). La ovulación ocurre aproximadamente 38 a 48 horas después del inicio del celo, el cual a su vez tiene una duración de 24 a 72 horas (Bazer y Johnson, 2014b; Knox *et al.*, 2001). Durante la ovulación, se liberan entre 15 y 24 ovocitos en un período de 1 a 4 horas. Para lograr tasas de concepción satisfactorias la inseminación no debe de ocurrir antes o después de la ovulación, por lo tanto, una práctica general es inseminar el día del celo detectado y la mañana del día siguiente (Kraeling y Webel, 2015). Cerca del 95% de los ovocitos son fertilizados por parte de los espermatozoides, sin embargo, durante el transcurso de la gestación se reporta una tasa de mortalidad del 30 a 40%, ocurriendo en su mayoría antes del período de implantación (Youngs *et al.*, 1994; Tayade *et al.*, 2006). Para que se pueda llevar a cabo el establecimiento y mantenimiento de la gestación, es preciso

que los blastocitos inicien una migración poco después de su eclosión, que continua hasta la elongación del trofoblasto dentro y entre los cuernos uterinos, esto para proporcionar un área suficiente para la unión de la placenta y una interfaz con el endometrio para prevenir la luteólisis debido a la liberación endometrial de $\text{PGF2}\alpha$ (Prostaglandina $\text{F2}\alpha$) hacia los vasos sanguíneos uterinos (Geisert *et al.*, 2015). El reconocimiento materno de la gestación en cerdos, se lleva a cabo mediante la síntesis y secreción de estrógenos por parte de los embriones, los cuales además de mantener el cuerpo lúteo (CL), abren la ventana de receptividad para la implantación (Ziecik *et al.*, 2011). La gestación tiene un periodo de entre 114 y 116 días, donde el CL produce de manera continua progesterona, modificando el ambiente uterino que conlleva a la formación de una red interconectada de comunicación con el embrión, mediante la estimulación de las funciones secretoras que modifican la expresión génica, la morfología celular y el entorno inmune materno, que permite el desarrollo y supervivencia del concepto a lo largo de las diferentes etapas de la gestación (Croy *et al.*, 2009; Soede *et al.*, 2011; Bazer y Johnson, 2014b).

2.2 Anatomía uterina de la cerda

El útero de la cerda es un órgano conformado por un cuerpo el cual tiene una longitud de 3 - 4 cm, de donde emergen dos cuernos uterinos cuyo tamaño oscila entre 30 - 35 cm para cerdas con un peso aproximado de 220 kg (Campo *et al.*, 2017). Anatómicamente, la pared del útero presenta tres capas: endometrio (mucosa), miometrio (muscular) y perimetrio (serosa). El aspecto de la pared uterina varía dependiendo de la etapa del CE, siendo edematoso durante el proestro y estro, debido a la influencia de los estrógenos; y secretor por acción de la progesterona durante el metaestro y diestro (Gil Corbalán *et al.*, 2009). El endometrio es un órgano epitelio mesenquimal complejo, que consta de un epitelio luminal (EL) el cual presenta un revestimiento cilíndrico simple en la mayoría de las especies domésticas, sin embargo, en el caso específico de la cerda puede ser

pseudoestratificado o estratificado. Por debajo del EL se encuentra la lámina propia, la cual contiene tejido conjuntivo laxo hiperplásico (estroma). La lámina propia presenta una gran cantidad de vasos sanguíneos, células inmunitarias y glándulas de tipo tubular simple enrolladas y ramificadas, revestidas por epitelio cilíndrico simple sobre una lámina basal bien desarrollada, las cuales atraviesan la lámina propia siguiendo un trayecto flexuoso. El miometrio se compone de dos capas de músculo liso, la capa adyacente al endometrio correspondiente a la circular interna y una segunda capa de fibras longitudinales externas también denominada estrato subseroso. Ambas capas se encuentran separadas por un estrato vascular, que en el caso de la cerda no es tan evidente, en comparación con otras especies. El perimetrio es la túnica serosa más externa del órgano, se encuentra conformada por tejido conjuntivo laxo cubierto por mesotelio, con numerosos vasos sanguíneos y fibras nerviosas (Bacha y Bacha, 2001).

Al nacer, en el útero porcino hay un EL cilíndrico simple sostenido por mesénquima indiferenciado y rodeado por un miometrio rudimentario, pero el epitelio glandular está ausente. El desarrollo de las glándulas endometriales (adenogénesis), cubiertas con epitelio glandular, se lleva a cabo poco después del nacimiento. Al principio, se produce la formación de brotes, lo cual tiene lugar el séptimo día postnatal (DPN), luego aproximadamente en el DPN 14, el EL se desarrolla en tubos epiteliales (tubulogénesis) que se extienden radialmente desde la superficie luminal hacia el estroma endometrial. Posteriormente, las glándulas tubulares se enrollan hacia el DPN 28 y se ramifican dentro del estroma hasta que alcanzan el borde adluminal del miometrio hacia el DPN 120 (Gray *et al.*, 2001; Cooke *et al.*, 2013).

En cerdas adultas, cíclicas y gestantes, se ha demostrado que estos tipos celulares uterinos experimentan una remodelación histológica significativa en su proporción, permitiendo una comunicación de manera autócrina, parácrina y/o endocrina con el fin de coordinar las respuestas a las hormonas y citocinas asociadas a efectos que faciliten principalmente el flujo de nutrientes, reconocimiento materno de la gestación, ventana de receptividad e implantación y

actividad secretora del útero (Blackwell *et al.*, 2003; Llobat, 2020; Johnson *et al.*, 2021) . La composición tisular y celular del útero porcino estudiada por Blackwell y colaboradores (2003), en los días 12 y 16 del ciclo estral reportaron algunas diferencias en las proporciones de endometrio y miometrio. La proporción de endometrio fue menor, pero el miometrio fue mayor el día 16 en comparación con el día 12. Este estudio también reveló que el endometrio porcino se compone predominantemente de células epiteliales estromales y glandulares. En el día 12, las células epiteliales del estroma, glandulares y lumbinales constituyeron el 47%, 37% y 16% de la cantidad total de células en el endometrio, respectivamente. Para el día 16, solo la cantidad de células epiteliales glandulares tendió a aumentar, mientras que el número de células del estroma y lumbinales permanecieron relativamente sin cambios (Blackwell *et al.*, 2003). Por otro lado, durante la gestación, las glándulas endometriales sufren hiperplasia e hipertrofia adquiriendo una alta actividad secretora (Gray *et al.*, 2001). Durante la gestación temprana, el endometrio porcino está sujeto a marcados cambios morfológicos y bioquímicos en función a su preparación para la implantación embrionaria. Este proceso comienza el día 13 y se completa entre los días 18 y 24 post-fertilización (Perry, 1981). Antes de la implantación, el epitelio uterino luminal se transforma de un epitelio columnar con microvellosidades durante la etapa pre-receptiva, a un epitelio con una superficie apical en forma de cúpula sin microvellosidades (Keys y King, 1989). La implantación es seguida por la formación de la placenta, que esencialmente se completa alrededor del día 30 post fertilización (King, 1993).

2.3 Tipo de placentación

Los cerdos presentan una placenta difusa, mutuamente plegada de tipo epiteliochorial, donde el epitelio luminal del endometrio uterino permanece intacto a lo largo de la gestación, es decir, no existe decidualización del endometrio (Aplin y Kimber, 2004). La placenta epiteliochorial está compuesta por seis capas celulares las cuales incluyen vasos endoteliales maternos, tejido conectivo, epitelio endometrial, epitelio trofoblástico, tejido conectivo y vasos endoteliales fetales). Las

células del trofocotodermo placentario se adhieren directamente al EL, para formar una red de capilares la cual reduce la distancia de difusión materno-embrionaria que sirve de soporte hematotrófico e histotrófico para el crecimiento, desarrollo y supervivencia del concepto (Johnson *et al.*, 2021). La remodelación extensa para formar crestas coriónicas (placentas) y las correspondientes invaginaciones endometriales, dan como resultado un plegamiento que aumenta la asociación útero-placentaria. Las interdigitaciones progresivas de microvellosidades en el trofoectodermo y el EL eventualmente cubren toda la placenta, a excepción de las aberturas de las glándulas uterinas. Aquí, el trofocotodermo nunca se fusiona con el EL, sino que forman una bolsa denominada “areola”, la cual permite que las secreciones del epitelio glandular, así como las moléculas que representan la transducción selectiva del suero materno (histotrofo), se absorban y transporten a través de la placenta para su liberación a la circulación fetal. Dentro de las funciones principales de la placenta se incluyen: el intercambio transplacentario de gases, micronutrientes (aminoácidos, glucosa) y macromoléculas (proteínas), así como la producción de hormonas, citocinas y otras moléculas reguladoras que intervienen en el crecimiento y desarrollo del concepto a lo largo de la gestación (Bazer y Johnson, 2014b).

2.4 Establecimiento temprano de la gestación

2.4.1 Transporte de gametos

El encuentro del espermatozoide competente y el ovocito ovulado viable para su fertilización, es el comienzo de una secuencia altamente coordinada de interacciones celulares entre los gametos haploides, que conducen a la formación del cigoto diploide e inicia el desarrollo embrionario. Justo antes de la ovulación, los ovocitos presentan una ruptura de la envoltura nuclear y completan su primera división meiótica (Gilbert, 2000). Los ovocitos ovulados se detienen en la metafase de la segunda división meiótica con su ADN empaquetado con histonas maternas (Li *et al.*, 2013). Después de la ovulación, los ovocitos se desprenden de los folículos

con cierta inversión de células del cúmulus y son captados a partir del fluido folicular por el extremo fimbriado del oviducto, el cual abraza íntimamente al ovario. Los ovocitos inician su transporte hacia el ámpula, sitio donde se forman agregados y de ahí son transportados hacia la unión istmo-ampular, proceso que toma entre 30-45 minutos post ovulación. El transporte de los ovocitos es favorecido por las ondas de contracción peristáltica del miosálpinx, continuo batido de los cilios que revisten al oviducto y los movimientos del mesosálpinx (Hunter, 1989). Para que los espermatozoides sean capaces de fertilizar al ovocito, deben sufrir una serie de cambios bioquímicos y morfológicos a su paso por el aparato reproductor femenino. El transporte de los espermatozoides a través del tracto genital femenino comienza inmediatamente después de la deposición intrauterina del semen durante la inseminación artificial (IA) o monta natural, el cual es favorecido por la alta contractibilidad, el movimiento ciliar y las características intrínsecas del moco estral (Rangel y Hernández-Medrano, 2021). Pocos minutos después, es posible encontrar algunos espermatozoides en el oviducto, sin embargo, estos no participan en el proceso de fertilización. Por otro lado, también se presenta una migración prolongada hacia las partes más craneales de los cuernos uterinos, que conducen a la colonización de un reservorio funcional de espermatozoides en la unión útero-tubárica y primera porción del istmo durante las próximas dos horas post servicio. El reservorio espermático favorece la prevención de la poliespermia, gracias a la retención de espermatozoides que evita que un número considerado llegue a la zona de fertilización, asimismo modula la capacitación espermática a través de un mecanismo de retraso y liberación paulatina (Hunter, 1994; Smith, 1998). Los espermatozoides quedan atrapados en la región ístmica del oviducto mediante una unión mediada por carbohidratos con el epitelio que recubre el oviducto. Dicho reservorio provee un medio ambiente propicio para los espermatozoides al protegerlos de la fagocitosis y prolongar su viabilidad. Cerca del momento de la ovulación, se inicia el proceso de capacitación y los espermatozoides se disocian del epitelio, modificando su patrón de motilidad flagelar y migran en oleadas hasta

el lugar de la fertilización, completando así su capacitación (Töpfer-Petersen *et al.*, 2008; Rangel y Hernández-Medrano, 2021).

2.4.2 Fertilización del ovocito

El primer contacto entre el espermatozoide y el ovocito tiene lugar en la superficie externa de la matriz extracelular circundante del ovocito, la zona pelúcida (ZP), dentro de las dos a seis horas posteriores a la ovulación. Al unirse a distintos oligosacáridos de las glicoproteínas de la ZP, el espermatozoide que fertiliza reconoce al ovocito. Al anclar el espermatozoide al ovocito a través de los carbohidratos de la ZP, se activa la cascada de señalización que conduce a la exocitosis acrosomal del espermatozoide; se forman así pequeñas vesículas, cuyo contenido de enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa y la acrosina, son liberadas hacia el exterior, lo que facilita que este pase a través de la ZP. El espermatozoide que reacciona con el acrosoma al final interactúa y se fusiona con la membrana plasmática del ovocito, lo que a su vez permite que el ovocito reinicie su ciclo celular, complete la meiosis y entre en el primer ciclo mitótico, dando lugar a la extrusión del segundo cuerpo polar (CP), para dar comienzo a la cascada de desarrollo embrionario (Töpfer-Petersen *et al.*, 2008). Una vez dentro del ovocito, la membrana nuclear del espermatozoide se rompe, se produce la sustitución de protaminas por histonas, la cromatina se descondensa y se forma una nueva membrana nuclear que constituirá el pronúcleo masculino. Por otro lado, tras la extrusión del segundo CP, el genoma materno también se descondensa y se forma la membrana nuclear que constituye al pronúcleo femenino (Thibault y Gérard, 1973). Posteriormente los pronúcleos masculino y femenino migran hacia el centro del citoplasma, desintegran sus membranas nucleares y sus cromosomas se asocian antes de efectuar la primera división mitótica. La fusión de membranas nucleares del ovocito y el espermatozoide permiten que los dos genomas haploides se condensen para formar un cigoto diploide de 1 célula, este proceso dura aproximadamente 12 horas (Figura 1) (Yanagimachi R., 1994). Después de la singamia de los dos pronúcleos, el genoma del cigoto sufre una desmetilación pasiva de manera dependiente de la

replicación del ADN hasta la etapa de mórula. Posteriormente, se establecen patrones de metilación de *novo* para mantener la diferenciación exitosa del linaje celular (Li *et al.*, 2013).

Para garantizar que no más de un espermatozoide fertilice al ovocito, una vez que las reacciones acrosomales tienen lugar y se fusionan las membranas de los gametos, inician los mecanismos que previenen fertilización poliespérmica, ya que este evento resultaría letal para el desarrollo embrionario temprano. Existen dos mecanismos que contribuyen al bloqueo de la poliespermia: los mecanismos basados en el oviducto, los cuales evitan una llegada masiva de espermatozoides hacia el ovocito, y los mecanismos basados en el ovocito, que incluyen la migración y fusión de los gránulos corticales, con la consecuente liberación de enzimas que cambian tanto la estructura de la ZP, como de la membrana vitelina, impidiendo la entrada de más espermatozoides (Coy y Avilés, 2010).

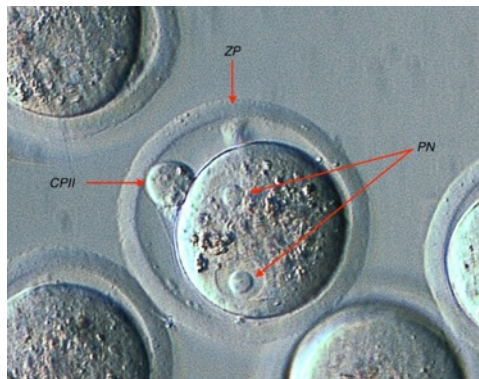


Figura 1. Microfotografía de ovocito fertilizado. Indicado con flechas rojas se aprecia la zona pelúcida (ZP), los pronúcleos masculino y femenino (PN) y el segundo cuerpo polar (CPII).

2.4.3 Segmentación

Después de la fertilización, el cigoto resultante es capaz de convertirse en todas las células especializadas y dar origen a un nuevo individuo, por lo que se le considera como una célula totipotencial (Mitalipov y Wolf, 2009). El desarrollo embrionario temprano comienza con una serie de divisiones mitóticas conocidas como segmentación rotacional. Alrededor de 26 horas después de la fertilización dentro

del oviducto, el cigoto porcino se escinde para formar un embrión de dos células y una segunda división 20 a 24 horas después, para formar un embrión de cuatro células (Figura 2 y 3). Las células resultantes de estas divisiones se conocen como blastómeros. Las divisiones de las células embrionarias son sincrónicas, sin embargo, conforme avanza el desarrollo se vuelve asincrónico. Las divisiones mitóticas de cada blastómero generalmente ocurren simultáneamente, pero son únicas en el sentido de que con cada división se producen dos células es decir pasando de 4, 8 a 16 células sucesivamente. Como resultado de estas divisiones, un embrión gana un número de células, pero aún contiene la masa total de citoplasma que tenía cuando era un cigoto (Senger, 2015).

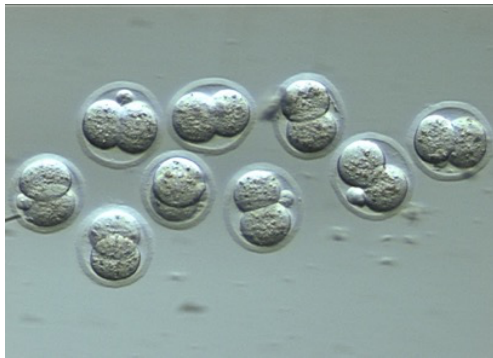


Figura 2. Microfotografía de embriones en etapa de 2 células.

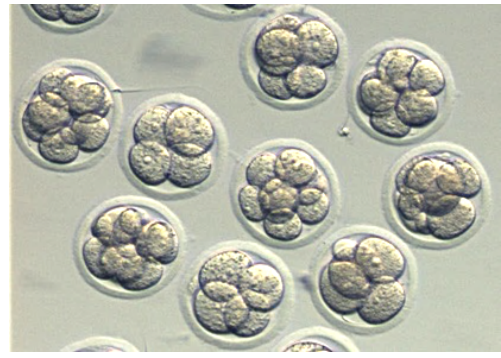


Figura 3. Microfotografía de embriones en etapa de 4 y 8 células.

Los embriones se encuentran principalmente en la etapa de 4 células cuando ingresan al útero, aproximadamente 60 a 72 horas después del inicio del estro (Johnson *et al.*, 2021; Almeida y Dias, 2022). Uno de los puntos críticos durante el desarrollo embrionario temprano es la activación del genoma, ya que, durante las etapas iniciales después de la fertilización, las proteínas y ARNs heredados del ovocito son responsables del metabolismo y desarrollo inicial del embrión. La síntesis de ARNm por parte del embrión comienza en la etapa de 8 células (blastómeros), cuando se sintetizan las proteínas transcritas por el genoma embrionario (Jarrell *et al.*, 1991; Rangel y Hernández-Medrano, 2021). Los embriones pasan los siguientes 2 a 3 días en la porción proximal de los cuernos uterinos, antes de distribuirse uniformemente por todo el útero (Johnson *et al.*,

2021). Cuando el embrión alcanza un promedio de 16 a 32 células (quinta división) se le denomina mórula (Saini y Yamanaka, 2018). A medida que los blastómeros individuales de la mórula ya no se pueden contar con precisión, las células de la periferia comienzan a compactarse más que las células del centro, esto con el fin de establecer distintas uniones celulares, según la relación espacial entre los blastómeros (Figura 4). Las células centrales desarrollan entre ellas uniones GAP que permiten la comunicación intercelular para que estas permanezcan en un grupo celular definido. Por otro lado, las que se encuentran en la periferia establecen uniones estrechas, dando origen a dos subpoblaciones de blastómeros: periféricos y centrales (Rangel y Hernández-Medrano, 2021). Durante esta transición aumenta la expresión de genes implicados en la adhesión célula-célula, el transporte de moléculas y la comunicación intra e intercelular, además de ir acompañado de divisiones celulares asimétricas (Senger, 2015).

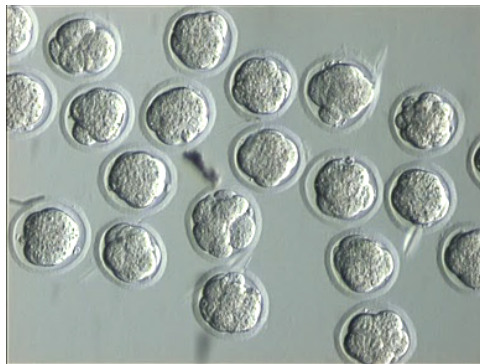


Figura 4. Microfotografía de embriones en etapa de mórula con blastómeros compactados.

2.4.4 Formación del blastocito

Conforme la mórula continúa dividiéndose, se comienza a acumular líquido hacia la parte central del embrión, debido a la diferencia en la presión osmótica provocada por una bomba de sodio activa en las células de la periferia que bombean iones de sodio, promoviendo la separación celular. Dicha acumulación de iones promueve el aumento en la concentración iónica del líquido que rodea las células internas de la mórula, originando una cavidad denominada blastocele. Cuando se reconoce una cavidad distinta, el embrión se denomina blastocito (Figura 5). La etapa de blastocito

en el cerdo se alcanza en el día 5 o 6, generalmente cuando los embriones comprenden de 16 a 32 células. Debido a la naturaleza de las uniones GAP y uniones estrechas a partir de la subpoblación celular central y de la periferia, se originan la masa celular interna (MCI) o embrioblasto y el trofoblasto respectivamente. La MCI dará lugar al disco embrionario y finalmente al cuerpo del feto; mientras que las células del trofoblasto (trofoectodermo) eventualmente darán lugar al corion, el cual a su vez se convertirá en la mayoría de las membranas extraembrionarias (Senger, 2015; Johnson *et al.*, 2021; Rangel y Hernández-Medrano, 2021).

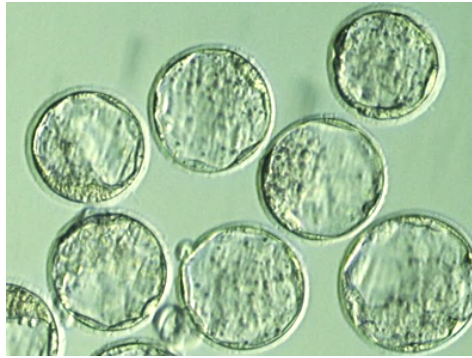


Figura 5. Microfotografía de embriones en etapa de blastocito. Al centro de estos se observa el desarrollo del blastocele.

2.4.5 Eclosión embrionaria

A medida que el blastocito continúa creciendo y diferenciándose, se va acumulando más líquido en el blastocele, aumentando la presión interna del embrión. Aunado a esto, las células del trofoblasto producen enzimas proteolíticas, las cuales debilitan la ZP para facilitar su ruptura. Finalmente el comportamiento de contracción y relajación del blastocito induce pulsos intermitentes de presión, los cuales junto con el crecimiento continuo y la degradación enzimática desencadenan que el blastocito esférico (0.5 – 1 mm de diámetro) eclosione entre los días 6 a 7 post servicio (Figura 6) (Senger, 2015; Johnson *et al.*, 2021; Rangel y Hernández-Medrano, 2021).

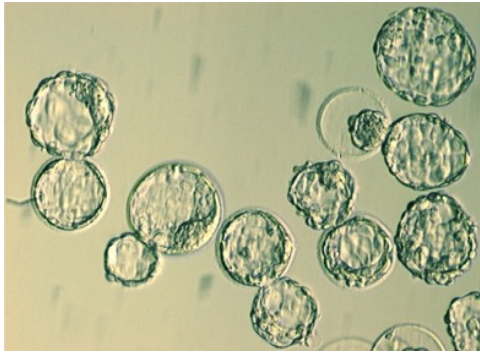


Figura 6. Microfotografía de blastocitos eclosionando.

A partir de esta etapa, el desarrollo de los embriones de cerdo diverge dramáticamente de otros mamíferos como roedores o primates. Estos cambios en la morfología ocurren justo antes de la unión inicial del trofotodermo al EL uterino, evento denominado implantación no invasiva de tipo central (Bazer y Johnson, 2014a).

2.4.6 Elongación

En los cerdos, durante el período de peri-implantación, los embriones migran dentro del útero antes de la aposición, crecen y experimentan una transformación morfológica dinámica (Guzewska *et al.*, 2023). Después de la eclosión los blastocitos experimentan una rápida transición inicial de formas esféricas (0.5 a 1 mm) a tubulares (10 a 50 mm) y filamentosas (100 a 800 mm) entre los días 10 y 16 de gestación, con el fin de incrementar su área de contacto física con los sitios de implantación del endometrio, para comenzar a adherirse estrechamente y secretar una variedad de factores hacia la luz uterina como estrógenos, citocinas, interleucina-1 β 2, factores de crecimiento, y proteasas entre otras moléculas (Perry *et al.*, 1973; Bazer y Johnson, 2014b; Ka *et al.*, 2018). Los blastocitos se expanden aproximadamente 0.25 mm/hora en la etapa inicial de blastocito esférico, después se presenta un incremento notable en la tasa de elongación de 30 a 45 mm/hora desde la transición de blastocitos tubulares (10 mm), hasta el filamentosos de 150 a 200 mm de largo (Bazer y Johnson, 2014a). La elongación inicial de los blastocitos se consigue por una remodelación celular y no por hiperplasia, ya que el índice

mitótico y el contenido de ADN de los embriones no se modifican durante la elongación (Rodney D. Geisert *et al.*, 1982). Los rápidos cambios morfológicos tanto en el trofotodermo como en el endodermo extraembrionario ocurren cuando los blastocitos tienen 10 mm de diámetro. En esta etapa, una densa banda de células (zona de elongación) compuesta por endodermo y trofotodermo se extienden desde la MCI hasta la punta del blastocito ovoide, esto gracias a cambios en la orientación de microfilamentos mediante la reorganización del citoesqueleto de actina y complejos de unión de las células del trofotodermo (Geisert *et al.*, 1982). Después de la formación de la zona de elongación, se presenta una elongación más rápida del concepto de cerdo de 100 a 200 mm de largo a un concepto de 800 a 1000 mm de longitud para el día 16 de gestación. Este último período de elongación involucra hiperplasia de las células trofoectodérmicas donde se ha visto, son estimuladas por factores de crecimiento y citocinas producidas en el endometrio, dentro de las cuales se han identificado: al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Kim *et al.*, 2009), factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF7) (Ka *et al.*, 2001), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) (Green *et al.*, 1995), interleucina 6 (IL6), factor inhibidor de la leucemia (Blitek *et al.*, 2012) y factor de crecimiento beta transformante (TGF β) (Jaeger *et al.*, 2005; Geisert *et al.*, 2014).

Diversas formas morfológicas del concepto se pueden hallar dentro del mismo útero, lo que indica que el desarrollo embrionario porcino no necesariamente es uniforme (Figura 7). Además, el embrión necesita migrar en la luz uterina, sin que se superpongan los embriones adyacentes y así conseguir un espaciamiento equidistante de los blastocitos e implantarse de manera no invasiva para desarrollar una verdadera placenta epiteliochorial, donde el endometrio permanece intacto durante toda la gestación (Jaeger *et al.*, 2001; Geisert *et al.*, 2015). Es en el período de peri-implantación donde se reportan pérdidas embrionarias que van del 30 al 40% (Tayade *et al.*, 2006).



Figura 7. Diversas formas morfológicas de embriones de cerdo recolectados en el día 16 de gestación.

2.5 Reconocimiento materno de la gestación

El establecimiento de la gestación requiere del mantenimiento de un CL funcional más allá de su vida útil cíclica normal, para sostener la producción de progesterona, ya que, dicha hormona estimula la actividad endometrial secretora crucial para el desarrollo, implantación embrionaria y sustento de la gestación (Ziecik *et al.*, 2011). A diferencia de otras especies de mamíferos, el cerdo requiere el mantenimiento de los cuerpos lúteos durante toda la gestación, independientemente de la presencia de la placenta (Bazer y Johnson, 2014c). La segunda semana de gestación es un período especialmente crítico para la supervivencia embrionaria en los cerdos. Dentro de este tiempo, inicia la síntesis de estrógenos (principalmente estradiol-17 β ; E2) por parte del embrión, se completa el espaciamiento y ubicación final de los embriones, y la madre recibe la señalización para extender la vida útil funcional de los cuerpos lúteos (Roberts *et al.*, 1993).

En los cerdos, el reconocimiento materno de la gestación comienza alrededor de los días 11 y 12 del CE; donde los embriones señalan su presencia en la cerda al sintetizar y liberar estrógenos para promover la continuidad de la gestación. Adicionalmente, se requiere de una segunda fase sostenida de aumento en la síntesis de estrógenos entre los días 15 y 18 del ciclo estral (Rodney D. Geisert *et al.*, 1982). El principal mecanismo involucrado en el componente estrogénico embrionario, es iniciar una disminución en la liberación uterina de PGF2 α , para

mantener la gestación más allá de los 30 días (Meyer *et al.*, 2019). Durante los días 15 y 16 del ciclo estral, el endometrio secreta $\text{PGF2}\alpha$ en un patrón pulsátil en dirección endocrina (hacia la circulación venosa), ocasionando la regresión del CL. En la gestación, los estrógenos embrionarios modifican el patrón de dirección de la secreción endometrial de $\text{PGF2}\alpha$, desde los vasos sanguíneos, a su secuestro en el lumen uterino (secreción exocrina), donde esta es metabolizada en el metabolito inactivo 15 ceto-13, 14 dihidroprostaglandina $\text{F2}\alpha$ antes de ser liberado a la vena útero-ovárica, e impedir así la regresión del CL (Bazer y Thatcher, 1977; Bazer y Johnson, 2014b; Almeida y Dias, 2022). Se ha descrito que los pulmones del cerdo, no metabolizan la prostaglandina de manera eficiente en comparación a otras especies como los rumiantes, proporcionando una vía vascular uterina local y sistémica para la regresión del CL, en consecuencia es esencial que los conceptos durante su migración, cubran el área de superficie uterina tan rápida y completamente como sea posible para llevar a cabo la señalización que impida la luteólisis (Ginther, 1981).

Además del patrón exocrino de la $\text{PGF2}\alpha$, se ha reportado que los estrógenos embrionarios proporcionan un incremento en la permeabilidad vascular endometrial (Ford *et al.*, 1982), así como diversas acciones lúteo-protectoras las cuales incluyen la estimulación de la secreción de progesterona (Conley y Ford, 1989); aumento de la concentración de receptores para la hormona luteinizante (LH) (Garverick *et al.*, 1982); y modulación de la síntesis y señalización de la prostaglandina en el endometrio (Waclawik *et al.*, 2009). Durante la elongación del concepto y la peri-implantación, el endometrio en respuesta a los estrógenos embrionarios aumenta la liberación de una serie de factores de crecimiento y citocinas, como el EGF, IGF-1, FGF7, VEGF, IL-6, $\text{TGF}\beta$ y el factor inhibidor de la leucemia (LIF) (Geisert *et al.*, 2014). Los estrógenos del concepto también aumentan la expresión endometrial de genes, como la fosfoproteína 1 (SPP1), transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1), proteína accesoria del receptor de interleucina 1 (IL1RAP), receptor de ácido lisofosfatídico 3 (LPAR3) y estaniocalcina 1 (STC1), (Geisert y Bazer, 2015; Almeida y Dias, 2022).

Aproximadamente en el día 12, el embrión porcino elongado que aún permanece flotando libremente, migra dentro y entre los cuernos uterinos secretando citocinas, incluida la interleucina-1 β 2 (IL1 β 2) específica de esta especie, interferón- γ (IFNG) e IFN- δ (IFND) (Almeida y Dias, 2022). El efecto directo de la IL1 β 2 en la interfaz materno-embionaria (Mathew *et al.*, 2015), no se ha dilucidado completamente, pero se ha demostrado que la IL1 β induce la expresión de diversos genes endometriales, relacionados con la producción y transporte de fosfolipasa A2 necesaria para la remodelación celular del concepto durante el proceso de elongación (Seo *et al.*, 2012). También, se ha reportado que la IL1 β estimula la síntesis y liberación de prostaglandina endometrial, que además de los estrógenos del concepto, puede inducir un aumento específico de PGE2 y PGF2 α en el contenido luminal durante la gestación (Seo *et al.*, 2014). El aumento y liberación de PGE2 en la vena útero-ovárica, se ha visto, puede tener un efecto luteotrófico directo sobre el CL, actuando localmente a través de su receptor endometrial y del concepto (Waclawik *et al.*, 2017). La secreción conjunta de estrógenos, IFND e IFNG por los conceptos, se ha planteado, podrían coordinar la activación de STAT1 en el lumen y estroma uterino, y por lo tanto inducir vías celulares para la unión del trofoblasto y la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria materna hacia los embriones, siendo críticos para el establecimiento y reconocimiento de la gestación (Sharkey, 1998; Joyce *et al.*, 2007).

2.6 Ventana de receptividad

La implantación es el proceso por el cual el blastocito se adhiere al útero para la yuxtaposición de la circulación embrionaria y materna, lo que conduce al desarrollo de una placenta funcional y una gestación exitosa (Bazer y Johnson, 2014c). En términos precisos, los embriones porcinos no penetran el EL uterino, ni invaden el estroma, por lo que, el término implantación resulta inapropiado para esta especie. Sin embargo, aunque el tipo de implantación difiere de otros mamíferos, sus etapas iniciales son comunes en todas las especies y se definen como la “cascada de

adhesión para la implantación”, la cual comienza desde el desprendimiento de la ZP (eclosión), seguido por la elongación del trofotodermo del concepto. Durante la peri-implantación, el EL uterino y el trofotodermo desarrollan competencia de adhesión en simultaneidad, para iniciar una cascada de adhesión dentro de un período restringido del ciclo uterino denominado “ventana de receptividad” (Bazer *et al.*, 2011); la cual se encuentra dirigida por las acciones de la progesterona y el estrógeno, a fin de regular la expresión de citocinas, factores de crecimiento, glicoproteínas de la superficie celular, moléculas de adhesión y proteínas de la matriz extracelular (MEC) (Johnson *et al.*, 2009). Para evitar fallas y por ende mortalidad embrionaria durante la peri-implantación, los eventos moleculares que regulan el crecimiento y la diferenciación embrionaria, debe de estar en completa sincronía con el programa molecular uterino (Guzewska *et al.*, 2023). Antes de que se torne receptivo el endometrio, la progesterona es la responsable de iniciar la cascada de adhesión en el día 10 de gestación en los cerdos (Geisert *et al.*, 1994). La progesterona induce la diferenciación del estroma endometrial y la secreción glandular para crear un entorno propicio para el desarrollo embrionario temprano, implantación y placentación, que son esenciales para la supervivencia y el desarrollo fetal (Spencer *et al.*, 2004). La secreción de progesterona es crucial para los embriones, ya que actúa de manera particular sobre el EL y el epitelio glandular (EG), estimulando la secreción de “histotrófo”, una mezcla compleja de hormonas, enzimas, factores de crecimiento, citocinas, proteínas, factores de adhesión, nutrientes y otras moléculas que juegan un papel en la nutrición, implantación y placentación del concepto (Gray *et al.*, 2001). Asimismo, se ha demostrado que la progesterona aumenta la expresión de calbindina-D9k (proteína fijadora de calcio intracelular), y las subunidades de integrina $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\beta 1$ en el útero porcino (Bowen *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 2004). Además, regula a la baja la expresión de receptores de progesterona (PGR) en el EL y el epitelio glandular (EG) uterino. A su vez dicha regulación, promueve un efecto a la baja en la expresión de la mucina 1 (MUC1), una glicoproteína de mucina transmembranal, expresada en la superficie apical del EL y del EG uterino, que inhibe físicamente las interacciones célula-célula presentes

durante la unión del trofotodermo del embrión al EL uterino (Brayman *et al.*, 2004). La reducción temporal de MUC1 debido a la actividad de las proteasas de la superficie apical de las células del EL y EG uterinas, da como resultado una mayor accesibilidad de los receptores de moléculas de adhesión a ligandos de carbohidratos de baja afinidad, que incluyen selectinas, galectinas y factores de crecimiento, los cuales contribuyen a mediar el precontacto y la orientación del trofotodermo del concepto al EL uterino (Bowen *et al.*, 1997; Kimber y Spanswick, 2000). A continuación, estos contactos de baja afinidad se estabilizan mediante la adhesión a un extenso repertorio de integrinas y proteínas de la MEC maternas, que apoyan la aposición del trofotodermo al EL (Lessey, 2002). La unión integrina-ligando promueve la adhesión célula-célula y célula-MEC, permite que el citoesqueleto dentro de las células se reorganice y establezca dicha adhesión, y traduce numerosas vías de señalización intracelulares (Johnson *et al.*, 2021). Las interacciones peri-implantacionales recíprocas entre las moléculas secretadas tanto por los embriones en desarrollo como por el endometrio receptor, aseguran un ambiente favorable para completar la cascada de implantación (Guzewska *et al.*, 2023).

Posterior a la adhesión del embrión, en los días 13 y 14, el EL uterino exhibe un desarrollo de protuberancias que quedan encerradas por capas de células trofoectodérmicas del concepto, las cuales inmovilizan físicamente al concepto en la superficie del EL uterino. Hacia el día 14, existe una aposición estrecha entre las membranas apicales del trofotodermo del embrión y las células del EL, y se forman microvellosidades que se interdigitan entre estas membranas plasmáticas durante los días 15 y 16 post servicio. Tras la aposición en los días 15 – 17, la corioalantoides que rodea inmediatamente cada una de las aberturas de las glándulas uterinas, comienza a extenderse por encima de la boca de las glándulas para desarrollar una cavidad denominada areola, la cual separa el EL uterino de la corioalantoides. La cavidad que se forma recibe las secreciones de las glándulas uterinas, y las células epiteliales coriónicas columnares que recubren el borde placentario de esta cavidad, forman un sello entre el EL uterino y las paredes de la

areola para evitar la disipación de histotrofos. La interfaz entre el trofotodermo del concepto y las células del EL, se vuelve cada vez más compleja a medida que se produce la transición funcional del transporte de nutrientes histotrófico al hemotrófico entre los días 15 y 20 de gestación. Dicha interfaz se caracteriza por la formación de cúpulas apicales en las células del trofotodermo del concepto, proporcionando largas extensiones citoplasmáticas (Johnson *et al.*, 2021). Por último, la adhesión se transforma en placentación mediante el desarrollo cada vez mayor de microvellosidades interdigitadas entre el trofotodermo y las células del EL uterino (Johnson *et al.*, 2021). La implantación del embrión y el desarrollo de una red de microvellosidades hacia la circulación materna, son fuertes ventajas evolutivas de los mamíferos euterios. El desarrollo de cada placenta en sincronía con los sitios de unión, forman una interfaz entre los sistemas microcirculatorios de la madre y el concepto para el intercambio eficiente, sostenido y de alto rendimiento de nutrientes, gases y desechos metabólicos (Carter y Enders, 2013).

2.7 Angiogénesis endometrial

Se ha reportado que los cerdos de líneas comerciales, presentan una tasa de mortalidad embrionaria durante el transcurso de los 114 días de gestación de entre 30 a 40%. Estas pérdidas espontáneas, se han identificado distribuidas en dos períodos; durante la peri-implantación (10 a 30 días de gestación) y alrededor de la mitad de la gestación (50 – 70 días de gestación) (Tayade *et al.*, 2006; Linton *et al.*, 2010). Aunque se desconocen los mecanismos exactos, que establecen la causa de las pérdidas prenatales, la angiogénesis, proceso que tiene inicio alrededor del día 15 de gestación (Winther *et al.*, 1999), parece ser crucial en el desarrollo exitoso de los conceptos durante la gestación (Edwards *et al.*, 2011).

La formación de un sistema vascular implica dos procesos fundamentales: la vasculogénesis, definida como la diferenciación de células progenitoras endoteliales y su ensamblaje en el plexo capilar primario, y la angiogénesis la cual se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, la cual depende de un equilibrio estricto entre factores angiogénicos promotores e

inhibidores (Kuвано *et al.*, 1994; Holmes y Zachary, 2005). La angiogénesis juega un papel crucial en la organogénesis y el desarrollo embrionario y fetal avanzado, resultando esencial para las funciones fisiológicas de los tejidos (Shibuya, 2011; Tahergorabi y Khazaei, 2012). En organismos adultos, la angiogénesis es necesaria para la cicatrización y reparación de tejidos, el crecimiento y la acción de los órganos reproductores femeninos, incluida la ovulación, el desarrollo folicular, formación del cuerpo lúteo, el crecimiento endometrial, y su regresión durante el ciclo estral así como la formación de un tejido completamente vascularizado para la implantación embrionaria y placentación durante la gestación (Fraser y Lunn, 2000). El endometrio uterino es un tejido dinámico que experimenta ciclos regulares de crecimiento y descomposición, reconocido como uno de los pocos tejidos adultos en los que se produce una angiogénesis significativa de manera fisiológica (Girling y Rogers, 2005).

La angiogénesis se puede presentar a través de diferentes mecanismos: brotación (germinación); intususcepción (división interna de vasos sanguíneos por células endoteliales que da como resultado ramificaciones más pequeñas); elongación (crecimiento longitudinal del vaso sin formación de nuevas uniones vasculares); o por la incorporación de células progenitoras endoteliales circulantes en el vaso en desarrollo (Khakoo y Finkel, 2005). La germinación fue el primer mecanismo angiogénico descrito, este ocurre durante la neovascularización de los tejidos avasculares como el cuerpo lúteo. Este mecanismo es el más estudiado en la mayoría de los modelos experimentales, sin embargo, no necesariamente es el mecanismo principal por el cual ocurre la angiogénesis endometrial. Estudios previos han demostrado que el mecanismo de elongación de los vasos mediado por estrógenos ocurre durante la fase proliferativa media-tardía del ciclo estral (Gambino *et al.*, 2002).

El crecimiento y la diferenciación del endometrio se encuentran regulados bajo el control general de los estrógenos y la progesterona. Existe evidencia de que los estrógenos estimulan la angiogénesis al actuar directamente sobre las células endoteliales y/o indirectamente sobre otros tipos de células endometriales a través

de numerosos promotores (Kayisli *et al.*, 2004). Los estrógenos ejercen su función a través de su unión a receptores de estrógeno α y β , los cuales se han localizado en células del músculo liso de vasos sanguíneos y células endoteliales endometriales (Critchley *et al.*, 2001; Krikun *et al.*, 2005). Adicionalmente, se considera que los estrógenos son uterotróficos y promotores de la angiogénesis y la permeabilidad vascular, al promover la proliferación de células endoteliales endometriales (Kayisli *et al.*, 2004). Por el contrario, existen pocos estudios sobre los efectos de la progesterona sobre la angiogénesis endometrial. Se han identificado receptores nucleares funcionales de progesterona en células endoteliales en una amplia variedad de tipos de tejido, incluido el endometrio (Vázquez *et al.*, 1999). Su función específica aún se encuentra bajo debate, ya que diferentes estudios a nivel *in vitro* han encontrado tanto efectos inhibitorios (Iruela-Arispe *et al.*, 1999), como estimulantes (Kayisli *et al.*, 2004) de la proliferación de células endoteliales. A pesar de la variación de los resultados, se presenta *in vivo* un aumento en la densidad de la ramificación de los vasos sanguíneos por mecanismos angiogénicos de germinación e intususcepción durante la fase secretora del ciclo estral, en respuesta a la progesterona (Gambino *et al.*, 2002). A diferencia de los estrógenos, se cree que los efectos angiogénicos estimulados por la progesterona ocurren sin vasodilatación concurrente (Ma *et al.*, 2001).

La angiogénesis consta de tres etapas: la primera, consiste en la selección de algunas células endoteliales dentro de los capilares denominadas “células punta”, para comenzar la descomposición de la membrana basal e iniciar la expansión angiogénica. La selección de las células punta, se encuentra regulada por los receptores de la familia Notch (proteínas heterodiméricas) y sus ligandos transmembrana DLL4 (ligando tipo Delta 4) (Sainson *et al.*, 2005). A su vez, la expresión de DLL4 y sus receptores Notch se activa mediante la interacción de VEGF con las células endoteliales (Liu *et al.*, 2003). Después de la función de VEGF, las células punta se orientan en el gradiente de VEGF, que se encuentra mediado por la interacción con su receptor VEGFR-2. La segunda etapa, también mediada por la interacción de VEGF y VEGFR-2 incluye la migración, proliferación

de células endoteliales y formación de estructuras tubulares inmaduras (Gerhardt *et al.*, 2003; Girling y Rogers, 2005). La tercera etapa, la maduración de los vasos de nueva formación, implica la inhibición de la proliferación endotelial y la migración de nuevos capilares, así como el reclutamiento de células de soporte (pericitos y células del músculo liso vascular) (Armulik *et al.*, 2005); las cuales además de proporcionar soporte mecánico, le da a los vasos sanguíneos la capacidad de regular el flujo de sangre. Asimismo, las células de soporte poseen un papel clave en la regulación del crecimiento y función de los vasos. Por lo tanto, el reclutamiento de células murales y la maduración vascular son eventos estrictamente necesarios para el desarrollo de una vasculatura endometrial funcional. Los pericitos están en comunicación directa con las células endoteliales para formar paredes capilares. El papel de los pericitos se encuentra mediado principalmente por el PDGF-B (factor de crecimiento derivado de plaquetas B) y su receptor PDGFR-B (Betsholtz, 2004). El proceso de maduración ocurre durante la fase secretora del CE (Girling y Rogers, 2009).

El sistema vascular que comprende vasos sanguíneos y linfáticos, tiene funciones críticas en el transporte de oxígeno, nutrición, excreción, equilibrio de líquidos, homeostasis y defensa inmunitaria. Dicho sistema se encuentra regulado por un gran número de hormonas, factores de crecimiento y citocinas, así como por proteínas de adhesión. Estas moléculas tienen efectos directos e indirectos en varias etapas del proceso de remodelación vascular durante el ciclo estral y la gestación. Como se describió previamente, el crecimiento y la remodelación vascular endometrial se encuentra regulado por los cambios en las concentraciones circulantes de los esteroides ováricos estrógeno y progesterona. El incremento en las concentraciones de estrógenos están asociadas con el rápido crecimiento de los vasos que se produce durante la fase proliferativa del ciclo estral, mientras que la progesterona regula la maduración del plexo capilar durante la fase secretora (Girling y Rogers, 2009). Los cerdos, una especie con una placentación epiteliocorial, presentan una extensa angiogénesis para formar la interfaz materno-embrionaria; esto le confiere la particularidad de ser un excelente modelo para el

estudio de los procesos de implantación y angiogénesis endometrial (Tayade *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2011).

2.8 Factores angiogénicos

Los miembros de la familia de VEGF y sus receptores componen uno de los sistemas ligando-receptor más importantes implicados en la angiogénesis, hiperpermeabilidad y remodelación vascular (Winther *et al.*, 1999). La familia de proteínas incluye a VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (este último codificado por virus Orf) y al factor de crecimiento placentario (PIGF) (Shibuya, 2003; Ferrara y Adamis, 2016). Los VEGF, son moléculas diméricas estructuralmente relacionadas, ampliamente expresadas. Las vías de señalización activadas por la familia VEGF, desempeñan funciones fundamentales en la formación de vasos a partir de células precursoras hematopoyéticas (un proceso llamado vasculogénesis), en la formación de vasos a partir de vasculatura preexistente (angiogénesis), en la supervivencia celular, permeabilidad vascular y la linfangiogénesis (Girling y Rogers, 2009). Los efectos biológicos de VEGF se encuentran mediados por la unión a los receptores con actividad tirosina quinasa de alta afinidad: VEGF-A se une a VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1), VEGF-B y PIGF se unen exclusivamente a VEGFR-1. Tanto VEGF-C como VEGF-D no solo inducen angiogénesis al unirse a VEGFR-2 sino que también actúan como los principales inductores de linfangiogénesis al unirse a VEGFR-3 (Flt-4) (Ferrara *et al.*, 2003). Además de su unión a receptores afines, los VEGF también interactúan con correceptores como los miembros de la familia de neuropilina (NRP) NRP1 y NRP2 y a los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) (Cébe-Suarez *et al.*, 2006). La capacidad de los VEGF de unirse simultáneamente a varios tipos de proteínas transmembrana, inicia la formación de complejos multiproteicos que incluyen, además de receptores y correceptores, varias proteínas auxiliares que no se unen al VEGF, como las integrinas y la efrina B2 (Simons *et al.*, 2016). El VEGF se ha descrito como un mitógeno selectivo para células endoteliales vasculares. Estudios previos en humanos (Ahmed *et al.*, 1995) y ratas (Cullinan-Bove y Koos, 1993),

demonstraron que los estrógenos regulan positivamente la expresión de VEGF en tejido uterino. Asimismo, se ha comprobado que la expresión génica de VEGF está regulada positivamente por una hipoxia en células del trofoblasto a nivel *in vivo* e *in vitro* (Winther *et al.*, 1999). Los miembros de la familia de los factores de crecimiento insulínico (por sus siglas en inglés IGF's), se han identificado en cerdos por influenciar la expresión de VEGF y por ende al proceso de angiogénesis. IGF1 e IGF2 participan regulando el crecimiento embrionario y fetal durante la gestación en el cerdo (Miese-Looy *et al.*, 2012). Se han implicado otras moléculas como reguladores positivos de la angiogénesis, incluido el factor de crecimiento de fibroblastos (por sus siglas en inglés FGF), el cual es considerado una molécula proangiogénica y un potente promotor de división de las células endoteliales, que provee el estímulo inicial necesario para la angiogénesis (Presta *et al.*, 2005); el factor de crecimiento básico de fibroblastos (por sus siglas en inglés bFGF), así como sus dos receptores angiogénicos (FGFR1 y FGFR2) (Welter *et al.*, 2004); el factor de crecimiento transformante α y β (TGF- α y TGF- β); el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); factor de necrosis tumoral - α (TNF- α); interleucina 8 (IL-8); y las angiopoyetinas 1 y 2 (Ferrara *et al.*, 2003).

2.8.1 Factor de crecimiento de endotelio vascular A (VEGF-A)

El factor de crecimiento de endotelio vascular A (VEGF-A) se identificó originalmente en 1983 como factor de permeabilidad vascular (Senger *et al.*, 1983), con la subsecuente clonación del gen en 1989 (Keck *et al.*, 1989). VEGF-A, también llamado VEGF, es el miembro prototípico de la familia de los factores de crecimiento de endotelio vascular, y pertenece a la superfamilia del nudo de cisteína de hormonas y moléculas de señalización extracelular, que se caracterizan por la presencia de ocho residuos de cisteína conservados que forman el arreglo estructural típico del nudo de cisteína (llamado así por la cistina, un dímero de dos cisteínas unidas por un enlace disulfuro) (Plouët *et al.*, 1989; Holmes y Zachary, 2005). La familia VEGF se encuentra relacionada evolutivamente con otros grupos dentro de la superfamilia del nudo de cisteína, en particular las familias de hormonas

glicoproteicas y proteínas similares a mucina y, más distante a la familia del TGF- β . Hasta el momento se ha identificado VEGF en todos los vertebrados, encontrándose altamente conservado entre especies (Holmes y Zachary, 2005).

VEGF es una glicoproteína homodimérica de unión a heparina, estable al calor y al ácido, con un peso molecular de 45 kDa (Ferrara *et al.*, 1991b). La estructura de VEGF-A consta de dos monómeros, cada uno contiene una estructura central de nudo de cistina que se mantiene unida por tres puentes disulfuro intracatenarios; los monómeros están dispuestos de cabeza a cola en un homodímero antiparalelo unido covalentemente por dos puentes disulfuro entre Cys-51 y Cys-60 (Muller *et al.*, 1997). El gen que codifica VEGF-A abarca 14 kb y está organizado en ocho exones separados por siete intrones altamente conservados (Cross *et al.*, 2003). VEGF-A emplea sitios de unión simétricos en cada polo del dímero para unirse tanto al VEGFR-1 como al VEGFR-2 y puede inducir heterodímeros entre estos receptores (Veikkola *et al.*, 2000). VEGF-A posee múltiples isoformas con funciones específicas, que resultaron del empalme alternativo del ARNm y el procesamiento proteolítico, que difieren tanto en su masa molecular como en sus propiedades biológicas (Robinson y Stringer, 2001; Harper y Bates, 2008). En un inicio se identificaron cuatro diferentes isoformas en humanos (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆), los cuales tienen 121, 165, 189 y 206 residuos de aminoácidos respectivamente (Ferrara *et al.*, 1991a). No obstante, se han reportado variantes de empalme menos frecuentes y específicas de tejido (VEGF₁₄₅ y VEGF₁₈₃) (Anthony *et al.*, 1994; Lei *et al.*, 1998). El VEGF porcino, es un aminoácido más corto en comparación con la forma humana. Las diferentes solubilidades de cada isoforma están relacionadas con la presencia o ausencia de dos dominios de unión a heparina; dichos dominios se encuentran codificados por lo exones 6 y 7 y confieren a una isoforma la capacidad de unirse a la matriz extracelular (Girling y Rogers, 2009). La secuencia de señal hidrofóbica esencial para la secreción de VEGF-A está codificada dentro del exón 1 y una pequeña región del exón 2. VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ humanos y sus equivalentes en otras especies son las isoformas más predominantes en los mamíferos; VEGF₁₂₁ carece

de los exones 6 y 7 y VEGF₁₆₅ carece del exón 6. El exón 6 codifica un dominio de unión a heparina, mientras que los exones 7 y 8 codifican un dominio de unión a NRP1/heparina; con la excepción de el polipéptido ácido soluble VEGF₁₂₁, se cree que todas las isoformas se unen con gran afinidad al polisacárido heparina (Figura 8) (Houck *et al.*, 1992). Mientras que VEGF₁₂₁ es una proteína de libre difusión, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ se encuentran secuestrados casi por completo en la matriz extracelular y su función se desconoce hasta el momento (Park *et al.*, 1993). VEGF₁₆₅ se une a los correceptores NRP1 y NRP2, mientras que VEGF₁₄₅ se une solo a NRP2 (Gluzman-Poltorak *et al.*, 2000).

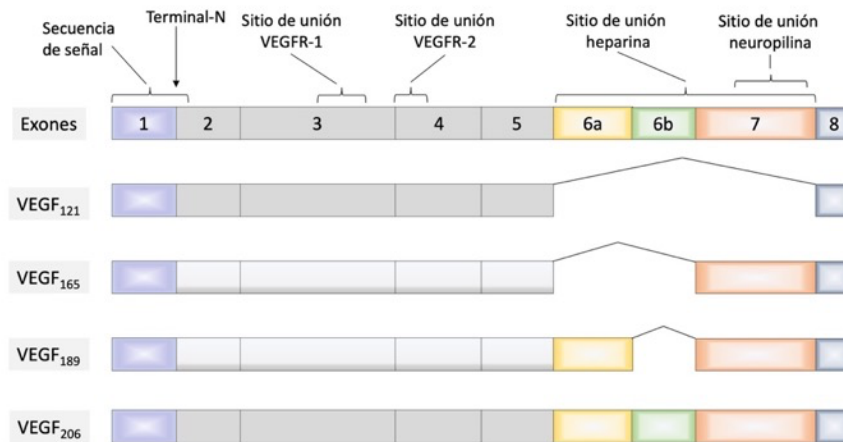


Figura 8. Esquematación de la organización del gen VEGF-A. Esquematación de la organización de los 8 exones que codifican el gen VEGF-A, así como las cuatro isoformas más comunes que resultan del empalme alternativo de una solo especie de pre-ARNm de VEGF-A. Estos corresponden a VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆, de los cuales VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ son las isoformas más predominantes en mamíferos. Modificado a partir de Cross *et al.* (2003).

La expresión del ARNm de VEGF es inducida por exposición a baja tensión de oxígeno. La regulación transcripcional del gen VEGF-A por hipoxia, está mediada por la unión del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) a los potenciadores sensibles a la hipoxia de VEGF. HIF-1 es un heterodímero compuesto por subunidades HIF-1 α y HIF-1 β . HIF-1 α normalmente es muy lábil, pero en condiciones hipóxicas, se acumula porque se inhibe la degradación proteosomal; con una tensión de oxígeno normal, HIF es hidroxilado por una clase de enzimas dependientes de oxígeno y hierro conocidas como prolil-hidroxilasas de

HIF (Semenza, 2000). La expresión del gen VEGF-A también está regulada por una variedad de factores de crecimiento y citocinas, incluidos el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), EGF, TGF- β , FGF2, interleucina-1 β e interleucina-6, algunos de los cuales pueden actuar sinérgicamente con hipoxia (Ferrara *et al.*, 2003).

El VEGF-A es distinguido por su capacidad de estimular la proliferación y migración de células endoteliales, así como la permeabilidad vascular en condiciones fisiológicas y patológicas (Ferrara *et al.*, 2003; Ferrara, 2004). Se ha demostrado en ratones el papel fundamental de VEGF-A en el desarrollo embrionario, ya que la inactivación de un solo alelo del gen, da como resultado un desarrollo vascular defectuoso y letalidad embrionaria (Ferrara *et al.*, 1996). Otro estudio en ratones homocigóticos, reportó que la sustitución simple de tirosina a fenilalanina en la posición 1173, desarrollaba vasculogénesis y angiogénesis defectuosas, muriendo en útero alrededor del día 8.5 a 9.5; destacando así la importancia de VEGF durante el desarrollo embrionario (Sakurai *et al.*, 2005). En los recién nacidos, VEGF-A es responsable del crecimiento eficiente y desarrollo de los órganos. Sin embargo, cuando los organismos se encuentran completamente desarrollados, VEGF también participa en la angiogénesis activa, por ejemplo en la regulación del crecimiento cíclico y regresión del CL y el útero durante el ciclo estral y la gestación (Ferrara *et al.*, 1998; Gerber *et al.*, 1999). Además, VEGF ha demostrado ser un factor de protección y supervivencia para las células endoteliales, tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante la inducción de la expresión de las proteínas antiapoptóticas BCL-2 y A1 en células endoteliales (Gerber *et al.*, 1998a).

Con base en estudios previos, VEGF parece ser uno de varios elementos críticos en el útero durante el proceso de implantación en varias especies incluidos humanos (Charnock-Jones *et al.*, 1993), roedores (Cullinan-Bove y Koos, 1993; Rabbani y Rogers, 2001), cerdos (Welter *et al.*, 2003; Kaczmarek *et al.*, 2008), ovejas (Grazul-Bilska *et al.*, 2010), bovinos (Hayashi *et al.*, 2019), primates (Wang *et al.*, 2003) y conejos (Das *et al.*, 1997). El ARNm y la proteína de VEGF-A, se

expresan tanto en el epitelio como en el estroma del endometrio de primates y roedores, con cambios aparentes temporales y espaciales durante el ciclo estral (Graubert *et al.*, 2001).

Las funciones biológicas de VEGF-A están mediadas por la unión específica a dos RTK de tipo III, VEGFR-1 y VEGFR-2 (Cébe-Suarez *et al.*, 2006; Ferrara *et al.*, 2003). Los RTK muestran una organización estructural primaria similar que se divide en cuatro porciones, las cuales incluye: las características comunes de siete repeticiones del dominio de homología de inmunoglobulina (Ig) extracelular; un dominio transmembrana helicoidal α corto; un dominio regulador de yuxtamembrana citoplasmático; seguido por un dominio de tirosina quinasa intracelular interrumpido por un péptido corto, el dominio de inserción de quinasa (con 70 residuos de aminoácidos), y una secuencia con varios residuos de tirosina involucrados en el reclutamiento de moléculas de señalización; y finalmente una región carboxilo-terminal flexible o cola (Park *et al.*, 2018) (Figura 9). Las siete repeticiones del dominio similar a Ig extracelulares, participan principalmente en la unión de ligando y la dimerización del receptor. Tanto para VEGFR-1 como VEGFR-2, el segundo y tercer dominio similar a Ig son fundamentales para el reconocimiento de VEGF-A, constituyendo el dominio de unión a ligando de alta afinidad (Figura 9). La unión del ligando desencadena cambios conformacionales que se transmiten a través de la región transmembrana para promover la activación de tirosina quinasa (Fuh *et al.*, 1998; Ruch *et al.*, 2007). El dominio transmembrana sufre una oligomerización no covalente dentro de la bicapa lipídica, lo que también influye en la formación y la estabilidad del complejo RTK (Shaik *et al.*, 2020). Inmediatamente después del dominio transmembrana, se ubica el dominio yuxtamembrana, el cual desempeña un papel en la activación y represión de la actividad de tirosina quinasa (Gille *et al.*, 2000). El dominio de tirosina quinasa de VEGFR de ~300 residuos, muestra una configuración atípica de división en lóbulos N- y C- terminales, causada por la inserción de una secuencia de ~70 residuos en medio de este dominio catalítico. El sitio de unión de ATP se encuentra entre la unión de los lóbulos N y C (Shaik *et al.*, 2020). La cola carboxiterminal puede mediar en la regulación tanto positiva como

negativa de la actividad de tirosina quinasa en VEGFR-2 y VEGFR-1 respectivamente (Meyer *et al.*, 2004). A pesar de la similitud, los receptores exhiben diferencias en su modo de activación, señalización y efectos biológicos. Estos receptores se expresan en la superficie celular de muchas células derivadas de la médula ósea, como las células hematopoyéticas, macrófagos, células endoteliales y en células del músculo liso vascular (Simons *et al.*, 2016).

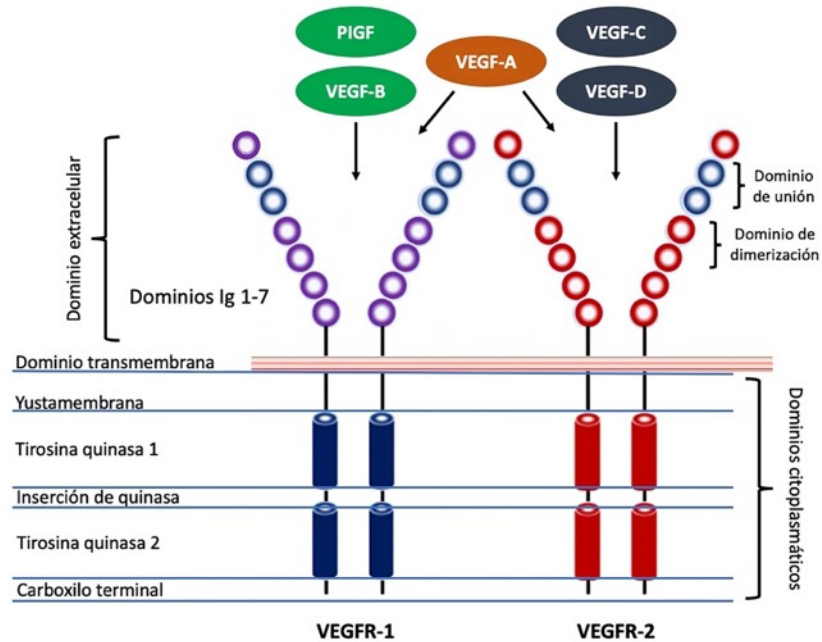


Figura 9. Esquemización de los receptores tirosina quinasa VEGFR-1 y VEGFR-2. VEGFR-1 y VEGFR-2 se expresan en la superficie celular de las células endoteliales. VEGF-A se une tanto a VEGFR-1 como a VEGFR-2. Por el contrario, PlGF y VEGF-B interactúan sólo con VEGFR-1. VEGF-C y VEGF-D se unen tanto a VEGFR-2 y VEGFR-3, este último implicado en la linfangiogénesis. Los ligandos se unen al segundo y tercer dominio de homología a Ig extracelular de las siete repeticiones, lo que induce la dimerización del receptor. Seguido se encuentra el dominio transmembrana, un dominio regulador de yuxtamembrana citoplasmático, luego un dominio de tirosina quinasa intracelular interrumpido por el dominio de inserción de quinasa, continuado con una secuencia con varios residuos de tirosina y un carboxilo-terminal.

2.8.2 Dimerización de VEGFR y activación de la quinasa

La interacción de los RTK VEGFR-1 y VEGFR-2 unidos covalentemente al ligando VEGF-A ocurre en la parte N-terminal del dominio extracelular del receptor. La unión de VEGF a su VEGFR puede ocurrir por VEGF libremente difusible, o por presentación de VEGF a través de correceptores ya sea estén expresados en la misma célula que el VEGFR o en células adyacentes. Esta unión conduce a la

dimerización de los receptores en forma de homodímero o heterodímero, la cual es necesaria, pero no suficiente, para la activación del receptor. La dimerización se estabiliza mediante puntos de contacto entre los dominios de homología Ig extracelulares del receptor (Yang *et al.*, 2010). La orientación de los monómeros del receptor está influenciada por los dominios transmembrana (Dosch y Ballmer-Hofer, 2010). La disposición rígida resultante de dos monómeros de receptores es necesaria para el posicionamiento exacto de los dominios de quinasa intracelulares (Ruch *et al.*, 2007). La dimerización se acompaña de cambios estructurales del dominio intracelular y la rotación de los dímeros, que a su vez, conducen a la exposición del sitio de unión de ATP en el dominio quinasa intracelular, seguido de la unión de ATP y la autofosforilación o transfosforilación de los residuos de tirosina en el propio dímero del receptor, así como en los transductores de señal aguas abajo (Hubbard, 1999; Koch y Claesson-Welsh, 2012). Las fosfotirosinas y los residuos de aminoácidos circundantes constituyen sitios de ensamblaje de grandes complejos moleculares, las llamadas “partículas de transducción de señales”, las cuales inician diversas vías de señalización intracelulares (Schlessinger y Lemmon, 2003). Estas vías median respuestas inmediatas como la permeabilidad vascular, y respuestas a largo plazo que requieren regulación génica, como la supervivencia, migración y proliferación de células endoteliales (Shibuya, 2013).

En general, la señalización de VEGFR se encuentra estrictamente regulada en diferentes niveles incluidos: expresión del receptor, disponibilidad y afinidad para la unión de sus ligandos, presencia de correceptores de unión a VEGF, proteínas auxiliares que no se unen a VEGF, tasa de captación celular del receptor, grado de degradación y velocidad de reciclaje. La endocitosis y el tráfico de VEGFR, regulan la especificidad, así como la duración y amplitud de la salida de señalización. Una vez que están en el citoplasma, los VEGFR se transportan a los lisosomas para su degradación o se reciclan a la membrana a través de vías de reciclaje rápidas o lentas (Simons *et al.*, 2016).

2.8.3 Receptor VEGFR-1

VEGFR-1 (también conocido como Flt-1) es una glicoproteína transmembrana de 180 -185 kDa (de Vries *et al.*, 1992), conformada por 1338 aminoácidos, cuyo ARNm puede ser cortado y empalmado, produciendo una proteína más corta. Flt-1 se expresa en células endoteliales vasculares en niveles relativamente altos durante el desarrollo embrionario y en animales adultos (Jakeman *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1993). Asimismo, VEGFR-1 se expresa en una amplia gama de células no endoteliales como células madre hematopoyéticas, monocitos, macrófagos, células dendríticas, espermatozoides y de Leydig, osteoclastos, pericitos, tejido epitelial, células mesangiales renales, células del músculo liso uterino, trofoblastos en la placenta y en distintos tipos celulares tumorales (Senger *et al.*, 1983; Korpelainen *et al.*, 1998; Niida *et al.*, 1999). La importancia de la expresión de VEGFR-1 en estas células no endoteliales no está clara, pero podría estar desempeñando un papel regulador en la supervivencia celular (Shibuya y Claesson-Welsh, 2006). El sitio de unión del ligando VEGF se localiza en la segunda repetición del dominio de homología a Ig extracelular, pero la repetición uno y tres también son necesarias para la unión de alta afinidad (Davis-Smyth *et al.*, 1996; Keyt *et al.*, 1996). Asimismo, esta parte amino-terminal, incluida la cuarta repetición extracelular, parecen ser esenciales para la dimerización de VEGFR-1. VEGFR-1 se une a VEGF-A con una afinidad muy alta de Kd 10 picomolar (pM) (Shibuya, 2006).

La expresión de VEGFR-1 está regulada positivamente por la hipoxia, a través de un mecanismo que involucra al complejo HIF-1 (Ramakrishnan *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la variante de empalme de VEGFR-1 que carece de tirosina quinasa intracelular y el dominio transmembrana (sVEGFR-1 soluble), es un inhibidor de la actividad de VEGF, ya que es deficiente en la señalización y se expresa en muchos tejidos durante el desarrollo embrionario normal (Kendall y Thomas, 1993). Flt-1 presenta una autofosforilación de tirosina diez veces más débil en comparación a la de VEGFR-2; transduciendo señales débiles para el crecimiento y la supervivencia de células endoteliales y pericitos, así como la

migración celular de macrófagos. La actividad quinasa de VEGFR-1 puede ser baja debido a la falta de residuos reguladores positivos de tirosina, o puede parecer baja como resultado de los pocos sitios de fosforilación estrechamente regulados. Además, existe una secuencia represora que suprime la actividad quinasa en el dominio yuxtamembrana de VEGFR-1 (Waltenberger *et al.*, 1994; Gille *et al.*, 2000; Sawano *et al.*, 2001). Estas características de VEGFR-1 sugieren que puede no ser principalmente un receptor que transmite una señal mitogénica, sino más bien un receptor “señuelo”, capaz de regular de manera negativa la actividad de VEGF en el endotelio vascular, al secuestrarlo a través de su dominio de unión, lo que reduce las concentraciones locales del factor de crecimiento y limita la unión de VEGF-A con VEGFR-2 (Park *et al.*, 1994). Se ha demostrado que las señales antagónicas de VEGFR-1 que anulan las señales mitogénicas de VEGFR-2 dependen de la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Rahimi *et al.*, 2000). Otros estudios demostraron que VEGFR-1 es capaz de interactuar con varias proteínas transductoras de señales y generar en ciertas circunstancias, una señal mitogénica (Maru *et al.*, 1998). Adicionalmente, otro reporte indicó que las funciones de VEGFR-1 pueden diferir dependiendo de la etapa de desarrollo animal y el tipo celular (Ferrara *et al.*, 2003).

Todos los RTK, incluido VEGFR-1, contienen un dominio quinasa conservado evolutivamente que contiene un sitio de unión a ATP, un motivo esencial para la catálisis y uno o dos sitios de autofosforilación de tirosina (Hanks y Quinn, 1991). A pesar de tener estos motivos y no estar bien caracterizadas las vías de señalización activadas por VEGFR-1, la estimulación del ligando solo media efectos proliferativos o migratorios débiles en las células endoteliales. Sin embargo, es indiscutible su papel en el reclutamiento de células hematopoyéticas a partir de precursores de la médula ósea (Hattori *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que los embriones de ratones con delección homocigota de *Flt-1*^{-/-} mueren en el útero entre los días 8.5 y 9.5, debido a la obstrucción de los vasos por un grave desarrollo desorganizado de las células endoteliales, provocando la proliferación excesiva de angioblastos, lo que sugiere que, al menos

durante el desarrollo embrionario temprano, VEGFR-1 es un regulador negativo de la acción de VEGF necesario para mantener un equilibrio adecuado entre los reguladores positivos y negativos (Fong *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 1999), este efecto parece ser ejercido por la forma sVEGFR-1, la cual se expresa en niveles considerables en la placenta durante la gestación (Clark *et al.*, 1998). Aunque Flt-1 fue el primer RTK que se identificó como un receptor de VEGF hace poco más de 20 años (de Vries *et al.*, 1992), su función precisa aún no se comprende completamente debido probablemente a la ligera actividad biológica de este receptor en cultivo, además de presentar distintas propiedades que puede encontrarse, dependiendo de la etapa del desarrollo y el tipo celular, por ejemplo actuando como un receptor dual; positivamente como VEGFR-1 en la superficie celular, y/o negativamente como el sVEGFR-1.

Mediante la sobreexpresión del receptor, se han identificado varios residuos de tirosina en el dominio intracelular de VEGFR-1 (794, 1169, 1213, 1242, 1327 y 1333), como sitios de autofosforilación (Ito *et al.*, 2001). Entre estas tirosinas fosforiladas (Tyr), la Tyr¹¹⁶⁹ parece corresponder a la Tyr¹¹⁷⁵ en VEGFR-2, la cual permite la unión y activación de la fosfolipasa C-RAF-MEK-MAP-quinasa, que regula la proliferación de células endoteliales hacia la angiogénesis (Takahashi *et al.*, 2001). No obstante, el grado de fosforilación en este residuo de tirosina parece ser relativamente menor. El Tyr¹²¹³ es el sitio con mayor grado de autofosforilación en VEGFR-1, pero su vía descendente de señalización aún no está clara, aunque la PI3K es una de las candidatas para la activación y señalización (Shibuya, 2006). Si bien la transcripción de VEGFR-1 probablemente no induce proliferación celular debido a que las proteínas quinastas activadas por mitógeno (MAPKs) no son activadas por este receptor, se ha reportado, si promueve la generación de proteasas como la metaloproteínasa de matriz extracelular 9 (MMP-9), las cuales son requeridas para la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos en las etapas iniciales de la angiogénesis (Gille *et al.*, 2001). VEGFR-1 no parece reciclarse, en comparación con VEGFR-2, lo que es compatible con un papel

importante de VEGFR-1 en la regulación negativa a través de la eliminación rápida de VEGF-A (Koch y Claesson-Welsh, 2012).

2.8.4 Receptor VEGFR-2

VEGFR-2 (también conocido como Flk-1 o receptor de dominio de inserción de quinasa KDR), fue el segundo receptor de VEGF identificado, contiene 1337 aminoácidos y la proteína madura es una glicoproteína de 210 - 230 kDa, de la cual se conocen dos variantes funcionales, producto del procesamiento del ARNm (Cébe-Suarez *et al.*, 2006). VEGFR-2 se expresa en la mayoría, sí no en todas, las células endoteliales vasculares adultas y sus precursores embrionarios, con niveles de expresión más altos durante la vasculogénesis y la angiogénesis embrionaria (Millauer *et al.*, 1993). También, se ha observado expresión no endotelial de VEGFR-2 en células neuronales, osteoblastos, células del conducto pancreático, células progenitoras de la retina, células madre hematopoyéticas y megacariocitos (Katoh *et al.*, 1995; Matsumoto y Claesson-Welsh, 2001). Aunque la producción de este receptor aumenta bajo condiciones de hipoxia, esta no es su principal vía inductora, se ha propuesto que un mecanismo post-transcripcional pudiera ser el responsable de su sobreexpresión (Partanen y Paavonen, 2001). La expresión de VEGFR-2 se induce junto con la angiogénesis activa, como en el útero durante el ciclo reproductivo (Tasaki *et al.*, 2010). Los ratones VEGFR-2^{-/-} mueren en el día embrionario 8.5 - 9.5, debido a un desarrollo deficiente de precursores de células hematopoyéticas y endoteliales, un fenotipo similar al del ratón VEGF^{-/-}, lo que indica que el receptor es crucial para el desarrollo vascular (Shalaby *et al.*, 1995). VEGFR-2 parece ser el principal transductor de los efectos de VEGF-A sobre la regulación de la diferenciación, proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales, así como la dilatación y permeabilidad de los vasos sanguíneos, además de procesos patológicos asociados con la neovascularización como el cáncer (Millauer *et al.*, 1994; Koch y Claesson-Welsh, 2012). Aunque los homodímeros de VEGFR-2 están implicados en la regulación funcional, la unión de VEGF-A también puede promover la formación de heterodímeros de VEGFR-1 y

VEGFR-2 (Cudmore *et al.*, 2012). VEGFR-2 se une a VEGF-A a través del segundo y tercer dominio extracelular similar a Ig, con una afinidad $K_d \sim 75$ a 125 pM, es decir de 10 a 100 veces menor que la afinidad de VEGFR-1 por VEGF-A (Terman *et al.*, 1992; Sawano *et al.*, 1996; Shinkai *et al.*, 1998). No obstante, los niveles de VEGFR-1 son relativamente bajos, con una actividad de tirosina quinasa menor en comparación con VEGFR-2 en las células endoteliales, por lo que los homodímeros de VEGFR-2 son los principales transductores de señales tras la unión de VEGF-A (López-García *et al.*, 2018). El empalme alternativo de VEGFR-2 da como resultado un VEGFR-2 soluble (s-VEGFR-2), el cual se encuentra expresado en varios tejidos, como la piel, corazón, bazo, riñones, ovarios y plasma. El s-VEGFR-2 puede contribuir a la regulación de la proliferación de células endoteliales linfáticas y a la maduración de los vasos al regular la migración de células murales y la cobertura de los vasos sanguíneos (Albuquerque *et al.*, 2009; Tugues *et al.*, 2011).

La unión de VEGF-A a VEGFR-2 promueve la dimerización del receptor y la activación de la quinasa que se estabiliza mediante interacciones homotípicas de baja afinidad entre dominios similares a Ig proximales a la membrana, lo que resulta en la autofosforilación de residuos de tirosina específicos dentro del complejo intracelular dimérico (Yang *et al.*, 2010). La propagación intracelular de la señal de VEGF-A induce la fosforilación de varias proteínas en células endoteliales, entre estas se encuentra la fosfolipasa C gamma (PLC γ) (Takahashi *et al.*, 2001); PI3K (Gerber *et al.*, 1998b); proteína activadora de Ras GTPasa (Ras GAP) (Guo *et al.*, 1995); la familia SRC de tirosina quinasa (c-Src) (Eliceiri *et al.*, 1999); quinasa de adhesión focal (FAK) (Rousseau *et al.*, 2000); Akt proteína quinasa B (PKB) (Gerber *et al.*, 1998b); proteína quinasa C (PKC) (Xia *et al.*, 1996); Raf-1; MEK (Takahashi *et al.*, 1999); quinasa regulada por señal extracelular (ERK) (Doanes *et al.*, 1999); y proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK) (Rousseau *et al.*, 1997) (Figura 10). En general, existe una homología de secuencia del 43.2% entre VEGFR-1 y VEGFR-2. El dominio extracelular de ambos receptores muestra una homología del 33.3% y la región citoplasmática del 54.6%. El dominio quinasa representa la región más conservada con un 70.1% de homología. Por el contrario, el extremo carboxilo

corresponde a la región más divergente con solo un 28.1% de homología de secuencia (Rahimi, 2006a). Entre los 19 residuos de tirosina presentes en el dominio intracelular de VEGFR-2, se han descrito hasta el momento siete sitios de autofosforilación (801, 951, 996, 1054, 1059, 1175 y 1214). Los principales sitios son Tyr⁹⁵¹ ubicado en el dominio de inserción de quinasa, Tyr¹⁰⁵⁴ y Tyr¹⁰⁵⁹ localizados en el bucle de activación del dominio tirosina quinasa, así como Tyr¹¹⁷⁵ y Tyr¹²¹⁴ ubicados en la cola del dominio carboxiterminal (Matsumoto *et al.*, 2005). Tyr¹¹⁷⁵ corresponde al sitio de unión más importante para varios mediadores de señalización, por lo que posee un papel crucial en la regulación de la angiogénesis dependiente de VEGF-A. Este residuo de aminoácido es necesario para activar la MAPK y posiblemente las vías de señalización de PI3K (Takahashi *et al.*, 2001; Olsson *et al.*, 2006). La mutación de Tyr¹⁰⁵⁹ conduce a la pérdida de la movilización de Ca²⁺ intracelular mediada por VEGFR-2 y la fosforilación de ERK. Por lo tanto, Tyr¹⁰⁵⁹ parece estar crucialmente involucrado en la mediación de señales para la proliferación, pero no para la migración celular. Por otro lado Tyr⁹⁵¹ es esencial para la migración de células endoteliales inducida por VEGF-A (Zeng *et al.*, 2001b). De manera similar a otros RTK, los sitios de fosforilación Tyr⁸⁰¹ y Tyr⁸²² ubicados en el dominio yuxtamembrana, pueden fosforilarse después de la dimerización de VEGFR-2 y mantener el receptor en una conformación activa (Hubbard, 2004).

La función de VEGFR-2 se modula a través de correceptores como HSPG que como se describió anteriormente, interactúa con ciertas isoformas de VEGF y adicionalmente con VEGFR-2 (Gitay-Goren *et al.*, 1992). También, el complejo funcional VEGF-VEGFR-2 incluye NRP, las cuales son moléculas ubicuas unidas a la membrana (Soker *et al.*, 1998; Gluzman-Poltorak *et al.*, 2000). La NRP1 es esencial para el desarrollo vascular (Kawasaki *et al.*, 1999), mientras que la NRP2 podría ser necesaria para el desarrollo linfático (Yuan *et al.*, 2002). Asimismo, la migración regulada por VEGF-VEGFR-2 está guiada por HSPG y NRP, donde a través de la presentación de VEGF-A modulan la dirección de las extensiones endoteliales (es decir, los filópodos) (Gerhardt *et al.*, 2003). VEGFR-2 se regula a la baja y se desfosforila tras la internalización en vesículas endocíticas (Duval *et al.*,

2003). Asimismo, se ha descrito tanto la inactivación por fosfatasas directamente asociadas como la desfosforilación por asociación con otros receptores de membrana que portan fosfatasas asociadas como fosfotirosina fosfatasa 1 y 2 (SHP-1 y -2) (Gallicchio *et al.*, 2005). A diferencia de otros RTK, VEGFR-2 se almacena en vesículas intracelulares negativas para proteínas de unión a GTP (Rab4 y Rab11) en células endoteliales en reposo, desde donde se entrega a la membrana plasmática de manera dependiente de Src, en respuesta a VEGF-A (Gampel *et al.*, 2006).

2.8.5 Vías de señalización de VEGF-A

La unión VEGF y su receptor VEGFR-2 promueve la activación de diferentes vías de transducción de señales intracelulares implicadas en proliferación y migración de células endoteliales y en mayor supervivencia y permeabilidad vascular (Ferrara *et al.*, 2003; Simons *et al.*, 2016). Las vías de señalización intracelulares que median los efectos tras la activación de VEGFR-2 se muestran esquemáticamente en la Figura 10.

La activación de PKC juega un papel crucial en la señalización mitogénica de células endoteliales mediada por VEGF-A, donde VEGFR-2 activa la clásica cascada de señalización dependiente de Ras, que incide sobre MAPK y ERK (Meadows *et al.*, 2001). En esta vía, VEGFR-2 recluta a la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb-2), ya sea por una interacción directa que implica el sitio de acoplamiento TYR¹²¹⁴, o mediante la asociación con la proteína adaptadora de la señalización Shc. La fosforilación de Grb-2 conduce a la activación del factor de intercambio de nucleótidos (SOS), seguido de la activación de Ras y la estimulación de la cascada de señalización Raf-Mek-Erk (Takahashi *et al.*, 1999; Cébe-Suarez *et al.*, 2006) (Figura 2). Por otro lado, el reclutamiento de receptores de PLC γ -1 tras la fosforilación de Tyr¹¹⁷⁵, también es esencial para la estimulación de la proliferación celular. La activación de PLC γ -1 promueve la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) dando lugar a 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol

1,4,5-trifosfato (IP₃). La producción de DAG activa a PKC, lo que promueve la activación de Raf independiente de Ras que conduce a la estimulación de ERK y por ende la proliferación de células endoteliales (Doanes *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2001, 1999) (Figura 2). Finalmente, la c-Src y el óxido nítrico (NO) se han identificado como mediadores intracelulares de la señalización de VEGF, mientras que el sulfato de heparán y los componentes de la matriz extracelular actúan como moduladores extracelulares en la señalización mitogénica (Wang *et al.*, 1999; Miralem *et al.*, 2001).

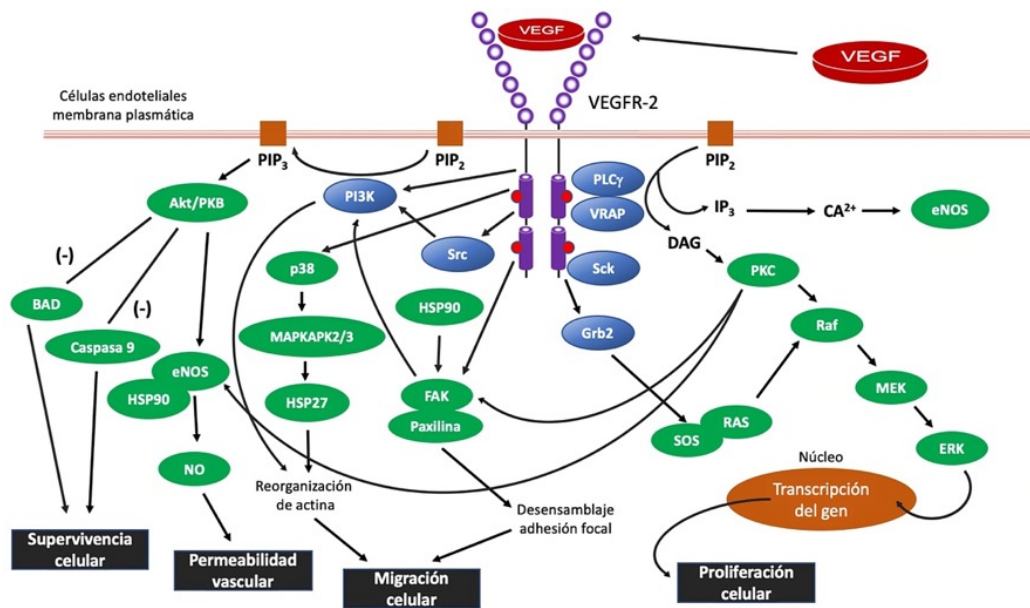


Figura 10. Esquemática de las diferentes vías de señalización de VEGFR-2 dependientes de VEGF. Después de la dimerización y autofosforilación del receptor (círculos pequeños rojos), varias moléculas de transducción de señales que contienen el dominio de homología SH2 (óvalos azules) se activan directamente mediante la unión al receptor, como PLC- γ , VRAP y Sck, o mediante mecanismo indirectos como Src y PI3K. Varias moléculas de señalización de transducción de señales aguas abajo se activan (óvalos verdes) y median diferentes vías de señalización que conducen a funciones celulares como supervivencia, permeabilidad, migración y proliferación celular. Figura editada a partir de Matsumoto y Claesson-Welsh (2001).

Las señales motogénicas (motilidad celular) transducidas por VEGFR-2 inciden en FAK, el cual regula el ensamblaje y desensamblaje de la adhesión focal y la organización de actina. VEGF regula la fosforilación y la actividad de FAK y conduce junto con la paxilina y las proteínas de anclaje a la actina, al reclutamiento de esta quinasa en las adherencias focales. Asimismo, se ha demostrado que la activación de FAK requiere adicionalmente de la señalización de PKC (Figura 2).

También, se demostró que Nck/PAK (quinasa activada por p21) promueve la fosforilación de FAK resultando en la señalización de migración celular (Abedi y Zachary, 1997; Kanno *et al.*, 2000). Además de su papel en la proliferación celular, se ha demostrado que la fosforilación de Tyr¹¹⁷⁵ regula la formación de fibras de estrés, el ensamblaje de adhesión focal y la migración celular tras el reclutamiento de la proteína adaptadora (SHB) y la activación posterior de PI3K y FAK (Holmqvist *et al.*, 2004). Por otra parte, la migración de células endoteliales inducida por VEGF también está mediada por PKC-2 activada por estrés, SAPK/p38. La movilización de Ca²⁺ y la activación de Cdc42 conducen a la fosforilación de SAPK/p38 e inducen la fosforilación de MAPKAPK2/3 y la pequeña proteína de choque térmico HSP27. Esto conduce a la liberación de HSP27 fosforilada de los filamentos de actina, la reorganización de la actina y la formación de fibras de estrés que promueve la migración celular (Huot *et al.*, 1997; Rousseau *et al.*, 1997) (Figura 10).

VEGF también posee un papel protector y de supervivencia en células endoteliales a través de la inhibición de la apoptosis *in vivo* e *in vitro*. *In vivo*, el papel de VEGF en la prevención de la apoptosis está restringido únicamente a vasos inmaduros que carecen de pericitos, con el fin de asegurar la supervivencia de las células endoteliales y el desarrollo de vasos sanguíneos en la vida postnatal temprana (Alon *et al.*, 1995; Gerber *et al.*, 1999). *In vitro*, se ha demostrado que la activación de la vía PI3K/Akt por VEGF protege a las células endoteliales en cultivo contra la apoptosis inducida por la inanición de suero (Gerber *et al.*, 1998b). La salida de señal de VEGFR-2 mantiene niveles adecuados de PI3K activada, por lo que regula la producción del segundo mensajero en la membrana plasmática fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), que se requiere para la activación de la serina/treonina quinasa Akt (Brazil y Hemmings, 2001) (Figura 10). También, se ha demostrado que VEGF puede inducir la expresión de moléculas antiapoptóticas, incluidos los inhibidores de caspasa BCL-2 y A1 (Gerber *et al.*, 1998a) y las proteínas de la familia IAP (inhibidores de la apoptosis) (Tran *et al.*, 1999). Es importante destacar que la señalización de supervivencia mediada por VEGFR-2, PI3K y Akt dependen de la integridad de las uniones adherentes que contienen un

complejo tetramérico transitorio compuesto por VEGFR-2, PI3K, cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) y β -catenina. La VE-cadherina es un componente de adherencia específico de células endoteliales, que participa en la formación de complejos con VEGFR-2. La función crucial de este complejo está indicada por el hecho de que la eliminación de la expresión de VE-cadherina, bloquea la transducción de señales inducidas por VEGF para la supervivencia celular (Carmeliet *et al.*, 1999).

La regulación de la permeabilidad en las células endoteliales por parte de VEGF, se puede dar a través de la inducción de la expresión de la proteína asociada a vesículas de plasmalema (PLVAP), un componente de las fenestraciones endoteliales con diafragma. La expresión de PLVAP está regulada por PI3K y SAPK/p38 (Strickland *et al.*, 2005). Además, en los vasos maduros VEGF regula la permeabilidad vascular al perder uniones entre células endoteliales, dando lugar a la formación de hendiduras trans-celulares. La dilatación y permeabilidad de los vasos sanguíneos también están reguladas por el óxido nítrico (NO), que está regulado al alza por Akt tras la inducción de la expresión de la NO sintasa endotelial (eNOS) (Michell *et al.*, 1999) (Figura 10). La activación de PLC γ hidroliza a PIP $_2$ para generar segundos mensajeros, IP $_3$ y DAG. IP $_3$ aumenta los niveles de Ca $^{2+}$ y DAG activa la PKC que conduce a diferentes respuestas celulares, entre ellas la estimulación de eNOS (Sekiya *et al.*, 1999) (Figura 10). El bloqueo de eNOS y la ciclooxigenasa con inhibidores específicos previenen la liberación de NO y prostaciclina, bloqueando la hiperpermeabilidad de los vasos inducida por VEGF (Murohara *et al.*, 1998).

2.9 Inhibición de la actividad tirosina quinasa

En los últimos años ha habido un intenso enfoque en el desarrollo de terapias basadas en la modulación de la angiogénesis. Aunque se han identificado muchos factores pro y antiangiogénicos, varias líneas de evidencia indican que VEGF y su receptor afín VEGFR-2 juegan un papel fundamental en la angiogénesis (Ferrara,

1999). En particular se ha utilizado enfoques genéticos (Millauer *et al.*, 1994, 1996; Ferrara *et al.*, 1996), uso de anticuerpos neutralizantes (Asano *et al.*, 1995; Rockwell *et al.*, 1995) e inhibidores sintéticos de la actividad de tirosina quinasa (Mendel *et al.*, 2000b), para demostrar que la interrupción de la señalización de VEGF a través de VEGFR-2 promueve la inhibición selectiva de la mitogénesis de las células endoteliales. Un ejemplo es la interrupción de la expresión de VEGF en células madre embrionarias, lo cual ha permitido validar el papel que juega VEGFR-2 en la angiogénesis (Ferrara *et al.*, 1996).

Por definición, los inhibidores de molécula pequeña son fármacos sintéticos que entran a las células con facilidad al tener un bajo peso molecular, interfiriendo con la transducción de diferentes vías de señalización. Los inhibidores de molécula pequeña son compuestos de menos de 500 Da de tamaño. Estos inhibidores pueden unirse a una gama amplia de proteínas extracelulares como intracelulares, como los receptores de unión a ligandos de la superficie celular (Megino-Luque *et al.*, 2020). El primer inhibidor de molécula pequeña de la actividad de tirosina quinasa Flk-1/KDR que se sometió a ensayos clínicos a gran escala para el tratamiento dirigido contra el cáncer fue SU5416 (Fong *et al.*, 1999; Mendel *et al.*, 2000a).

SU5416 (3-[(2,4-dimetilpirrol-5-il) metilidenil]-2-indola); semaxanib), es una molécula pequeña aromática polar sintética, lipofílica, altamente ligada a proteínas (Sukbuntherng *et al.*, 2001). SU5416 se desarrolló para actuar de forma selectiva como un potente inhibidor del receptor tirosina quinasa VEGFR-2. Como se describió anteriormente, esta vía receptora juega un papel crucial en el proceso de angiogénesis (O'Donnell *et al.*, 2005). SU5416 es un inhibidor competitivo, potente y selectivo que se incorpora al sitio catalítico de unión a ATP, dentro del dominio quinasa del receptor, lo que promueve un bloqueo de la señalización de VEGFR-2, inhibiendo la proliferación de CE's dependientes de VEGF en modelos animales e *in vitro* (Figura 11) (Fong *et al.*, 1999; Sukbuntherng *et al.*, 2001).

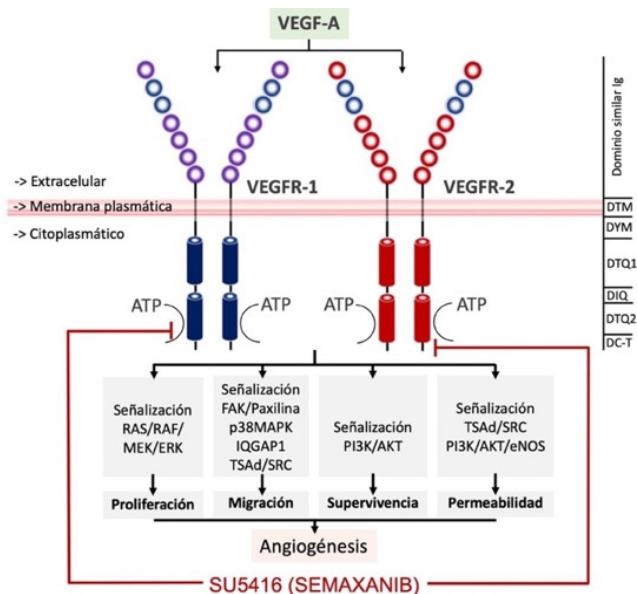


Figura 11. Esquematización de la inhibición de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 y sus vías de señalización por SU5416.

SU5416 es un antagonista RTK el cual compite por la unión de ATP al dominio de quinasa intracelular. Los RTK se muestran con su organización general que incluye siete repeticiones del dominio de homología a Ig extracelular, un dominio transmembranal (DTM), dominio yuxtamembrana (DYM), dominio tirosina quinasa 1 (DTQ1), dominio de inserción a quinasa (DIQ), seguido por un dominio tirosina quinasa 2 (DTQ2) y el dominio carboxiterminal (DC-T). VEGFR-2 traduce señales de proliferación, migración, supervivencia y permeabilidad vascular (a través de las vías indicadas en los recuadros grises), que resulta en la angiogénesis.

Aunque se ha reportado en ensayos bioquímicos que SU5416 exhibe una actividad similar contra el receptor del PDGF, su efecto inhibitorio en la fosforilación de dicho receptor fue 20 veces menos potente, que la inhibición de la fosforilación reportada para VEGFR-2 en células endoteliales. También, se ha descrito un papel de SU5416, en la inhibición dirigida a otros dos RTK, FLT3 (tirosina quinasa relacionada con FMS-3) y del receptor del factor de células madre (C-kit), los cuales se expresan en los blastos (Giles *et al.*, 2003). Otros trabajos han sugerido que SU5416 puede mediar algunos de sus efectos a través de la inhibición de VEGFR-1, necesario para la migración de las células endoteliales, monocitos y macrófagos (Itokawa *et al.*, 2002). Por el contrario, SU5416 es un inhibidor débil del receptor FGF y no posee efecto inhibitorio sobre el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Fong *et al.*, 1999¹; Mendel *et al.*, 2000a). Asimismo, la mitad de la concentración máxima inhibitoria (IC₅₀) de SU5416 contra los receptores de IGF-1, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) y Src son de al menos 10

μM , por lo que se considera que SU5416 es un inhibidor selectivo de la actividad de la quinasa de VEGFR-2 (Giles *et al.*, 2003). Se ha demostrado en ensayos de cultivo celular, que SU5416 inhibe la respuesta mitogénica dependiente de VEGF mediada por VEGFR2 de células de vena umbilical humana (HUVEC), con un valor de IC_{50} de 40 nM, pero no inhibe la respuesta mitogénica de HUVEC estimuladas con FGF (Fong *et al.*, 1999¹). Adicionalmente, en estudios farmacocinéticos, SU5416 ha mostrado en ratones, tener una vida media plasmática corta de 30 minutos (Mendel *et al.*, 2000b).

A pesar de que el proceso de neovascularización endometrial implicado en el establecimiento de la gestación ha sido objeto de varios estudios en los últimos años, aún existe falta de conocimiento en relación a los eventos que llevan a tener una mortalidad durante la etapa de la peri-implantación en el sistema de producción de cerdos, la mayoría de la investigación que se ha generado sobre los principios antes planteados, han utilizado otros modelos experimentales, por lo anterior el presente trabajo constituye una excelente área de investigación. La generación de conocimiento acerca de los mecanismos y condiciones, a través de los cuales se desarrollan los procesos de angiogénesis e implantación en el cerdo, podrá influir en la futura toma de decisiones sobre las estrategias que se implementen con el fin de incrementar la concepción y el mantenimiento de la gestación, y así hacer más eficientes los sistemas productivos. Es decir, una comprensión de los mecanismos celulares y moleculares angiogénicos que subyacen en las interacciones concepto-endometrio para el establecimiento de la gestación, resulta esencial para reducir la mortalidad embrionaria. Asimismo, la caracterización de los tipos celulares endometriales como modelos potenciales para la evaluación de los mecanismos reguladores de la síntesis y secreción de moléculas angiogénicas, es necesaria para elucidar las funciones que desempeñan en el establecimiento y mantenimiento de la gestación.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la localización de la proteína y la expresión del ARNm de VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2, en los sitios de implantación endometriales, en los días 12, 14, 16 y 18 de gestación, así como en tejido uterino durante los días 2 (fase folicular) y 12 (fase lútea) del ciclo estral, con el fin de dilucidar la localización y el patrón de expresión del sistema VEGF. Además, definir el potencial de inhibición selectiva de VEGFR-2, con el inhibidor SU5416 en cultivo primario de células epiteliales endometriales de cerda.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar y localizar mediante inmunohistoquímica la proteína de VEGF y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en tejido uterino de cerdas gestantes y no gestantes.
2. Determinar y cuantificar los niveles de expresión relativa del ARNm de los genes VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 en tejido uterino de cerdas gestantes y no gestantes.
3. Establecer un modelo de cultivo primario de células epiteliales endometriales de cerda, en etapa proliferativa del ciclo estral.
4. Determinar el tipo y homogeneidad de células aisladas con marcadores específicos para células epiteliales lumbinales y estromales.
5. Cuantificar los niveles de expresión relativa del ARNm de los genes VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, BAX, BCL-2, CASP3, FGF2 y MAPK, en las células epiteliales endometriales de cerda tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor SU5416.

4 Hipótesis

Los niveles de expresión relativa de ARNm y la localización proteica del ligando VEGF y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en tejido uterino de cerda, son diferentes en los días 12, 14, 16 y 18 de gestación y en la fase folicular y en la fase lútea del ciclo estral. Asimismo, el patrón de expresión relativa del ARNm de los genes de VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, BAX, BCL-2, CASP3, FGF2 y MAPK en células epiteliales endometriales de cerda, se modifica mediante el tratamiento a diferentes concentraciones del inhibidor SU5416.

5 Material y métodos

Todos los procedimientos y protocolos que involucran el uso de animales, fueron previamente aprobados y realizados bajo los lineamientos generales del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA), con el número de registro DC-2019/3-2, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales utilizados para la evaluación de tejidos de cerdas gestantes y no gestantes fueron criados en el Centro de Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la FMVZ-UNAM, ubicado en el altiplano del Estado de México.

5.1 Características de los animales utilizados

Este estudio se realizó utilizando hembras nulíparas, cruce Landrace-Yorkshire, seleccionadas aleatoriamente, las cuales habían presentado al menos dos ciclos regulares. Las hembras fueron sincronizadas con un progestágeno sintético (Altrenogest - Regumate®) por vía oral a una dosis de 20 mg cada 24 horas durante 18 días, transcurridos tres días después del retiro del producto, se determinó la presentación de estro con apoyo de macho celador (Soede *et al.*, 2011). Las hembras del grupo gestante, al presentar comportamiento positivo de estro, fueron inseminadas artificialmente con concentraciones de 300 millones de espermatozoides por dosis en dos períodos: primero, en la detección del comportamiento positivo de estro (0 horas) y una segunda dosis doce horas después (Knox, 2016).

5.2 Toma de muestras

Las hembras fueron sacrificadas bajo las disposiciones generales de la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, “Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres”, en la Planta de Procesamientos Cárnicos del CEIEPP – FMVZ UNAM. Para la recolección del tracto reproductivo en cerdas gestantes, se asignaron los días 12, 14, 16 y 18 de gestación (tomando como día cero la primera inseminación artificial) (n=5/día). Se considera que con los diferentes

días seleccionados se cubren en gran medida los eventos de interés que ocurren durante la peri-implantación. A los 12 días de gestación, los embriones aún se encuentran flotando dentro del lumen uterino para establecer el contacto que conlleva al reconocimiento materno de la gestación; a los 14 días se lleva a cabo una aposición estrecha entre los embriones y el epitelio luminal; hacia el día 16 se forman microvellosidades que se interdigitan entre las membranas apicales del trofotodermo del embrión con las células del EL uterino; y en el día 18 se establece una adhesión la cual conduce al posterior desarrollo placentario. La gestación se confirmó por la presencia de embriones en los cuernos uterinos. En cerdas no gestantes, la etapa del ciclo estral (CE) se determinó tomando la detección positiva de estrógeno como día cero y se confirmaron por citología vaginal los días 2 y 12 del CE (n=5/día). Se extrajo el tracto reproductivo de cada hembra (gestante y no gestante) y se transportaron al laboratorio a 4°C. En las hembras del día 12 de gestación, se removieron los cuernos uterinos y se realizaron lavados con Solución Salina Amortiguada con Fosfatos (por sus siglas en inglés PBS, Gibco, NY, EE. UU.) para recolectar los embriones, los cuales debido al estadio aún se encontraban flotando dentro del lumen uterino. Para los días 14, 16 y 18 de gestación, el útero se incidió longitudinalmente a través de una incisión realizada en el mesometrio ventral, se exteriorizó el endometrio, se localizaron los embriones y se recolectaron aleatoriamente muestras uterinas de diferentes sitios de implantación del segmento proximal, medio y distal de los cuernos uterinos, definidos mediante su evaluación macroscópica. En las hembras vacías se recolectaron muestras uterinas de la parte proximal, media y distal de los cuernos uterinos (Kaczmarek *et al.*, 2008).

5.3 Procesamiento de las muestras

Una parte de los tejidos recolectados (de menos de 1 cm³), fueron depositados en tubos cónicos de 15 ml previamente llenados con paraformaldehído al 4% en buffer PBS 1X (pH 7.4) y conservados a temperatura constante de refrigeración (4°C) por 24 horas. Posteriormente, los tejidos fueron lavados con PBS 1X buffer (pH 7.4),

cortados y montados en casetes para su inclusión, los cuales se mantuvieron sumergidos en etanol al 70% hasta su procesamiento en el histoquinete ([Anexo 1](#)). Después del aclaramiento e inclusión en parafina, las muestras fueron cortadas en el micrótopo y montadas en laminillas tratadas con Poly-L-Lysine (sigma, lot # SBLX1450) ([Anexo 2](#)), para su análisis a través de inmunohistoquímica (IHQ).

La otra parte de las muestras de aproximadamente 1 cm³, se depositaron en criotubos (Cryovial[®]) con rosca estériles y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para ser transportados y almacenados a -80°C para la extracción de Ácidos Ribonucleicos (ARN), estandarización y ensayos experimentales de la reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés PCR) de punto final y de tiempo real (qPCR).

5.4 Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN)

Se extrajo el ARN total de cada muestra de tejido uterino (30 mg), utilizando el método de tiocinato de guanidino-fenol-cloroformo con el reactivo TRI (T9424 Sigma, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante ([Anexo 3](#)) (Chomczynski, 1993). Todos los consumibles empleados durante la extracción como puntas y microtubos se encontraban estériles y libres de DNAsas y RNAsas. Para la limpieza de los equipos y área de trabajo se utilizaron dos tratamientos, el primero con etanol al 70% y el segundo a base de una solución para remover RNAsas (RNaseZap[®], R2020, Sigma, EE. UU.). La manipulación de las muestras se llevó a cabo con guantes de nitrilo estériles, asimismo se mantuvieron las muestras en todo momento sobre hielo con el fin de evitar la degradación prematura del ARN. Al final de la extracción, el ARN se resuspendió en un volumen promedio por muestra de 50 µl de agua molecular DEPC (95284, sigma, EE. UU.) mediante pipeteo, se dividieron en dos alícuotas (microtubos de 0.6 ml previamente identificados) y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

5.5 Cuantificación y determinación del grado de pureza del ARN

Una vez llevada a cabo la extracción de ARN se llevó a cabo la cuantificación total de la concentración de ARN por μl de las muestras extraídas, además de la determinación del grado de pureza y posible contaminación en un espectrofotómetro de ácido nucleico (NanoDrop® ND-1000; Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y el software ND-1000 V3.3.0. Antes de la cuantificación, el equipo se calibró con $1\mu\text{l}$ de agua molecular DEPC correspondiente a la misma alícuota utilizada previamente para la elución del pellet de ARN. Para la evaluación se utilizó $1\mu\text{l}$ de cada muestra previamente homogenizada mediante pipeteo repetido. La relación 260/280 calculada a partir del software ND-1000 V3.3.0, también se usó para determinar posible contaminación, en donde se consideró una pureza aceptable entre un valor de 1.8 y de 2.01.

5.6 Diseño de primers

Los primers para RPS20, β -actina, VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 se usaron de acuerdo a lo reportado en la literatura (García Fernández *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011). Las secuencias de los primers, los tamaños de amplicón y la temperatura de alineación se presentan en el [\(Anexo 4\)](#).

Cada uno de los primers se reconstituyeron en agua libre de nucleasas (Norgen Biotek Corp., cat.# 28015, Canadá) a una concentración de $100\mu\text{M}$, tomando como referencia la concentración total en nmoles reportadas por el laboratorio donde se sintetizaron (Integrated DNA Technologies, IDT). Después, cada primer fue llevado a una concentración final de $10\mu\text{M}$ en un volumen de $100\mu\text{l}$ y se almacenaron en microtubos estériles de 0.6 ml previamente identificados, a -20°C hasta su procesamiento.

5.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcriptasa Reversa (RT-PCR)

Se transcribieron inversamente en ADN complementario (ADNc), 2000 ng de ARN total por muestra, durante 60 minutos a 37°C , en un termociclador Mastercycler

(Eppendorf, Madrid España), utilizando el Omniscript Reverse Transcription kit (205113, Qiagen GmbH, Alemania) con random primers, dNTP mix, MgCl₂ e inhibidor de RNasa. En el [Anexo 5](#) se detallan los componentes de la reacción de RT-PCR en un volumen para cada reacción de 3.75µl de master mix, muestra de RNA y agua cuanto baste para un volumen final de 10µl. Finalizado el ciclo del RT-PCR, el ADNc se almacenó en microtubos estériles de 0.2 ml a -20°C hasta su procesamiento.

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

La reacción de PCR de punto final se realizó con el kit ReadyMix – Taq PCR Reaction Mix (Sigma – Aldrich #201443, EE. UU.), el cual se ajustó a un volumen final de 10µl por muestra y una concentración de 2µg de ADNc. Los componentes de reacción se detallan en el [Anexo 6](#). La PCR de punto final se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient® (Eppendorf, Madrid España). Se utilizaron las siguientes condiciones generales para cada gen: desnaturalización inicial 95°C por 2:30 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación 54 – 62°C (con base en el par de primers) por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Como tejido control se utilizó cDNA proveniente de riñón de cerdo, los genes de referencia que se amplificaron fueron RPS20 y β-actina. Como control negativo se sustituyó el ADNc por agua de grado molecular libre de RNasas.

5.9 Electroforesis en gel de agarosa

El gel se preparó a una concentración del 2% de agarosa (A6877, Sigma, EE.UU.) en Buffer TAE 1x y se calentó en horno de microondas por aproximadamente 1:30 minutos. Una vez fundida la agarosa se agregaron 0.8µl de GelRed (41003, Biotium, EE.UU.) para teñir el gel y hacer evidentes los ácidos nucleicos. Se colocaron por pozo 5µl del producto de amplificación de la PCR de punto final, más 1µl de buffer de carga. En el primer pozo se depositaron 2µl de marcador de peso molecular de

100pb. El gel se corrió en una cámara de electroforesis (Thermo scientific) unida a una fuente de poder (Thermo scientific – EC105), a 84 volts por aproximadamente 90 minutos. La imagen del gel se capturó en el equipo Gel Logic 200 Imaging System ® y se visualizó con el software Molecular Imaging.

5.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

La qPCR se realizó en un termociclador MyGo Pro PCR real time systems (IT-IS Life Science LTD, Dublin, República de Irlanda); utilizando el QuantiNova SYBR Green PCR kit (208054, Qiagen GMBH, Alemania), en un volumen final de 10µl por reacción. Los componentes utilizados durante la qPCR se detallan en el [Anexo 7](#). Cada muestra se analizó por duplicado y se calculó la media. Previo a los ensayos experimentales de las muestras de interés, se realizó el análisis de rangos dinámicos (curvas estándar) para cada uno de los genes, y determinar la concentración óptima de cDNA. A partir de un concentrado del cDNA de todas las muestras, se evaluaron 5 puntos en una dilución seriada 1:2 a partir de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng de ADNc. Con los valores obtenidos del Ciclo umbral (C_T) y el logaritmo de las concentraciones evaluadas, se corrió una prueba de regresión lineal. Se utilizaron las siguientes condiciones generales para cada gen: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos; seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos; 20 segundos de alineación/extensión de 54 a 62°C (dependiendo de la temperatura de fusión específica de cada primer); un ciclo de Pre-melt de 95°C por 10 segundos; y un ciclo final de Melting de 97°C por 60 segundos. Las curvas de disociación generadas después de cada qPCR (esperando ver la formación de un solo pico), así como la corrida de los productos de qPCR en gel de agarosa al 2%, sirvieron para confirmar la especificidad de los Primers y de los productos obtenidos. La expresión relativa del ARNm para VEGF, VEGFR1 y VEGFR2, se normalizó sobre la base del contenido de ARNm de los genes de referencia RPS20 y β -actina (los cuales han demostrado ser adecuados

para la normalización en tejido uterino porcino), utilizando los valores C_T de cada muestra en el análisis matemático descrito por Pfafft (2001).

5.11 Inmunohistoquímica (IHQ)

Se estandarizó el protocolo de IHQ a las condiciones del laboratorio utilizando el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa, según el método descrito por García *et al.* (2015) con modificaciones ([Anexo 8](#)). Asimismo, se comprobó la viabilidad de las muestras de tejido uterino de las laminillas procesadas, con el anticuerpo de proliferación PCNA (PC10, monoclonal antibody sc-7383, EE.UU.), el cual se expresó a nivel nuclear en células del epitelio luminal y estroma uterino, así como en el trofoblasto (Figuras 12 y 13). Para la determinación de la viabilidad y funcionamiento correcto de los anticuerpos específicos a analizar, se utilizó tejido hepático y renal porcino como control positivo (Figuras 14 y 15). Una vez evaluados y estandarizados los anticuerpos, se realizaron ensayos experimentales, donde se determinó la localización y tipo de reacción de las proteínas de interés, en los cortes histológicos de útero de cerdas gestantes en los días 12, 14, 16 y 18, así como en útero de cerdas no gestante en los días 2 y 12 del ciclo estral. El control negativo se realizó utilizando anticuerpo de control IgG de ratón (0.5 mg/ml, I-2000-1, Burlingame CA, EE.UU.), diluido a concentraciones equivalentes a los anticuerpos primarios (Figuras 16 y 17). Las características de los anticuerpos utilizados, así como sus diluciones se describen en la Tabla 1.

Se realizó un análisis subjetivo para estimar una reacción positiva (+) o negativa (-) del complejo VEGF. Para ello, se evaluó la reacción en las muestras uterinas recolectadas, poniendo especial énfasis en el epitelio luminal uterino, epitelio glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio. Se examinaron al menos cinco campos de cada muestra con el objetivo 40X. Un resultado con puntuación (+) indica la presencia de tinción, mientras que una puntuación (-) ilustra la ausencia de tinción (reacción). Los portaobjetos incubados con el mismo anticuerpo primario se tiñeron en el mismo lote para disminuir una posible variación.

5.12 Captura de microfotografías

Se obtuvieron capturas de las secciones histológicas para los días de gestación y ciclo estral teñidas mediante la técnica de IHQ y el uso de anticuerpos específicos previamente descritos. Las imágenes se tomaron con la magnificación 400X, con una cámara digital Moticam 5 (CMOS) conectada a un microscopio Carl Zeiss modelo PrimoStar y se procesaron en una computadora con el programa Motic Images Plus 2.0 y se colocaron las leyendas y la barra de escala con el programa ImageJ.

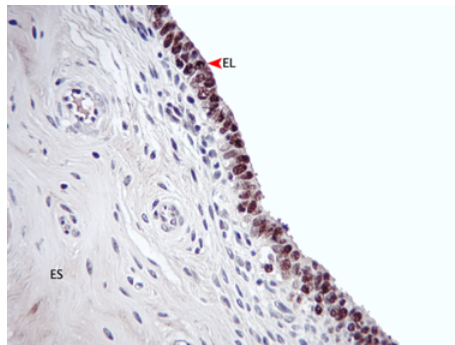


Figura 12. Estandarización del protocolo de IHQ y viabilidad del tejido, PCNA, tejido uterino, magnificación 400X.

Útero de cerda, la punta de flecha roja señala con marca positiva nuclear, las células del epitelio luminal (EL) de tipo cilíndrico pseudoestratificado.

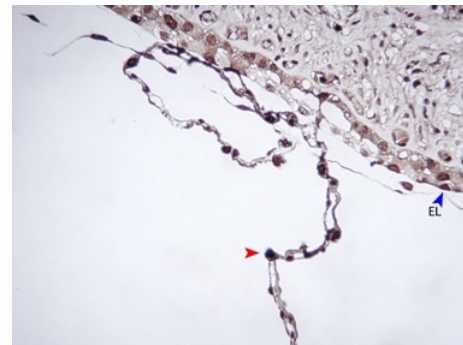


Figura 13. Estandarización del protocolo de IHQ, tejido uterino y trofoblasto, magnificación 400X.

La punta de flecha roja indica la marca positiva en los núcleos de las células en estado proliferativo del trofoblasto, cabeza de flecha azul células del epitelio luminal uterino (EL).

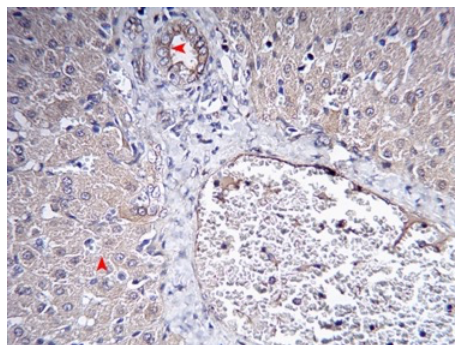


Figura 14. Control de VEGF, tejido hepático porcino, magnificación 400X.

Hígado con marcaje del anticuerpo para la proteína VEGF, localizado en el citoplasma de los hepatocitos (cabeza de flecha roja inferior) y en un conducto biliar (cabeza de flecha roja superior).

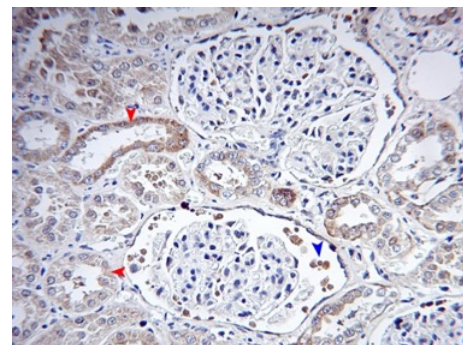


Figura 15. Control de VEGF en tejido renal porcino, magnificación 400X.

Riñón, señal citoplasmática en túbulos renales (cabeza de flecha roja).

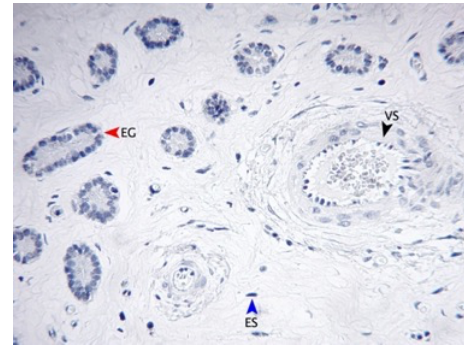
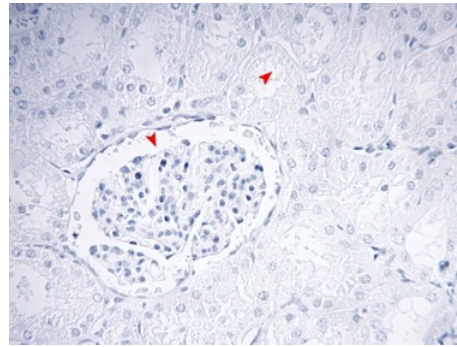


Figura 16. Control negativo en tejido renal, magnificación 400X.
Tejido renal con un corpúsculo (flecha roja izquierda) y túbulos renales (flecha roja derecha) sin señal.

Figura 17. Control negativo en tejido uterino, magnificación 400X.
Señal negativa en epitelio glandular (EG), estroma (ES) y vaso sanguíneo (VS).

Tabla 1. Características de los anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica.

Anticuerpo Primario	Número de catálogo	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (Anti-VEGF)	Polyclonal antibody ABS82	1:300	Biotinylated anti-rabbit IgG Vector Laboratories	1:100
Receptor 1 del Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (Anti-VEGFR-1)	Monoclonal antibody sc-271789	1:100	Biotinylated anti-mouse IgG Vector Laboratories	1:100
Receptor 2 del Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (Anti-VEGFR-2)	Monoclonal antibody sc-393163	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

5.13 Aislamiento y cultivo primario de células endometriales

Se recolectaron tractos reproductivos de cerdas nulíparas cíclicas Landrace-Duroc (n=5), de aproximadamente 6 meses de edad (de 100 a 120 kg de peso vivo), en etapa proliferativa del ciclo estral (los ovarios que mostraron crecimiento folicular dominante y ausencia de cuerpo lúteo fueron seleccionados como fase folicular), provenientes de un rastro local (Figura 18). Se ligó con hilo de algodón la bifurcación

de los cuernos uterinos y se cortó por detrás de este, para evitar la contaminación de la luz uterina durante el transporte. Inmediatamente los úteros fueron lavados dos veces (para remover la mayor cantidad posible de eritrocitos y otros contaminantes) con PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Gibco 70011-044, NY, EE.UU.), suplementada con una mezcla de antibióticos a base de penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma, P4333, EE.UU.) y anfotericina B (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma, A2942, EE.UU.) y colocados dentro de una bolsa con cierre hermético que contenía 350 ml de PBS. La bolsa se transportó al laboratorio dentro de una hielera a temperatura de refrigeración, en un transcurso no mayor a 1 hora (Figura 19).

En el laboratorio se trabajó asépticamente bajo una campana de flujo laminar, se colocó el útero completo en una caja Petri estéril y se lavó el tejido dos veces por la parte externa con PBS estéril (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) suplementada con antibióticos (Figura 20). Se prepararon muestras de 10 cuernos uterinos de 10 cm de longitud, se realizó un segundo corte longitudinal por el borde antimesometrial para exponer el endometrio, se colocó en una caja Petri estéril la fracción de muestra con la superficie luminal expuesta hacia arriba y se realizaron tres lavados con PBS estéril pH 7.4 (sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) suplementada con antibióticos (Figura 21).



Figura 18. Características de los ovarios de los úteros incluidos en el aislamiento de las células epiteliales endometriales.

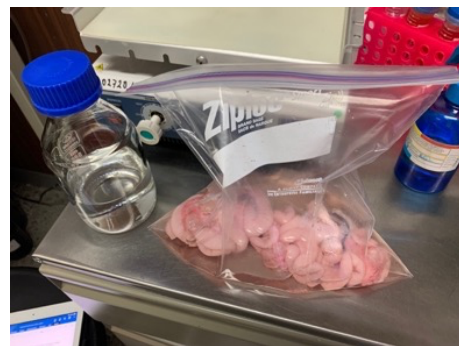


Figura 19. Método de transporte de los úteros al laboratorio.



Figura 20. Manejo aséptico en laboratorio de los úteros de cerda.



Figura 21. Fragmento de 10 cm de longitud con la superficie luminal expuesta hacia la parte de arriba.

A continuación, se cortaron de 10 a 15 pequeños fragmentos de tejido por muestra, abarcando únicamente el endometrio, y se lavaron tres veces con PBS estéril adicionada con antibióticos (Figura 22). Los fragmentos se transfirieron a un tubo cónico estéril de 15 ml que contenía 2.5 ml de 0.25% de tripsina-EDTA (Gibco, 25200-056, EE.UU.) y se incubaron y homogeneizaron continuamente en un agitador automático a 20 rpm (FINEPCR CR100, Corea) a temperatura ambiente durante 90 minutos (Figura 23). Finalizado el tiempo de digestión enzimática, se colocó el tubo en vortex por 5 segundos dos veces. Se colectaron y removieron los fragmentos de tejido no digerido y se agregaron 500 μ l de 0.25% de tripsina-EDTA fresca a 38°C y mediante pipeteo repetido se disgregaron los cúmulos celulares.



Figura 22. Lavado con PBS de los pequeños fragmentos de tejido endometrial.



Figura 23. Homogenizado continuo de las muestras para la digestión enzimática con 0.25% de tripsina-EDTA.

Para detener la digestión enzimática (tripsinización), se añadió al tubo un volumen igual de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco 12100-061 EE.UU.), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS, Sigma F2442, EE.UU.) y mezcla de antibióticos. El medio que contenía las células se pasó a través de un filtro estéril para células de 100 μm (Corning 431752, EE.UU.), se depositó en un tubo estéril nuevo de 15 ml y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Para asegurar un pellet limpio y de alta calidad, se realizaron tres lavados, resuspendiendo el paquete celular con PBS estéril más antibióticos y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Para eliminar los glóbulos rojos, se descartó el sobrenadante y se depositó el buffer de lisis de eritrocitos (Sigma R7757, EE.UU.), realizando pipeteo repetido durante 1 minuto. Inmediatamente se colocaron 10 ml de medio DMEM con 10% de FBS y antibióticos y se realizaron dos lavados a 2500 rpm durante 8 minutos con medio DMEM fresco (Figura 24).

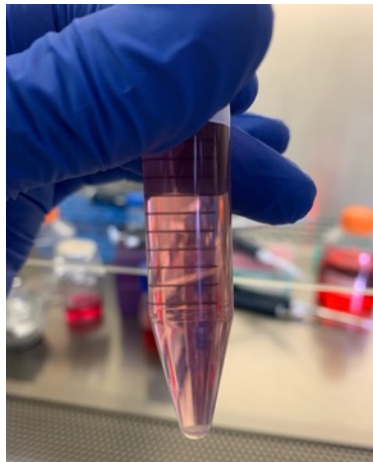


Figura 24. Pellet celular en DMEM obtenido después de la lisis de eritrocitos y lavados.

Se llevó a cabo el conteo con un hemocitómetro y determinación de la viabilidad celular con azul de tripano al 0.4% (Sigma T8154, Reino Unido), para conocer la concentración previo al sembrado, donde su viabilidad a partir de este protocolo fue superior al 90% ([Anexo 9](#)) (Freshney, 2016). El pellet celular se resuspendió en medio DMEM con 10% de FBS y mezcla de antibióticos y se sembró en una placa de cultivo de 24 pozos (Sarstedt 83.1836, EE.UU.), con una densidad

de 300,000 células, en un volumen final de 400 μ l de medio DMEM por pozo (Figura 25). Finalmente, la placa de cultivo se transfirió dentro de la incubadora a 38°C con una atmósfera de 5% de CO₂ (Figura 26).

Después de 24 horas de iniciado el cultivo, se evaluaron las células bajo el microscopio invertido. Se removi6 el medio de cultivo viejo y se realizaron dos lavados con 400 μ l de PBS est6ril a 37°C, efectuando pipeteo ligero al centro y paredes del pozo, con el fin de asegurar el arrastre de los detritos celulares. Finalmente se depositaron 400 μ l de medio fresco DMEM con 10% de FBS y mezcla de antibi6ticos, y se regres6 la placa de cultivo a la incubadora. El medio de cultivo se cambi6 cada 24 horas. Las c6lulas aisladas se tiñeron mediante inmunocitoqu6mica para evaluar su calidad y homogeneidad. El protocolo que se utiliz6 para este prop6sito se detalla en el [Anexo 10](#). Las caracter6sticas de los anticuerpos utilizados, as6 como sus diluciones se describen en la Tabla 2.

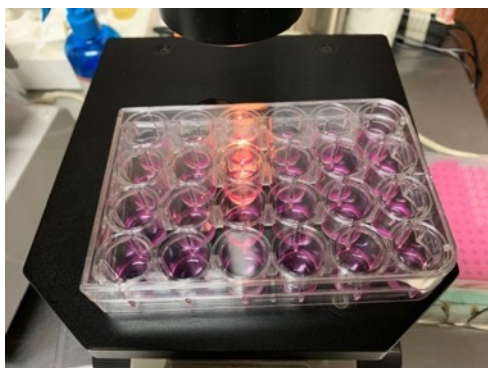


Figura 25. Caja de cultivo de 24 pozos con una concentraci6n de 300,000 c6lulas en un volumen de 400 μ l de medio DMEM.



Figura 26. Cajas de cultivo dentro de la incubadora a 38°C con una atm6sfera de 5% de CO₂.

Tabla 2. Caracter6sticas de los anticuerpos utilizados en la inmunocitoqu6mica.

Anticuerpo Primario	N6mero de cat6logo	Diluci6n	Anticuerpo secundario	Diluci6n
Vimentina-V9	Monoclonal antibody sc-6260	1:400	Biotinylated anti-mouse IgG Vector Laboratories	1:100
pan-Citoqueratina-C11				

Monoclonal antibody sc-8018	1:200	Biotinylated anti-mouse IgG Vector Laboratories	1:100
-----------------------------	-------	---	-------

5.14 Tratamiento de células con el inhibidor SU5416

Se reconstituyó el inhibidor SU5416 (semaxanib, ab145056 Abcam, Reino Unido) en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma D2650, Reino Unido), a una concentración de 100 mM. A partir del stock inicial (100 mM), se realizaron diluciones con medio DMEM suplementado con FBS inactivado al 1% y antibióticos hasta llegar a las tres diferentes concentraciones (100, 1500 y 2500 nM) con las que fueron tratadas las células (Figura 27), además del control DMSO a 2500 nM en DMEM (Figura 28).

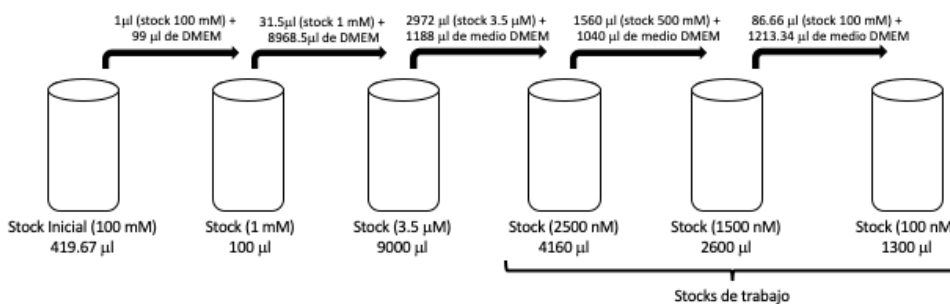


Figura 27. Diluciones del inhibidor SU5416 a partir del stock inicial 100 mM.

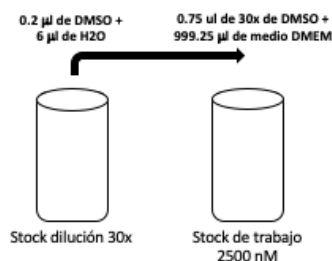


Figura 28. Dilución del control DMSO en DMEM.

La distribución en la placa de 24 pozos de los grupos tratados y el control, se esquematiza en la Figura 29. Se trabajó cada grupo por triplicados (3 pozos por grupo), con un volumen total de 400 µl de medio por pozo.

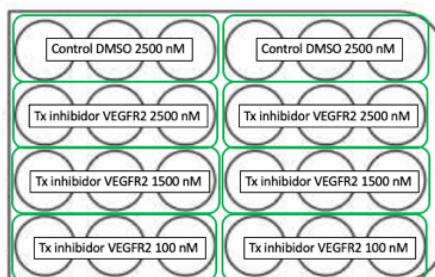


Figura 29. Distribución en placa de 24 pozos de grupos de células tratadas con SU5416.

Después de 48 horas en cultivo, las células fueron tratadas con el inhibidor SU5416 con las tres diferentes concentraciones previamente descritas. Para ello, las células de cada pozo se lavaron dos veces con 400 μ l de PBS estéril más antibióticos, a 37°C, y se agregó un volumen total de 400 μ l del tratamiento correspondiente por pozo y se regresó la placa a la incubadora para iniciar el tratamiento por las próximas 48 horas a 38°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Se analizaron 5 úteros, los cuales representaron 5 repeticiones.

5.15 Desprendimiento y recolección de las células

Después de 48 horas, se removió el tratamiento de cada pozo y se lavaron dos veces con 400 μ l de PBS estéril más antibióticos, a 37°C. Se descartó el PBS de los lavados y se depositaron 300 μ l de 0.25% de tripsina-EDTA fresca a 38°C y se incubó durante 5 minutos a 38°C con 5% de CO₂. Después, se efectuaron movimientos rotatorios suaves de la placa de cultivo durante 1 minuto a temperatura ambiente, para favorecer el desprendimiento de la monocapa y mediante pipeteo ligero se terminaron de separar las células. La digestión enzimática se bloqueó agregando el mismo volumen de medio DMEM con 10% de FBS y antibióticos. Se transfirió el volumen de cada pozo en microtubos de 2 ml previamente identificados, se concentró en un solo tubo el volumen correspondiente de los tres pozos destinados a cada tratamiento, y se centrifugó a 2500 rpm durante 8 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavaron dos veces los pellets con 400 μ l de PBS más antibióticos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 350 μ l de Buffer de lisis

(Illustra®, RNAspin Mini RNA Isolation Kit, Reino Unido) y 3.5 µl de β-mercaptoetanol (Sigma M3148, Alemania) en cada tubo, y se homogeneizó mediante pipeteo hasta que desapareció el pellet celular. Finalmente, los tubos previamente identificados se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

5.16 Extracción de ARN de células epiteliales endometriales

Se extrajo el ARN total de cada muestra correspondiente a las células epiteliales endometriales tratadas con tres diferentes concentraciones del inhibidor SU5416 (2500 nM, 1500 nM y 100 nM) y el control DMSO (2500 nM). Se utilizó el método de extracción de ARN con columnas giratorias de sílice (Illustra®, RNAspin Mini RNA Isolation Kit - 25050070, UK), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como se detalla en el [Anexo 11](#). El ARN se resuspendió en un volumen promedio por muestra de 25 µl de agua molecular libre de RNasas presente en el kit de extracción y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

5.17 Cuantificación y determinación del grado de pureza del ARN de células

Se cuantificó la concentración por µl del ARN extraído de las muestras de cultivo celular, además de la determinación del grado de pureza y posible contaminación en el equipo NanoDrop® (ND-1000; Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y el software ND-1000 V3.3.0. Se utilizaron las mismas condiciones y procedimiento empleado en el ensayo experimental con tejido proveniente de cerdas gestantes y no gestantes.

5.18 Diseño de primers

Además de los primers empleados en el ensayo experimental con tejido proveniente de cerdas (RPS20, β-actina, VEGF, VEGFR1 y VEGFR2), se diseñaron primers correspondientes a los genes BAX, BCL-2, CASP3, FGF2 y MAPK con el programa en línea Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Las secuencias de cada gen se obtuvieron del genoma reportado para *Sus scrofa* en el

National Center for Biotechnology Information (NCBI), posteriormente se analizó la especificidad y empalmes de cada secuencia en el OligoAnalyzer del portal en línea de IDT ([Anexo 12](#)). La reconstitución y dilución de los primers, se realizó siguiendo el mismo protocolo empleado en el primer ensayo experimental.

5.19 Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcriptasa Reversa

Se transcribieron inversamente en ADNc, 500 ng de ARN total por muestra, durante 60 minutos a 37°C, en un termociclador Mastercycler (Eppendorf, Madrid España), utilizando el Omniscript Reverse Transcription kit (205113, Qiagen GmbH, Alemania) con random primers, dNTP mix, MgCl₂ e inhibidor de RNasa. En el [Anexo 5](#) se detallan los componentes de la reacción de RT-PCR, donde se ocuparon las mismas condiciones del ensayo experimental con tejido proveniente de cerdas. Finalizado el RT-PCR, el ADNc se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

5.20 Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final (PCR)

La reacción de PCR de punto final se realizó con el kit ReadyMix – Taq PCR Reaction Mix (Sigma – Aldrich #201443, USA), el cual se ajustó a un volumen total de 10µl por muestra y una concentración de 1µg de ADNc. Los componentes de reacción se detallan en el [Anexo 6](#). La PCR de punto final se llevó a cabo bajo las mismas condiciones y protocolo utilizado en el ensayo experimental con tejido proveniente de cerdas. Con la PCR de punto final se determinó la especificidad de los primers previamente evaluados en tejido, y la estandarización de los primers diseñados para este segundo ensayo experimental, con muestras procedentes de cultivo celular primario.

5.21 Electroforesis en gel de agarosa

El gel se preparó bajo las mismas condiciones y protocolo empleado en el primer ensayo experimental con tejido de cerda. Se utilizó una concentración del 2% de agarosa (Sigma A6877, EE.UU.) en Buffer TAE 1x y 0.8 µl de GelRed[®] para teñir

el gel y hacer evidentes los ácidos nucleicos. El gel se corrió en una cámara de electroforesis unido a una fuente de poder (Thermo scientific – EC105), a 84 volts por 90 minutos.

5.22 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

La qPCR se llevó a cabo bajo las mismas condiciones y protocolo utilizado en el primer ensayo experimental con tejido de cerda. Las muestras se analizaron en un termociclador MyGo Pro; con el QuantiNova SYBR Green PCR kit (208054, Qiagen GMBH, Alemania), con un volumen final de 10 μ l por reacción y una concentración de 50 ng de ADNc (previamente estandarizado por medio de la generación de rangos dinámicos). Cada muestra se analizó por duplicado y se calculó la media. Las condiciones de temperatura programadas en el termociclador, fueron las mismas que se emplearon en el primer ensayo experimental, adicionalmente se estandarizaron las temperaturas de alineación para los primers utilizados en esta segunda etapa ([Anexo 12](#)). Asimismo, se ocuparon las curvas de disociación generadas después de cada qPCR, para confirmar la especificidad de los Primers y de los productos obtenidos. La expresión relativa del ARNm para VEGF, VEGFR1, VEGFR2, BAX, BCL-2, CASP3, FGF2 y MAPK se normalizó sobre la base del contenido de ARNm de los genes de referencia RPS20 y β -actina, utilizando los valores C_T de cada muestra en el análisis matemático descrito por Pfaffl (Pfaffl, 2001).

5.23 Análisis estadístico

Para analizar los niveles de expresión relativa del ARNm del sistema VEGF-VEGFR en los diferentes días de gestación temprana y ciclo estral, se utilizó un modelo de efectos mixtos (Park *et al.*, 2009), se consideró la mejor estructura de covarianza y la diferencia se encontró realizando la prueba de Tukey. Para determinar la diferencia en la expresión relativa de ARNm de los genes evaluados en células epiteliales endometriales tratadas con el inhibidor SU5416, se utilizó primero una

prueba de Barlett, seguida de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (Becsek *et al.*, 2021). El análisis de datos para este trabajo se generó con el software SAS/STAT, versión (9.4), y se graficó con el software GraphPad PRISM. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. La significancia estadística se consideró en $P < 0.05$ para todos los análisis.

6 Resultados

6.1 Inmunohistoquímica

Inmunolocalización de VEGF y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, en tejido uterino proveniente de cerdas gestantes y no gestantes.

6.1.1 VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 en día 12 de gestación

VEGF presenta marca citoplasmática con un reforzamiento en el borde apical del epitelio de revestimiento, mientras que las células del estroma aparentemente delimitan una señal en aquellas células cercanas a la luz endometrial. Por otro lado, la tinción parece localizarse tanto en células del músculo liso, como en el endotelio vascular de vasos sanguíneos (Figura 30). En el epitelio glandular se observa una marca citoplasmática (Figura 31). En cuanto al miometrio este presenta una reacción citoplasmática distribuida uniformemente (Figura 32). Para el receptor VEGFR-1, la reacción se limita en algunos vasos sanguíneos del endometrio y miometrio, y de manera generalizada en el estroma (Figura 33). Sin embargo, no se detecta en el epitelio luminal, glandular y miometrio (Figuras 34 y 35). Con respecto a VEGFR-2, la reacción se localiza en epitelio luminal, glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio; sin embargo, el estroma presenta una reacción distribuida uniformemente al igual que VEGFR-1 (Figuras 36, 37 y 38). Control negativo (Figura 39). Barra de escala = 300 μ m.

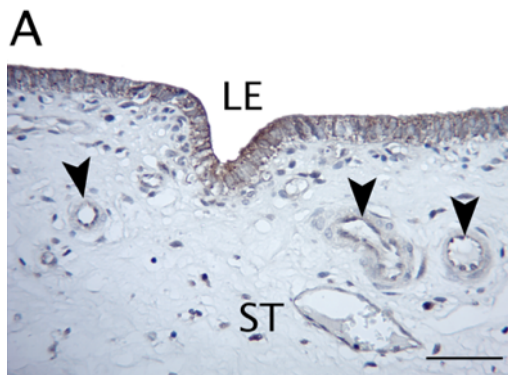


Figura 30. Epitelio de revestimiento, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 de gestación, 400X.

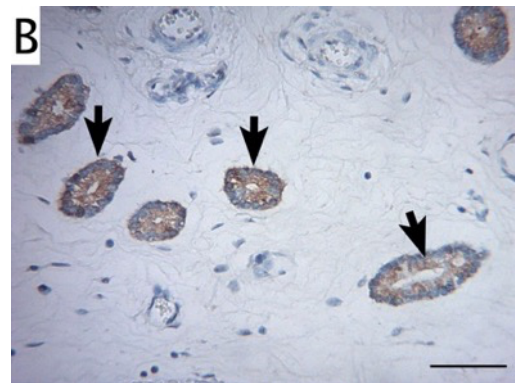


Figura 31. Epitelio glandular marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 de gestación, 400X.

Marca en el citoplasma de las células epiteliales, con reforzamiento en el borde apical (LE). Reacción citoplasmática en el tejido conjuntivo subepitelial cercano a la luz endometrial (ST). Así como en células del músculo liso y en el endotelio vascular de vasos sanguíneos (cabeza de flecha).

Marca citoplasmática granular en el epitelio glandular (flechas negras).

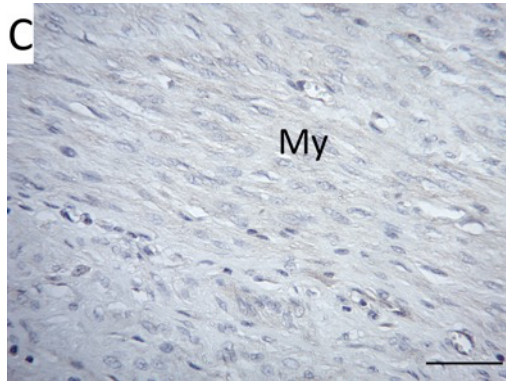


Figura 32. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 de gestación, 400X. Marca citoplasmática distribuida uniformemente en el citoplasma de las células del músculo liso del miometrio (My).



Figura 33. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR1, día 12 de gestación, 400X. Marca citoplasmática limitada a algunos vasos sanguíneos presentes en el tejido conjuntivo subepitelial (cabeza de flecha). Células del epitelio luminal sin señal (LE).

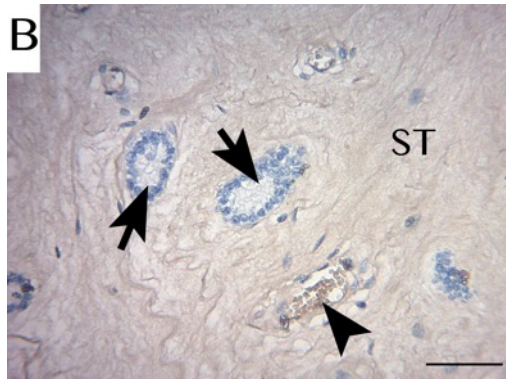


Figura 34. Estroma y vaso sanguíneo marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 de gestación, 400X. Marca citoplasmática generalizada en las fibras elásticas que componen el tejido conjuntivo ordinario denso irregular de la lámina propia estroma (ST), y vaso sanguíneo (cabeza de flecha). Células del epitelio glandular sin señal (Flecha negra).



Figura 35. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 de gestación, 400X. Marca citoplasmática limitada a algunos vasos sanguíneos (cabeza de flecha). Células del músculo liso del miometrio sin señal (My).

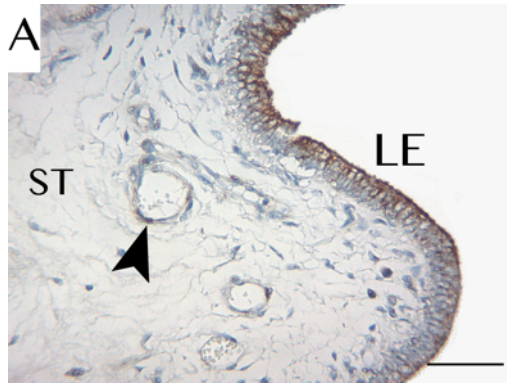


Figura 36. Epitelio de revestimiento, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 de gestación, 400X.

Marca en el citoplasma de las células epiteliales, con reforzamiento en el borde apical (LE). Señal citoplasmática en el tejido conjuntivo subepitelial con un patrón difuso (ST). Así como en células del músculo liso y en el endotelio vascular de vasos sanguíneos (cabeza de flecha).

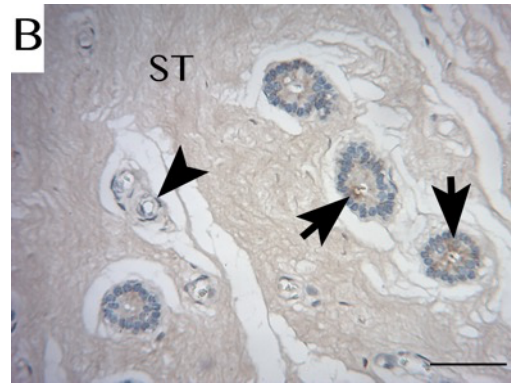


Figura 37. Epitelio glandular y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST). Marca citoplasmática en el epitelio glandular (flechas negras).



Figura 38. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática generalizada en las células del músculo liso del miometrio (My).

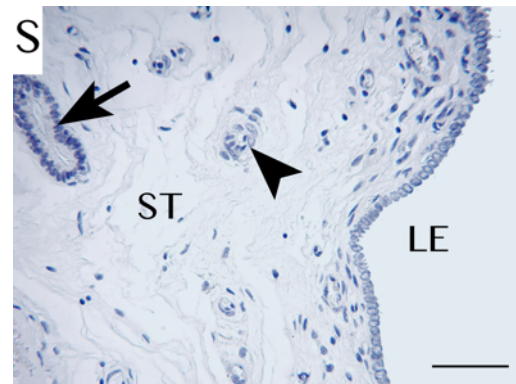


Figura 39. Células del epitelio luminal, glandular y estroma control negativo, 400X.

Epitelio luminal, glandular y estroma sin señal.

6.1.2 VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 en día 14 de gestación

La localización de VEGF para el día 14 de gestación continua en el citoplasma del epitelio de revestimiento y tanto en células del músculo liso, como en el endotelio vascular de vasos sanguíneos. Las células del estroma muestran una reacción citoplasmática, sobre todo aquellas cercanas a la luz endometrial (Figura 40). En cuanto al epitelio glandular y miometrio, siguen presentando una reacción citoplasmática localizada en estos tipos celulares (Figuras 41 y 42). En cuanto al

receptor VEGFR-1, este mantiene una reacción únicamente en algunos vasos sanguíneos del endometrio y miometrio, y de forma uniforme en estroma (Figuras 43, 44 y 45). VEGFR-2 conserva una localización citoplasmática en epitelio luminal, glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio (Figuras 46, 47 y 48). Control negativo (Figura 49). Barra de escala = 300 μ m.

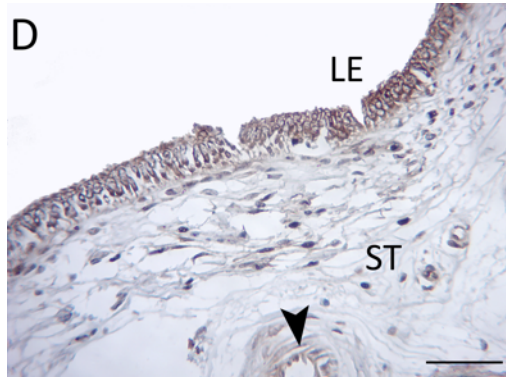


Figura 40. Epitelio de revestimiento, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 14 de gestación, 400X.

Marca en el citoplasma de las células epiteliales (LE). Señal citoplasmática en el tejido conjuntivo subepitelial cercano a la luz endometrial (ST); así como en células del músculo liso y en el endotelio vascular de vasos sanguíneos (cabeza de flecha).

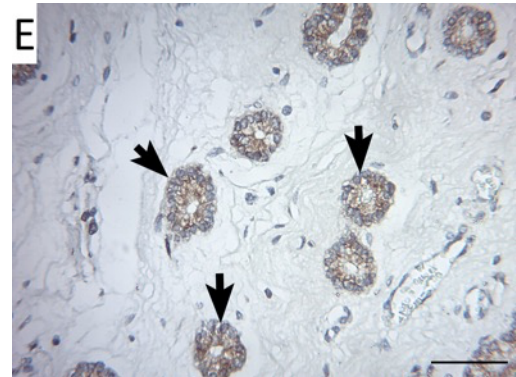


Figura 41. Epitelio glandular marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 14 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática en el epitelio glandular (flechas negras).

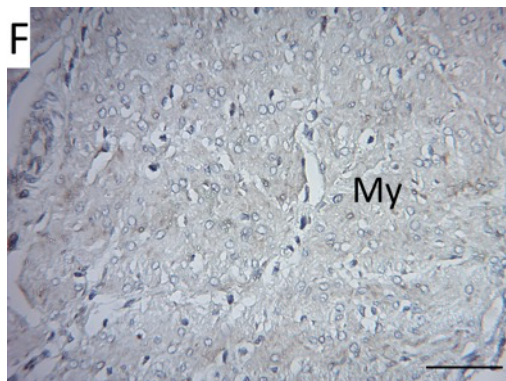


Figura 42. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 14 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática distribuida uniformemente en las células del músculo liso del miometrio (My).

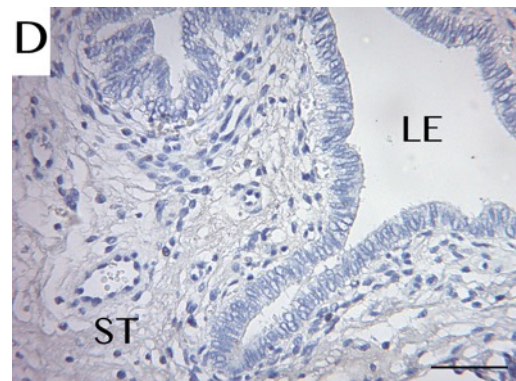


Figura 43. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 14 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST). Epitelio luminal sin señal (LE).

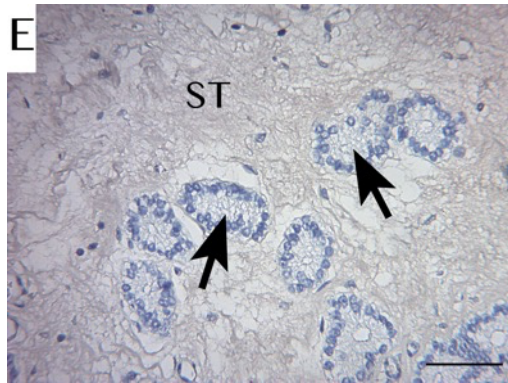


Figura 44. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 14 de gestación, 400X. Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST). Glándulas sin señal (Flechas negras).

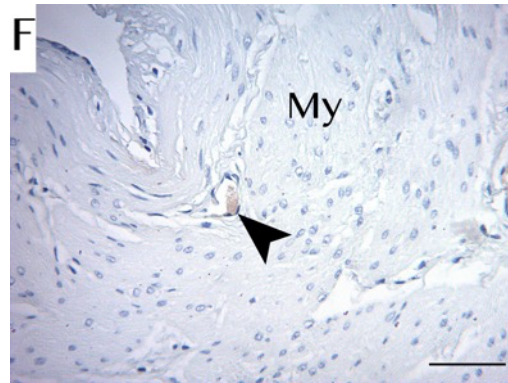


Figura 45. Vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo anti-VEGFR1, día 14 de gestación, 400X. Marca citoplasmática en vaso sanguíneo (cabeza de flecha). Miometrio sin señal (My).

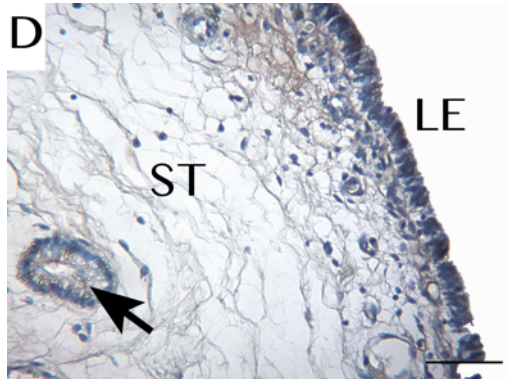


Figura 46. Epitelio luminal, glandular y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 14 de gestación, 400X. Marca citoplasmática en el borde apical de las células epiteliales luminales (LE). Señal citoplasmática en estroma (ST); así como en el citoplasma del epitelio glandular (Flecha negra).

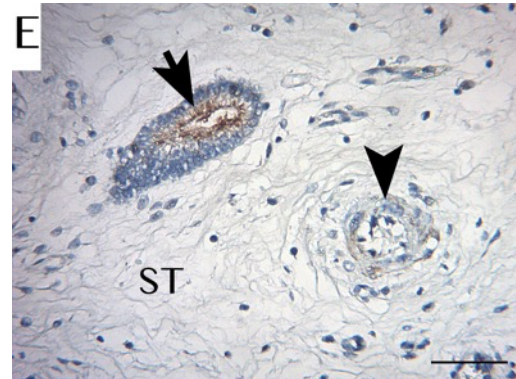


Figura 47. Epitelio glandular, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 14 de gestación, 400X. Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST). Marca citoplasmática en el epitelio glandular (flecha negra) y vaso sanguíneo (cabeza de flecha).

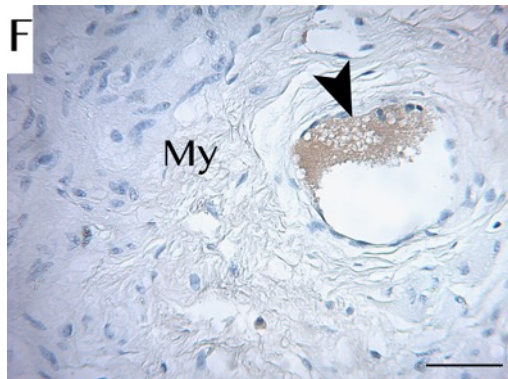


Figura 48. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 14 de gestación, 400X. Marca citoplasmática generalizada en las células del músculo liso del miometrio (My).

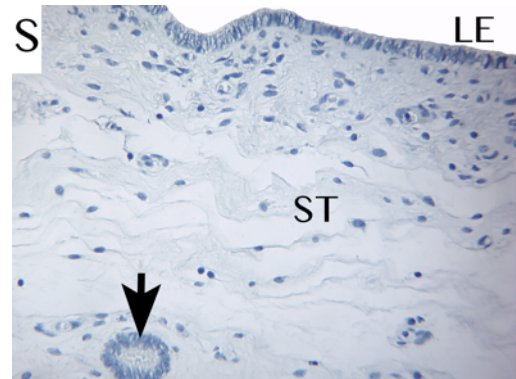


Figura 49. Células del epitelio luminal, glandular y estroma, control negativo, 400X.

Epitelio luminal, glandular y estroma sin señal.

6.1.3 VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 en día 16 de gestación

En el día 16 de gestación, VEGF conserva una reacción en el citoplasma del epitelio luminal, glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio (Figuras 50, 51 y 52). VEGFR-1 mantiene una marca únicamente en algunos vasos sanguíneos del endometrio y miometrio, y de manera generalizada en el estroma (Figuras 53, 54 y 55). La localización para VEGFR-2 conserva su patrón citoplasmático en epitelio luminal, glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio (Figuras 56, 57 y 58). Control negativo (Figura 59). Barra de escala = 300 μ m.

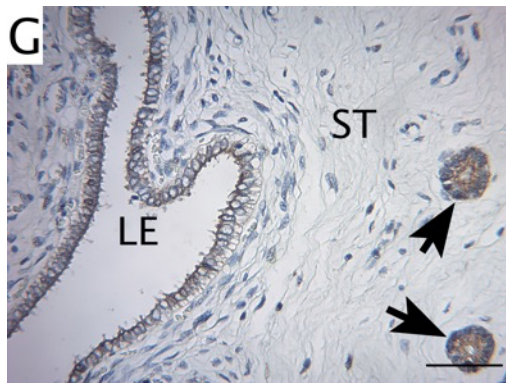


Figura 50. Epitelio luminal y glandular marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 16 de gestación, 400X. Marca en el citoplasma de las células epiteliales, con reforzamiento en el borde apical (LE). Señal citoplasmática granular en el citoplasma de las células del epitelio glandular (flechas negras).



Figura 51. Epitelio glandular marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 16 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática granular en las células del epitelio glandular (flechas negras).

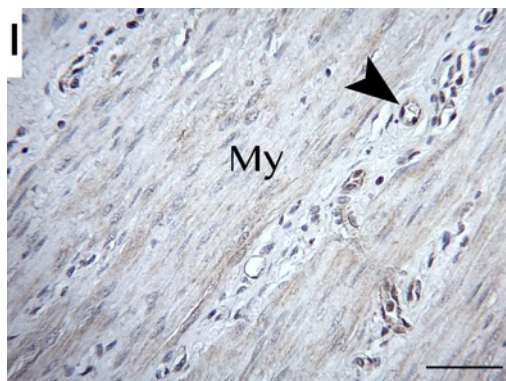


Figura 52. Miometrio y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo VEGF, día 16 de gestación, 400X. Marca citoplasmática generalizada en las células del músculo liso del miometrio (My) y en el citoplasma de vasos sanguíneos (cabeza de flecha).

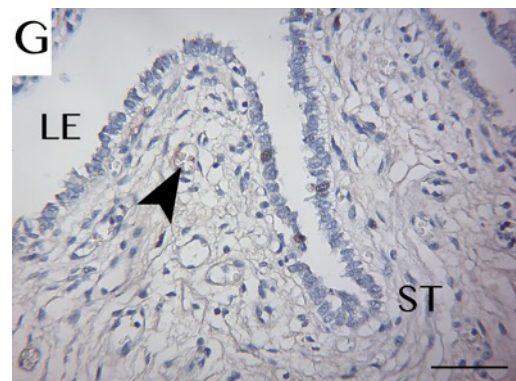


Figura 53. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 16 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática con distribución uniforme en el estroma (ST). Epitelio luminal sin señal (LE).

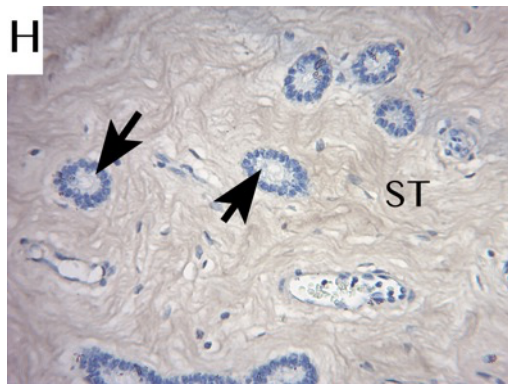


Figura 54. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 16 de gestación, 400X. Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST). Epitelio glandular sin señal (flechas negras).

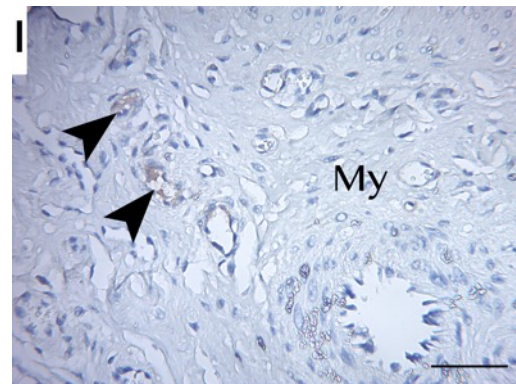


Figura 55. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 16 de gestación, 400X. Marca citoplasmática limitada únicamente a vasos sanguíneos (cabeza de flecha) localizados en el miometrio. Miometrio sin señal (My).

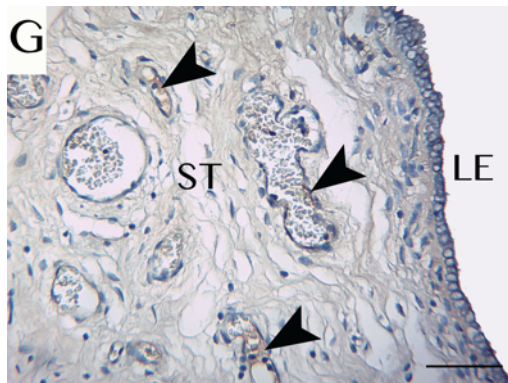


Figura 56. Epitelio luminal, vasos sanguíneos y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 14 de gestación, 400X. Marca citoplasmática en el borde apical de las células epiteliales luminales (LE). Señal en el estroma (ST), con un patrón difuso; así como en el citoplasma de vasos sanguíneos (cabeza de flecha).

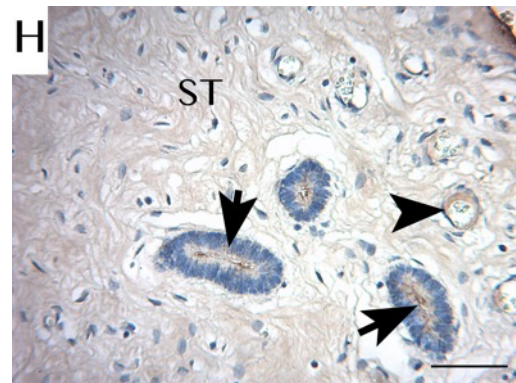


Figura 57. Epitelio glandular, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 16 de gestación, 400X. Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST). Marca citoplasmática granular en el epitelio glandular (flecha negra) y vaso sanguíneo (cabeza de flecha).

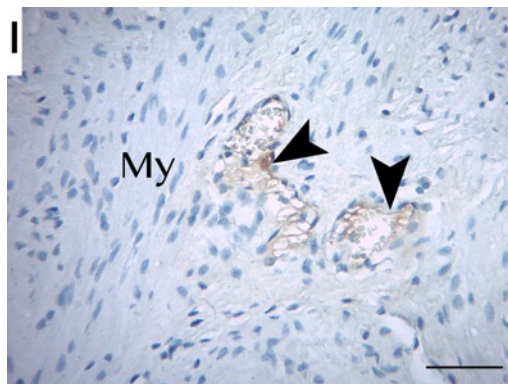


Figura 58. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 16 días de gestación 400X.

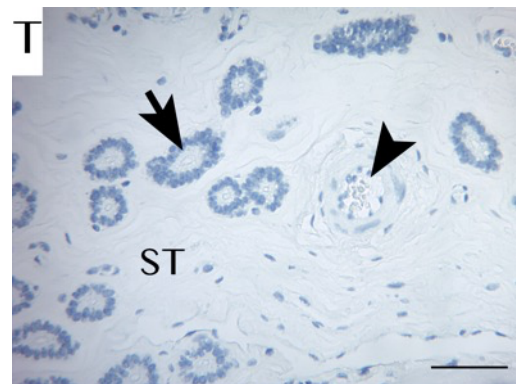


Figura 59. Células del epitelio glandular, vaso sanguíneo y estroma, control negativo, 400X.

Marca citoplasmática limitada únicamente a vasos sanguíneos (cabeza de flecha) localizados en el miometrio.

Células del epitelio glandular (flecha negra), vasos sanguíneos (cabeza de flecha) y estroma (ST) sin señal.

6.1.4 VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 en día 18 de gestación

En día 18 de gestación, la disposición de la reacción de VEGF se conserva en el citoplasma del epitelio luminal, glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio (Figuras 60, 61 y 62). VEGFR-1 continúa con una marca localizada únicamente en algunos vasos sanguíneos del endometrio y miometrio, y de manera generalizada en el estroma (Figuras 63, 64 y 65). VEGFR-2 conserva su patrón citoplasmático localizado en epitelio luminal, glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio (Figuras 66, 67 y 68). Control negativo (Figura 69). Barra de escala = 300 μ m.

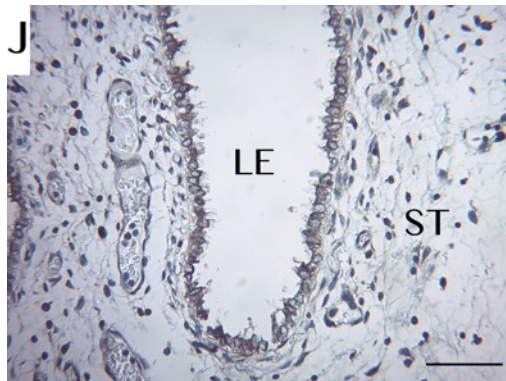


Figura 60. Epitelio luminal y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 18 de gestación, 400X. Marca en el citoplasma de las células epiteliales (LE). Señal citoplasmática en el tejido conjuntivo subepitelial (ST).

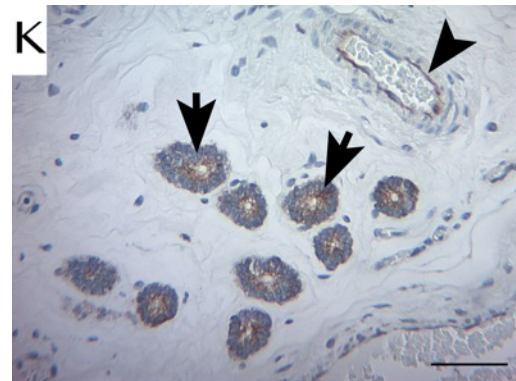


Figura 61. Epitelio glandular y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 18 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática granular en las células del epitelio glandular (flechas negras); así como en vasos sanguíneos (cabeza de flecha).

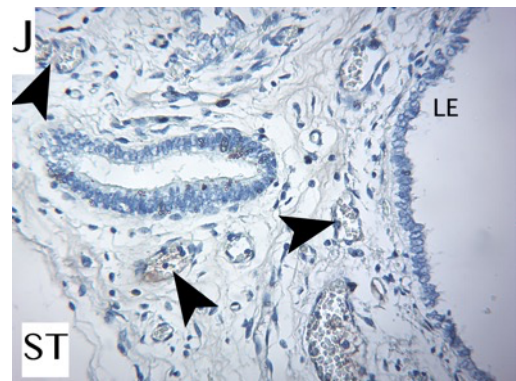


Figura 62. Células del músculo liso del miometrio y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 18 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática generalizada en las células del músculo liso del miometrio (My) y en el citoplasma de vasos sanguíneos (cabeza de flecha).

Figura 63. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 18 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática del endotelio vascular de vasos sanguíneos (cabeza de flecha). Células del epitelio luminal sin señal (LE).

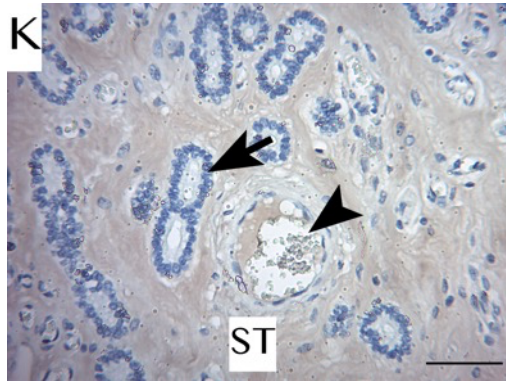


Figura 64. Estroma y vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 18 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST) y en vaso sanguíneo (cabeza de flecha). Epitelio glandular sin señal (flecha negra).

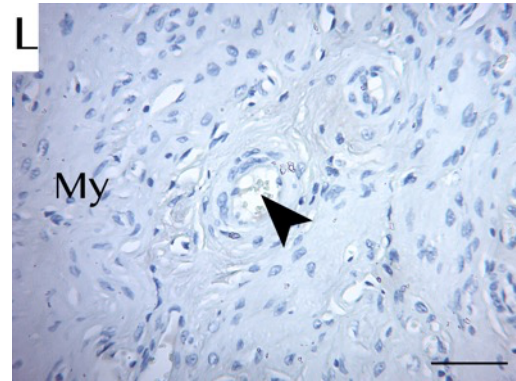


Figura 65. Músculo liso del miometrio sin señal del anticuerpo anti-VEGFR-1, día 18 de gestación, 400X. Células del músculo liso del miometrio sin señal (My).

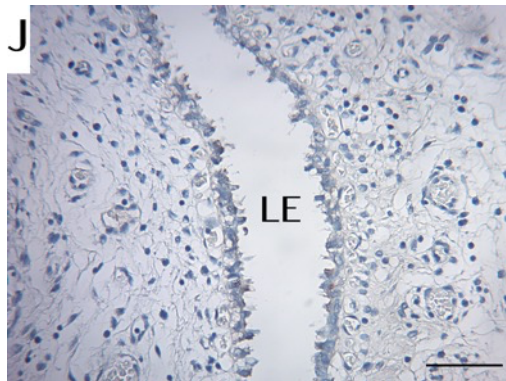


Figura 66. Epitelio luminal marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 18 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática en el borde apical de las células epiteliales (LE).

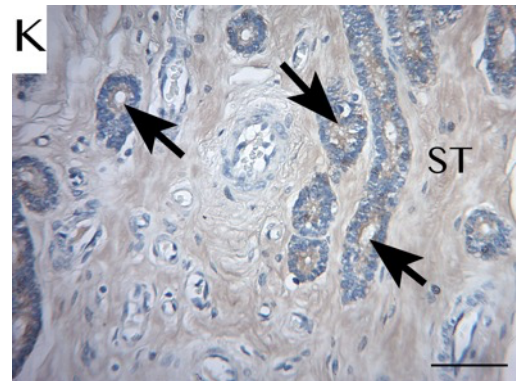


Figura 67. Epitelio glandular, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 18 de gestación, 400X.

Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST) y en el epitelio glandular (flecha negra).

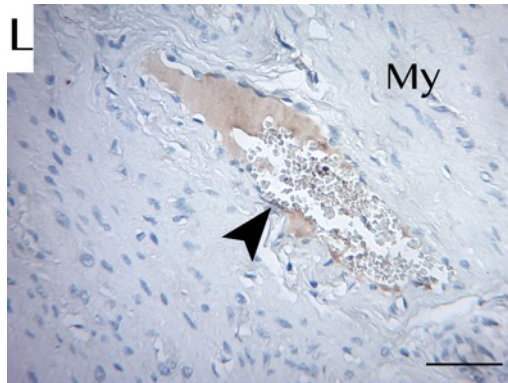


Figura 68. Vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 18 de gestación, 400X. Marca citoplasmática limitada únicamente a vasos sanguíneos (cabeza de flecha) localizados en el miometrio. Músculo liso del miometrio sin señal (My).

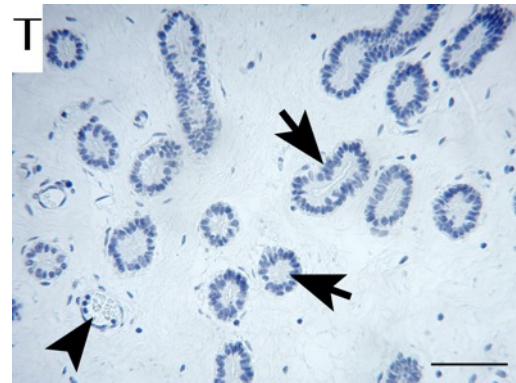


Figura 69. Células del epitelio glandular, vaso sanguíneo y estroma, control negativo, 400X. Células del epitelio glandular (flecha negra), vasos sanguíneos (cabeza de flecha) y estroma (ST) sin señal.

6.1.5 VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 en día 2 del ciclo estral.

En el día 2 del ciclo estral (fase folicular), la distribución de la reacción de VEGF se localiza en el citoplasma del epitelio luminal, glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio (Figuras 70, 71 y 72). El receptor VEGFR-1 se sitúa únicamente en algunos vasos sanguíneos del endometrio y miometrio, y de forma generalizada en el estroma (Figuras 73, 74 y 75). La localización de VEGFR-2 posee un patrón citoplasmático en epitelio luminal, glandular, estroma y vasos sanguíneos (Figuras 76 y 77). En el caso del miometrio, no se detecta la proteína del receptor (Figura 78). Control negativo (Figura 79). Barra de escala = 300 μ m.

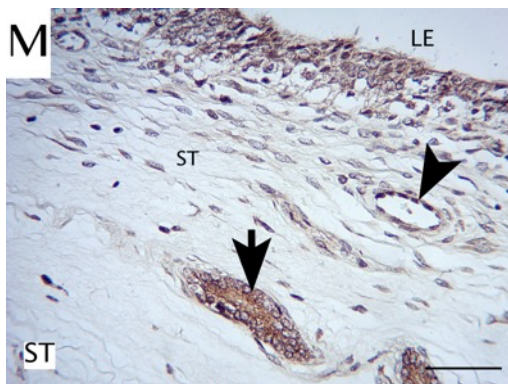


Figura 70. Epitelio luminal, glandular, estroma y vaso sanguíneo marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 2 del ciclo estral, 400X.

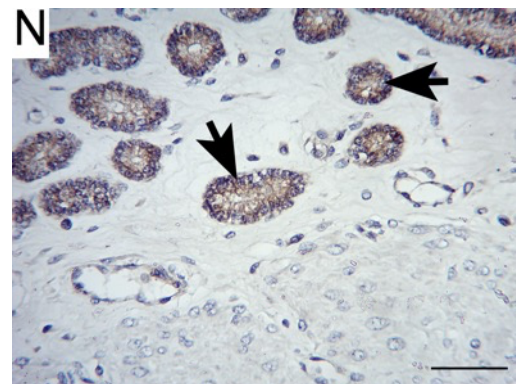


Figura 71. Epitelio glandular marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 2 del ciclo estral, 400X.

Marca en el citoplasma de las células epiteliales (LE), estroma (ST), epitelio glandular (flecha negra) y vaso sanguíneo (flecha negra).

Marca citoplasmática granular en las células del epitelio glandular (flechas negras).

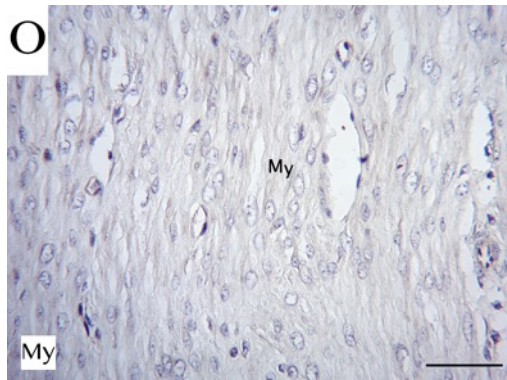


Figura 72. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 2 del ciclo estral, 400X.

Marca citoplasmática generalizada en las células del músculo liso del miometrio (My).

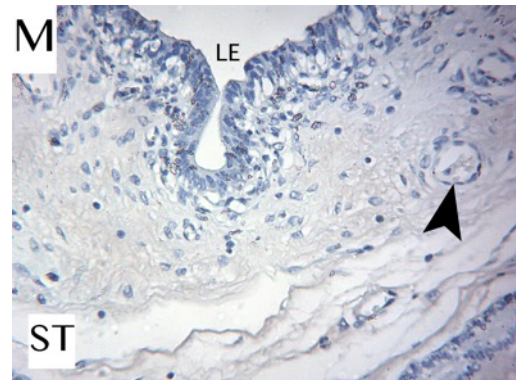


Figura 73. Vaso sanguíneo y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 2 del ciclo estral, 400X.

Marca citoplasmática del endotelio vascular de vaso sanguíneo (cabeza de flecha) y estroma (ST).

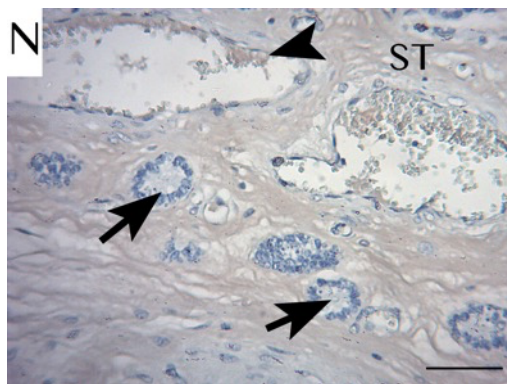


Figura 74. Estroma y vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo VEGFR-1, día 2 del ciclo estral, 400X. Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST) y en vaso sanguíneo (cabeza de flecha). Epitelio glandular sin señal (flecha negra).



Figura 75. Músculo liso del miometrio sin señal del anticuerpo anti-VEGFR-1, día 2 del ciclo estral, 400X. Células del músculo liso del miometrio sin señal (My).

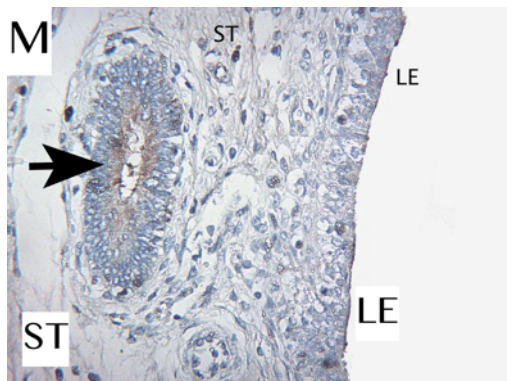


Figura 76. Epitelio luminal y glandular marcado con el anticuerpo VEGFR-2, día 2 del ciclo estral, 400X.

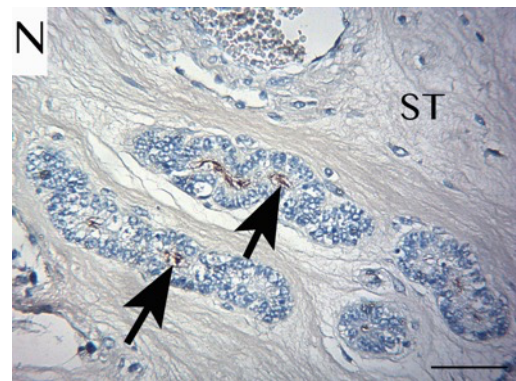


Figura 77. Epitelio glandular y estroma marcados con el anticuerpo VEGFR-2, día 2 ciclo estral, 400X.

Marca citoplasmática en el borde apical de las células epiteliales (LE) y señal citoplasmática granular en epitelio glandular (flecha negra).

Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST). Marca citoplasmática granular en el epitelio glandular (flecha negra).

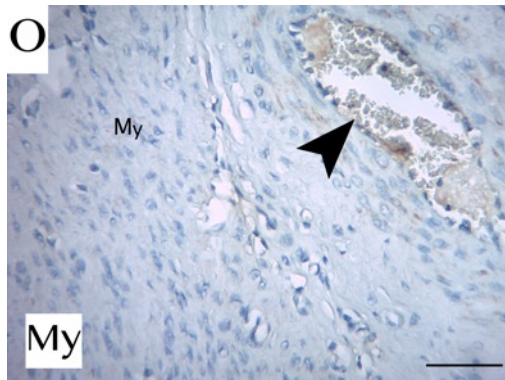


Figura 78. Vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo VEGFR-2, día 2 del ciclo estral, 400X. Marca citoplasmática limitada únicamente a vaso sanguíneo (cabeza de flecha) localizados en el miometrio. Músculo liso del miometrio sin señal (My).

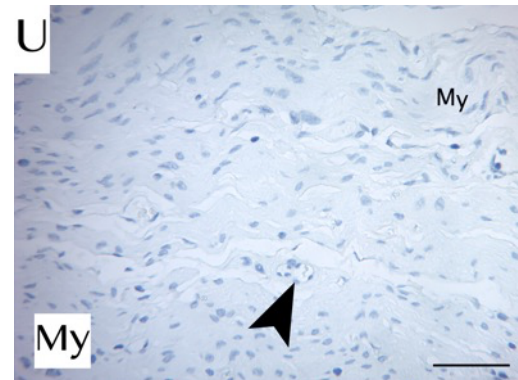


Figura 79. Células del músculo liso del miometrio y vaso sanguíneo, control negativo, 400X. Células del músculo liso del miometrio (My) y vaso sanguíneo (cabeza de flecha) sin señal.

6.1.6 VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 en día 12 del ciclo estral

En el día 12 del ciclo estral (fase lútea), la distribución de la señal de VEGF se localiza en el citoplasma del epitelio luminal, glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio (Figuras 80, 81 y 82). VEGFR-1 se ubica únicamente en algunos vasos sanguíneos del endometrio y miometrio, y de manera generalizada en el estroma (Figuras 83, 84 y 85). VEGFR-2 tiene una señal citoplasmática en epitelio luminal, glandular, estroma y vasos sanguíneos (Figuras 86 y 87). En miometrio no se observa señal (Figura 88). Control negativo (Figura 89). Barra de escala = 300 μ m.

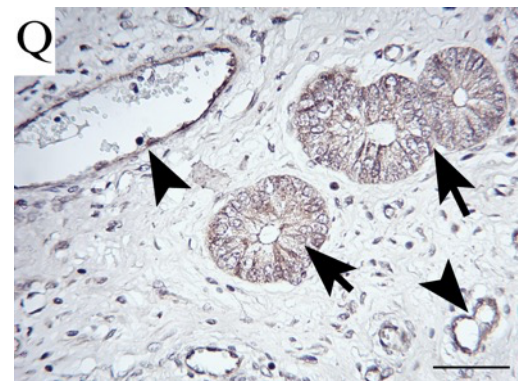
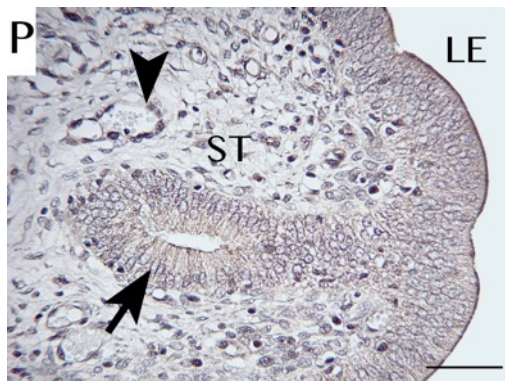


Figura 80. Epitelio luminal, glandular, estroma y vaso sanguíneo marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 del ciclo estral, 400X.

Marca en el citoplasma de las células epiteliales (LE), tejido conjuntivo subepitelial (ST), epitelio glandular (flecha negra) y vaso sanguíneo (flecha negra).

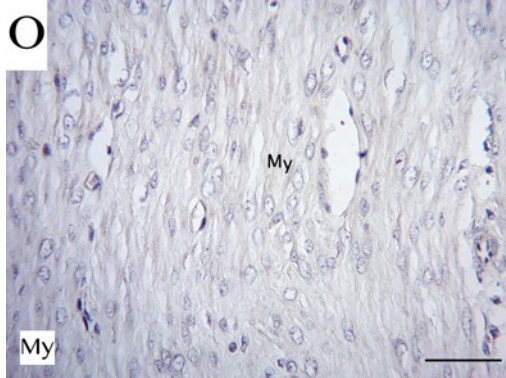


Figura 82. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 del ciclo estral, 400X.

Marca citoplasmática generalizada en las células del músculo liso del miometrio (My).

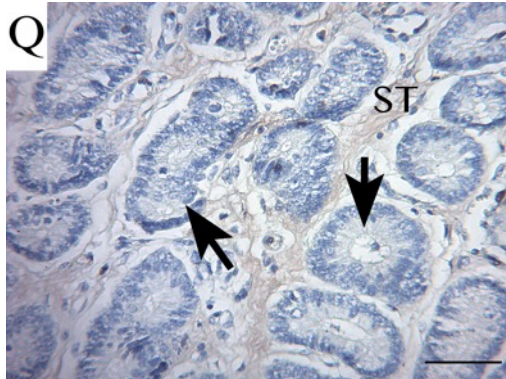


Figura 84. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 del ciclo estral, 400X.

Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST). Epitelio glandular sin señal (flecha negra).

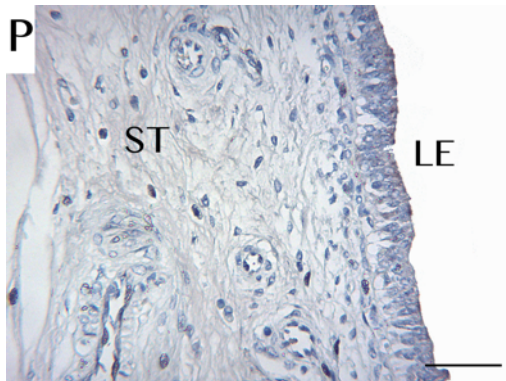


Figura 81. Epitelio glandular y vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 del ciclo estral, 400X.

Marca citoplasmática granular en las células del epitelio glandular (flechas negras), y citoplasma en vasos sanguíneos (cabeza de flecha).

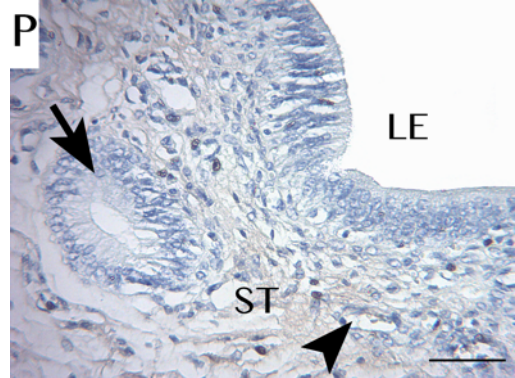


Figura 83. Vaso sanguíneo y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 del ciclo estral, 400X.

Marca citoplasmática del endotelio vascular de vaso sanguíneo (cabeza de flecha) y estroma (ST).

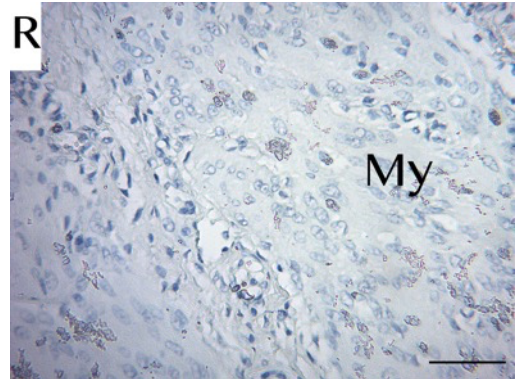


Figura 85. Músculo liso del miometrio sin señal del anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 del ciclo estral, 400X.

Células del músculo liso del miometrio sin señal (My).

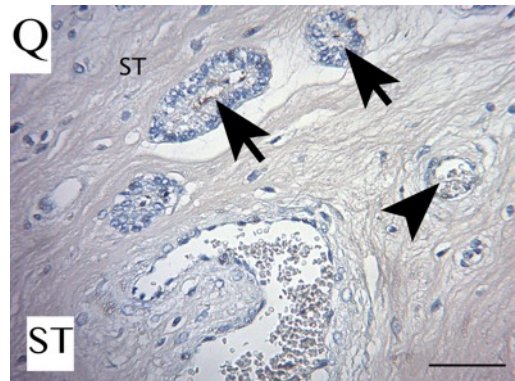


Figura 86. Epitelio luminal marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 del ciclo estral, 400X. Marca citoplasmática en el borde apical de las células epiteliales luminales (LE).

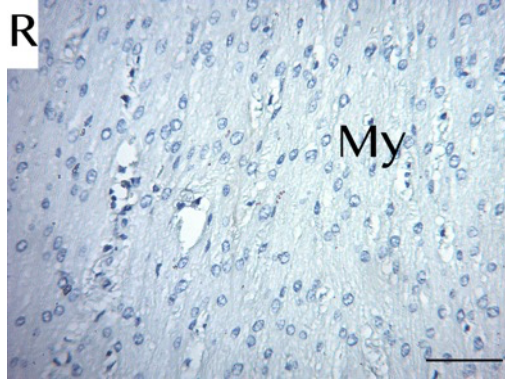


Figura 88. Miometrio sin señal del anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 del ciclo estral, 400X. Músculo liso del miometrio sin señal (My).

Figura 87. Epitelio glandular y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 ciclo estral, 400X. Marca citoplasmática generalizada en el estroma (ST). Marca citoplasmática granular en el epitelio glandular (flecha negra).

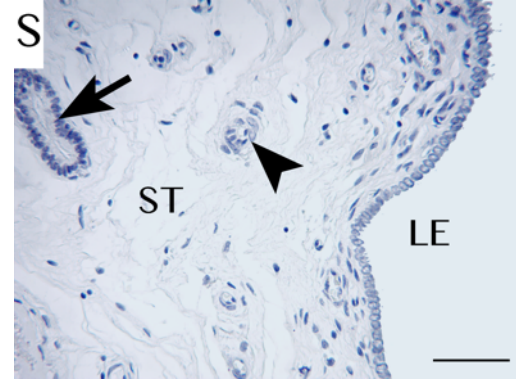


Figura 89. Células del epitelio luminal, glandular, vasos sanguíneos y estroma, control negativo, 400X. Epitelio luminal (LE), glandular (flecha negra), vaso sanguíneo (cabeza de flecha) y estroma (ST) sin señal.

5.1.7 Inmunolocalización de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 en tejido uterino de cerdas gestantes y no gestantes

Tabla 3. Resumen de inmunolocalización de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 en tejido uterino.

		Días de gestación temprana (p.i.)				Días del ciclo estral	
		12	14	16	18	2	12
Endometrio	VEGF	+	+	+	+	+	+
	Epitelio luminal						
	VEGFR1	-	-	-	-	-	-
	VEGFR2	+	-	+	+	+	+
Vasos sanguíneos	VEGF	+	+	+	+	+	+
	VEGFR1	+	+	+	+	+	+
	VEGFR2	+	+	+	+	+	+
Estroma	VEGF	+	+	+	+	+	+
	VEGFR1	+	+	+	+	+	+
	VEGFR2	+	+	+	+	+	+
Epitelio glandular	VEGF	+	+	+	+	+	+

	VEGFR1	-	+	-	-	-	-
	VEGFR2	+	+	+	+	+	+
Miometrio Células del músculo liso	VEGF	+	+	+	+	+	+
	VEGFR1	-	-	-	-	-	-
	VEGFR2	+	+	+	+	-	-

(+) Reacción subjetiva positiva; (-) Sin reacción; (p.i.) Post inseminación.

6.2 ARN de muestras de tejido uterino de cerdas gestantes y vacías

La concentración y el grado de pureza del ARN total extraído de cada una de las muestras mediante el método de tiocinato de guanidino-fenol-cloroformo, se determinó a partir de la relación 260/280 calculada por el software del espectrofotómetro. En general las muestras mostraron resultados de calidad óptima para ser utilizadas en ensayos de PCR de punto final y tiempo real. En la Tabla 4 se muestran las concentraciones de ARN (ng/μl), así como su relación 260/280 de cada una de las muestras incluidas en los ensayos experimentales.

Tabla 4. Características generales del ARN extraído de muestras de tejido uterino de cerdas gestantes y no gestantes.

Grupo	Identificación de la muestra	Concentración (ng/μl)	Relación 260/280
Gestación día 12	134	798	1.99
	206	2524	2.03
	124	867	2.01
	207	2916	2.01
Gestación día 14	431	3444	1.98
	116	419	1.90
	435	3922	1.86
	117	804	2.00
Gestación día 16	278	1224	2.01
	470	1397	2.03
	280	2317	2.02
	467	2186	2.09
Gestación día 18	J-4	3688	1.93
	260	2357	2.04
	J-2	1555	2.03
	257	2468	2.03

Ciclo estral día 2	704	3082	2.01
	673	2664	2.04
	703	2120	2.08
	675	1706	2.03
Ciclo estral día 12	543	3167	2.02
	545	3920	1.91
	546	3865	1.93
	547	3621	2.01

6.3 PCR de punto final

En cada uno de los días evaluados se visualiza la formación de una sola banda para la expresión del transcrito de los genes de referencia RPS20 y β -Actina; siendo correspondiente al tamaño de amplicón esperado de 148pb y 110pb respectivamente (Figuras 90 y 91).



Figura 90. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen RPS20.

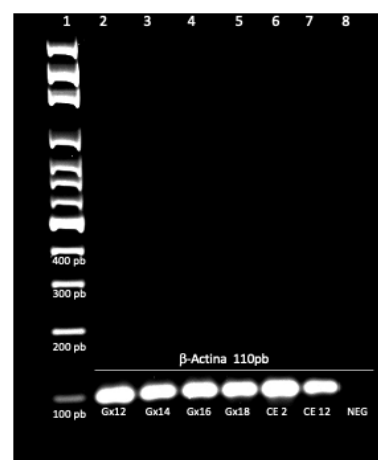


Figura 91. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen β -Actina.

La expresión de VEGF y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se identificaron presentes en todas las muestras correspondientes a los días 12, 14, 16 y 18 de gestación y días 2 y 12 del ciclo estral, con un tamaño de amplicón de 232pb, 180pb y 177pb respectivamente, los cuales fueron correspondientes al tamaño esperado (Figuras 92, 93 y 94).

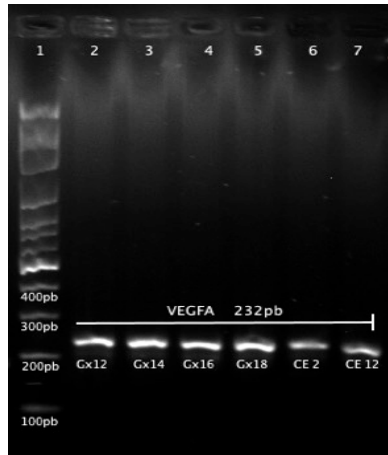


Figura 92. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGF.

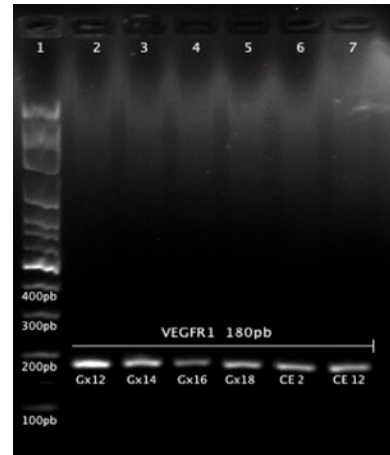


Figura 93. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGFR-1.

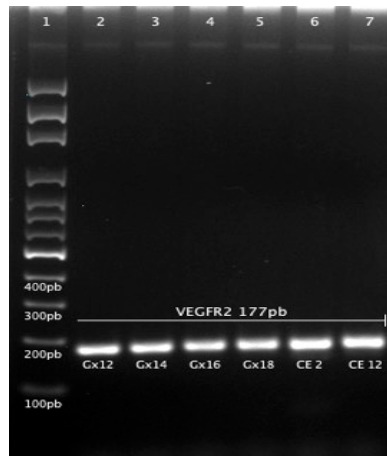


Figura 94. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen de VEGFR2.

6.4 Rangos dinámicos

6.4.1 Gen de referencia RPS20

En la Figura 95 se observan las curvas de amplificación correspondientes a las diluciones seriadas del concentrado de cDNA, las cuales obtuvieron valores del ciclo umbral (C_T) de 14 a 19, de mayor a menor concentración de cDNA (200, 100, 50, 25 y 12.5 ng/ μ l) respectivamente. En el Gráfico 1 se aprecia la regresión lineal entre los valores del C_T y el logaritmo de las concentraciones evaluadas, el cual tuvo un

valor de R^2 de 0.9889. Las curvas de disociación generadas, demostraron la especificidad del primer y de los productos de la qPCR, donde se aprecia la formación de un solo pico (Figura 96).

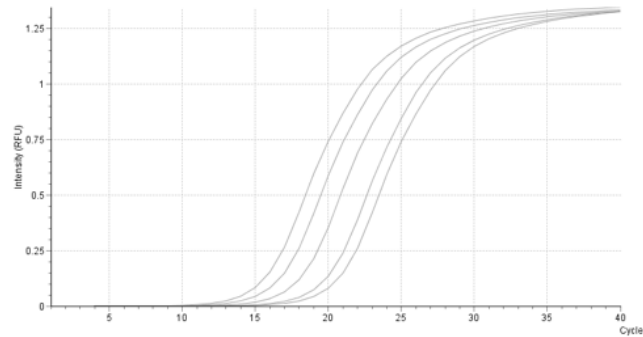


Figura 95. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para RPS20 correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μ l de cDNA.

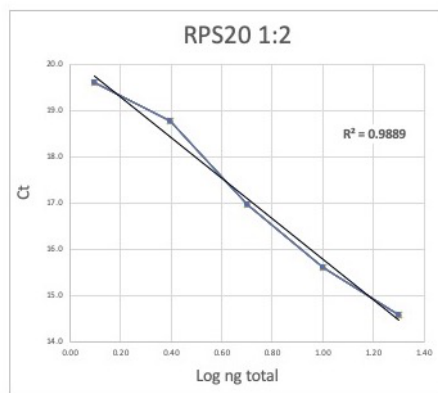


Gráfico 1. Regresión lineal para RPS20.

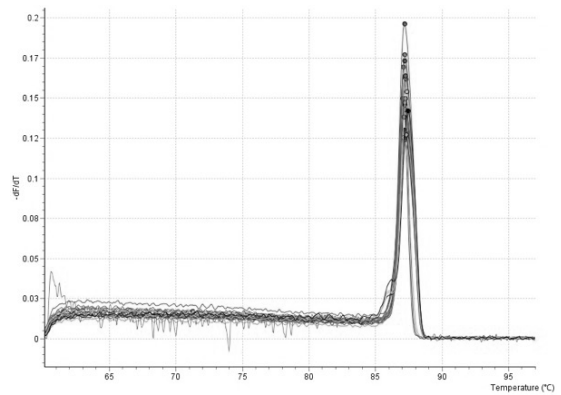


Figura 96. Curvas de disociación de los productos de amplificación del gen RPS20.

6.4.2 Gen de referencia β -Actina

En la Figura 97 se observan las curvas de amplificación para β -Actina, correspondientes a las diluciones seriadas del concentrado de cDNA, las cuales obtuvieron valores del C_T de 17 a 22, de mayor a menor concentración de cDNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) respectivamente. En el Gráfico 2 se aprecia la regresión lineal entre los valores del C_T y el logaritmo de las concentraciones evaluadas, el cual tuvo un valor de R^2 de 0.9877. Las curvas de disociación generadas, demostraron la especificidad del primer y de los productos de la qPCR (Figura 98).

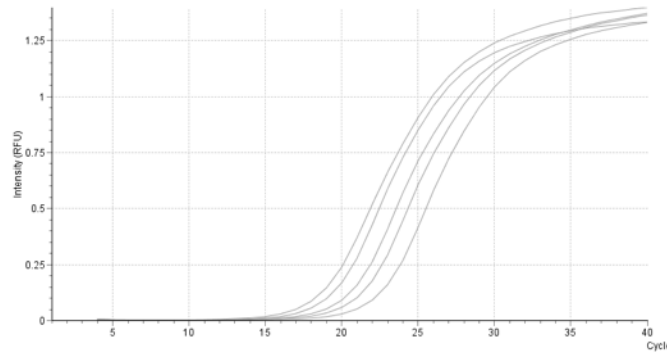


Figura 97. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para β -Actina correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μ l de cDNA.

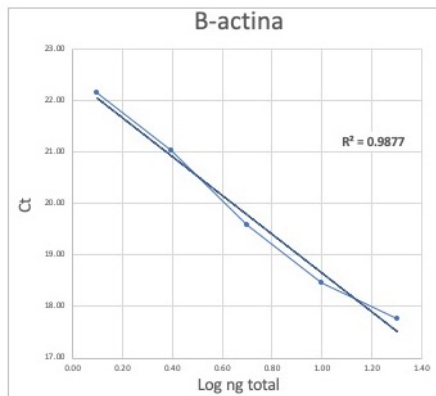


Gráfico 2. Regresión lineal para β -Actina.

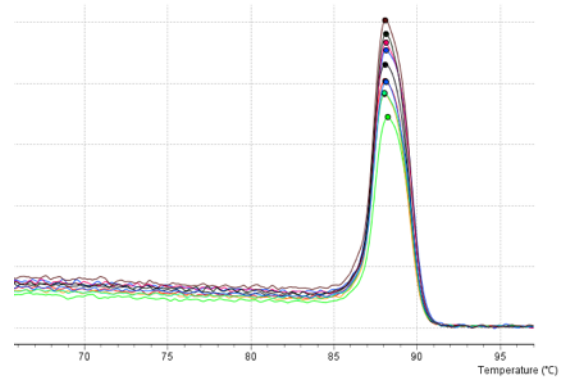


Figura 98. Curvas de disociación de los productos del gen β -Actina.

6.4.3 Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF)

En la Figura 99 se observan las curvas de amplificación para VEGF, con valores C_T desde 26 hasta 29, de mayor a menor concentración de cDNA (ng/ μ l) respectivamente. En el Gráfico 3 se aprecia la regresión lineal en donde se obtuvo un valor de R^2 de 0.9888. Las curvas de disociación generadas, muestran la especificidad del primer y de los productos de la qPCR, donde se aprecia la formación de un solo pico (Figura 100).

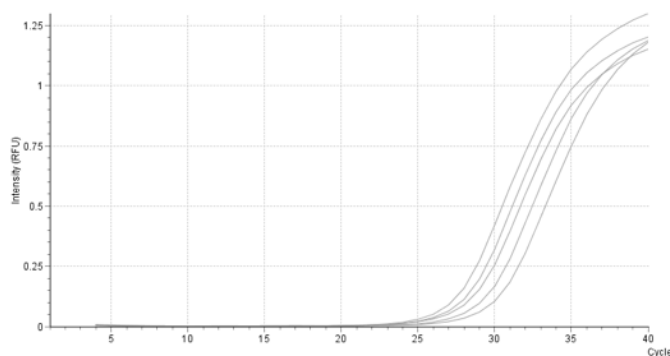


Figura 99. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para VEGF correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μl de cDNA.

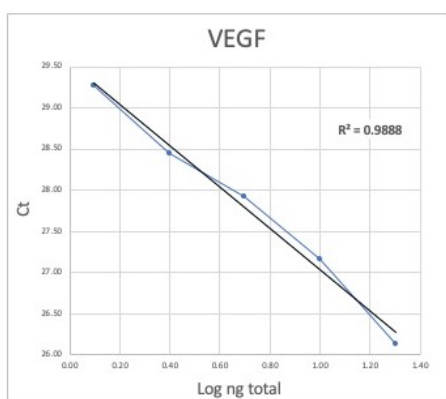


Gráfico 3. Regresión lineal para VEGF.

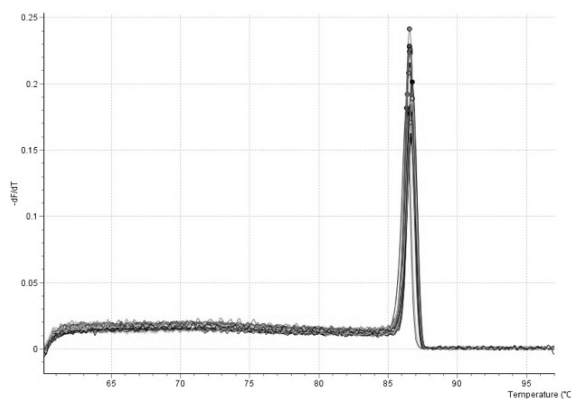


Figura 100. Curvas de disociación de los productos del gen VEGF.

6.4.4 Receptor 1 del Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGFR-1)

En la Figura 101 se observan las curvas de amplificación para el gen del receptor VEGFR-1, con valores C_T desde 26 hasta 30, de mayor a menor concentración de cDNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) respectivamente. En el Gráfico 4 se aprecia la regresión lineal en donde se obtuvo un valor de R^2 de 0.981. Las curvas de disociación generadas, formaron un solo pico, evidenciando la especificidad del primer y de los productos de la qPCR (Figura 102).

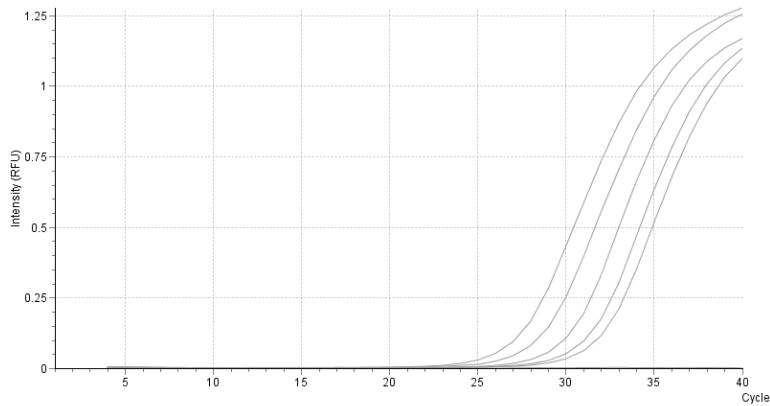


Figura 101. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para VEGFR-1 correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μl de cDNA.

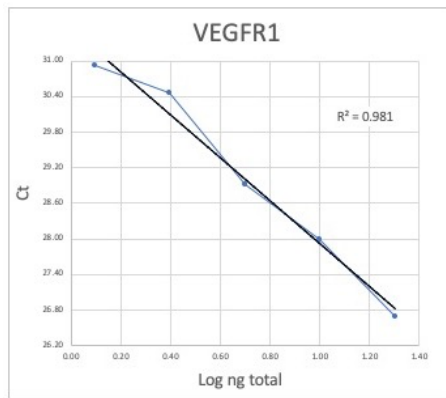


Gráfico 4. Regresión lineal para VEGFR-1.

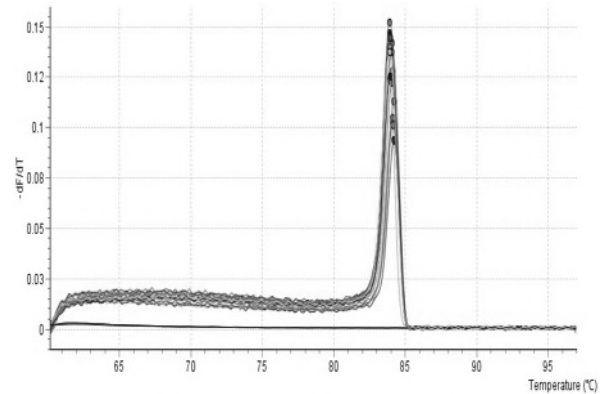


Figura 102. Curvas de disociación para los productos del gen VEGFR-1.

6.4.5 Receptor 2 del Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGFR-2)

En la Figura 103 se observan las curvas de amplificación para el gen VEGFR-2, con valores C_T desde 28 hasta 32, de mayor a menor concentración de cDNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) respectivamente. En la Gráfico 5 se aprecia la regresión lineal entre los valores del C_T y el logaritmo de las concentraciones evaluadas, el cual tuvo un valor de R^2 de 0.9916. Las curvas de disociación generadas, formaron un solo pico, evidenciando la especificidad del primer y de los productos del qPCR (Figura 104).

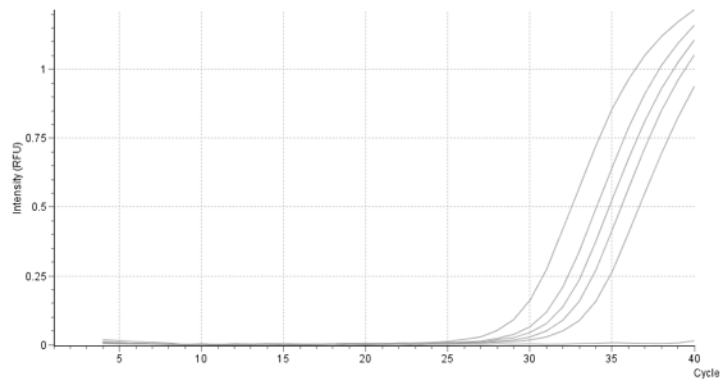


Figura 103. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para VEGFR-2 correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μl de cDNA.

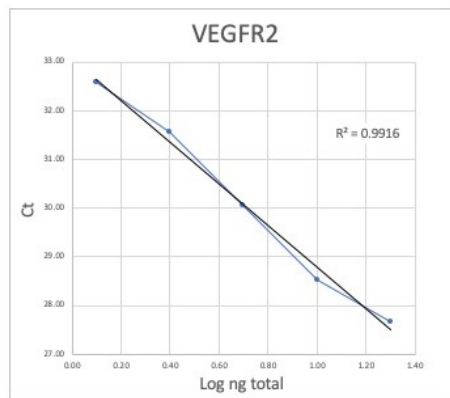


Gráfico 5. Regresión lineal para VEGFR-2.

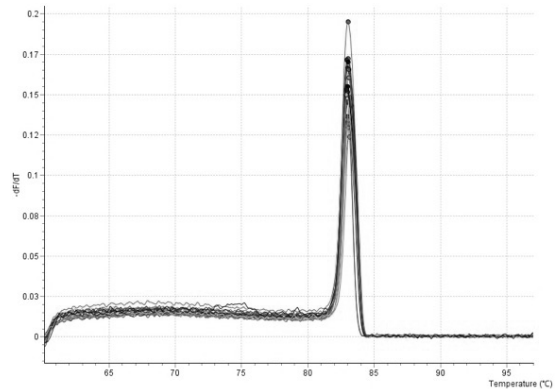


Figura 104. Curvas de disociación para los productos del gen VEGFR-2.

Todas las concentraciones de cDNA analizadas (200, 100, 50, 25 y 12.5 ng/ μl) con cada uno de los genes de interés, amplificaron de forma congruente a las diluciones seriadas, es decir, amplificando más temprano a medida que incrementaba la concentración de cDNA y viceversa. Por lo tanto, se utilizó una concentración de cDNA la cual no amplificara ni muy temprano, ni muy tardío, decidiendo usar la concentración de 50 ng/ μl de cDNA para los siguientes ensayos experimentales.

6.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa de tiempo real (qPCR)

Se llevaron a cabo ensayos experimentales de qPCR, donde se determinaron los niveles de expresión relativa de los genes VEGF, VEGFR-1 y VEGF-2 en los diferentes días de gestación temprana y ciclo estral estudiados;

normalizados sobre la base de expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

6.5.1 Determinación de expresión relativa del gen VEGF

En las Figuras 105 y 106 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGF y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos del C_T , de las cuatro repeticiones para cada uno de los días de interés, asimismo, se enlistan los promedios de los valores del C_T de los dos genes de referencia y finalmente los valores de la expresión relativa del gen VEGF normalizados sobre la base de expresión de los genes de referencia. En el Gráfico 6 se observan niveles similares de expresión del ARNm de VEGF entre los días 12 y 14 de gestación, en comparación con los días 2 y 12 del ciclo estral; seguido de una ligera disminución en el día 16 de gestación y un aumento significativo en el día 18 de gestación en comparación con el día 16 de gestación ($P<0.05$) y los días 2 y 12 del ciclo estral ($P<0.05$). Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

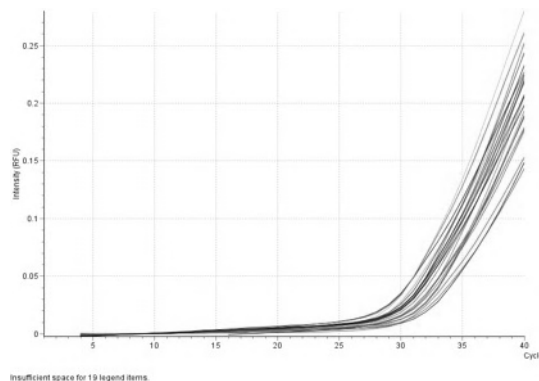


Figura 105. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGF.

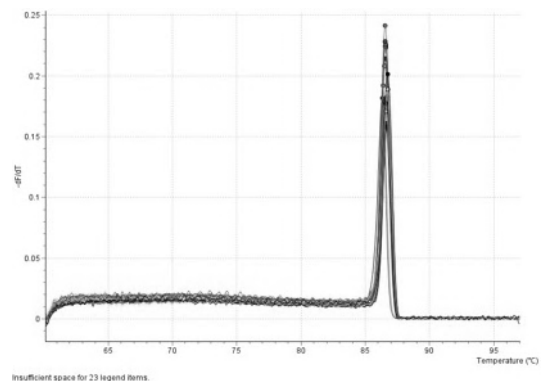


Figura 106. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen VEGF.

Tabla 5. Valores de expresión del gen VEGF normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Gestación temprana				Ciclo estral	
		Gx 12	Gx 14	Gx 16	Gx 18	CE 2	CE 12
Valor C_T	VEGF	29.0489	29.7141	29.9380	30.9152	31.8994	32.0412
		31.8760	32.5912	33.3881	29.6606	33.0838	32.9810
		29.9278	30.6085	29.5853	28.7264	33.4844	32.9843
		31.8466	30.5106	32.3292	30.0597	33.5274	32.8833
	Promedio	30.6748	30.8561	31.3102	29.8405	32.9987	32.7225
Valor C_T	RPS20/ β -Actina	23.9283	25.0326	23.3759	25.9610	24.1856	25.1556
		24.9888	24.8014	26.4130	24.4874	26.2331	26.3147
		24.3785	23.5304	23.4841	23.2168	25.5488	24.8044
		24.0634	24.4273	24.5477	24.7246	25.4999	24.6755
	Promedio	24.3398	24.4480	24.4552	24.5975	25.3669	25.2375
Valor normalizado	VEGF (ratio)	1.8222	2.4706	0.6709	2.0451	0.3020	0.5361
		0.8929	0.4776	0.8401	2.9291	0.9157	1.0406
		2.2599	0.7833	1.5416	2.3231	0.4323	0.3649
		0.6689	2.1731	0.6697	3.6502	0.5647	0.4983
	Promedio	1.4110	1.4762	0.9306	2.7369	0.5537	0.6100

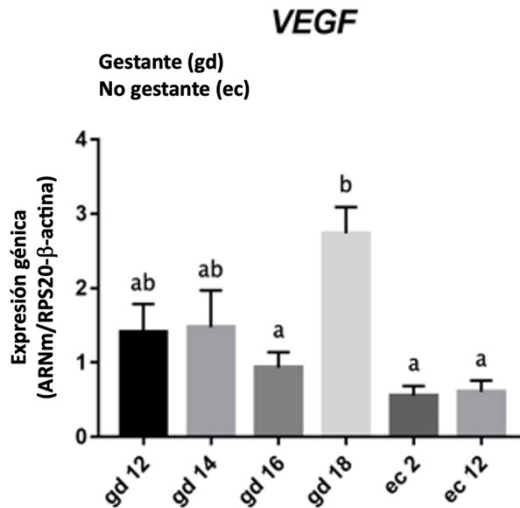


Gráfico 6. Niveles de expresión relativa de ARNm de VEGF en tejido uterino de cerdas gestantes (gd) y no gestantes (ec) (n=4). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.5.2 Determinación de expresión relativa del gen VEGFR-1

En las Figuras 107 y 108 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGFR-1 y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos del C_T de las cuatro repeticiones para cada uno de los días de interés analizados, asimismo, se enlistan los promedios de los valores del C_T de los dos genes de referencia y finalmente los valores de la expresión relativa del gen VEGFR-1 normalizados sobre la base de expresión de los genes de referencia. En el Gráfico 7 se observan los niveles de expresión relativa del ARNm de VEGFR-1, con una tendencia a incrementar los valores entre los días 12, 14 y 16 de gestación, alcanzando su nivel significativo más alto en el día 18 de gestación en comparación con los días 12, 14 y 16 de gestación ($P < 0.05$) y los días 2 y 12 del ciclo estral ($P < 0.05$). Los datos se muestran como la media \pm SEM, donde los valores con letras diferentes poseen diferencia significativa ($P < 0.05$).

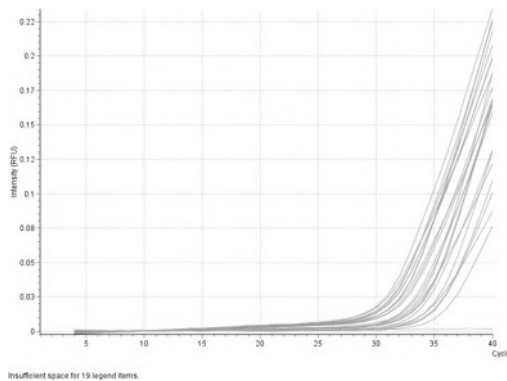


Figura 107. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGFR-1.

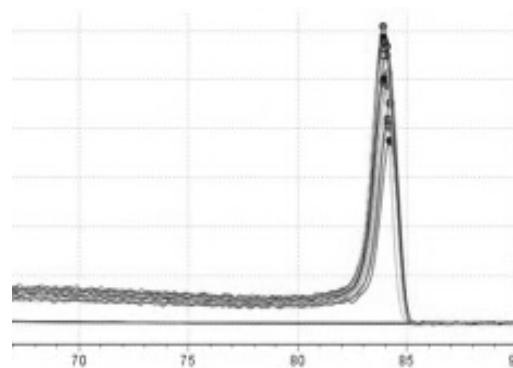


Figura 108. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen VEGFR-1.

Tabla 6. Valores de expresión del gen VEGFR-1 normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Gestación temprana				Ciclo estral	
		Gx 12	Gx 14	Gx 16	Gx 18	CE 2	CE 12
Valor C_T	VEGFR-1	33.6160	34.5999	32.4398	34.1978	33.0428	33.6316
		33.6704	32.6159	34.2502	32.1402	34.3314	33.5481
		34.0178	32.8435	32.4303	32.0799	34.9420	34.2668
		34.2868	34.3273	34.2829	33.2825	34.3757	34.4148
	Promedio	33.8977	33.5967	33.3508	32.9251	34.1730	33.9653
Valor C_T	RPS20/ β -Actina	23.9283	25.0326	23.3759	25.9610	24.1856	25.1556
		24.9888	24.8014	26.4130	24.4874	26.2331	26.3147
		24.3785	23.5304	23.4841	23.2168	25.5488	24.8044
		24.0634	24.4273	24.5477	24.7246	25.4999	24.6755
	Promedio	24.3398	24.4480	24.4552	24.5975	25.3669	25.2375
Valor normalizado	VEGFR-1 (ratio)	0.6129	0.6663	0.9445	1.6757	1.0900	1.4196
		0.5762	1.0510	1.0346	1.1756	0.8633	1.5724
		0.7739	0.9703	1.2512	1.3254	0.9179	0.8748
		0.6079	0.7606	0.8527	1.9284	1.5470	0.8502
	Promedio	0.6427	0.8621	1.0207	1.5263	1.1045	1.1793

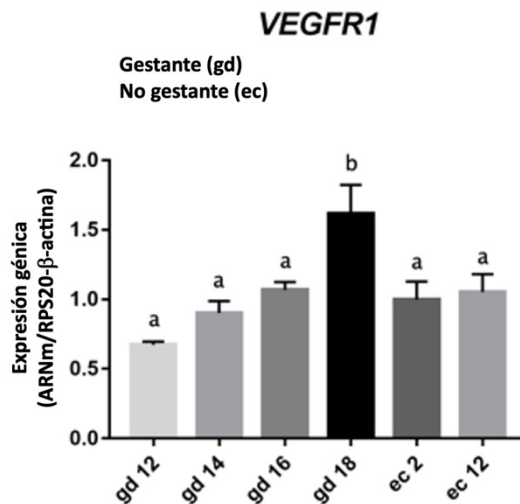


Gráfico 7. Niveles de expresión relativa de ARNm de VEGFR-1 en tejido uterino de cerdas gestantes (gd) y no gestantes (ec) ($n=4$). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes muestran diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.5.3 Determinación de expresión relativa del gen VEGFR-2

En las Figuras 109 y 110 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGFR-2 y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos del C_T , de las cuatro repeticiones para cada uno de los días de interés, asimismo, se enlistan los promedios de los valores del C_T de los dos genes de referencia y finalmente los valores de la expresión relativa del gen VEGFR-2 normalizados sobre la base de expresión de los genes de referencia. En el Gráfico 8 se observan niveles similares de expresión del ARNm de VEGFR-2 entre los días 12 y 14 de gestación, en comparación con los observados en los días 2 y 12 del ciclo estral; seguido de un incremento en el día 16 de gestación, sin embargo, este aumento fue significativo hasta el día 18 de gestación en comparación con los días 12 y 14 de gestación ($P < 0.05$) y los días 2 y 12 del ciclo estral ($P < 0.05$).

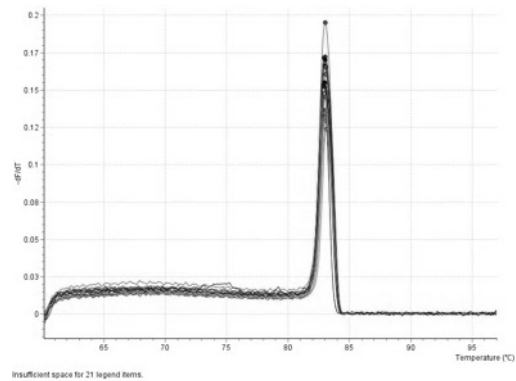
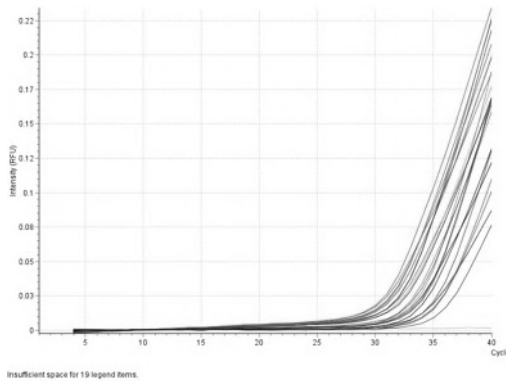


Figura 109. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGFR-2.

Figura 110. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen VEGFR-2.

Tabla 7. Valores de expresión del gen VEGFR-2 normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Gestación temprana				Ciclo estral	
		Gx 12	Gx 14	Gx 16	Gx 18	CE 2	CE 12
Valor C_T	VEGFR-2	32.7263	33.3381	32.4762	33.1840	33.0310	33.6765
		32.4830	31.8713	32.0981	30.2941	32.4937	32.5574

		32.5426	32.5263	30.7654	30.8511	33.3086	32.3153
		32.8074	33.3621	31.9934	31.5459	33.4714	32.3306
	Promedio	32.6398	32.7745	31.8333	31.4688	33.0762	32.7199
Valor C _T		23.9283	25.0326	23.3759	25.9610	24.1856	25.1556
	RPS20/ β-Actina	24.9888	24.8014	26.4130	24.4874	26.2331	26.3147
		24.3785	23.5304	23.4841	23.2168	25.5488	24.8044
		24.0634	24.4273	24.5477	24.7246	25.4999	24.6755
	Promedio	24.3398	24.4480	24.4552	24.5975	25.3669	25.2375
Valor normalizado		0.73649	1.03613	0.59724	2.19419	0.89364	1.11902
	VEGFR-2	0.50691	0.68022	1.77634	1.63268	0.99379	1.00625
		0.90428	0.50806	1.66732	1.30547	0.91738	1.09006
		0.59149	0.51824	1.45474	2.24254	0.89617	1.11586
	Promedio	0.6848	0.6857	1.3739	1.8437	0.9252	1.0828

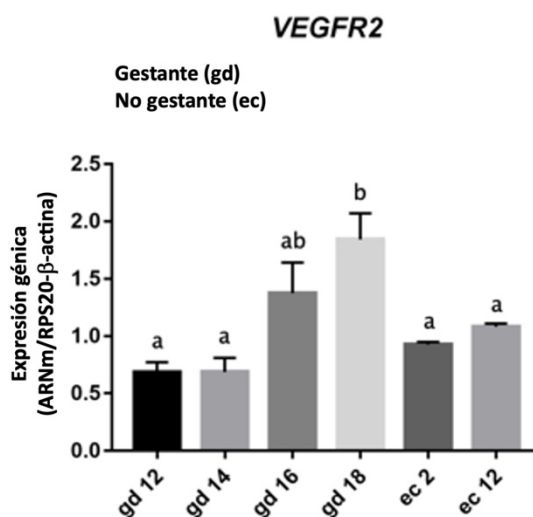


Gráfico 8. Niveles de expresión relativa de ARNm de VEGFR-2 en tejido uterino de cerdas gestantes (gd) y no gestantes (ec) ($n=4$). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes muestran diferencia significativa ($P<0.05$).

6.6 Cultivo primario de células epiteliales endometriales de cerda

Las células epiteliales endometriales de cerda, se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de FBS y mezcla de antibióticos a 38°C con una atmósfera

del 5% de CO₂. Se llevó a cabo el recambio de medio de cultivo cada 24 horas. El tiempo promedio para alcanzar una confluencia del 90% fue de 120 horas (5 días), sembrando a una densidad de 300,000 células en 400 µl de medio, en placas de 24 pozos. En las Figuras 111, 112, 113, 114, 115 y 116 se muestran las diferentes etapas de crecimiento de las células epiteliales endometriales, bajo las condiciones previamente descritas.

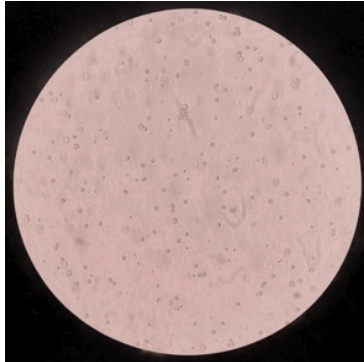


Figura 111. Células epiteliales endometriales aisladas, 0 horas en cultivo.

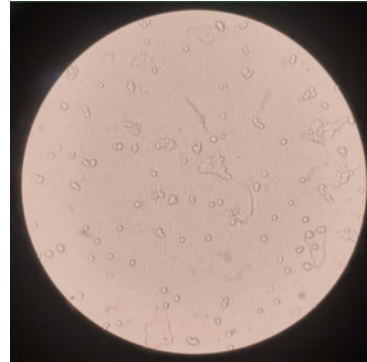


Figura 112. Células epiteliales endometriales aisladas, 24 horas en cultivo.

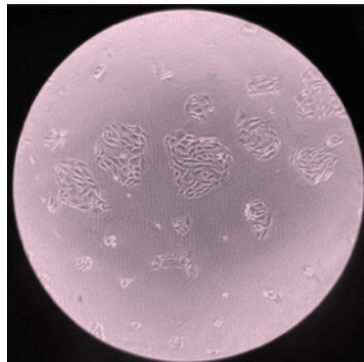


Figura 113. Células epiteliales endometriales aisladas, 48 horas en cultivo.

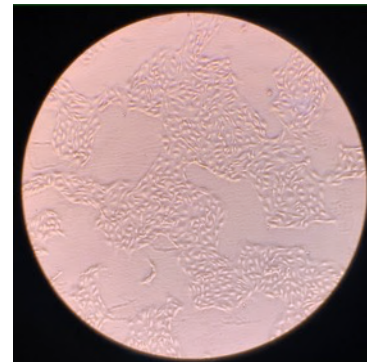


Figura 114. Células epiteliales endometriales aisladas, 72 horas en cultivo.

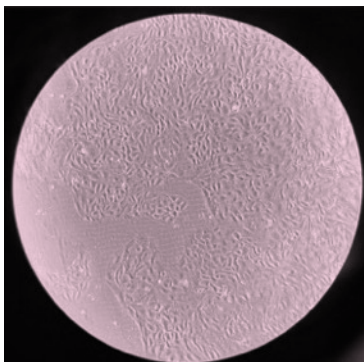


Figura 115. Células epiteliales endometriales aisladas, 96 horas en cultivo.

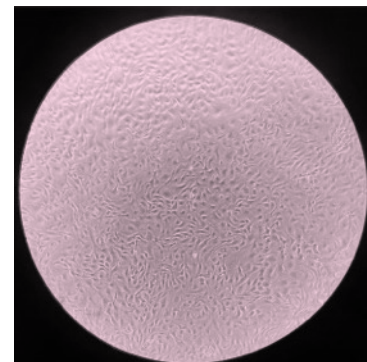


Figura 116. Células epiteliales endometriales aisladas, 120 horas en cultivo.

6.7 Inmunocitoquímica de células epiteliales endometriales

Las células epiteliales se tiñeron mediante inmunocitoquímica para evaluar su viabilidad. Más del 90% de las células incubadas con el anticuerpo pan-Citoqueratina-C11 mostraron un color marrón, lo que indicó que se trataban de células epiteliales (Figuras 117 y 118).

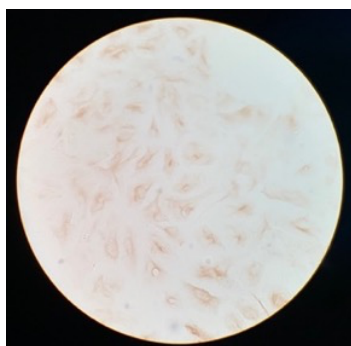


Figura 117. Microfotografía de células con señal del anticuerpo pan-Citoqueratina-C11.

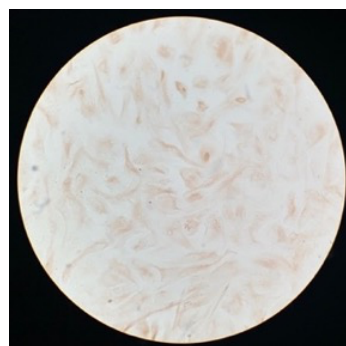


Figura 118. Microfotografía de células con señal del anticuerpo pan-Citoqueratina-C11.

6.8 ARN de muestras de cultivo de células epiteliales endometriales

La concentración y grado de pureza del ARN extraído de cada una de las muestras mediante el método de columnas giratorias de sílice, se determinaron a partir de la relación 260/280 calculada por el software del espectrofotómetro. En general las muestras mostraron resultados de calidad óptima para ser utilizadas en ensayos de PCR de punto final y tiempo real. En la Tabla 8 se presentan las concentraciones de ARN (ng/μl), así como su relación 260/280 de cada una de las muestras incluidas en los ensayos experimentales.

Tabla 8. Características generales del ARN extraído de muestras de cultivo de células epiteliales endometriales de cerda tratadas con el inhibidor SU5416.

Grupo	Repetición	Concentración (ng/ml)	Relación 260/280
2500 nM	Rep 1	234.44	2.14
	Rep 2	240.81	2.14
	Rep 3	178.52	2.15
	Rep 4	92.42	2.17

1500 nM	Rep 5	152.97	2.14
	Rep 1	257.02	2.15
	Rep 2	313.08	2.15
	Rep 3	237.64	2.13
	Rep 4	129.405	2.12
100 nM	Rep 5	117.12	2.11
	Rep 1	200.64	2.16
	Rep 2	235.08	2.15
	Rep 3	235.73	2.14
	Rep 4	259.43	2.11
DMSO 2500 nM	Rep 5	262.61	2.11
	Rep 1	221.15	2.14
	Rep 2	215.6	2.13
	Rep 3	222.06	2.14
	Rep 4	237.43	2.08
	Rep 5	231.54	2.12

6.9 PCR de punto final

En cada uno de los grupos de tratamiento evaluados, se visualiza la formación de una sola banda para la expresión del transcrito de los genes de referencia RPS20 y β -Actina; siendo correspondiente al tamaño de amplicón esperado de 148pb y 110pb respectivamente (Figuras 119 y 120).

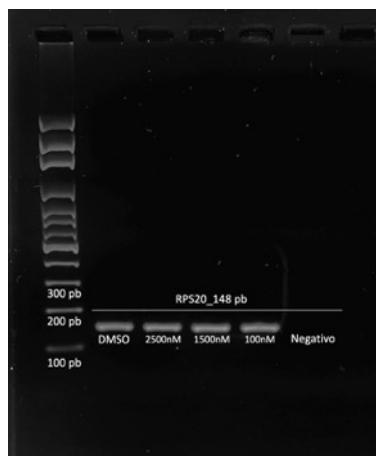


Figura 119. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen RPS20.

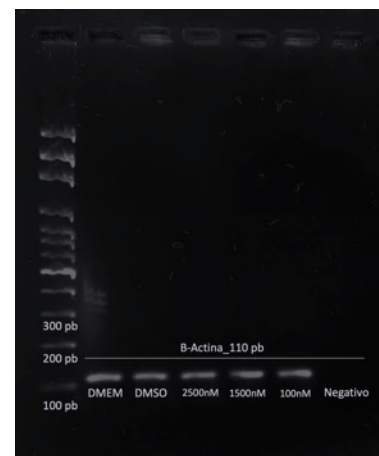


Figura 120. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen β -Actina.

La expresión de VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 se identificó presente en todos los grupos de las células tratadas con el inhibidor SU5416, con un tamaño de amplicón de 232pb, 180pb y 177pb respectivamente (Figuras 121, 122 y 123).

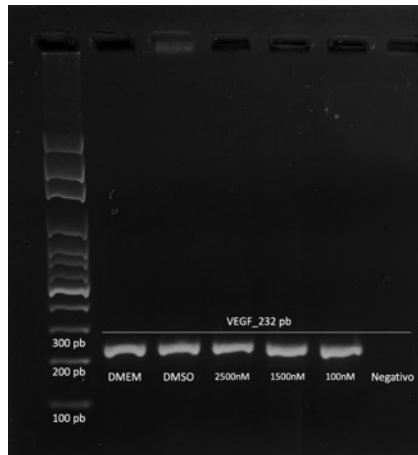


Figura 121. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGF.



Figura 122. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGFR-1.

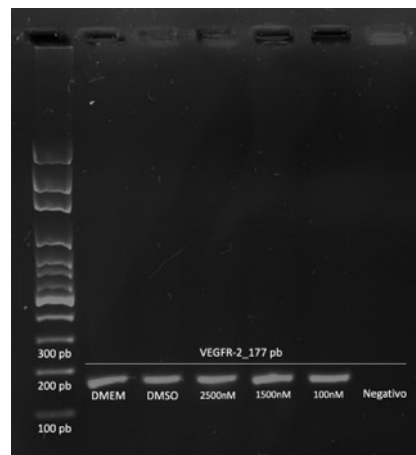


Figura 123. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGFR-2.

6.10 qPCR de células tratadas con el inhibidor SU5416

Se llevaron a cabo ensayos experimentales de qPCR, donde se determinaron los niveles de expresión relativa de los genes VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, BAX, BCL-

2, CASP3, FGF2 y MAPK en los diferentes grupos de células tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor SU5416; normalizados sobre la base de expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

6.10.1 Determinación de expresión relativa del gen RPS20 en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 124 y 125 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia RPS20 y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente, donde se puede apreciar la alta especificidad de este gen de referencia con respecto al tipo de muestra utilizada.

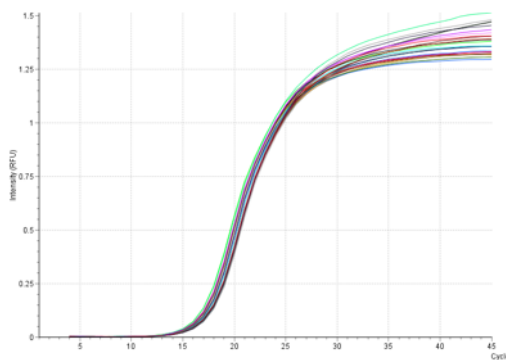


Figura 124. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia RPS20.

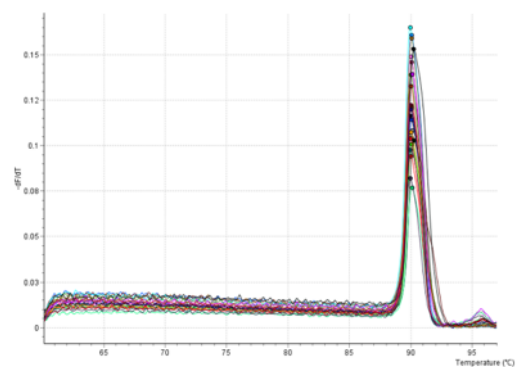


Figura 125. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia RPS20.

6.10.2 Determinación de expresión relativa del gen β -Actina en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 126 y 127 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia β -Actina y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente, donde se puede apreciar la alta especificidad de este gen de referencia con respecto al tipo de muestra utilizada.

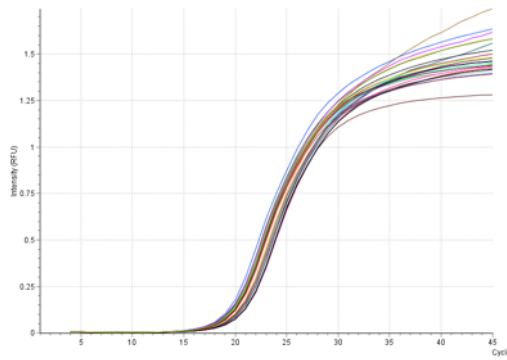


Figura 126. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia β -Actina.

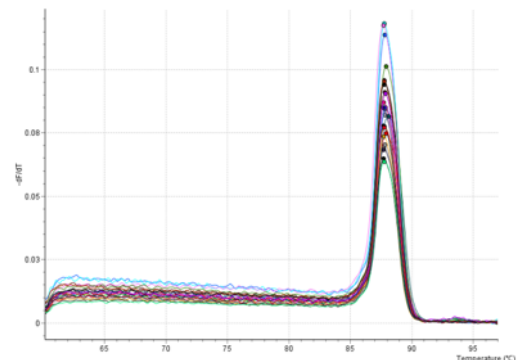


Figura 127. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia β -Actina.

6.10.3 Determinación de expresión relativa del gen VEGF en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 128 y 129 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGF y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos del C_T de las cinco repeticiones de cada uno de los grupos de células tratadas, asimismo, se enlistan los promedios de los valores del C_T de los dos genes de referencia y finalmente los valores de la expresión relativa del gen VEGF normalizados sobre la base de expresión de los genes de referencia, así como el valor normalizado transformado mediante logaritmo. En el gráfico 9 se observa que no existe diferencia significativa entre los grupos tratados con el inhibidor SU5416 a diferentes concentraciones y el grupo control (DMSO 2500 nM). Los datos se muestran como la media \pm SEM, donde los valores con letras diferentes poseen diferencia significativa ($P < 0.05$).

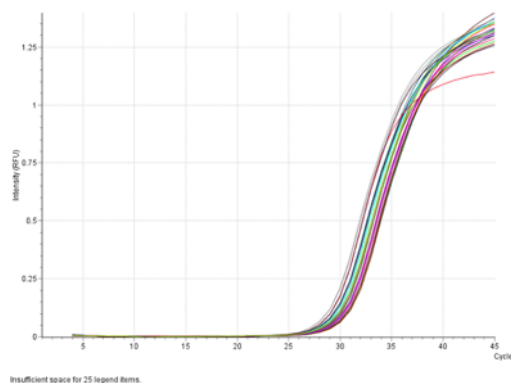


Figura 128. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia VEGF.

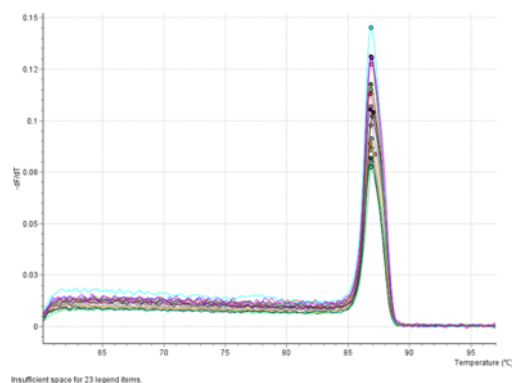


Figura 129. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia VEGF.

Tabla 9. Valores de expresión del gen VEGF en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Grupos de células tratadas con SU5416			
		100 nM	1500 nM	2500 nM	DMSO 2500 nM
Valor C_T	VEGF	30.1471	28.6757	29.4324	30.2168
		30.5873	29.7764	30.3655	29.8222
		29.7033	30.2222	30.0222	29.3355
		31.8018	30.3133	31.4180	29.3999
		30.9713	29.1775	29.8845	30.2922
	Promedio	30.6422	29.6330	30.2245	29.8133
Valor C_T	RPS20/ B-Actina	19.1289	17.3266	17.4775	18.6972
		17.7572	17.4682	17.9976	17.3651
		18.5453	17.4346	17.4329	17.5635
		18.9566	17.9194	18.2945	18.7719
		18.5206	17.7916	17.5962	17.9670
	Promedio	18.5817	17.5881	17.7597	18.0729
Valor normalizado	VEGF (ratio)	1.3587	1.0802	0.7098	0.9598
		0.7904	1.1349	1.0889	1.0237
		1.8904	0.6109	0.7010	1.2352
		0.6609	0.9036	0.5449	3.0729
		0.7911	1.6547	0.8853	0.8630
	Promedio	1.0983	1.0769	0.7860	1.4309
	VEGF	0.3727	0.3181	0.2330	0.2922

	(Log)	0.2530	0.3294	0.3199	0.3061
Valor transformado (Logaritmo)		0.4610	0.2071	0.2307	0.3493
		0.2203	0.2796	0.1889	0.6099
		0.2531	0.4240	0.2754	0.2702
	Promedio	0.3120	0.3116	0.2496	0.3656

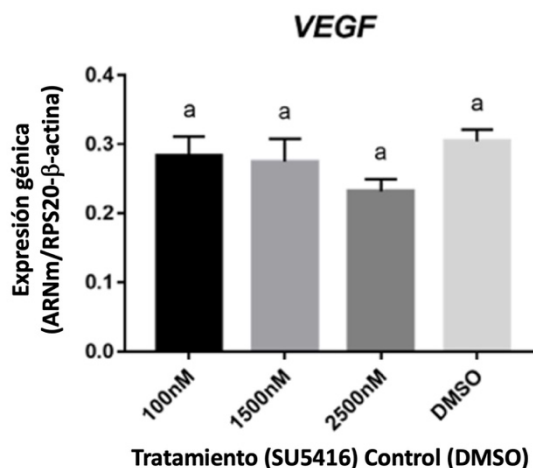


Gráfico 9. Valores de expresión relativa de ARNm para VEGF en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes muestran diferencia significativa (P<0.05).

6.10.4 Determinación de expresión relativa del gen VEGFR-1 en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 130 y 131 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGFR-1 y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos del C_T de las cinco repeticiones de cada uno de los grupos de células tratadas, asimismo, se enlistan los promedios de los valores del C_T de los dos genes de referencia y finalmente los valores de la expresión relativa del gen VEGFR-2 normalizados sobre la base de expresión de los genes de referencia, así como el valor normalizado transformado mediante logaritmo. En el gráfico 10 se aprecia una tendencia a la baja en la expresión relativa de VEGFR-1, a medida que incrementa la concentración del tratamiento con SU5416. La diferencia entre tratamientos

resultó significativa en los grupos tratados con 1500 nM y 2500 nM, en comparación con 100 nM y DMSO 2500 nM ($P < 0.05$). Sin embargo, entre 1500 nM y 2500 nM no hubo diferencia.

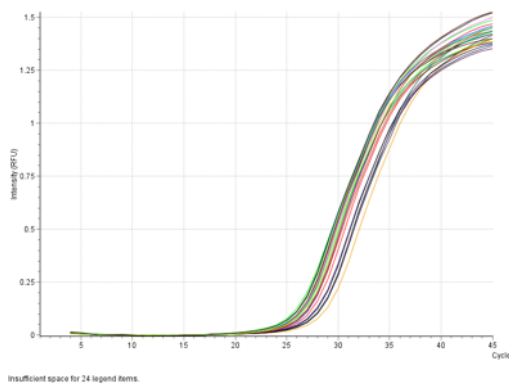


Figura 130. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia VEGFR-1.

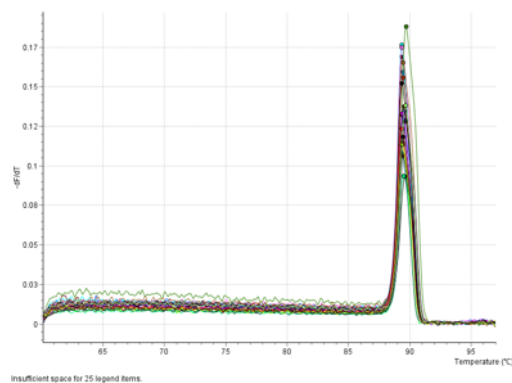


Figura 131. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia VEGFR-1.

Tabla 10. Valores de expresión del gen VEGFR1 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Grupos de células tratadas con SU5416			
		100 nM	1500 nM	2500 nM	DMSO 2500 nM
Valor C_T	VEGFR1	26.8351	26.1675	26.5443	26.7007
		24.4778	25.7771	25.2906	24.4820
		26.0887	25.8694	25.6146	24.8687
		26.6204	26.1684	27.2050	26.4014
		26.1284	25.5986	25.2856	25.4672
	Promedio	26.0301	25.9162	25.9880	25.5840
Valor C_T	RPS20/ β -Actina	19.1289	17.3266	17.4775	18.6972
		17.7572	17.4682	17.9976	17.3651
		18.5453	17.4346	17.4329	17.5635
		18.9566	17.9194	18.2945	18.7719
		18.5206	17.7916	17.5962	17.9670
	Promedio	18.5817	17.5881	17.7597	18.0729
Valor normalizado	VEGFR-1 (ratio)	1.6225	0.7389	0.6318	1.3203
		1.5575	0.5180	1.0474	1.1835

		1.2508	0.6743	0.8036	1.4753
		1.3655	0.9102	0.5754	1.3983
		1.0305	0.8976	0.9738	1.1102
	Promedio	1.3653	0.7478	0.8064	1.2975
		0.4187	0.2403	0.2127	0.3655
Valor transformado (Logaritmo)	VEGFR-1 (Log)	0.4078	0.1813	0.3112	0.3391
		0.3523	0.2238	0.2561	0.3936
		0.3739	0.2811	0.1974	0.3799
		0.3076	0.2782	0.2953	0.3243
		Promedio	0.3721	0.2409	0.2545

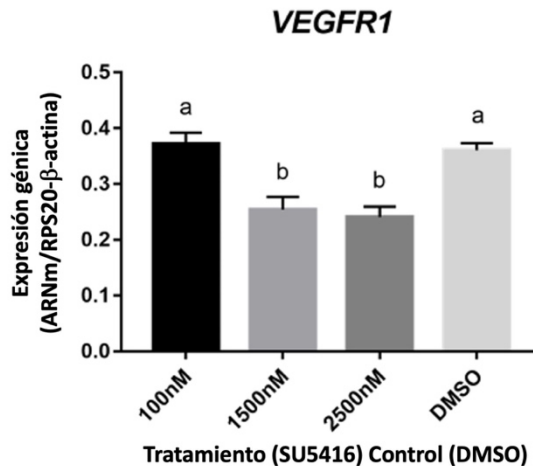


Gráfico 10. Valores de expresión relativa de ARNm para VEGFR-1 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.10.5 Determinación de expresión relativa del gen VEGFR-2 en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 132 y 133 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGFR-2 y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 11 se presentan los resultados obtenidos del C_T de las cinco repeticiones de cada uno de los grupos de células tratadas, asimismo, se enlistan los promedios de los valores del C_T de los dos genes de referencia y finalmente los valores de la expresión relativa del gen VEGFR-2

normalizados sobre la base de expresión de los genes de referencia, así como el valor normalizado transformado mediante logaritmo. En el gráfico 11 se aprecia una tendencia a la baja en la expresión relativa de VEGFR-2, a medida que incrementa la concentración del tratamiento con SU5416. La diferencia entre tratamientos resultó significativa en los grupos tratados con 1500 nM y 2500 nM, en comparación con 100 nM y DMSO 2500 nM ($P < 0.05$). Entre 1500 nM y 2500 nM no hubo diferencia.

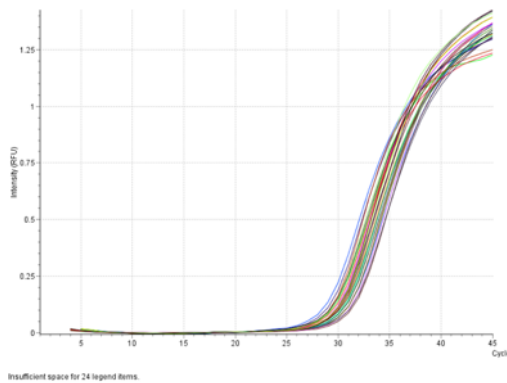


Figura 132. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia VEGFR-2.

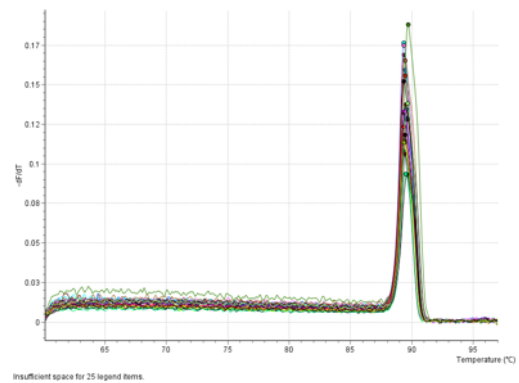


Figura 133. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia VEGFR-2.

Tabla 11. Valores de expresión del gen VEGFR2 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Grupos de células tratadas con SU5416			
		100 nM	1500 nM	2500 nM	DMSO 2500 nM
Valor C_T	VEGFR-2	28.8165	29.4168	29.9867	28.6984
		27.9058	28.8474	29.4096	27.4546
		28.1658	29.5899	29.4238	27.4621
		29.7039	30.0616	31.2886	29.1353
		28.4648	28.7181	28.0346	27.1750
	Promedio	28.6113	29.3268	29.6287	27.9851
Valor C_T	RPS20/ B-Actina	19.1289	17.3266	17.4775	18.6972
		17.7572	17.4682	17.9976	17.3651
		18.5453	17.4346	17.4329	17.5635
		18.9566	17.9194	18.2945	18.7719

		18.5206	17.7916	17.5962	17.9670
	Promedio	18.5817	17.5881	17.7597	18.0729
Valor normalizado	VEGFR-2 (ratio)	1.5524	0.5872	0.4392	2.4981
		1.5249	0.6498	0.6352	1.5888
		1.4598	0.5039	0.5646	2.4078
		1.7587	0.6688	0.3705	2.2947
		1.1369	0.5754	0.8071	1.8937
	Promedio	1.4865	0.5970	0.5633	2.1366
Valor transformado (Logaritmo)	VEGFR-2 (Log)	0.4069	0.2006	0.1581	0.5438
		0.4022	0.2174	0.2136	0.4131
		0.3909	0.1772	0.1944	0.5325
		0.4407	0.2224	0.1369	0.5178
		0.3298	0.1974	0.2570	0.4615
		Promedio	0.3941	0.2030	0.1920

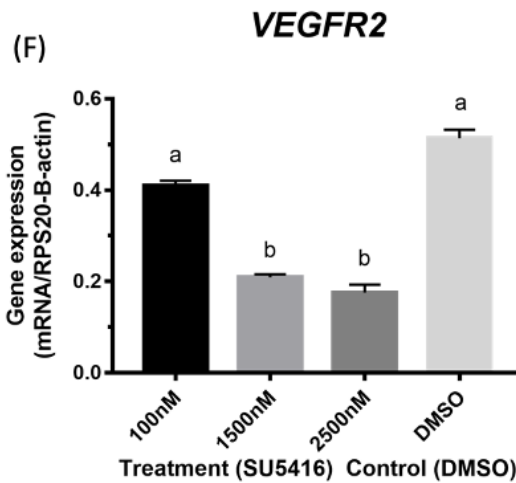


Gráfico 11. Valores de expresión relativa de ARNm para VEGFR-2 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.10.6 Determinación de expresión relativa del gen BAX en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 134 y 135 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen BAX y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 12 se presentan los resultados de la expresión relativa

del gen BAX, obtenidos de las cinco repeticiones de cada uno de los grupos de células tratadas. En el Gráfico 12 se observa que no existe diferencia significativa en la expresión del gen BAX, entre los grupos tratados con el inhibidor SU5416 a diferentes concentraciones y el grupo control (DMSO 2500 nM).

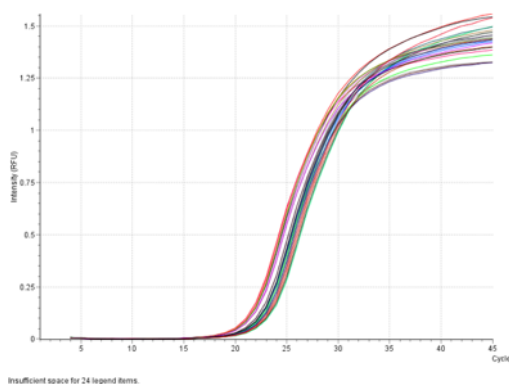


Figura 134. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen BAX.

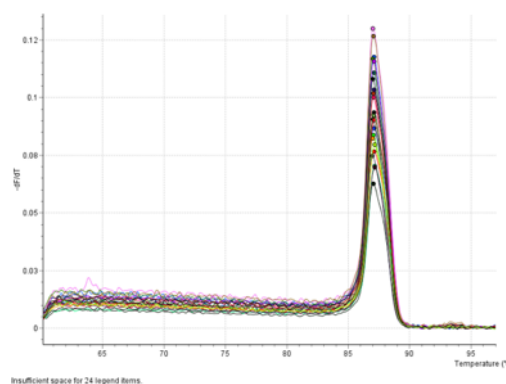


Figura 135. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen BAX.

Tabla 12. Valores de expresión del gen BAX en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Grupos de células tratadas con SU5416			
		100 nM	1500 nM	2500 nM	DMSO 2500 nM
Valor C_T	BAX	21.7754	20.9158	21.3446	21.6822
		20.6847	21.3664	21.0327	20.4858
		21.8386	21.3361	21.4915	20.4995
		22.1995	21.7265	20.9925	22.4169
		21.5433	21.4404	21.3991	21.9457
	Promedio	21.6083	21.3570	21.2521	21.4060
Valor C_T	RPS20/ B-Actina	19.1289	17.3266	17.4775	18.6972
		17.7572	17.4682	17.9976	17.3651
		18.5453	17.4346	17.4329	17.5635
		18.9566	17.9194	18.2945	18.7719
		18.5206	17.7916	17.5962	17.9670
	Promedio	18.5817	17.5881	17.7597	18.0729
Valor	BAX	0.9173	1.0597	0.7091	1.4509

normalizado	(Ratio)	1.2465	0.9180	0.8016	1.0903
		0.7091	0.9293	0.8353	1.8167
		1.0758	0.9436	1.2102	0.8140
		1.5059	0.8521	1.0040	0.7762
		Promedio	1.0909	0.9405	0.9120
Valor transformado (Logaritmo)	BAX (Log)	0.2827	0.3138	0.2328	0.3893
		0.3515	0.2828	0.2556	0.3202
		0.2328	0.2854	0.2637	0.4497
		0.3172	0.2886	0.3444	0.2586
		0.3990	0.2677	0.3019	0.2495
		Promedio	0.3166	0.2877	0.2797

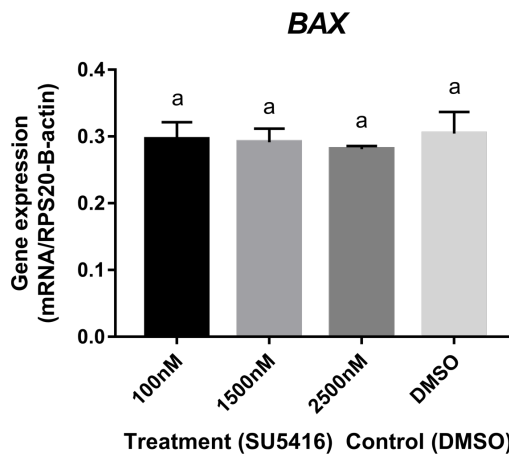


Gráfico 12. Valores de expresión relativa de ARNm para BAX en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.10.7 Determinación de expresión relativa del gen BCL-2 en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 136 y 137 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen BCL-2 y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 13 se presentan los resultados de la expresión relativa del gen BAX, obtenidos de las cinco repeticiones de cada uno de los grupos de células tratadas. En el Gráfico 13 se observa que a pesar de tener una aparente

disminución en la expresión del gen BCL-2, a medida que incrementa la concentración de SU5416, no existe diferencia significativa entre los grupos.

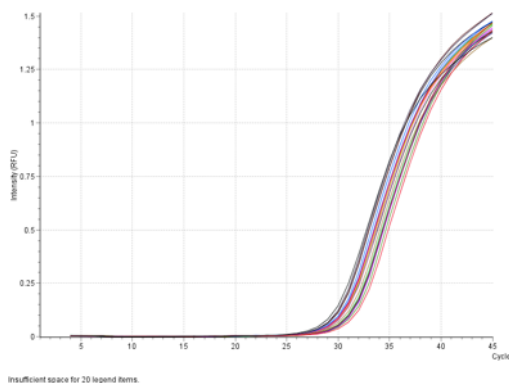


Figura 136. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen BCL-2.

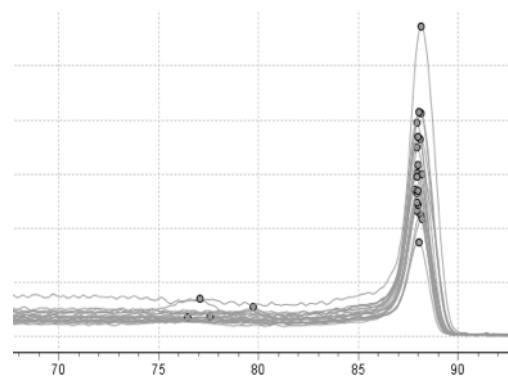


Figura 137. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen BCL-2.

Tabla 13. Valores de expresión del gen BCL-2 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Grupos de células tratadas con SU5416			
		100 nM	1500 nM	2500 nM	DMSO 2500 nM
Valor C_T	BCL-2	31.2924	29.6011	30.3975	30.4706
		29.4350	29.3134	29.6790	29.4176
		29.8400	29.6338	30.2806	28.8747
		30.5750	29.7635	30.8511	31.3199
		30.7437	29.1854	28.8283	30.6444
	Promedio	30.3772	29.4994	30.0073	30.1455
Valor C_T	RPS20/ B-Actina	19.1289	17.3266	17.4775	18.6972
		17.7572	17.4682	17.9976	17.3651
		18.5453	17.4346	17.4329	17.5635
		18.9566	17.9194	18.2945	18.7719
		18.5206	17.7916	17.5962	17.9670
	Promedio	18.5817	17.5881	17.7597	18.0729
Valor normalizado	BCL-2 (Ratio)	1.0863	1.0058	0.6430	1.4235
		1.0991	0.9788	1.0964	0.8478
		1.5353	0.8202	0.5232	1.5178

		1.4373	1.2292	0.7501	0.7546
		0.7892	1.4023	1.5687	0.5760
	Promedio	1.1894	1.0873	0.9163	1.0239
		0.3194	0.3023	0.2156	0.3844
Valor transformado (Logaritmo)	BCL-2 (Log)	0.3220	0.2964	0.3215	0.2667
		0.4040	0.2601	0.1828	0.4010
		0.3869	0.3481	0.2431	0.2442
		0.2527	0.3806	0.4097	0.1976
	Promedio	0.3370	0.3175	0.2745	0.2988

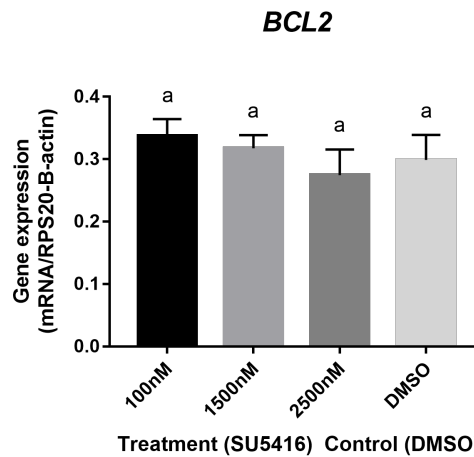


Gráfico 13. Valores de expresión relativa de ARNm para BCL-2 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.10.8 Determinación de expresión relativa del gen CASP3 en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 138 y 139 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen CASP3 y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 14 se presentan los resultados de la expresión relativa del gen CASP3, obtenidos de las cinco repeticiones de cada uno de los grupos de células tratadas. En el Gráfico 14 se observa un aparente incremento en la expresión del gen CASP3, a medida que aumenta la concentración de SU5416, no obstante, esta diferencia no es significativa entre los grupos.

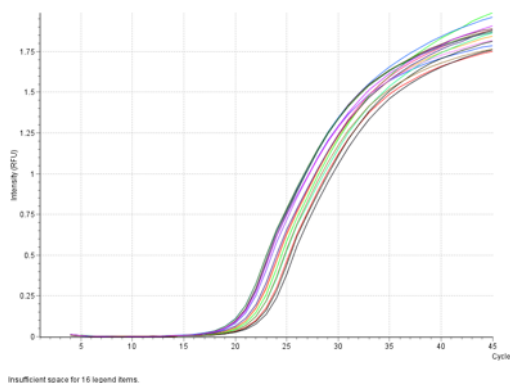


Figura 138. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen CASP3.

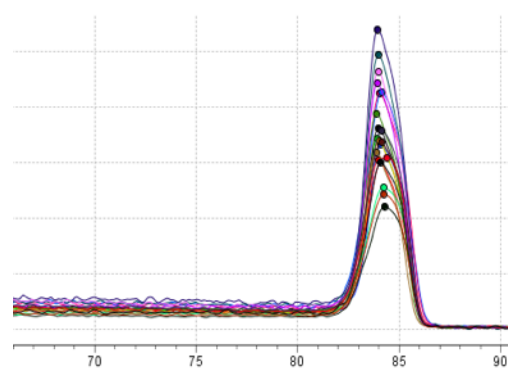


Figura 139. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen CASP3.

Tabla 14. Valores de expresión del gen CASP3 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Grupos de células tratadas con SU5416			
		100 nM	1500 nM	2500 nM	DMSO 2500 nM
Valor C _T	CASP3	21.6648	19.5932	19.8270	21.6644
		20.3874	19.9072	20.1940	19.7441
		20.3118	20.1550	19.9652	19.5306
		21.4328	20.4293	20.4799	20.6611
		20.9492	20.6484	19.7961	21.3033
	Promedio	20.9492	20.1466	20.0524	20.5807
Valor C _T	RPS20/ B-Actina	19.1289	17.3266	17.4775	18.6972
		17.7572	17.4682	17.9976	17.3651
		18.5453	17.4346	17.4329	17.5635
		18.9566	17.9194	18.2945	18.7719
		18.5206	17.7916	17.5962	17.9670
	Promedio	18.5817	17.5881	17.7597	18.0729
Valor normalizado	CASP3 (Ratio)	0.5921	1.4272	1.3475	0.8782
		0.8591	0.9809	1.1605	1.0226
		1.3948	0.7201	0.8203	1.2137
		0.8639	0.8440	1.0568	1.2977
		1.2115	0.9004	1.4196	0.6458
	Promedio	0.9843	0.9745	1.1610	1.0116
Valor	BAX	0.2020	0.3851	0.3706	0.2737

transformado (Logaritmo)	(Log)	0.2693	0.2969	0.3346	0.3059
		0.3793	0.2355	0.2601	0.3451
		0.2704	0.2658	0.3132	0.3613
		0.3447	0.2788	0.3837	0.2164
Promedio		0.2931	0.2924	0.3325	0.3005

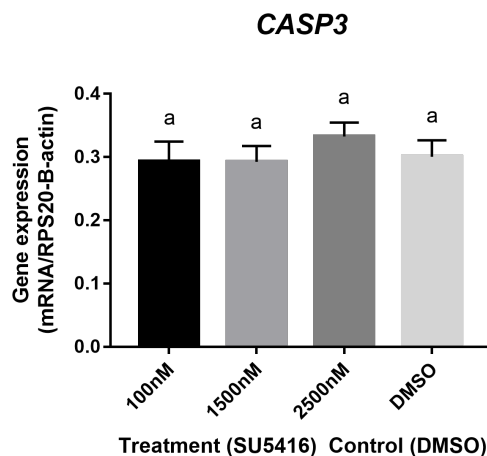


Gráfico 14. Valores de expresión relativa de ARNm para CASP3 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) ($n=5$). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa ($P<0.05$).

6.10.9 Determinación de expresión relativa del gen FGF2 en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 140 y 141 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen FGF2 y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 15 se presentan los resultados de la expresión relativa del gen FGF2, obtenidos de las cinco repeticiones de cada uno de los grupos de células tratadas. En el Gráfico 15 se observa una tendencia hacia la baja en la expresión del gen FGF2, a medida que aumenta la concentración de SU5416, sin embargo, esta diferencia no es significativa entre los grupos.

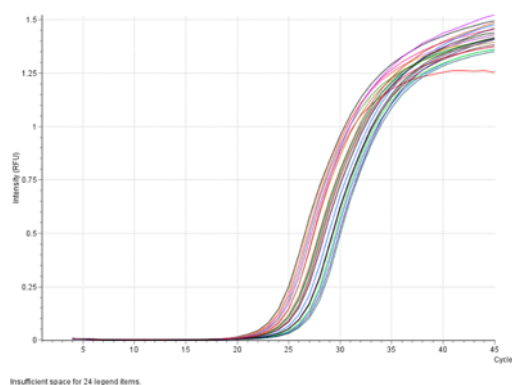


Figura 140. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen FGF2.

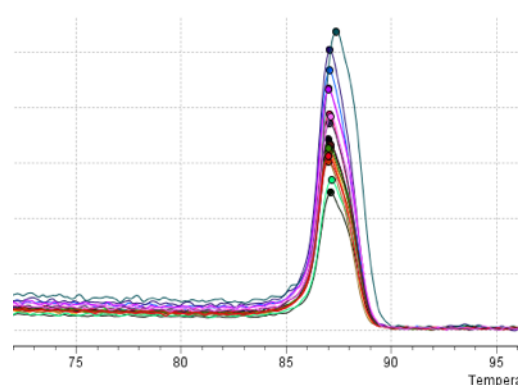


Figura 141. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen FGF2.

Tabla 15. Valores de expresión del gen FGF2 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Grupos de células tratadas con SU5416			
		100 nM	1500 nM	2500 nM	DMSO 2500 nM
Valor C_T	FGF2	26.1323	24.0308	24.3580	25.7752
		23.1149	23.7073	23.8776	22.6827
		23.5007	24.8183	25.1689	22.9069
		24.2330	23.9719	24.5495	24.1918
		25.4125	24.3586	24.5733	25.1849
	Promedio	24.4786	24.1774	24.5055	24.1483
Valor C_T	RPS20/ B-Actina	19.1289	17.3266	17.4775	18.6972
		17.7572	17.4682	17.9976	17.3651
		18.5453	17.4346	17.4329	17.5635
		18.9566	17.9194	18.2945	18.7719
		18.5206	17.7916	17.5962	17.9670
	Promedio	18.5817	17.5881	17.7597	18.0729
Valor normalizado	FGF2 (Ratio)	0.5599	1.3778	1.2193	1.0632
		1.2665	0.6875	0.8819	1.3022
		2.6376	0.4900	0.3838	2.0156
		1.3896	0.8114	0.7051	1.2579
		0.8476	1.0616	0.7989	1.3912
	Promedio	1.3402	0.8857	0.7978	1.4060
Valor	FGF2	0.1931	0.3762	0.3462	0.3146

transformado (Logaritmo)	(Log)	0.3554	0.2273	0.2746	0.3622
		0.5608	0.1732	0.1411	0.4794
		0.3783	0.2580	0.2317	0.3537
		0.2666	0.3142	0.2550	0.3786
	Promedio	0.3508	0.2698	0.2497	0.3777

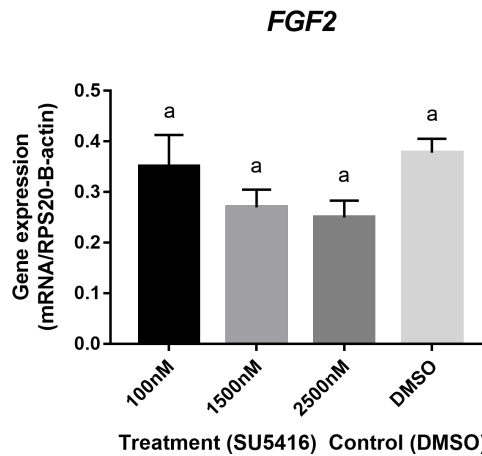


Gráfico 15. Valores de expresión relativa de ARNm para FGF2 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa ($P < 0.05$).

6.10.10 Determinación de expresión relativa del gen MAPK en células epiteliales endometriales de cerda

En las Figuras 142 y 143 se muestran las curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen MAPK y las curvas de disociación de los productos de qPCR respectivamente. En la Tabla 16 se presentan los resultados de la expresión relativa del gen MAPK, obtenidos de las cinco repeticiones de cada uno de los grupos de células tratadas. En el Gráfico 16 se observa una ligera tendencia hacia la baja en la expresión del gen MAPK, a medida que aumenta la concentración de SU5416, sin embargo, esta diferencia no es significativa entre los grupos.

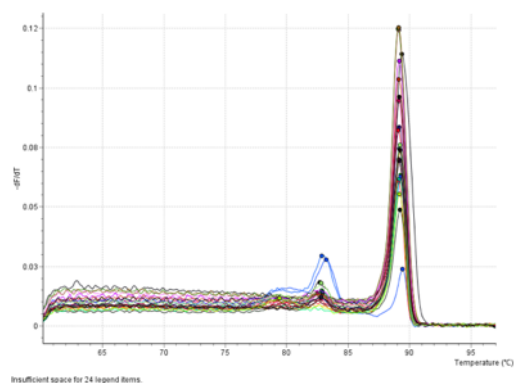
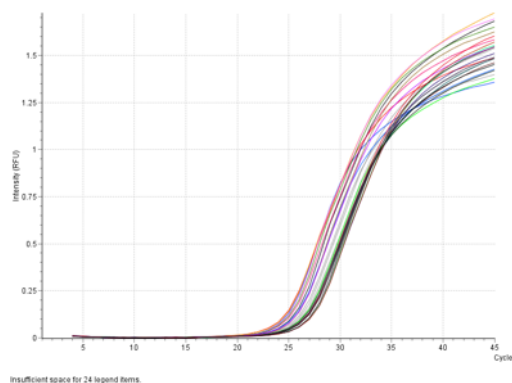


Figura 142. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen MAPK.

Figura 143. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen MAPK.

Tabla 16. Valores de expresión del gen MAPK en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β -Actina.

		Grupos de células tratadas con SU5416			
		100 nM	1500 nM	2500 nM	DMSO 2500 nM
Valor C_T	MAPK	26.1574	24.6515	25.8758	25.6375
		24.0183	24.5149	24.8794	24.6091
		24.8030	24.4834	24.4306	23.9911
		26.1489	24.7581	25.8228	26.0261
		25.9475	24.5280	25.2094	25.9922
	Promedio	25.4150	24.5872	25.2436	25.2512
Valor C_T	RPS20/ β -Actina	19.1289	17.3266	17.4775	18.6972
		17.7572	17.4682	17.9976	17.3651
		18.5453	17.4346	17.4329	17.5635
		18.9566	17.9194	18.2945	18.7719
		18.5206	17.7916	17.5962	17.9670
	Promedio	18.5817	17.5881	17.7597	18.0729
Valor normalizado	MAPK (Ratio)	1.3145	1.0704	0.5086	1.3974
		1.5129	0.8776	0.9839	0.7655
		0.7984	0.9228	0.9561	1.4195
		1.0077	1.2876	0.7983	0.9654
		0.8487	1.3696	0.7459	1.1535
	Promedio	1.0964	1.1056	0.7986	1.1402
Valor	MAPK	0.3645	0.3161	0.1786	0.3797

transformado (Logaritmo)	(Log)	0.4002	0.2736	0.2975	0.2469
		0.2549	0.2839	0.2914	0.3837
		0.3027	0.3594	0.2549	0.2934
		0.2669	0.3747	0.2420	0.3331
Promedio		0.3178	0.3215	0.2529	0.3274

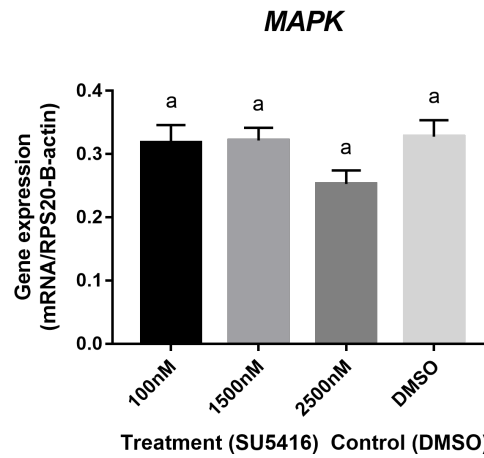


Gráfico 16. Valores de expresión relativa de ARNm para MAPK en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa ($P < 0.05$).

7 Discusión

Estudios previos se han enfocado en determinar la expresión y localización de VEGF y sus receptores de membrana, en tejido reproductivo incluido el cuerpo lúteo, folículos ováricos, endometrio y sitios de implantación (Krüssel *et al.*, 2001) de diversos mamíferos (Charnock-Jones *et al.*, 1993; Cullinan-Bove y Koos, 1993; Graubert *et al.*, 2001; Rabbani y Rogers, 2001; Wang *et al.*, 2003; Pfarrer *et al.*, 2006; Grazul-Bilska *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2019). En el presente estudio, se investigó la localización de la proteína y los patrones de expresión relativa del ARNm del ligando VEGF-A y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en tejido uterino de cerda durante el período de peri-implantación y ciclo estral. Un estudio previo en cerdos, demostró que las proteínas VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2 se presentaron en los días 1 y 12 de gestación en el epitelio luminal, epitelio glandular y el estroma. Además, VEGFR-1 y VEGFR-2 mostraron un marcaje adicional en vasos sanguíneos localizados en el endometrio (Welter *et al.*, 2003). En el presente estudio se identificó una señalización similar para VEGF y su receptor VEGFR-2 durante la fase folicular (día 2) y lútea (día 12) del ciclo estral, así como en la gestación temprana (días 12, 14, 16 y 18), donde la señal positiva se localizó en células endometriales del epitelio luminal, epitelio glandular, estroma y vasos sanguíneos, con un hallazgo novedoso de una señal en el miometrio de la cerda. Estos resultados concuerdan a los obtenidos en un estudio realizado por Winther y colaboradores, en donde se señaló un perfil de localización de VEGFR-2 casi idéntico al de VEGF (Winther *et al.*, 1999). Otro hallazgo relevante del presente estudio fue la detección de señal positiva para VEGFR-1, exclusivamente en estroma y vasos sanguíneos. En otras especies como las vacas, se ha detectado una señal positiva durante la peri-implantación para VEGF en estroma y vasos sanguíneos del endometrio y miometrio, mientras sus receptores se localizan en epitelio luminal, epitelio glandular y vasos sanguíneos (Hayashi *et al.*, 2019). En yeguas, se han descrito patrones de señal para VEGF en el epitelio luminal, epitelio glandular, estroma y vasos sanguíneos durante el ciclo estral y peri-implantación

(Silva *et al.*, 2011). A pesar de tener diferentes subtipos de placenta, ambas especies mencionadas, tienen patrones de localización similares a los encontrados en el presente estudio, lo que subraya la importancia de VEGF durante la peri-implantación de mamíferos euterios.

La demostración de VEGF y VEGFR-2 en el epitelio luminal, glandular, estroma, vasos sanguíneos y miometrio, así como la localización previa en otros estudios (Winther *et al.*, 1999; Kaczmarek *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2019), indica un papel funcional de VEGF en estos tipos celulares. La localización de VEGF y VEGFR-2 en epitelio luminal podría estar conduciendo a una asociación más estrecha entre el endotelio vascular placentario y el endometrio (Winther *et al.*, 1999; Vonnahme *et al.*, 2001), ya que se requiere de una interacción precisa durante las etapas de vascularización tanto materna como embrionaria para que la gestación sea exitosa (Zygmunt *et al.*, 2003), como lo demostró previamente un experimento funcional de otros autores que apoya esta idea, donde la adición de VEGF promueve la capacidad adhesiva de las células epiteliales del endometrio (Hannan *et al.*, 2011). Asimismo, la localización de ambas proteínas en el epitelio luminal uterino, podría estar mediando un papel funcional parácrino en la angiogénesis endometrial (Albrecht *et al.*, 2003). De manera similar, la señal positiva observada en el epitelio glandular podría significar una regulación de funciones adicionales del ligando, tales como actividad secretora, capacidad de transporte y prolongación de vida útil de las células endometriales durante la gestación (Winther *et al.*, 1999; Sugino *et al.*, 2002; Kaczmarek *et al.*, 2009). La interacción entre el embrión y el endometrio comienza con las secreciones uterinas, también denominado histotrofo, que es producido principalmente por las glándulas uterinas (Spencer, 2014). Durante el período de peri-implantación, las glándulas endometriales secretan importantes mediadores, incluido el VEGF (Binder *et al.*, 2016). El papel de VEGF en el diálogo entre el embrión y el endometrio se ha demostrado mediante experimentos funcionales, en los que se observó un aumento en el número de blastocitos y las tasas de implantación después del tratamiento con VEGF (Binder *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que durante la peri-

implantación la secreción de VEGF se produce con preferencia hacia la luz del epitelio glandular y epitelio luminal, lo que propone que este último tipo celular puede proporcionar una señal trófica de permeabilidad o diferenciación para el desarrollo o implantación de células trofoblásticas (Hornung *et al.*, 1998).

La localización de la proteína de VEGF y sus receptores en vasos sanguíneos endometriales podría estar promoviendo la proliferación de células endoteliales y la supervivencia del endotelio diferenciado de manera parácrina (Kaczynski *et al.*, 2016), ya que un cambio en el compartimiento vascular hacia el soporte de la gestación temprana, es un componente obligatorio en el tejido endometrial (Ferrara, 1999; Kaczmarek *et al.*, 2009). La señal generalizada que se sitúa en el músculo liso del miometrio sugiere la presencia de la proteína de VEGF, tal como se ha reportado localizada en el miometrio humano (Harrison-Woolrych *et al.*, 1995). Aunque VEGF actúa como un potente factor angiogénico (Bates y Harper, 2002; Bird *et al.*, 2000; Brownbill *et al.*, 2007), también se ha descrito una interacción con una amplia gama de células no endoteliales que expresan receptores de VEGF (Claesson-Welsh, 2016; Brown *et al.*, 2019). La evidencia de tal supuesto es la detección de transcritos del sistema receptor de VEGF en embriones de cerdo durante las etapas de cigoto a blastocito, en las que no tiene lugar una angiogénesis activa (Biswas *et al.*, 2011). En otros términos, VEGF podría estar jugando otro papel durante la peri-implantación además de la ya conocida respuesta angiogénica. En el presente estudio, al confirmar la presencia del ligando y su receptor VEGFR-2 en el músculo liso de miometrio y vasos sanguíneos, suma evidencia a la especulación de que VEGF podría actuar también como factor autócrino o parácrino en células del músculo liso además de su efecto mitogénico endotelial. En este sentido, estudios previos han descrito un efecto sinérgico entre el VEGF y los factores de crecimiento liberados por las células endoteliales, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y el factor de crecimiento transformante, los cuales pueden inducir indirectamente la migración y proliferación de células del músculo liso (Couper *et al.*, 1997; Cucina *et al.*, 2003). Por otra parte,

se ha referido que VEGF podría actuar como un factor de supervivencia al inhibir la apoptosis de las células endoteliales (Gerber *et al.*, 1998a).

Durante la peri-implantación, la morfología del concepto, así como la arquitectura endometrial exhiben cambios críticos (Waclawik *et al.*, 2017), los cuales incluyen un desarrollo, remodelación y aumento en la permeabilidad vascular uterina; eventos que son precisos para el establecimiento de la gestación y el desarrollo del concepto (Dantzer y Leiser, 1994; Su *et al.*, 2011). Asimismo, se ha determinado que la vascularización uterina está directamente relacionada a una buena perfusión, la cual parece estar regulando la receptividad endometrial (Nardo, 2005); por lo que un flujo sanguíneo deficiente conduce a fallas reproductivas. Un estudio previo en cerdos confirmó un alto nivel de expresión de ARNm de VEGF en el día 25 de gestación en tejido endometrial (Kaczmarek *et al.*, 2009). Otras especies como caballos (Silva *et al.*, 2011), conejos (Das *et al.*, 1997) y ratones (Halder *et al.*, 2000), han informado una alta expresión de ARNm de VEGF y sus receptores en el tejido endometrial durante la peri-implantación. Por el contrario, en los resultados del presente trabajo se encontraron niveles constantes de expresión de ARNm de VEGF, con una regulación al alza significativa hasta el día 18 de gestación. En cuanto a los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, se encontró un patrón casi idéntico en los niveles de expresión de ARNm, presentándose un aumento significativo hasta el día 18 de gestación. Aunque se utilizó una muestra conjunta de tejido uterino para determinar la expresión de ARNm en el presente estudio, experimentos previos en ratones señalaron un acúmulo de ARNm de VEGF en células del epitelio luminal y estroma, mientras que VEGFR-1 y VEGFR-2 solo se encontraron en células del estroma (Chakraborty *et al.*, 1995; Halder *et al.*, 2000; Kaczynski *et al.*, 2016). Las funciones y propiedades de señalización de VEGFR-1 se ha visto, dependen de la etapa de desarrollo y tipo celular donde se esté expresando (Ferrara *et al.*, 2003); se tiene conocimiento de que la angiogénesis inicia con la producción de proteasas en las células endoteliales estimuladas, que degradan su membrana basal circundante para iniciar procesos de migración celular (Moses, 1997); la expresión de VEGFR-1 se ha relacionado con la inducción de

MMP-9, por lo que este receptor podría tener un rol en la angiogénesis temprana (Hiratsuka *et al.*, 2002). Referente a VEGFR-2, se han propuesto que las células endoteliales responden principalmente a través de la activación y señalización de dicho receptor, como mediador primordial de los efectos de migración, proliferación o diferenciación de las células endoteliales (Rahimi *et al.*, 2000; Ferrara *et al.*, 2003).

Un mecanismo de VEGF que contribuye a la implantación, es la regulación de las capacidades de transporte celular a través del incremento en la permeabilidad (Winther *et al.*, 1999); esto se ha comprobado mediante la reducción de la permeabilidad vascular endometrial y sitios de implantación de embriones, en respuesta a la administración de un anticuerpo anti-VEGF (Rabbani y Rogers, 2001). El aumento en la permeabilidad de vasos sanguíneos mediado por VEGF, puede facilitar como se mencionó previamente, el acceso a factores séricos esenciales para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Connolly, 1991); esta capacidad se ha visto, es única de VEGF (Murohara *et al.*, 1998).

Entre los días 10 y 13 de gestación, los estrógenos de origen embrionario incrementan con un patrón de liberación bifásico, con el fin de llevar a cabo el reconocimiento materno de la gestación en el cerdo (Bazer y Johnson, 2014d; Cole y Foxcroft, 2013). Estudios previos han reportado en el día 12 de gestación, un aumento en la expresión de receptores a estradiol localizados en epitelio luminal y glandular, además de un incremento en el suministro de sangre en respuesta a estrógenos embrionarios (Ford *et al.*, 1982). La evidencia sugiere que el aumento en la expresión de VEGF y la regulación de la angiogénesis durante la peri-implantación, está mediada indirectamente por los estrógenos (Lebovic *et al.*, 2000). Investigaciones previas, coinciden al indicar una dependencia y supresión de la expresión de VEGF en ausencia de estradiol, en tejido endometrial (Nayak y Brenner, 2002).

El incremento progresivo de VEGF y sus receptores observado en los días de gestación de estudio, sugiere que la permeabilidad vascular y la densidad de vasos sanguíneos endometriales aumentan a medida que avanza la gestación para contribuir a mejorar la vascularización endometrial (Vonnahme *et al.*, 2001). En las

cerdas, existe una correlación positiva entre un acrecentamiento progresivo de la densidad de vasos sanguíneos uterinos y la expresión de VEGF (Vonnahme y Ford, 2004). Algo similar ocurre en las vacas, donde el número de vasos sanguíneos endometriales aumenta desde el día 15 hasta el día 18 de gestación (Hayashi *et al.*, 2019). Aunque la hipoxia es un fuerte estímulo para la expresión de VEGF y sus receptores (Gerber *et al.*, 1997; Ferrara, 1999), se puede suponer lógicamente que la creciente demanda de nutrientes y oxígeno por parte del embrión a medida que se desarrolla, hace que los tejidos adyacentes se tornen hipóxicos, un fenómeno teóricamente compensado por angiogénesis activa. Esta hipótesis podría estar respaldada por nuestros resultados, dado el aumento significativo en la expresión de VEGF observado en el día 18 de gestación.

Con base en los patrones de localización de la proteína y la expresión del ARNm de VEGF, los hallazgos presentados podrían indicar que VEGF y sus receptores juegan un papel en la proliferación, supervivencia y mayor viabilidad de la células endoteliales, así como en la regulación parácrina de funciones adicionales del ligando en los tipos celulares no endoteliales como epitelio luminal, glandular, estroma y miometrio, en apoyo a la implantación y viabilidad de los embriones durante la fase de peri-implantación, ya que una desregulación en tales eventos endoteliales y epiteliales tempranos puede conducir a pérdidas espontáneas.

Estudios previos han demostrado que el bloqueo de la vía de señalización del receptor VEGFR-2 utilizando inhibidores selectivos de molécula pequeña como SU5416 conduce a la inhibición de la proliferación de células endoteliales (Fong *et al.*, 1999; Lund *et al.*, 2003). Hasta donde sabemos, el presente estudio reveló por primera vez una diferencia significativa en la expresión del receptor VEGFR-2 en las células epiteliales endometriales, disminuyendo de manera dependiente de la dosis, a medida que aumentaba la concentración de SU5416. Adicionalmente, se observó una disminución significativa en la expresión del ARNm de VEGFR-1 en las células epiteliales endometriales tratadas con SU5416. Este efecto podría esperarse dada la homología sustancial de aminoácidos en el sitio de unión de ATP entre los receptores de VEGF (Rahimi, 2006b). Finalmente, nuestros resultados

concuerdan con estudios previos en los que se bloqueó la actividad de VEGFR-1 en las células endoteliales utilizando el inhibidor SU5416 (Kendall y Thomas, 1993).

Aunque la inactivación de VEGF es letal durante las primeras semanas postnatales, la inhibición de VEGF en animales mayores es mucho menos traumática y parece afectar sólo aquellas estructuras que continúan experimentando remodelación vascular, como el endometrio (Ferrara *et al.*, 1998). Un estudio anterior demostró que la administración de dosis bajas de SU5416 es eficaz a pesar de tener una vida media plasmática corta, lo que promueve una actividad inhibitoria de larga duración *in vitro* (Mendel *et al.*, 2000b). En el presente estudio se comprobó que SU5416 ejerce un efecto sobre la expresión de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 *in vitro* tras un tratamiento de 48 horas en cultivo debido a su capacidad para inhibir específicamente su fosforilación y posterior señalización.

VEGF y FGF, así como sus RTK, juegan un papel clave en la angiogénesis parácrina y el mantenimiento vascular (Jin *et al.*, 2011). En el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen FGF2 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5415. Estos resultados concuerdan con aquellos reportados previamente en células endoteliales, donde se observó que SU5416 tiene un efecto débil sobre FGF (Fong *et al.*, 1999; Mendel *et al.*, 2000a). Además, como se describió previamente, una de las vías de señalización de VEGF, vía VEGFR-2, es la supervivencia células a través de la inducción de proteínas antiapoptóticas como BAX y BCL-2 en células endoteliales (Cucina *et al.*, 2003). Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la expresión del ARNm de BAX y BCL-2 en las células epiteliales tratadas con SU5416. La misma observación se detectó en la expresión de CASP3, una proteína ejecutora involucrada en la vía de señalización de la apoptosis (Jung *et al.*, 2021). El presente estudio respalda a SU5416 como un inhibidor específico de la actividad de la tirosina quinasa de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en células no endoteliales que expresan el sistema ligando receptor de VEGF, como las células epiteliales del endometrio de

cerdo a nivel *in vitro*, lo que sugiere que podría influir en la señalización parácrina para la formación de nuevos vasos sanguíneos o en la permeabilidad vascular.

7.1 Conclusiones

Este estudio proporciona evidencia adicional en relación a los patrones de localización de la proteína y la expresión del ARNm de VEGF y sus receptores, dichos hallazgos podrían indicar que el sistema VEGF juega un papel en la proliferación, permeabilidad y viabilidad de las células endoteliales, así como en la regulación parácrina de funciones adicionales del ligando en los tipos celulares no endoteliales donde se comprobó, poseen reacción positiva como el caso del epitelio luminal, glandular, estroma y miometrio, para asegurar la comunicación materno-embriónica en tejido endotelial y no endotelial, en apoyo a la implantación. Además, respalda por primera vez a SU5416 como un inhibidor específico de la actividad de la tirosina quinasa de los receptores de VEGF en células no endoteliales a nivel *in vitro*, lo que propone que podría influir en la señalización parácrina para la formación de nuevos vasos sanguíneos o en la permeabilidad vascular. Finalmente, se considera que se requieren más estudios para dilucidar los efectos específicos de VEGF y sus receptores en los diferentes tipos celulares donde se expresan, así como la identificación de potenciales factores de crecimiento asociados a VEGF en la angiogénesis endometrial durante la peri-implantación.

8 Referencias

- Abbot, P., Rokas, A., 2017. Mammalian pregnancy. *Current Biology* 27, R127–R128. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.046>
- Abedi, H., Zachary, I., 1997. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 15442–15451. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15442>
- Ahmed, A., Li, X.F., Dunk, C., Whittle, M.J., Rushton, D.I., Rollason, T., 1995. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 12, 235–243.
- Albrecht, E.D., Babischkin, J.S., Lidor, Y., Anderson, L.D., Udoff, L.C., Pepe, G.J., 2003. Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. *Human Reproduction* 18, 2039–2047. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg415>
- Albuquerque, R.J.C., Hayashi, T., Cho, W.G., Kleinman, M.E., Dridi, S., Takeda, A., Baffi, J.Z., Yamada, K., Kaneko, H., Green, M.G., Chappell, J., Wilting, J., Weich, H.A., Yamagami, S., Amano, S., Mizuki, N., Alexander, J.S., Peterson, M.L., Brekken, R.A., Hirashima, M., Capoor, S., Usui, T., Ambati, B.K., Ambati, J., 2009. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nature Medicine* 15, 1023–1030. <https://doi.org/10.1038/nm.2018>
- Almeida, F.R.C.L., Dias, A.L.N.A., 2022. Pregnancy in pigs: the journey of an early life. *Domestic Animal Endocrinology* 78, 106656. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106656>
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., Keshet, E., 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Medicine* 1, 1024–1028. <https://doi.org/10.1038/nm1095-1024>
- Anthony, F.W., Wheeler, T., Elcock, C.L., Pickett, M., Thomas, E.J., 1994. Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts. *Placenta* 15, 557–561. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(05\)80424-2](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(05)80424-2)
- Aplin, J.D., Kimber, S.J., 2004. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2, 48. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-48>
- Armulik, A., Abramsson, A., Betsholtz, C., 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation Research* 97, 512–523. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>
- Asano, M., Yukita, A., Matsumoto, T., Kondo, S., Suzuki, H., 1995. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor121. *Cancer Research* 55, 5296–5301.
- Bacha, W.J., Bacha, L.M., 2001. Atlas a color de histologia veterinaria 2 Ed. Inter-Medica.
- Bates, D.O., Harper, S.J., 2002. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascular Pharmacology, Endothelial Hyperpermeability in Vascular Leakage* 39, 225–237. [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(03\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(03)00011-9)
- Bazer, F.W., Johnson, G.A., 2014a. Pig blastocyst–uterine interactions. *Differentiation, Exotic Animals in Development* 87, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.11.005>
- Bazer, F.W., Johnson, G.A., 2014b. Pig blastocyst-uterine interactions. *Differentiation* 87, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.11.005>
- Bazer, F.W., Johnson, G.A., 2014c. Pig blastocyst-uterine interactions. *Differentiation* 87, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.11.005>
- Bazer, F.W., Johnson, G.A., 2014d. Pig blastocyst-uterine interactions. *Differentiation* 87, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.11.005>
- Bazer, F.W., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., 2011. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)* 3, 745–767.

- Bazer, F.W., Thatcher, W.W., 1977. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen-controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F₂alpha by the uterine endometrium. *Prostaglandins* 14, 397–400.
- Becsek, A., Tzanidakis, N., Blanco, M., Schmicke, M., Bollwein, H., 2021. Transrectal three-dimensional fetal volumetry in early pregnant mares: Relationships between maternal factors and equine fetal volume measurements. *Theriogenology* 174, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.003>
- Betsholtz, C., 2004. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 215–228. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.005>
- Binder, N.K., Evans, J., Gardner, D.K., Salamonsen, L.A., Hannan, N.J., 2014. Endometrial signals improve embryo outcome: functional role of vascular endothelial growth factor isoforms on embryo development and implantation in mice. *Human Reproduction* 29, 2278–2286. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu211>
- Binder, N.K., Evans, J., Salamonsen, L.A., Gardner, D.K., Kaitu'u-Lino, T.J., Hannan, N.J., 2016. Placental Growth Factor Is Secreted by the Human Endometrium and Has Potential Important Functions during Embryo Development and Implantation. *PLoS One* 11, e0163096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163096>
- Bird, I.M., Sullivan, J.A., Di, T., Cale, J.M., Zhang, L., Zheng, J., Magness, R.R., 2000. Pregnancy-dependent changes in cell signaling underlie changes in differential control of vasodilator production in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 141, 1107–1117. <https://doi.org/10.1210/endo.141.3.7367>
- Biswas, D., Jung, E.M., Jeung, E.B., Hyun, S.H., 2011. Effects of vascular endothelial growth factor on porcine preimplantation embryos produced by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 75, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.012>
- Blackwell, D.M., Speth, R.C., Mirando, M.A., 2003. Morphometric analysis of the uterine endometrium of swine on days 12 and 16 postestrus. *The Anatomical Record A Discoveries Molecular Cellular and Evolutionary Biology* 270, 59–66. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10182>
- Blitek, A., Morawska, E., Ziecik, A.J., 2012. Regulation of expression and role of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in the uterus of early pregnant pigs. *Theriogenology* 78, 951–964. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.016>
- Bowen, J.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., 1997. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vitro. *Biology and Reproduction* 56, 409–415. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.2.409>
- Brayman, M., Thathiah, A., Carson, D.D., 2004. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2, 4. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-4>
- Brazil, D.P., Hemmings, B.A., 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 657–664. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01958-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01958-2)
- Brown, L.F., Detmar, M., Tognazzi, K., Abu-Jawdeh, G., Iruela-Arispe, L., 2019. Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Laboratory Investigation* 76, 245–255.
- Brownbill, P., McKeeman, G.C., Brockelsby, J.C., Crocker, I.P., Sibley, C.P., 2007. Vasoactive and Permeability Effects of Vascular Endothelial Growth Factor-165 in the Term in Vitro Dually Perfused Human Placental Lobule. *Endocrinology* 148, 4734–4744. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0180>
- Campo, H., Baptista, P.M., López-Pérez, N., Faus, A., Cervelló, I., Simón, C., 2017. De- and recellularization of the pig uterus: a bioengineering pilot study. *Biology of Reproduction* 96, 34–45. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.143396>
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.-G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysen, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., Ruiter, M.C. de, Groot, A.G., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.-M., Collen, D., Dejana, E., 1999. Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-

- cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis. *Cell* 98, 147–157. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81010-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81010-7)
- Carter, A.M., Enders, A.C., 2013. The evolution of epitheliochorial placentation. *Annual Review Animal Biosciences* 1, 443–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103653>
- Cébe-Suarez, S., Zehnder-Fjällman, A., Ballmer-Hofer, K., 2006. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 601–615. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5426-3>
- Chakraborty, I., Das, S.K., Dey, S.K., 1995. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *Journal of Endocrinology* 147, 339–352. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1470339>
- Charnock-Jones, D.S., Sharkey, A.M., Rajput-Williams, J., Burch, D., Schofield, J.P., Fountain, S.A., Boocock, C.A., Smith, S.K., 1993. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biology of Reproduction* 48, 1120–1128. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.5.1120>
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532–534, 536–537.
- Claesson-Welsh, L., 2016. VEGF receptor signal transduction - A brief update. *Vascular Pharmacology* 86, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.011>
- Clark, D.E., Smith, S.K., He, Y., Day, K.A., Licence, D.R., Corps, A.N., Lammoglia, R., Charnock-Jones, D.S., 1998. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biology of Reproduction* 59, 1540–1548. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1540>
- Cole, D.J.A., Foxcroft, G.R., 2013. *Control of Pig Reproduction*. Butterworth-Heinemann.
- Conley, A.J., Ford, S.P., 1989. Direct luteotrophic effect of oestradiol-17 β on pig corpora lutea. *Reproduction* 87, 125–131. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870125>
- Connolly, D.T., 1991. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *Journal of Cellular Biochemistry*. 47, 219–223. <https://doi.org/10.1002/jcb.240470306>
- Cooke, P.S., Spencer, T.E., Bartol, F.F., Hayashi, K., 2013. Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Molecular Human Reproduction* 19, 547–558. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat031>
- Couper Leslie L., Bryant Shane R., Eldrup-Jørgensen Jens, Bredenberg Carl E., Lindner Volkhard, 1997. Vascular Endothelial Growth Factor Increases the Mitogenic Response to Fibroblast Growth Factor-2 in Vascular Smooth Muscle Cells In Vivo via Expression of fms-Like Tyrosine Kinase-1. *Circulation Research* 81, 932–939. <https://doi.org/10.1161/01.RES.81.6.932>
- Coy, P., Avilés, M., 2010. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 85, 593–605. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00117.x>
- Critchley, H.O., Brenner, R.M., Henderson, T.A., Williams, K., Nayak, N.R., Slayden, O.D., Millar, M.R., Saunders, P.T., 2001. Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 1370–1378. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.3.7317>
- Cross, M.J., Dixelius, J., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Science* 28, 488–494. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00193-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00193-2)
- Croy, B.A., Wessels, J.M., Linton, N.F., van den Heuvel, M., Edwards, A.K., Tayade, C., 2009. Cellular and molecular events in early and mid-gestation porcine implantation sites: a review. *Society for Reproduction Fertility Supplement journal* 66, 233–244.
- Cucina, A., Borrelli, V., Randone, B., Coluccia, P., Sapienza, P., Cavallaro, A., 2003. Vascular endothelial growth factor increases the migration and proliferation of smooth muscle cells through the mediation of growth factors released by endothelial cells. *Journal of Surgical Research* 109, 16–23. [https://doi.org/10.1016/S0022-4804\(02\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0022-4804(02)00042-2)

- Cudmore, M.J., Hewett, P.W., Ahmad, S., Wang, K.-Q., Cai, M., Al-Ani, B., Fujisawa, T., Ma, B., Sissaoui, S., Ramma, W., Miller, M.R., Newby, D.E., Gu, Y., Barleon, B., Weich, H., Ahmed, A., 2012. The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nature Communications* 3, 972. <https://doi.org/10.1038/ncomms1977>
- Cullinan-Bove, K., Koos, R.D., 1993. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 133, 829–837. <https://doi.org/10.1210/endo.133.2.8344219>
- Dantzer, V., Leiser, R., 1994. Initial vascularisation in the pig placenta: I. Demonstration of nonglandular areas by histology and corrosion casts. *The Anatomical Record* 238, 177–190. <https://doi.org/10.1002/ar.1092380204>
- Das, S.K., Chakraborty, I., Wang, J., Dey, S.K., Hoffman, L.H., 1997. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor messenger ribonucleic acids in the peri-implantation rabbit uterus. *Biology of Reproduction* 56, 1390–1399. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.6.1390>
- Davis-Smyth, T., Chen, H., Park, J., Presta, L.G., Ferrara, N., 1996. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO Journal* 15, 4919–4927.
- de Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., Williams, L.T., 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989–991. <https://doi.org/10.1126/science.1312256>
- Doanes, A.M., Hegland, D.D., Sethi, R., Kovsdi, I., Bruder, J.T., Finkel, T., 1999. VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 255, 545–548. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0227>
- Dosch, D.D., Ballmer-Hofer, K., 2010. Transmembrane domain-mediated orientation of receptor monomers in active VEGFR-2 dimers. *FASEB Journal* 24, 32–38. <https://doi.org/10.1096/fj.09-132670>
- Duval, M., Bédard-Goulet, S., Delisle, C., Gratton, J.-P., 2003. Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination. Consequences on nitric oxide production from endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 20091–20097. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301410200>
- Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., Dvorak, A.M., 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *American Journal of Pathology* 146, 1029–1039.
- Edwards, A.K., van den Heuvel, M.J., Wessels, J.M., Lamarre, J., Croy, B.A., Tayade, C., 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, 5. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-5>
- Eliceiri, B.P., Paul, R., Schwartzberg, P.L., Hood, J.D., Leng, J., Cheresh, D.A., 1999. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Molecular Cell* 4, 915–924. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80221-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80221-x)
- Evans, A.C.O., O'Doherty, J.V., 2001. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. *Livestock Production Science* 68, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00202-5](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00202-5)
- Ferrara, N., 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 25, 581–611. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0027>
- Ferrara, N., 1999. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Journal of Molecular Medicine* 77, 527–543. <https://doi.org/10.1007/s001099900019>
- Ferrara, N., Adamis, A.P., 2016. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 15, 385–403. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.17>

- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., Moore, M.W., 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439–442. <https://doi.org/10.1038/380439a0>
- Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H.P., Nguyen, T.N., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K.J., Schwall, R.H., 1998. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine* 4, 336–340. <https://doi.org/10.1038/nm0398-336>
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., LeCouter, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9, 669–676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>
- Ferrara, N., Houck, K.A., Jakeman, L.B., Winer, J., Leung, D.W., 1991a. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *Journal of Cellular Biochemistry* 47, 211–218. <https://doi.org/10.1002/jcb.240470305>
- Ferrara, N., Leung, D.W., Cachianes, G., Winer, J., Henzel, W.J., 1991b. Purification and cloning of vascular endothelial growth factor secreted by pituitary folliculostellate cells. *Methods in Enzymology* 198, 391–405. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)98040-d](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)98040-d)
- Fong, G.-H., Rossant, J., Gertsenstein, M., Breitman, M.L., 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66–70. <https://doi.org/10.1038/376066a0>
- Fong, G.H., Zhang, L., Bryce, D.M., Peng, J., 1999. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126, 3015–3025.
- Fong, T.A., Shawver, L.K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T.J., Kim, Y.H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., Ullrich, A., Hirth, K.P., McMahon, G., 1999. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59, 99–106.
- Ford, S.P., Reynolds, L.P., Magness, R.R., 1982. Blood flow to the uterine and ovarian vascular beds of gilts during the estrous cycle or early pregnancy. *Biology of Reproduction* 27, 878–885.
- Foxcroft, G.R., Silva, P.V., Paradis, F., 2016. Application of transcriptomic analyses to reproductive studies in contemporary commercial sows. *Theriogenology* 85, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.017>
- Fraser, H.M., Lunn, S.F., 2000. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *British Medical Bulletin* 56, 787–797. <https://doi.org/10.1258/0007142001903364>
- Freshney, R.I., 2016. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Edición: 7th Revised ed. ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey.
- Fuh, G., Li, B., Crowley, C., Cunningham, B., Wells, J.A., 1998. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *Journal of Cellular Biochemistry* 273, 11197–11204. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11197>
- Gallicchio, M., Mitola, S., Valdembrì, D., Fantozzi, R., Varnum, B., Avanzi, G.C., Bussolino, F., 2005. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood* 105, 1970–1976. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1469>
- Gambino, L.S., Wreford, N.G., Bertram, J.F., Dockery, P., Lederman, F., Rogers, P.A.W., 2002. Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Human Reproduction* 17, 1199–1206. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.5.1199>
- Gampel, A., Moss, L., Jones, M.C., Brunton, V., Norman, J.C., Mellor, H., 2006. VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood* 108, 2624–2631. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-007484>
- García Fernández, R.A., Sánchez Pérez, M.A., Sánchez Maldonado, B., García-Palencia, P., Naranjo Freixa, C., Palomo Yagüe, A., Flores, J.M., 2015. Iberian pig early pregnancy: vascular endothelial growth factor receptor system expression in the maternofetal interface in healthy and arresting conceptuses. *Theriogenology* 83, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.046>

- Garverick, H.A., Polge, C., Flint, A.P.F., 1982. Oestradiol administration raises luteal LH receptor levels in intact and hysterectomized pigs. *Reproduction* 66, 371–377. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0660371>
- Geisert, R.D., Bazer, F.W. (Eds.), 2015. Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals: Tribute to 45 Year Anniversary of Roger V. Short's "Maternal Recognition of ... in Anatomy, Embryology and Cell Biology), 1st ed. 2015 edition. ed. Springer, New York, NY.
- Geisert, R.D., Brookbank, J.W., Michael Roberts, R., Bazer, F.W., 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, 941–955. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.4.941>
- Geisert, R.D., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., 2015. Implantation and Establishment of Pregnancy in the Pig. *Advances in Anatomy Embryology Cell Biology* 216, 137–163. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15856-3_8
- Geisert, R.D., Lucy, M.C., Whyte, J.J., Ross, J.W., Mathew, D.J., 2014. Cytokines from the pig conceptus: roles in conceptus development in pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5, 51. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-51>
- Geisert, R.D., Pratt, T.N., Bazer, F.W., Mayes, J.S., Watson, G.H., 1994. Immunocytochemical localization and changes in endometrial progesterin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development* 6, 749–760. <https://doi.org/10.1071/rd9940749>
- Geisert, R. D., Renegar, R.H., Thatcher, W.W., Roberts, R.M., Bazer, F.W., 1982. Establishment of pregnancy in the pig: I. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. *Biology of Reproduction* 27, 925–939.
- Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J., Ferrara, N., 1997. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 272, 23659–23667. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23659>
- Gerber, H.-P., Dixit, V., Ferrara, N., 1998a. Vascular Endothelial Growth Factor Induces Expression of the Antiapoptotic Proteins Bcl-2 and A1 in Vascular Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13313–13316. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.13313>
- Gerber, H.P., Hillan, K.J., Ryan, A.M., Kowalski, J., Keller, G.A., Rangell, L., Wright, B.D., Radtke, F., Aguet, M., Ferrara, N., 1999. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126, 1149–1159.
- Gerber, H.-P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., Ferrara, N., 1998b. Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway: REQUIREMENT FOR Flk-1/KDR ACTIVATION*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 30336–30343. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30336>
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C., 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology* 161, 1163–1177.
- Gil Corbalán, M.A., Cuello Medina, C., Parrilla Riera, I., 2009. Fisiología del tracto genital de la cerda y el verraco. *Anaporc: revista de la Asociación de Porcinocultura Científica* 6, 24–31.
- Gilbert, S.F., 2000. Oogenesis, in: *Developmental Biology*. 6th Edition. Sinauer Associates.
- Giles, F.J., Stopeck, A.T., Silverman, L.R., Lancet, J.E., Cooper, M.A., Hannah, A.L., Cherrington, J.M., O'Farrell, A.-M., Yuen, H.A., Louie, S.G., Hong, W., Cortes, J.E., Verstovsek, S., Albitar, M., O'Brien, S.M., Kantarjian, H.M., Karp, J.E., 2003. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood* 102, 795–801. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3023>
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T.F., Pelletier, N., Ferrara, N., 2001. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *Journal of Biological Chemistry* 276, 3222–3230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002016200>

- Gille, H., Kowalski, J., Yu, L., Chen, H., Pisabarro, M.T., Davis-Smyth, T., Ferrara, N., 2000. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *EMBO J* 19, 4064–4073. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.4064>
- Ginther, O.J., 1981. Local versus systemic uteroovarian relationships in farm animals. *Acta Veterinaria Scandinavica Suppl* 77, 103–115.
- Girling, J.E., Rogers, P.A.W., 2009. Regulation of endometrial vascular remodelling: role of the vascular endothelial growth factor family and the angiopoietin-TIE signalling system. *Reproduction* 138, 883–893. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0147>
- Girling, J.E., Rogers, P.A.W., 2005. Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis* 8, 89–99. <https://doi.org/10.1007/s10456-005-9006-9>
- Gitay-Goren, H., Soker, S., Vlodaysky, I., Neufeld, G., 1992. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *Journal of Biological Chemistry* 267, 6093–6098.
- Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y., Neufeld, G., 2000. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]. *Journal of Biological Chemistry* 275, 18040–18045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909259199>
- Graubert, M.D., Ortega, M.A., Kessel, B., Mortola, J.F., Iruela-Arispe, M.L., 2001. Vascular repair after menstruation involves regulation of vascular endothelial growth factor-receptor phosphorylation by sFLT-1. *American Journal of Pathology* 158, 1399–1410. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64091-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64091-6)
- Gray, C.A., Taylor, K.M., Ramsey, W.S., Hill, J.R., Bazer, F.W., Bartol, F.F., Spencer, T.E., 2001. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biology of Reproduction* 64, 1608–1613. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1608>
- Grazul-Bilska, A.T., Borowicz, P.P., Johnson, M.L., Minten, M.A., Bilski, J.J., Wroblewski, R., Redmer, D.A., Reynolds, L.P., 2010. Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. *Reproduction* 140, 165–174. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0548>
- Green, M.L., Simmen, R.C., Simmen, F.A., 1995. Developmental regulation of steroidogenic enzyme gene expression in the periimplantation porcine conceptus: a paracrine role for insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 136, 3961–3970. <https://doi.org/10.1210/endo.136.9.7649105>
- Guo, D., Jia, Q., Song, H.Y., Warren, R.S., Donner, D.B., 1995. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 270, 6729–6733. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6729>
- Guzewska, M.M., Szuszkiewicz, J., Kaczmarek, M.M., 2023. Extracellular vesicles: Focus on peri-implantation period of pregnancy in pigs. *Molecular Reproduction and Development* <https://doi.org/10.1002/mrd.23664>
- Halder, J.B., Zhao, X., Soker, S., Paria, B.C., Klagsbrun, M., Das, S.K., Dey, S.K., 2000. Differential expression of VEGF isoforms and VEGF(164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF(164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. *Genesis* 26, 213–224.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., 1991. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods in Enzymology* 200, 38–62. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)00126-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)00126-h)
- Hannan, N.J., Paiva, P., Meehan, K.L., Rombauts, L.J.F., Gardner, D.K., Salamonsen, L.A., 2011. Analysis of fertility-related soluble mediators in human uterine fluid identifies VEGF as a key regulator of embryo implantation. *Endocrinology* 152, 4948–4956. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1248>
- Harper, S.J., Bates, D.O., 2008. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature Reviews Cancer* 8, 880–887. <https://doi.org/10.1038/nrc2505>
- Harrison-Woolrych, M.L., Sharkey, A.M., Charnock-Jones, D.S., Smith, S.K., 1995. Localization and quantification of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in human

- myometrium and leiomyomata. *Journal Clinical Endocrinology & Metabolism* 80, 1853–1858. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.6.7775632>
- Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Bohlen, P., Witte, L., Hendrikx, J., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Moore, M.A.S., Werb, Z., Lyden, D., Rafii, S., 2002. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature Medicine* 8, 841–849. <https://doi.org/10.1038/nm740>
- Hayashi, K.-G., Hosoe, M., Fujii, S., Kanahara, H., Sakumoto, R., 2019. Temporal expression and localization of vascular endothelial growth factor family members in the bovine uterus during peri-implantation period. *Theriogenology* 133, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.021>
- Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J.M., Senior, R.M., Shibuya, M., 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2, 289–300. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00153-8](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00153-8)
- Holmes, D.I., Zachary, I., 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology* 6, 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-209>
- Holmqvist, K., Cross, M.J., Rolny, C., Hägerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., Welsh, M., 2004. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *Journal of Biological Chemistry* 279, 22267–22275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312729200>
- Hornung, D., Lebovic, D.I., Shifren, J.L., Vigne, J.L., Taylor, R.N., 1998. Vectorial secretion of vascular endothelial growth factor by polarized human endometrial epithelial cells. *Fertility and Sterility* 69, 909–915. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00044-2)
- Houck, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M., Winer, J., Ferrara, N., 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 267, 26031–26037.
- Hubbard, S.R., 2004. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 464–471. <https://doi.org/10.1038/nrm1399>
- Hubbard, S.R., 1999. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 71, 343–358. [https://doi.org/10.1016/s0079-6107\(98\)00047-9](https://doi.org/10.1016/s0079-6107(98)00047-9)
- Hunter, R.H.F., 1994. Ovarian regulation of sperm progression in the Fallopian tubes. *Zygote* 2, 363–366. <https://doi.org/10.1017/S0967199400002227>
- Hunter, R.H.F., 1989. Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital tract. *Zoological Journal of the Linnean Society* 95, 117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1989.tb02304.x>
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F., Landry, J., 1997. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Research* 80, 383–392. <https://doi.org/10.1161/01.res.80.3.383>
- Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas (Wash.), Prophet, E.B., 1995. Métodos histotecnológicos. Registro de Patología, Washington.
- Iruela-Arispe, M.L., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Abu-Jawdeh, G., 1999. Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors. *Microcirculation* 6, 127–140.
- Ito, N., Huang, K., Claesson-Welsh, L., 2001. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. *Cell Signal* 13, 849–854. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(01\)00209-1](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(01)00209-1)
- Ito, T., Nokihara, H., Nishioka, Y., Sone, S., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Cherrington, J., McMahon, G., Shibuya, M., Kuwano, M., Ono, M., 2002. Antiangiogenic effect by SU5416 is partly attributable to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 295–302.

- Jaeger, L.A., Johnson, G.A., Ka, H., Garlow, J.G., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., Bazer, F.W., 2001. Functional analysis of autocrine and paracrine signalling at the uterine-conceptus interface in pigs. *Reproductive Health Supplies Coalition* 58, 191–207.
- Jaeger, L.A., Spiegel, A.K., Ing, N.H., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., 2005. Functional effects of transforming growth factor beta on adhesive properties of porcine trophoderm. *Endocrinology* 146, 3933–3942. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0090>
- Jakeman, L.B., Winer, J., Bennett, G.L., Altar, C.A., Ferrara, N., 1992. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *Journal of Clinical Investigation* 89, 244–253. <https://doi.org/10.1172/JCI115568>
- Jarrell, V.L., Day, B.N., Prather, R.S., 1991. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biology of Reproduction* 44, 62–68. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.1.62>
- Jin, Y.-Z., Fu, D.-X., Ma, N., Li, Z.-C., Liu, Q.-H., Xiao, L., Zhang, R.-H., 2011. Synthesis and biological evaluation of 3-substituted-indolin-2-one derivatives containing chloropyrrole moieties. *Molecules* 16, 9368–9385. <https://doi.org/10.3390/molecules16119368>
- Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., Wu, G., Bayless, K.J., 2009. Conceptus-uterus interactions in pigs: endometrial gene expression in response to estrogens and interferons from conceptuses. *Society for Reproduction and Fertility Supplement* 66, 321–332.
- Johnson, G.A., Bazer, F.W., Seo, H., 2021. The Early Stages of Implantation and Placentation in the Pig. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 234, 61–89. https://doi.org/10.1007/978-3-030-77360-1_5
- Joyce, M.M., Burghardt, R.C., Geisert, R.D., Burghardt, J.R., Hooper, R.N., Ross, J.W., Ashworth, M.D., Johnson, G.A., 2007. Pig conceptuses secrete estrogen and interferons to differentially regulate uterine STAT1 in a temporal and cell type-specific manner. *Endocrinology* 148, 4420–4431. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0505>
- Jung, W., Yoo, I., Han, J., Kim, M., Lee, S., Cheon, Y., Hong, M., Jeon, B.-Y., Ka, H., 2021. Expression of Caspases in the Pig Endometrium Throughout the Estrous Cycle and at the Maternal-Conceptus Interface During Pregnancy and Regulation by Steroid Hormones and Cytokines. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 641916. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.641916>
- Ka, H., Jaeger, L.A., Johnson, G.A., Spencer, T.E., Bazer, F.W., 2001. Keratinocyte growth factor is up-regulated by estrogen in the porcine uterine endometrium and functions in trophoderm cell proliferation and differentiation. *Endocrinology* 142, 2303–2310. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8194>
- Ka, H., Seo, H., Choi, Y., Yoo, I., Han, J., 2018. Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin-1 β at the time of implantation in pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 9, 44. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0259-8>
- Kaczmarek, M.M., Kiewisz, J., Schams, D., Ziecik, A.J., 2009. Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology* 71, 1298–1306. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.022>
- Kaczmarek, M.M., Waclawik, A., Blitek, A., Kowalczyk, A.E., Schams, D., Ziecik, A.J., 2008a. Expression of the vascular endothelial growth factor-receptor system in the porcine endometrium throughout the estrous cycle and early pregnancy. *Molecular Reproduction and Development* 75, 362–372. <https://doi.org/10.1002/mrd.20815>
- Kaczynski, P., Kowalewski, M.P., Waclawik, A., 2016. Prostaglandin F2 α promotes angiogenesis and embryo-maternal interactions during implantation. *Reproduction* 151, 539–552. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0496>
- Kanno, S., Oda, N., Abe, M., Terai, Y., Ito, M., Shitara, K., Tabayashi, K., Shibuya, M., Sato, Y., 2000. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 19, 2138–2146. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203533>

- Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A., Satow, Y., 1995. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Research* 55, 5687–5692.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Fujisawa, H., 1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126, 4895–4902. <https://doi.org/10.1242/dev.126.21.4895>
- Kayisli, U.A., Luk, J., Guzeloglu-Kayisli, O., Seval, Y., Demir, R., Arici, A., 2004. Regulation of angiogenic activity of human endometrial endothelial cells in culture by ovarian steroids. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89, 5794–5802. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030820>
- Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., Connolly, D.T., 1989. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309–1312. <https://doi.org/10.1126/science.2479987>
- Kendall, R.L., Thomas, K.A., 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 90, 10705–10709. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10705>
- Keys, J.L., King, G.J., 1989. Structural changes in the luminal epithelium of the porcine uterus between days 10 and 19 of the estrous cycle. *American Journal of Anatomy* 185, 42–57. <https://doi.org/10.1002/aja.1001850106>
- Keyt, B.A., Nguyen, H.V., Berleau, L.T., Duarte, C.M., Park, J., Chen, H., Ferrara, N., 1996. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 271, 5638–5646. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5638>
- Khakoo, A.Y., Finkel, T., 2005. Endothelial progenitor cells. *Annual Review of Medicine* 56, 79–101. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.090203.104149>
- Kim, Y.-J., Lee, G.-S., Hyun, S.-H., Ka, H.-H., Choi, K.-C., Lee, C.-K., Jeung, E.-B., 2009. Uterine expression of epidermal growth factor family during the course of pregnancy in pigs. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 797–804. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01082.x>
- Kimber, S.J., Spanswick, C., 2000. Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11, 77–92. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0154>
- King, B.F., 1993. Development and structure of the placenta and fetal membranes of nonhuman primates. *Journal of Experimental Zoology* 266, 528–540. <https://doi.org/10.1002/jez.1402660605>
- Knox, R.V., 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 85, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009>
- Knox, R.V., Rodriguez-Zas, S.L., Miller, G.M., Willenburg, K.L., Robb, J.A., 2001. Administration of p.g. 600 to sows at weaning and the time of ovulation as determined by transrectal ultrasound. *Journal of Animal Science* 79, 796–802. <https://doi.org/10.2527/2001.794796x>
- Koch, S., Claesson-Welsh, L., 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine* 2, a006502. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006502>
- Korpelainen, E.I., Karkkainen, M.J., Tenhunen, A., Lakso, M., Rauvala, H., Vierula, M., Parvinen, M., Alitalo, K., 1998. Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: evidence for nonendothelial targets for VEGF. *Journal of Cell Biology* 143, 1705–1712. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.6.1705>
- Kraeling, R.R., Webel, S.K., 2015. Current strategies for reproductive management of gilts and sows in North America. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6, 3. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-6-3>
- Krikun, G., Schatz, F., Taylor, R., Critchley, H.O.D., Rogers, P.A.W., Huang, J., Lockwood, C.J., 2005. Endometrial endothelial cell steroid receptor expression and steroid effects on gene expression. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90, 1812–1818. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1814>

- Krüssel, J.S., Behr, B., Milki, A.A., Hirschenhain, J., Wen, Y., Bielfeld, P., Polan, M.L., 2001. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Molecular Human Reproduction* 7, 57–63. <https://doi.org/10.1093/molehr/7.1.57>
- Kuwano, M., Ushiro, S., Ryuto, M., Samoto, K., Izumi, H., Ito, K.I., Abe, T., Nakamura, T., Ono, M., Kohno, K., 1994. Regulation of angiogenesis by growth factors. *Gann Monographs on Cancer Research* 42, 113–125.
- Lebovic, D.I., Shifren, J.L., Ryan, I.P., Mueller, M.D., Korn, A.P., Darney, P.D., Taylor, R.N., 2000. Ovarian steroid and cytokine modulation of human endometrial angiogenesis. *Human Reproduction* 15 Suppl 3, 67–77. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_3.67
- Lei, J., Jiang, A., Pei, D., 1998. Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1443, 400–406. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(98\)00240-1](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00240-1)
- Lessey, B.A., 2002. Adhesion molecules and implantation. *Journal of Reproductive Immunology* 55, 101–112. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(01\)00139-5](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(01)00139-5)
- Li, L., Lu, X., Dean, J., 2013. The Maternal to Zygotic Transition in Mammals. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 919–938. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.003>
- Linton, N.F., Wessels, J.M., Cnossen, S.A., van den Heuvel, M.J., Croy, B.A., Tayade, C., 2010. Angiogenic DC-SIGN(+) cells are present at the attachment sites of epitheliochorial placentae. *Immunol. Cell Biology*. 88, 63–71. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.62>
- Liu, Z.-J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G.P., Fairman, R.M., Velazquez, O.C., Herlyn, M., 2003. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 23, 14–25. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.14-25.2003>
- Llobat, L., 2020. Embryo gene expression in pig pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals* 55, 523–529. <https://doi.org/10.1111/rda.13647>
- López-García, M., Nowicka, M., Bendtsen, C., Lythe, G., Ponnambalam, S., Molina-París, C., 2018. Quantifying the phosphorylation timescales of receptor-ligand complexes: a Markovian matrix-analytic approach. *Open Biology* 8, 180126. <https://doi.org/10.1098/rsob.180126>
- Lund, E.L., Olsen, M.W.B., Lipson, K.E., McMahon, G., Howlett, A.R., Kristjansen, P.E.G., 2003. Improved effect of an antiangiogenic tyrosine kinase inhibitor (SU5416) by combinations with fractionated radiotherapy or low molecular weight heparin. *Neoplasia* 5, 155–160. [https://doi.org/10.1016/s1476-5586\(03\)80007-6](https://doi.org/10.1016/s1476-5586(03)80007-6)
- Ma, W., Tan, J., Matsumoto, H., Robert, B., Abrahamson, D.R., Das, S.K., Dey, S.K., 2001. Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Molecular Endocrinology* 15, 1983–1992. <https://doi.org/10.1210/mend.15.11.0734>
- Maru, Y., Yamaguchi, S., Shibuya, M., 1998. Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials. *Oncogene* 16, 2585–2595. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201786>
- Mathew, D.J., Newsom, E.M., Guyton, J.M., Tuggle, C.K., Geisert, R.D., Lucy, M.C., 2015. Activation of the transcription factor nuclear factor-kappa B in uterine luminal epithelial cells by interleukin 1 Beta 2: a novel interleukin 1 expressed by the elongating pig conceptus. *Biology of Reproduction* 92, 107. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.126128>
- Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., Wang, L., Wikner, C., Qi, J.H., Wernstedt, C., Wu, J., Bruheim, S., Mugishima, H., Mukhopadhyay, D., Spurkland, A., Claesson-Welsh, L., 2005. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *EMBO Journal* 24, 2342–2353. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600709>
- Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., 2001. VEGF receptor signal transduction. *Science's STKE* 2001, re21. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.112.re21>
- Meadows, K.N., Bryant, P., Pumiglia, K., 2001. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 49289–49298. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108069200>
- Megino-Luque, C., Moiola, C.P., Molins-Escuder, C., López-Gil, C., Gil-Moreno, A., Matias-Guiu, X., Colas, E., Eritja, N., 2020. Small-Molecule Inhibitors (SMIs) as an Effective Therapeutic

- Strategy for Endometrial Cancer. *Cancers* (Basel) 12, 2751. <https://doi.org/10.3390/cancers12102751>
- Mendel, D.B., Laird, A.D., Smolich, B.D., Blake, R.A., Liang, C., Hannah, A.L., Shaheen, R.M., Ellis, L.M., Weitman, S., Shawver, L.K., Cherrington, J.M., 2000a. Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an anti-angiogenesis agent. *Anticancer Drug Design* 15, 29–41.
- Mendel, D.B., Schreck, R.E., West, D.C., Li, G., Strawn, L.M., Tanciongco, S.S., Vasile, S., Shawver, L.K., Cherrington, J.M., 2000b. The angiogenesis inhibitor SU5416 has long-lasting effects on vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation and function. *Clinical Cancer Research* 6, 4848–4858.
- Meyer, A.E., Pfeiffer, C.A., Brooks, K.E., Spate, L.D., Benne, J.A., Cecil, R., Samuel, M.S., Murphy, C.N., Behura, S., McLean, M.K., Ciernia, L.A., Smith, M.F., Whitworth, K.M., Wells, K.D., Spencer, T.E., Prather, R.S., Geisert, R.D., 2019. New perspective on conceptus estrogens in maternal recognition and pregnancy establishment in the pig†. *Biology of Reproduction* 101, 148–161. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz058>
- Meyer, R.D., Singh, A.J., Rahimi, N., 2004. The carboxyl terminus controls ligand-dependent activation of VEGFR-2 and its signaling. *Journal of Biological Chemistry* 279, 735–742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305575200>
- Michell, B.J., Griffiths, J.E., Mitchelhill, K.I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Montellano, P.R., Kemp, B.E., Pearson, R.B., 1999. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current Biology* 9, 845–848. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80371-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80371-6)
- Miese-Looy, G., VAN DEN Heuvel, M.J., Edwards, A.K., Lamarre, J., Tayade, C., 2012. Expression of insulin-like growth factor (IGF) family members in porcine pregnancy. *Journal of Reproduction and Development* 58, 51–60.
- Millauer, B., Longhi, M.P., Plate, K.H., Shawver, L.K., Risau, W., Ullrich, A., Strawn, L.M., 1996. Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Research* 56, 1615–1620.
- Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H., Risau, W., Ullrich, A., 1994. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367, 576–579. <https://doi.org/10.1038/367576a0>
- Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., Møller, N.P., Risau, W., Ullrich, A., 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72, 835–846. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90573-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90573-9)
- Miralem, T., Steinberg, R., Price, D., Avraham, H., 2001. VEGF165 requires extracellular matrix components to induce mitogenic effects and migratory response in breast cancer cells. *Oncogene* 20, 5511–5524. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204753>
- Mitalipov, S., Wolf, D., 2009. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 114, 185–199. https://doi.org/10.1007/10_2008_45
- Moses, M.A., 1997. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 15, 180–189. <https://doi.org/10.1002/stem.150180>
- Muller, Y.A., Li, B., Christinger, H.W., Wells, J.A., Cunningham, B.C., de Vos, A.M., 1997. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proceeding National Academy Sciences USA* 94, 7192–7197. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7192>
- Murohara, T., Horowitz, J.R., Silver, M., Tsurumi, Y., Chen, D., Sullivan, A., Isner, J.M., 1998. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97, 99–107. <https://doi.org/10.1161/01.cir.97.1.99>
- Nardo, L.G., 2005. Vascular endothelial growth factor expression in the endometrium during the menstrual cycle, implantation window and early pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 17, 419–423. <https://doi.org/10.1097/01.gco.0000175362.12470.e0>

- Nayak, N.R., Brenner, R.M., 2002. Vascular proliferation and vascular endothelial growth factor expression in the rhesus macaque endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87, 1845–1855. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.4.8413>
- Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S., Tanne, K., Maeda, N., Nishikawa, S.-I., Kodama, H., 1999. Vascular Endothelial Growth Factor Can Substitute for Macrophage Colony-Stimulating Factor in the Support of Osteoclastic Bone Resorption. *Journal of Experimental Medicine* 190, 293–298.
- O'Donnell, A., Padhani, A., Hayes, C., Kakkar, A.J., Leach, M., Trigo, J.M., Scurr, M., Raynaud, F., Phillips, S., Aherne, W., Hardcastle, A., Workman, P., Hannah, A., Judson, I., 2005. A Phase I study of the angiogenesis inhibitor SU5416 (semaxanib) in solid tumours, incorporating dynamic contrast MR pharmacodynamic end points. *British Journal of Cancer* 93, 876–883. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602797>
- Okrasa, S., Franczak, A., Zmijewska, A., Wojciechowicz, B., Dziekoński, M., Martyniak, M., Kołakowska, J., Zglejc-Waszak, K., G., K., 2014. The uterine secretory activity and its physiological changes in the pig. *Acta Biol. Cracoviensia Series Zoologia* 55/56: 40-57. *Acta Biologica Cracoviensia Series Zoologia* 55.
- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L., 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 359–371. <https://doi.org/10.1038/nrm1911>
- Park, E., Cho, M., Ki, C.-S., 2009. Correct use of repeated measures analysis of variance. *Korean Journal of Laboratory Medicine* 29, 1–9. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.1.1>
- Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., Ferrara, N., 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry* 269, 25646–25654.
- Park, J.E., Keller, G.A., Ferrara, N., 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell* 4, 1317–1326. <https://doi.org/10.1091/mbc.4.12.1317>
- Park, S.A., Jeong, M.S., Ha, K.-T., Jang, S.B., 2018. Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system. *BMB Reports* 51, 73–78. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.2.233>
- Partanen, T.A., Paavonen, K., 2001. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microscopy Research and Technique* 55, 108–121. <https://doi.org/10.1002/jemt.1162>
- Perry, J.S., 1981. The mammalian fetal membranes. *Journal of Reproduction and Fertility* 62, 321–335. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0620321>
- Perry, J.S., Heap, R.B., Amoroso, E.C., 1973. Steroid Hormone Production by Pig Blastocysts. *Nature* 245, 45–47. <https://doi.org/10.1038/245045a0>
- Peters, K.G., De Vries, C., Williams, L.T., 1993. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proceeding National Academy Sciences USA* 90, 8915–8919. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.8915>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pfarrer, C.D., Ruziwa, S.D., Winther, H., Callesen, H., Leiser, R., Schams, D., Dantzer, V., 2006. Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in bovine placentomes from implantation until term. *Placenta* 27, 889–898. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.09.004>
- Plouët, J., Schilling, J., Gospodarowicz, D., 1989. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO Journal* 8, 3801–3806.
- Rangel, L.P., Juan H. Hernández, 2021. Fisiología reproductiva. Animales domésticos, *Alttexto | Red de trabajo formada por los representantes de las instituciones de educación superior (IES). Universidad Nacional Autónoma de México.*

- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., Rusnati, M., 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.004>
- Rabbani, M.L., Rogers, P.A., 2001. Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* 122, 85–90. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220085>
- Rahimi, N., 2006a. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Frontiers in Bioscience* 11, 818–829.
- Rahimi, N., 2006b. Vascular endothelial growth factor receptors: Molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. *Experimental Eye Research* 83, 1005–1016. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.03.019>
- Rahimi, N., Dayanir, V., Lashkari, K., 2000. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *Journal of Biology Chemistry* 275, 16986–16992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000528200>
- Ramakrishnan, S., Anand, V., Roy, S., 2014. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *Journal Neuroimmune Pharmacology* 9, 142–160. <https://doi.org/10.1007/s11481-014-9531-7>
- Roberts, R.M., Xie, S., Trout, W.E., 1993. Embryo-uterine interactions in pigs during week 2 of pregnancy. *Journal of Reproduction Fertility Supplement* 48, 171–186.
- Robinson, C.J., Stringer, S.E., 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of Cell Science* 114, 853–865.
- Rockwell, P., Neufeld, G., Glassman, A., Caron, D., Goldstein, N., 1995. In vitro neutralization of vascular endothelial growth factor activation of Flk-1 by a monoclonal antibody 3, 91–109.
- Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., Huot, J., 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *Journal of Biology Chemistry* 275, 10661–10672. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10661>
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., Huot, J., 1997. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15, 2169–2177. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201380>
- Ruch, C., Skiniotis, G., Steinmetz, M.O., Walz, T., Ballmer-Hofer, K., 2007. Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nature Structural Molecular Biology* 14, 249–250. <https://doi.org/10.1038/nsmb1202>
- Saini, D., Yamanaka, Y., 2018. Chapter Two - Cell Polarity-Dependent Regulation of Cell Allocation and the First Lineage Specification in the Preimplantation Mouse Embryo, in: Plusa, B., Hadjantonakis, A.-K. (Eds.), *Current Topics in Developmental Biology, Cell Fate in Mammalian Development*. Academic Press, pp. 11–35. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.008>
- Sainson, R.C.A., Aoto, J., Nakatsu, M.N., Holderfield, M., Conn, E., Koller, E., Hughes, C.C.W., 2005. Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis. *FASEB Journal* 19, 1027–1029. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3172fje>
- Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., Shibuya, M., 2005. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 1076–1081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404984102>
- Sawano, A., Iwai, S., Sakurai, Y., Ito, M., Shitara, K., Nakahata, T., Shibuya, M., 2001. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97, 785–791. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.3.785>
- Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., Aonuma, M., Shibuya, M., 1996. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth & Differentiation* 7, 213–221.

- Schlessinger, J., Lemmon, M.A., 2003. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Science's STKE* 2003, RE12. <https://doi.org/10.1126/stke.2003.191.re12>
- Sekiya, F., Bae, Y.S., Rhee, S.G., 1999. Regulation of phospholipase C isozymes: activation of phospholipase C-gamma in the absence of tyrosine-phosphorylation. *Chemistry and Physics of Lipids* 98, 3–11. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(99\)00013-4](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(99)00013-4)
- Semenza, G.L., 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 88, 1474–1480. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1474>
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F., 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983–985. <https://doi.org/10.1126/science.6823562>
- Senger, P.L., 2015. *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 3rd edition. ed. Current Conceptions Inc, Redmond, OR.
- Seo, H., Choi, Y., Shim, J., Yoo, I., Ka, H., 2014. Comprehensive analysis of prostaglandin metabolic enzyme expression during pregnancy and the characterization of AKR1B1 as a prostaglandin F synthase at the maternal-conceptus interface in pigs. *Biology of Reproduction* 90, 99. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.114926>
- Seo, H., Choi, Yohan, Shim, J., Choi, Youngsok, Ka, H., 2012. Regulatory mechanism for expression of IL1B receptors in the uterine endometrium and effects of IL1B on prostaglandin synthetic enzymes during the implantation period in pigs. *Biology of Reproduction* 87, 31. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099051>
- Shaik, F., Cuthbert, G.A., Homer-Vanniasinkam, S., Muench, S.P., Ponnambalam, S., Harrison, M.A., 2020. Structural Basis for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Activation and Implications for Disease Therapy. *Biomolecules* 10, 1673. <https://doi.org/10.3390/biom10121673>
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C., 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62–66. <https://doi.org/10.1038/376062a0>
- Sharkey, A., 1998. Cytokines and implantation. *Reproduction* 3, 52–61. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0030052>
- Shibuya, M., 2013. VEGFR and type-V RTK activation and signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a009092. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009092>
- Shibuya, M., 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis. *Genes Cancer* 2, 1097–1105. <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>
- Shibuya, M., 2006. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 9, 225–230; discussion 231. <https://doi.org/10.1007/s10456-006-9055-8>
- Shibuya, M., 2003. Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Science* 94, 751–756. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01514.x>
- Shibuya, M., Claesson-Welsh, L., 2006. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research* 312, 549–560. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.012>
- Shinkai, A., Ito, M., Anazawa, H., Yamaguchi, S., Shitara, K., Shibuya, M., 1998. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 273, 31283–31288. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.31283>
- Silva, L.A., Klein, C., Ealy, A.D., Sharp, D.C., 2011. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: an anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. *Reproduction* 142, 593–603. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0149>
- Simons, M., Gordon, E., Claesson-Welsh, L., 2016. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 611–625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>

- Smith, T.T., 1998. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biology Reproduction* 58, 1102–1104. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.5.1102>
- Soede, N.M., Langendijk, P., Kemp, B., 2011. Reproductive cycles in pigs. *Animal Reproduction Science* 124, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.025>
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M., 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735–745. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81402-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81402-6)
- Spencer, T.E., 2014. Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Seminars in Reproductive Medicine* 32, 346–357. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1376354>
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Bazer, F.W., 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction* 71, 2–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024133>
- Strickland, L.A., Jubb, A.M., Hongo, J.-A., Zhong, F., Burwick, J., Fu, L., Frantz, G.D., Koepfen, H., 2005. Plasmalemmal vesicle-associated protein (PLVAP) is expressed by tumour endothelium and is upregulated by vascular endothelial growth factor-A (VEGF). *Journal of Pathology* 206, 466–475. <https://doi.org/10.1002/path.1805>
- Su, M.-T., Lin, S.-H., Chen, Y.-C., 2011. Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 17, 803–812. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr027>
- Sugino, N., Kashida, S., Karube-Harada, A., Takiguchi, S., Kato, H., 2002. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 123, 379–387. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230379>
- Sukbuntherng, J., Cropp, G., Hannah, A., Wagner, G.S., Shawver, L.K., Antonian, L., 2001. Pharmacokinetics and interspecies scaling of a novel VEGF receptor inhibitor, SU5416. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53, 1629–1636. <https://doi.org/10.1211/0022357011778232>
- Tahergorabi, Z., Khazaei, M., 2012. A Review on Angiogenesis and Its Assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 15, 1110–1126.
- Takahashi, T., Ueno, H., Shibuya, M., 1999. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18, 2221–2230. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202527>
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., Shibuya, M., 2001. A single autophosphorylation site on KDR/Fli-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO Journal* 20, 2768–2778. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2768>
- Tasaki, Y., Nishimura, R., Shibuya, M., Lee, H.-Y., Acosta, T.J., Okuda, K., 2010. Expression of VEGF and its receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: effects of VEGF on prostaglandin production in endometrial cells. *Journal of Reproduction and Development* 56, 223–229. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-139s>
- Tayade, C., Black, G.P., Fang, Y., Croy, B.A., 2006. Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. *Journal of Immunology* 176, 148–156.
- Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D., Böhlen, P., 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187, 1579–1586. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)90483-2](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)90483-2)
- Thibault, C., Gérard, M., 1973. Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes *in vitro*. *Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique* 13, 145–159. <https://doi.org/10.1051/rnd:19730513>
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., Tsoolova, M., 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *International Journal of Developmental Biology* 52, 717–736. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072536et>

- Tran, J., Rak, J., Sheehan, C., Saibil, S.D., LaCasse, E., Korneluk, R.G., Kerbel, R.S., 1999. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 781–788. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1589>
- Tugues, S., Koch, S., Gualandi, L., Li, X., Claesson-Welsh, L., 2011. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 32, 88–111. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.04.004>
- Vázquez, F., Rodríguez-Manzanique, J.C., Lydon, J.P., Edwards, D.P., O'Malley, B.W., Iruela-Arispe, M.L., 1999. Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 274, 2185–2192. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2185>
- Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., Alitalo, K., 2000. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Research* 60, 203–212.
- Vonnahme, K.A., Ford, S.P., 2004. Differential Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor System in the Gravid Uterus of Yorkshire and Meishan Pigs. *Biology of Reproduction* 71, 163–169. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026344>
- Vonnahme, K.A., Wilson, M.E., Ford, S.P., 2001. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biology of Reproduction* 64, 1821–1825. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1821>
- Waclawik, A., Jabbour, H.N., Blitek, A., Ziecik, A.J., 2009. Estradiol-17 β , Prostaglandin E2 (PGE2), and the PGE2 Receptor Are Involved in PGE2 Positive Feedback Loop in the Porcine Endometrium. *Endocrinology* 150, 3823–3832. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1499>
- Waclawik, A., Kaczmarek, M.M., Blitek, A., Kaczynski, P., Ziecik, A.J., 2017. Embryo-maternal dialogue during pregnancy establishment and implantation in the pig. *Molecular Reproduction and Development* 84, 842–855. <https://doi.org/10.1002/mrd.22835>
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin, C.H., 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 269, 26988–26995.
- Wang, A., Miralem, T., Templeton, D.M., 1999. Heparan sulfate chains with antimitogenic properties arise from mesangial cell-surface proteoglycans. *Metabolism - Clinical and Experimental* 48, 1220–1229. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(99\)90259-7](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(99)90259-7)
- Wang, H., Li, Q., Lin, H., Yu, X., Qian, D., Dai, J., Duan, E., Zhu, C., 2003. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) endometrium and placenta during early pregnancy. *Molecular Reproduction and Development* 65, 123–131. <https://doi.org/10.1002/mrd.10308>
- Wang, S., Li, J., Zhang, A., Liu, M., Zhang, H., 2011. Selection of reference genes for studies of porcine endometrial gene expression on gestational day 12. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 408, 265–268. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.010>
- Welter, H., Wollenhaupt, K., Einspanier, R., 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, 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2003.12.011>
- Welter, H., Wollenhaupt, K., Tiemann, U., Einspanier, R., 2003. Regulation of the VEGF-system in the endometrium during steroid-replacement and early pregnancy of pigs. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 111, 33–40. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37498>
- Winther, H., Ahmed, A., Dantzer, V., 1999. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus. *Placenta* 20, 35–43. <https://doi.org/10.1053/plac.1998.0350>
- Xia, P., Aiello, L.P., Ishii, H., Jiang, Z.Y., Park, D.J., Robinson, G.S., Takagi, H., Newsome, W.P., Jirousek, M.R., King, G.L., 1996. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *Journal of Clinical Investigation* 98, 2018–2026. <https://doi.org/10.1172/JCI119006>
- Yanagimachi R., 1994. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction* 1, 273–279.

- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J., 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242–248. <https://doi.org/10.1038/35025215>
- Yang, Y., Xie, P., Opatowsky, Y., Schlessinger, J., 2010. Direct contacts between extracellular membrane-proximal domains are required for VEGF receptor activation and cell signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107, 1906–1911. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914052107>
- Youngs, C.R., Christenson, L.K., Ford, S.P., 1994. Investigations into the control of litter size in swine: III. A reciprocal embryo transfer study of early conceptus development. *Journal of Animal Science* 72, 725–731.
- Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Bréant, C., Karkkainen, M.J., Alitalo, K., Eichmann, A., 2002. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 129, 4797–4806. <https://doi.org/10.1242/dev.129.20.4797>
- Yun, S.-M., Choi, K.-C., Kim, I.-H., An, B.-S., Lee, G.-S., Hong, E.-J., Oh, G.-T., Jeung, E.-B., 2004. Dominant expression of porcine Calbindin-D9k in the uterus during a luteal phase. *Molecular Reproduction and Development* 67, 251–256. <https://doi.org/10.1002/mrd.20019>
- Zeng, H., Dvorak, H.F., Mukhopadhyay, D., 2001a. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry* 276, 26969–26979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103213200>
- Zeng, H., Sanyal, S., Mukhopadhyay, D., 2001b. Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively. *Journal of Biological Chemistry* 276, 32714–32719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103130200>
- Ziecik, A.J., Waclawik, A., Kaczmarek, M.M., Blitek, A., Jalali, B.M., Andronowska, A., 2011. Mechanisms for the establishment of pregnancy in the pig. *Reproduction in Domestic Animals* 46 Suppl 3, 31–41. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01843.x>
- Zygmunt, M., Herr, F., Münstedt, K., Lang, U., Liang, O.D., 2003. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, The Regulation of Fetal Growth, Fetal Oxygen Supply and Intrauterine Development* 110, S10–S18. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(03\)00168-4](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(03)00168-4)

9 Abreviaturas y siglas usadas

β -actina: Beta actina.

μ g: Microgramo.

μ l: Microlitro.

μ m: Micrometro.

μ M: Micromolar.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATP: Adenosina trifosfato.

BAX: Proteína X asociada a Bcl-2.

BCL-2: Proteína 2 de la leucemia.

bFGF: Factor de crecimiento básico de fibroblastos.

C-kit: Receptor del factor de células madre.

c-Met: Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.

c-Src: Familia SRC de tirosina quinasa.

Ca: Calcio.

CASP3: Caspasa 3.

CE: Ciclo estral.

CE's: Células endoteliales.

CEIEPP: Centro de Investigación y Extensión en Producción Porcina.

CICUA: Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales.

CL: Cuerpo lúteo.

cm: centímetro.

CONAHCYT: Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías.

CP: Cuerpo polar.

C_T: Ciclo umbral.

Cys: Cisteína.

Da: Dalton.

DAG: 1,2-diacilglicerol.

DEPC: Pirocarbonato de dietilo.

DLL4: Ligando tipo Delta 4.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato.

DPN: Día postnatal.

EG: Epitelio glandular.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EL: Epitelio luminal uterino.

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial.

ERK: Quinasa regulada por señal extracelular.

ES: Estroma.

FAK: Quinasa de adhesión focal.

FBS: Suero fetal bovino.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.

FGFR: Receptor del factor de crecimiento básico de fibroblastos.

Grb-2: Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento.

Gx: Gestación.

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos.

HIF-1: Factor de transcripción inducible por hipoxia.

HSP27: Proteína de choque térmico.

HSPG: Proteoglicanos de heparán sulfato.

HUVEC: Células de vena umbilical humana.

IA: Inseminación artificial.

IFND: Interferón- δ .

IFNG: Interferón- γ .

Ig: inmunoglobulina.

IGF1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IL1 β 2: Interleucina-1 β 2.

IL1RAP: Proteína accesoria del receptor de interleucina 1.

IL6: Interleucina 6.

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato.

kb: Kilobase.

kDa: Kilodalton.

kg: kilogramo.

LH: Hormona luteinizante.

LIF: Factor inhibidor de la leucemia.

LPAR3: Receptor de ácido lisofosfatídico 3.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno.

MCI: Masa celular interna.

MEC: Matriz extracelular.

Mek: MAPK que fosforila la MAPK ERK.

Mg: Magnesio.

mg: Miligramo.

ml: Mililitro.

mm: Milímetro.

mM: Milimolar.

MMP-9: Metaloproteínasa de matriz extracelular 9.

MUC1: Mucina 1.

My: Miometrio.

ng: Nanogramos.

nM: Nanomolar.

NO: Óxido nítrico.

NRP: Neuropilina.

pb: Pares de bases:

PBS: Solución Salina Amortiguada con Fosfatos.
PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PDGFR-B: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas B.
PGE2: Prostaglandina E2.
PGF2 α : Prostaglandina F2 α .
PGR: Receptores de progesterona.
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.
PIGF: Factor de crecimiento placentario.
PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PIP₃: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.
PKB: Akt proteína quinasa B.
PKC: Proteína quinasa C.
PLC γ : Fosfolipasa C gamma.
PLVAP: Proteína asociada a vesículas de plasmalema.
pM: Picomolar.
PN: Pronúcleo.
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa de tiempo real.
Raf-1: Protooncogén Raf-1, serina/treonina quinasa.
Ras GAP: Proteína activadora de Ras GTPasa.
RNasa: Ribonucleasa.
rpm: Revoluciones por minuto.
RPS20: Proteína ribosómica S20.
RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcriptasa Reversa.
RTK: Receptores tirosina quinasa.
SEM: Error estandar de la media.
Shb: proteína adaptadora B
Shc: Proteína adaptadora de la señalización.
SHP-1, 2: Fosfotirosina fosfatasa 1 y 2.
SOS: Factor de intercambio de nucleótidos.
SPP1: Fosfoproteína 1.
STAT1: Activador de la transcripción 1.
STC1: Estaniocalcina 1.
SU5416: 3-[(2,4-dimetilpirrol-5-il) metilidenil]-2-indola); Semaxanib.
TAE: Tris-Acetato-EDTA.
TGF- β : Factor de crecimiento beta transformante.
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.
Tyr: Tirosinas fosforiladas.
VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular.
VEGFR-1/Flt-1: Receptor 1 del factor de crecimiento de endotelio vascular.
VEGFR-2/KDR/Fik-1: Receptor 2 del factor de crecimiento de endotelio vascular.
VEGFs: Factores de crecimiento de endotelio vascular.
VS: Vaso sanguíneo.
ZP: Zona pelúcida.

10 Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Características de los anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica.</i>	58
<i>Tabla 2. Características de los anticuerpos utilizados en la inmunocitoquímica.</i>	62
<i>Tabla 3. Inmunolocalización de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 en tejido uterino.</i>	82
<i>Tabla 4. Características generales del ARN extraído de muestras de tejido uterino de cerdas gestantes y no gestantes.</i>	83
<i>Tabla 5. Valores de expresión del gen VEGF normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	92
<i>Tabla 6. Valores de expresión del gen VEGFR-1 normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	94
<i>Tabla 7. Valores de expresión del gen VEGFR-2 normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	95
<i>Tabla 8. Características generales del ARN extraído de muestras de cultivo de células epiteliales endometriales de cerda tratadas con el inhibidor SU5416.</i>	98
<i>Tabla 9. Valores de expresión del gen VEGF en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	103
<i>Tabla 10. Valores de expresión del gen VEGFR1 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	105
<i>Tabla 11. Valores de expresión del gen VEGFR2 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	107
<i>Tabla 12. Valores de expresión del gen BAX en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	109
<i>Tabla 13. Valores de expresión del gen BCL-2 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	111
<i>Tabla 14. Valores de expresión del gen CASP3 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	113
<i>Tabla 15. Valores de expresión del gen FGF2 en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	115
<i>Tabla 16. Valores de expresión del gen MAPK en células tratadas con SU5416, normalizados sobre la expresión de los genes de referencia RPS20 y β-Actina.</i>	117

11 Lista de Gráficos

Gráfico 1. Regresión lineal para RPS20.....	86
Gráfico 2. Regresión lineal para β -Actina.....	87
Gráfico 3. Regresión lineal para VEGF.....	88
Gráfico 4. Regresión lineal para VEGFR-1.....	89
Gráfico 5. Regresión lineal para VEGFR-2.....	90
Gráfico 6. Niveles de expresión relativa de ARNm de VEGF en tejido uterino de cerdas gestantes (gd) y no gestantes (ec) (n=4). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes muestran diferencia significativa (P<0.05).....	92
Gráfico 7. Niveles de expresión relativa de ARNm de VEGFR-1 en tejido uterino de cerdas gestantes (gd) y no gestantes (ec) (n=4). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes muestran diferencia significativa (P<0.05).....	94
Gráfico 8. Niveles de expresión relativa de ARNm de VEGFR-2 en tejido uterino de cerdas gestantes (gd) y no gestantes (ec) (n=4). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes muestran diferencia significativa (P<0.05).....	96
Gráfico 9. Valores de expresión relativa de ARNm para VEGF en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes muestran diferencia significativa (P<0.05).....	104
Gráfico 10. Valores de expresión relativa de ARNm para VEGFR-1 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa (P<0.05).....	106
Gráfico 11. Valores de expresión relativa de ARNm para VEGFR-2 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa (P<0.05).....	108
Gráfico 12. Valores de expresión relativa de ARNm para BAX en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa (P<0.05).....	110
Gráfico 13. Valores de expresión relativa de ARNm para BCL-2 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa (P<0.05).....	112
Gráfico 14. Valores de expresión relativa de ARNm para CASP3 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa (P<0.05).....	114
Gráfico 15. Valores de expresión relativa de ARNm para FGF2 en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa (P<0.05).....	116
Gráfico 16. Valores de expresión relativa de ARNm para MAPK en células epiteliales endometriales tratadas con SU5416 (100 nM, 1500 nM y 2500 nM) y control DMSO (2500 nM) (n=5). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Valores con letras diferentes poseen diferencia significativa (P<0.05).....	118

12 Lista de Figuras

Figura 1. Microfotografía de ovocito fertilizado.....	12
Figura 2. Microfotografía de embriones en etapa de 2 células.....	13
Figura 3. Microfotografía de embriones en etapa de 4 y 8 células.....	13
Figura 4. Microfotografía de embriones en etapa de mórula con blastómeros compactados.....	14
Figura 5. Microfotografía de embriones en etapa de blastocito.....	15
Figura 6. Microfotografía de blastocitos eclosionando.....	16
Figura 7. Diversas formas morfológicas de embriones de cerdo recolectados en el día 16 de gestación.....	18
Figura 8. Esquematización de la organización del gen VEGF-A.....	30
Figura 9. Esquematización de los receptores tirosina quinasa VEGFR-1 y VEGFR-2.....	33
Figura 10. Esquematización de las diferentes vías de señalización de VEGFR-2 dependientes de VEGF.....	42
Figura 11. Esquematización de la inhibición de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 y sus vías de señalización por SU5416.....	46
Figura 12. Estandarización del protocolo de IHQ y viabilidad del tejido, PCNA, tejido uterino, magnificación 400X.....	57
Figura 13. Estandarización del protocolo de IHQ, tejido uterino y trofoblasto, magnificación 400X.....	57
Figura 14. Control de VEGF, tejido hepático porcino, magnificación 400X.....	57
Figura 15. Control de VEGF en tejido renal porcino, magnificación 400X.....	57
Figura 16. Control negativo en tejido renal, magnificación 400X.....	58
Figura 17. Control negativo en tejido uterino, magnificación 400X.....	58
Figura 18. Características de los ovarios de los úteros incluidos en el aislamiento de las células epiteliales endometriales.....	59
Figura 19. Método de transporte de los úteros al laboratorio.....	59
Figura 20. Manejo aséptico en laboratorio de los úteros de cerda.....	60
Figura 21. Fragmento de 10 cm de longitud con la superficie luminal expuesta hacia la parte de arriba.....	60
Figura 22. Lavado con PBS de los pequeños fragmentos de tejido endometrial.....	60
Figura 23. Homogenizado continuo de las muestras para la digestión enzimática con 0.25% de tripsina-EDTA.....	60
Figura 24. Pellet celular en DMEM obtenido después de la lisis de eritrocitos y lavados.....	61
Figura 25. Caja de cultivo de 24 pozos con una concentración de 300,000 células en un volumen de 400 μ l de medio DMEM.....	62
Figura 26. Cajas de cultivo dentro de la incubadora a 38°C con una atmósfera de 5% de CO ₂	62
Figura 27. Diluciones del inhibidor SU5416 a partir del stock inicial 100 mM.....	63
Figura 28. Dilución del control DMSO en DMEM.....	63
Figura 29. Distribución en placa de 24 pozos de grupos de células tratadas con SU5416.....	64
Figura 30. Epitelio de revestimiento, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 de gestación, 400X.....	69
Figura 31. Epitelio glandular marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 de gestación, 400X.....	69
Figura 32. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 de gestación, 400X.....	70
Figura 33. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR1, día 12 de gestación, 400X.....	70
Figura 34. Estroma y vaso sanguíneo marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 de gestación, 400X.....	70
Figura 35. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 de gestación, 400X.....	70
Figura 36. Epitelio de revestimiento, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 de gestación, 400X.....	71

Figura 37. Epitelio glandular y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 de gestación, 400X.	71
Figura 38. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 de gestación, 400X.	71
Figura 39. Células del epitelio luminal, glandular y estroma control negativo, 400X.	71
Figura 40. Epitelio de revestimiento, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 14 de gestación, 400X.	72
Figura 41. Epitelio glandular marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 14 de gestación, 400X.	72
Figura 42. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 14 de gestación, 400X.	72
Figura 43. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 14 de gestación, 400X.	72
Figura 44. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 14 de gestación, 400X.	73
Figura 45. Vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo anti-VEGFR1, día 14 de gestación, 400X.	73
Figura 46. Epitelio luminal, glandular y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 14 de gestación, 400X.	73
Figura 47. Epitelio glandular, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 14 de gestación, 400X.	73
Figura 48. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 14 de gestación, 400X.	73
Figura 49. Células del epitelio luminal, glandular y estroma, control negativo, 400X.	73
Figura 50. Epitelio luminal y glandular marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 16 de gestación, 400X.	74
Figura 51. Epitelio glandular marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 16 de gestación, 400X.	74
Figura 52. Miometrio y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo VEGF, día 16 de gestación, 400X.	74
Figura 53. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 16 de gestación, 400X.	74
Figura 54. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 16 de gestación, 400X.	75
Figura 55. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 16 de gestación, 400X.	75
Figura 56. Epitelio luminal, vasos sanguíneos y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 14 de gestación, 400X.	75
Figura 57. Epitelio glandular, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 16 de gestación, 400X.	75
Figura 58. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 16 días de gestación 400X.	75
Figura 59. Células del epitelio glandular, vaso sanguíneo y estroma, control negativo, 400X.	75
Figura 60. Epitelio luminal y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 18 de gestación, 400X.	76
Figura 61. Epitelio glandular y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 18 de gestación, 400X.	76
Figura 62. Células del músculo liso del miometrio y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 18 de gestación, 400X.	77
Figura 63. Vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 18 de gestación, 400X.	77
Figura 64. Estroma y vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 18 de gestación, 400X.	77
Figura 65. Músculo liso del miometrio sin señal del anticuerpo anti-VEGFR-1, día 18 de gestación, 400X.	77
Figura 66. Epitelio luminal marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 18 de gestación, 400X.	77
Figura 67. Epitelio glandular, estroma y vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 18 de gestación, 400X.	77
Figura 68. Vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 18 de gestación, 400X.	78
Figura 69. Células del epitelio glandular, vaso sanguíneo y estroma, control negativo, 400X.	78

Figura 70. Epitelio luminal, glandular, estroma y vaso sanguíneo marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 2 del ciclo estral, 400X.....	78
Figura 71. Epitelio glandular marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 2 del ciclo estral, 400X....	78
Figura 72. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 2 del ciclo estral, 400X.....	79
Figura 73. Vaso sanguíneo y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 2 del ciclo estral, 400X.....	79
Figura 74. Estroma y vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo VEGFR-1, día 2 del ciclo estral, 400X.....	79
Figura 75. Músculo liso del miometrio sin señal del anticuerpo anti-VEGFR-1, día 2 del ciclo estral, 400X.....	79
Figura 76. Epitelio luminal y glandular marcado con el anticuerpo VEGFR-2, día 2 del ciclo estral, 400X.....	79
Figura 77. Epitelio glandular y estroma marcados con el anticuerpo VEGFR-2, día 2 ciclo estral, 400X.....	79
Figura 78. Vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo VEGFR-2, día 2 del ciclo estral, 400X.....	80
Figura 79. Células del músculo liso del miometrio y vaso sanguíneo, control negativo, 400X.....	80
Figura 80. Epitelio luminal, glandular, estroma y vaso sanguíneo marcados con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 del ciclo estral, 400X.....	81
Figura 81. Epitelio glandular y vaso sanguíneo marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 del ciclo estral, 400X.....	81
Figura 82. Células del músculo liso del miometrio marcado con el anticuerpo anti-VEGF, día 12 del ciclo estral, 400X.....	81
Figura 83. Vaso sanguíneo y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 del ciclo estral, 400X.....	81
Figura 84. Estroma marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 del ciclo estral, 400X.....	81
Figura 85. Músculo liso del miometrio sin señal del anticuerpo anti-VEGFR-1, día 12 del ciclo estral, 400X.....	81
Figura 86. Epitelio luminal marcado con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 del ciclo estral, 400X.....	82
Figura 87. Epitelio glandular y estroma marcados con el anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 ciclo estral, 400X.....	82
Figura 88. Miometrio sin señal del anticuerpo anti-VEGFR-2, día 12 del ciclo estral, 400X.....	82
Figura 89. Células del epitelio luminal, glandular, vasos sanguíneos y estroma, control negativo, 400X.....	82
Figura 90. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen RPS20.....	84
Figura 91. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen β -Actina.....	84
Figura 92. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGF.....	85
Figura 93. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGFR-1.....	85
Figura 94. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen de VEGFR2.....	85
Figura 95. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para RPS20 correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μ l de cDNA.....	86
Figura 96. Curvas de disociación de los productos de amplificación del gen RPS20.....	86
Figura 97. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para β -Actina correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μ l de cDNA.....	87
Figura 98. Curvas de disociación de los productos del gen β -Actina.....	87
Figura 99. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para VEGF correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μ l de cDNA.....	88
Figura 100. Curvas de disociación de los productos del gen VEGF.....	88
Figura 101. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para VEGFR-1 correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μ l de cDNA.....	89
Figura 102. Curvas de disociación para los productos del gen VEGFR-1.....	89

Figura 103. Curvas de amplificación de rangos dinámicos para VEGFR-2 correspondientes a las concentraciones de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng por μ l de cDNA.....	90
Figura 104. Curvas de disociación para los productos del gen VEGFR-2.....	90
Figura 105. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGF.....	91
Figura 106. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen VEGF.....	91
Figura 107. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGFR-1.....	93
Figura 108. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen VEGFR-1.....	93
Figura 109. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen VEGFR-2.....	95
Figura 110. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen VEGFR-2.....	95
Figura 111. Células epiteliales endometriales aisladas, 0 horas en cultivo.....	97
Figura 112. Células epiteliales endometriales aisladas, 24 horas en cultivo.....	97
Figura 113. Células epiteliales endometriales aisladas, 48 horas en cultivo.....	97
Figura 114. Células epiteliales endometriales aisladas, 72 horas en cultivo.....	97
Figura 115. Células epiteliales endometriales aisladas, 96 horas en cultivo.....	97
Figura 116. Células epiteliales endometriales aisladas, 120 horas en cultivo.....	97
Figura 117. Microfotografía de células con señal del anticuerpo pan-Citoqueratina-C11.....	98
Figura 118. Microfotografía de células con señal del anticuerpo pan-Citoqueratina-C11.....	98
Figura 119. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen RPS20.....	99
Figura 120. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen β -Actina.....	99
Figura 121. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGF.....	100
Figura 122. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGFR-1.....	100
Figura 123. Productos de PCR en gel de agarosa correspondientes al gen VEGFR-2.....	100
Figura 124. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia RPS20.....	101
Figura 125. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia RPS20.....	101
Figura 126. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia β -Actina.....	102
Figura 127. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia β -Actina.....	102
Figura 128. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia VEGF.....	103
Figura 129. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia VEGF.....	103
Figura 130. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia VEGFR-1.....	105
Figura 131. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia VEGFR-1.....	105
Figura 132. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen de referencia VEGFR-2.....	107
Figura 133. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen de referencia VEGFR-2.....	107
Figura 134. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen BAX.....	109
Figura 135. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen BAX.....	109
Figura 136. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen BCL-2.....	111
Figura 137. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen BCL-2.....	111
Figura 138. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen CASP3.....	113
Figura 139. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen CASP3.....	113
Figura 140. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen FGF2.....	115
Figura 141. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen FGF2.....	115
Figura 142. Curvas de amplificación de las muestras analizadas con el gen MAPK.....	117
Figura 143. Curvas de disociación de los productos de qPCR del gen MAPK.....	117
Figura 145. Cuadrícula de hemocitómetro y zona de conteo indicado con la letra L.....	158
Figura 146. Microfotografía representativa, obtenida durante el conteo y prueba de viabilidad de los ensayos experimentales.....	158
Figura 147. Células sembradas de manera uniforme en la placa de cultivo.....	159

13 Anexos

Anexo 1. Protocolo de procesamiento de muestras en el histoquinete.

Los fragmentos de tejido previamente montados en casetes y conservados en alcohol al 70%, se deshidrataron en pases de concentraciones crecientes de alcohol, comenzando en alcohol al 80% por una hora, tres cambios de dos horas cada uno en alcohol al 95% y dos cambios de una hora cada uno en alcohol absoluto. Después, se llevó a cabo el aclaramiento durante dos horas en una solución de 1:1 de xilol y alcohol absoluto, tres cambios de una hora cada uno en xilol absoluto e infiltración en dos cambios de dos horas cada uno en parafina a 56°C, dejando solidificar la muestra. A la mañana siguiente, se derritió la parafina y se infiltró parafina al vacío por 2 horas .

Anexo 2. Protocolo de corte y montaje de tejidos para inmunohistoquímica.

Después del procesamiento de los tejidos en el histoquinete, los casetes se colocaron en moldes metálicos y se embebieron en parafina líquida. Solidificados los bloques, se almacenaron a temperatura ambiente. Para llevar a cabo los cortes de los bloques, se empleó un micrótopo automático (Microm HM355 S®), programado para cortes a 2.5 µm. Previo a la serie de cortes, se colocaron los bloques dentro de un congelador por aproximadamente 15 minutos cada uno, inmediatamente se efectuaron los cortes, se colocaron y extendieron en un baño María con agua a una temperatura de 50°C y se montaron en portaobjetos previamente tratado con solución de poli-L-lisina para lograr una mejor adherencia de los tejidos a la laminilla durante la IHQ. Finalmente se secaron dentro de un horno a 40°C y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su evaluación.

Anexo 3. Extracción de ARN.

Cada muestra congelada se colocó en criotubos (Cryovial®) de 2 ml con rosca estériles libres de RNasas, los cuales contenían 800 µl de TRI Reagent® y una esfera de cristal estéril. El tejido se disrumpió usando un homogeneizador

automático (BeadBug homogenizer, Benchmark Scientific®, Melrose EE.UU.). La homogeneización se realizó por 5 segundos cada una, hasta que se observó la completa disrupción del tejido, cuidando de mantener el tubo sobre hielo para evitar la degradación prematura del ARN. Al lisado de cada muestra se le agregaron 200 μ l de cloroformo a 4°C (IBI Scientific®, 6766-3, EE.UU.), se mezcló por 10 segundos con un vórtex, se incubó por 5 minutos en hielo y se centrifugó a 12,000G por 15 minutos a 4°C. La fase donde se encuentra el ARN de interés, corresponde a la fase acuosa, formada en la parte superior del tubo. Se transfirió únicamente la fase acuosa a un microtubo de 2 ml nuevo el cual contenía 500 μ l de isopropanol (IBI Scientific® 6763-0, EE.UU.), se homogeneizó con el vórtex, se incubó en hielo por 15 minutos, se centrifugó a 12,000G por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante por decantación (teniendo cuidado de no desprender el pellet formado en el fondo del tubo). A continuación, se lavó el pellet de ARN dos veces resuspendiéndolo en 1 ml de etanol al 75%, se agitó en vórtex, se centrifugó a 7,500G por 8 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. Posteriormente el pellet se secó por 15 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió por pipeteo en un volumen promedio de 50 μ l de agua molecular DEPC (Sigma 95284, EE.UU.). Finalmente, cada muestra se dividió en dos microtubos de 0.6 ml previamente identificados y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Anexo 4. Secuencias y características de los primers utilizados.

Gen	Secuencia del primer (5' - 3')	Tamaño del amplicón (bp)	Temperatura de alineación (°C)
RPS20	Fw: CGCTCCTGGCTCACCGCTGTT	148	62
	Rv: TGCGGCTGGTGAGGGTGATCC		
β -Actina	Fw: ACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACG	365	54
	Rv: AGGGGCGATGATCTTGATCTTCA		
VEGF	Fw: CTACCTCCACCATGCCAAGT	232	56

	Rv: ACACTCCAGACCTTCGTCGT		
VEGFR1	Fw: CACCCCGGAAATCTATCAGATC		
	Rv: GAGTACGTGAAGCCGCTGTTG	180	56
VEGFR2	Fw: GAAATGGCTTCATCCTCCAA		
	Rv: CAAGGAAGACTTGGCTCAGG	177	54

Anexo 5. Reactivos, concentraciones y volumen utilizado en la RT-PCR.

Reactivo	Volumen por reacción (μl)
10x Buffer RT	1
dNTP Mix	1
Random primers (10μM)	1
RNase inhibitor	0.25
Omniscript Reverse Transcriptase	0.5
Muestra de RNA (2000/500ng por reacción)	Variable
Agua libre de RNasas	Variable
Volumen total	10

Anexo 6. Reactivos, concentraciones y volumen utilizado en la PCR de punto final.

Reactivo	Volumen por reacción (μl)
Taq PCR master mix (2x)	5
Primer Forward (2.5μM)	0.25
Primer Reverse (2.5μM)	0.25
Agua libre de RNasas	3.5
Muestra de cDNA (2 / 1 μg)	1
Volumen total	10

Anexo 7. Reactivos, concentraciones y volumen utilizado en la reacción de qPCR.

Reactivo	Volumen por reacción (μl)
QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix (2x)	5

Primer Forward (1 μ M)	0.7
Primer Reverse (1 μ M)	0.7
Agua libre de RNasas	2.6
Muestra de cDNA	1
Volumen total	10

Anexo 8. Protocolo estandarizado de inmunohistoquímica (IHQ).

Paso	Tiempos	Observaciones
Desparafinado e hidratación		
Termoplatina	25 minutos / 55°C	Colocar laminillas con tejido hacia arriba por 10 minutos.
Xilol I	10 minutos	x1
Xilol II	5 minutos	x1
Alcohol/Xilol	3 minutos	Concentración 1:1
Alcohol 96 %	3 minutos	x1
Alcohol 80 %	3 minutos	x1
Alcohol 70 %	3 minutos	x1
Lavado H ₂ O destilada	10 minutos	x2
PBS	10 minutos	x1
Determinar si el desparafinado fue correcto, de lo contrario repetir el proceso		
Desenmascaramiento con Citrato de Na 1x		
Olla de presión	Calentar en horno de microondas por 5 minutos	Llenar con 400 ml H ₂ O destilada
Citrato de Na 1x (Inmuno DNA retriever)	Calentar por 3 minutos	En horno de microondas
Colocar laminillas después del último lavado dentro del copling con Citrato de Na pre calentado dentro de la olla de presión		
Calentar olla	15 minutos	Sacar olla y evaluar la integridad de tejido
Permitir que la temperatura del citrato de Na baje gradualmente hasta 20°C		
PBS	10 minutos	x1
Bloqueo de peroxidasas endógenas		
Peróxido 0.9%	5 minutos	Cubrir de la luz
PBS	5 minutos	x1
PBS-Tween 0.1%	5 minutos	x1
PBS	10 minutos	x1

Bloqueo con BSA al 1% en PBS y primer anticuerpo en cámara húmeda

BSA 1%	30 minutos	No lavar tejido después del bloqueo
Anticuerpo primario	<u>Por toda la noche</u>	Incubar a 4°C
PBS	5 minutos	x1
PBS-Tween 0.1%	5 minutos	x1
PBS	10 minutos	x1
Segundo anticuerpo	1 hora	Concentración 1:100
PBS-Tween 0.1%	5 min	x1
PBS	10 min	x1

Preparar 30 minutos antes de su uso, el sistema de bloqueo Avidina/Biotina (AB)

Bloqueo AB	30 minutos	x1
PBS-Tween 0.1%	5 minutos	x1
PBS	10 minutos	x1
Revelado con Diaminobencidina	Máximo por 2 minutos	Monitorear bajo el microscopio
H ₂ O destilada	10 min	x1
Contrastación con Hematoxilina	30 segundos	Evaluar al microscopio

Deshidratación del tejido y montaje de cubreobjetos

Alcohol/Xilol	30 segundos	Realizar múltiples pases
Cubreobjetos	Citoseal 60 ®	Evitar hacer burbujas

Anexo 9. Protocolo de conteo y viabilidad celular en hemocitómetro.

Se llevó a cabo la limpieza del hemocitómetro con etanol al 70% y armado con su respectivo cubreobjetos. Es importante considerar la concentración de células para determinar el factor de dilución que se utilizará antes de depositar las células dentro de la cámara.

En el último lavado después de la lisis de los eritrocitos, se reconstituyó mediante pipeteo el pellet celular, en 5 ml de medio DMEM fresco. Se tomaron directamente de la alícuota de trabajo 10 µl y se depositaron en un microtubo de 0.6 ml. Inmediatamente se agregó al microtubo, el mismo volumen de azul de tripano (Sigma, T8154, UK) y se homogeneizó mediante pipeteo suave. Con la micropipeta, se tomaron únicamente 10 µl de la mezcla, se llenó por capilaridad el hemocitómetro y se colocó debajo del microscopio invertido con el objetivo de 10X para contabilizar las células.

Se contabilizaron de izquierda a derecha las células ubicadas en cada uno de los 16 cuadros grandes de cada orilla de la zona de conteo de la cámara, indicados con la letra L de la Figura 145. Una vez terminado el conteo, se sumaron los resultados obtenidos de los cuatro recuadros de las orillas y se dividieron entre 4 para sacar el promedio y tener un resultado más exacto (Figura 146).

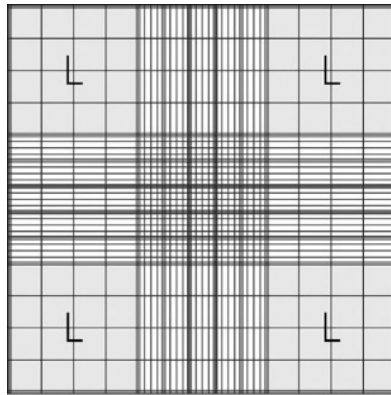


Figura 144. Cuadrícula de hemocitómetro y zona de conteo indicado con la letra L.

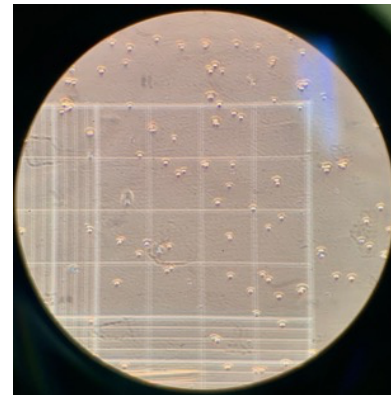


Figura 145. Microfotografía representativa, obtenida durante el conteo y prueba de viabilidad de los ensayos experimentales.

Nota: Las células teñidas con azul de tripano, no fueron consideradas dentro del conteo, ya que estas representan las células muertas.

Ejemplo de conteo:

Para este ejemplo supongamos que se obtuvieron de los cuatro cuadros grandes de cada orilla (L) un promedio de 75 células, por lo tanto:

- Por el factor de dilución del azul de tripano se multiplica el resultado por 2
→ (Dilución 1:2) $75 \times 2 = 150$
- Por la constante del volumen de llenado del hemocitómetro.
→ $150 \times 10,000 = 1,500,000$ células por ml
- Dependiendo del volumen total con el que se reconstituyó el pellet, se multiplica por ese valor para obtener el total, para este caso fueron 5 ml.
→ $1,500,000 \times 5 \text{ ml} = 7,500,000$ células en 5 ml de medio DMEM

Las células se sembraron en una placa de 24 pozos, con una concentración de 300,000 células por pozo en 400 μ l de DMEM más 10% de FBS y antibióticos, por lo tanto:

→ 7,500,000 células en 5000 μ l
300,000 en cuanto = 200 μ l

Finalmente se homogeniza y colocan 200 μ l de la alícuota en cada uno de los 24 pozos de la placa de cultivo y se agregan 200 μ l de medio DMEM adicionado con 10% de FBS y antibióticos, para tener una concentración final de 300,000 células por pozo en 400 μ l de medio. Se identifica claramente la tapa de la placa de cultivo y se coloca dentro de la incubadora a 38°C con 5% de CO₂.

Nota: se colocaron primero los 200 μ l de medio DMEM en cada uno de los 24 pozos y después se agregaron los 200 μ l de medio que contenían las 300,000 células, se homogeneizó suavemente la placa para distribuir uniformemente las células (Figura 147) y se situó dentro de la incubadora.

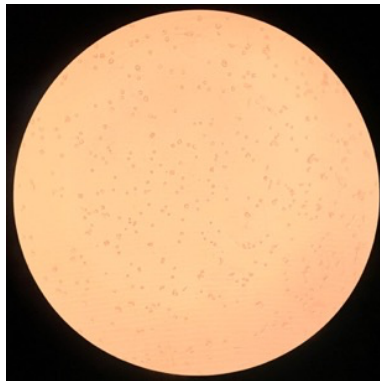


Figura 146. Células sembradas de manera uniforme en la placa de cultivo.

Anexo 10. Protocolo estandarizado de inmunocitoquímica.

Cultivo de células epiteliales uterinas de cerdo

Cultivo en placa de 5 pozos más cubreobjetos de vidrio de 12 mm /0.13-0.17 mm

Se siembran sobre el cubreobjetos 200,000 células por pozo en 400 μ l de medio DMEM con 10% de FBS y antibióticos, y se incuban a 38°C con 5% de CO₂ por 48 horas, con recambio de medio cada 24 horas.

Lavado

Retirar medio de cultivo

Lavar 2x con PBS

1 minuto cada uno

Fijación de células

Paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4	500 µl por pozo durante 20 minutos a temperatura ambiente	3x lavados con PBS 5 minutos cada uno
PBS	1 lavado	5 minutos
PBS-Tween 0.1%	1 lavado	5 minutos

Bloqueo de peroxidasa endógenas

Peróxido al 0.9%	5 minutos	Cubrir de la luz
PBS	1 lavado	5 minutos
PBS-Tween 0.1%	1 lavado	5 minutos
PBS-Tween 0.1%	1 lavado	10 minutos

Bloqueo con BSA al 1% en PBS y anticuerpo primario

BSA 1%	30 minutos	No lavar tejido después del bloqueo
Anticuerpo primario	350 µl por pozo, diluir en BSA 1% en PBS	Por toda la noche

Sellar con parafilm la caja de cultivo e incubar a 4°C por toda la noche.

Al segundo día

Remover el anticuerpo primario

PBS	1 lavado	5 minutos
PBS-Tween 0.1%	1 lavado	5 minutos
PBS	1 lavado	10 minutos

Anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado

Anticuerpo secundario	Concentración 1:100, 350µl diluir en BSA 1% en PBS	1 hora
PBS-Tween 0.1%	1 lavado	5 minutos
PBS	1 lavado	10 minutos

Preparar 30 minutos antes de su uso, el sistema de bloqueo Avidina/Biotina (AB)

Bloqueo AB (350 µl)	1 bloqueo	30 minutos
PBS-Tween 0.1%	1 lavado	5 minutos
PBS	1 lavado	10 minutos

Preparar el sistema de detección Diaminobencidina (DAB) en H₂O destilada

DAB	Monitorear bajo el microscopio	Máximo 2 minutos
-----	--------------------------------	------------------

Retirar el DAB e inactivar en cloro

H ₂ O destilada	1 lavado	10 minutos
----------------------------	----------	------------

Se retira el H₂O destilada y se separa cuidadosamente el cubreobjetos del fondo del pozo que contiene la monocapa celular.

Se deja secar al aire, se coloca una gota de medio de montaje (Citoseal 60[®]) en un portaobjetos y se voltea el cubreobjetos para que entre en contacto el medio de montaje con las células.

Cubreobjetos	Citoseal 60 [®]	Evitar hacer burbujas
--------------	--------------------------	-----------------------

Anexo 11. Protocolo de extracción de ARN de células epiteliales endometriales, mediante kit de columnas de sílice (Ilustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit).

- 1.- Las muestras se encontraban almacenadas en buffer de lisis y β - mercaptoetanol a -80°C, por lo que los tubos correspondientes a las células de cada una de las repeticiones, se extrajeron del ultracongelador y se colocaron sobre hielo para que se descongelaran gradualmente.
- 2.- Una vez descongeladas las muestras, se homogeneizaron mediante pipeteo hasta que se observó un líquido completamente translúcido.
- 3.- Se colocó el filtro (RNAspin Mini Filter) proveído por el kit, en un tubo de colección nuevo.
- 4.- A continuación, se depositó el lisado celular dentro de la columna del filtro y se centrifugó a 11,000 g por 1 minuto. Se descartó el filtro y se transfirió el filtrado a un nuevo tubo de 1.5 ml.
- 5.- Se agregaron 350 μ l de etanol de grado molecular al 70% al filtrado y se mezcló por medio de vortex dos veces por 5 segundos. Se colectó la mezcla y se depositó dentro de la columna proveída por el kit (RNAspin Mini Column). A continuación se centrifugó a 8,000 g por 30 segundos y se transfirió la columna a un nuevo tubo de colección.
- 6.- Se agregaron 350 μ l de Desalting Buffer (proveído por el kit) en la columna, se centrifugó a 11,000 g durante 1 minuto para secar la membrana y se descartó el líquido del tubo de colección.

7.- Se preparó el DNase reaction mixture (proveído por el kit), en un microtubo estéril, agregando 10 µl de la DNase I, más 90 µl de DNase Reaction Buffer para cada muestra y se homogeneizó suavemente.

8.- Se agregaron 95 µl del mix en el centro de la membrana de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

9.- Transcurrido el tiempo de incubación, se depositaron 200 µl de Buffer de lavado I (proveído por el kit) en la columna, se centrifugó a 11,000 g por 1 minuto y se colocó la columna en un tubo nuevo de colección.

10.- A continuación se agregaron 600 µl del buffer de lavado II (proveído por el kit) a la columna, se centrifugó a 11,000 g por 1 minuto y se descartó el fluido del tubo de colección. Nuevamente se agregaron 250 µl del buffer de lavado II a la columna y se centrifugó a 11,000 g por 2 minutos para secar por completo la membrana.

11.- Se colocó la columna en un tubo nuevo libre de nucleasas de 1.5 ml (previamente identificado), se depositaron 25 µl de agua libre de Rnasas directamente en la membrana para eluir el RNA presente en la columna y se centrifugó a 11,000 g por 1 minuto.

12.- Inmediatamente se colocaron las muestras sobre hielo, para prevenir una degradación prematura del ARN y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Anexo 12. Secuencias y características de los primers utilizados.

Gen	Secuencia del primer (5' - 3')	Tamaño del amplicón (bp)	Temperatura de alineación (°C)
RPS20	Fw: CGCTCCTGGCTCACCGCTGTT	148	62
	Rv: TGCGGCTGGTGAGGGTGATCC		
β-Actina	Fw: ACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACG	365	54
	Rv: AGGGGCGATGATCTTGATCTTCA		
VEGF	Fw: CTACCTCCACCATGCCAAGT	232	56
	Rv: ACACTCCAGACCTTCGTCGT		

VEGFR1	Fw: CACCCCGGAAATCTATCAGATC Rv: GAGTACGTGAAGCCGCTGTTG	180	56
VEGFR2	Fw: GAAATGGCTTCATCCTCAA Rv: CAAGGAAGACTTGGCTCAGG	177	54
BAX	Fw: GCCTATGTCCATGTGGTCAC Rv: CCAGCAAGAAGTCCCAGTCT	138	54
BCL2	Fw: CCTGTGGATGACTGAGTACC Rv: TTCAGAGACAGCCAGGAGAA	132	55
CASP3	Fw: TTGCGTGCTTCTAAGCCATG Rv: GTCCGTCTCAATCCCACAGT	162	56
FGF2	Fw: GAAGAGCGACCCTCACATCAA Rv: CAGTGCCACATACCAACTGGA	221	58
MAPK	Fw: TTAAATTTGTCAGGACACGGGCT Rv: GTCAAGGTGGACAAGCCGAG	117	54