



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**Expresión y localización de factores de crecimiento parecidos a la insulina y
sus receptores y factor de crecimiento de fibroblastos dos y receptor dos,
que participan en la angiogénesis durante la implantación en cerdas**

TESIS

que para optar por el grado de

Maestro en Ciencias

presenta:

MVZ Paulo Martín Barajas Oliva

Asesor:

**PhD. David Alejandro Contreras Caro del Castillo
FMVZ**

Comité tutorial:

**Dra. María Elena Trujillo Ortega
FMVZ**

**Dra. Susana Mendoza Elvira
FES Cuautitlán**

Ciudad de México, 2020 agosto



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a la vida, a ella le agradezco todo lo aprendido hasta este momento. Tengo la firme creencia de que todo sucede por una o varias razones, y entre ellas están las personas, situaciones, circunstancias y experiencias a lo largo de todo este proceso. Todas las decisiones que he tomado me han convertido en lo que soy y me han otorgado todo lo que tengo hasta ahora.

AGRADECIMIENTOS

- Universidad Nacional Autónoma de México.
- Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM.
- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ-UNAM).
- Departamentos de la FMVZ-UNAM: Fisiología y Farmacología, Medicina y Zootecnia de Cerdos, Microbiología e Inmunología y Patología.
- Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), Jilotepec, Edo. Méx., FMVZ-UNAM.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
- IPVS (*International Pig Veterinary Society*) – México 2014 – Identificación de moléculas que participan en la interacción materno-embionaria y proceso de angiogénesis durante la implantación de cerdos.
- PAPIIT-UNAM Clave: IA205617. Determinación de la expresión de moléculas que participan en la interacción materno-embionaria y proceso de angiogénesis durante la implantación en cerdos.
- Mi asesor principal: PhD. David Alejandro Contreras Caro del Castillo.
- Mi comité tutorial.

CONTENIDO

<u>RESUMEN</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
MARCO TEÓRICO	
1. El desarrollo embrionario en el cerdo. a) El periodo de peri-implantación y la comunicación materno-embrionaria. b) El proceso de angiogénesis.	
2. Factores potencialmente relacionados con la angiogénesis durante el periodo de peri-implantación en la gestación de cerdas. a) El factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF). b) La familia de factores de crecimiento parecidos a la Insulina: IGF-1 e IGF-2. c) Los receptores de la familia IGF: IGF1R e IGF2R. d) El factor de crecimiento de fibroblastos dos: FGF2, y receptor dos: FGFR2.	
3. La cerda como modelo de estudio del proceso de angiogénesis durante el periodo de peri-implantación.	
HIPÓTESIS	
OBJETIVO	
OBJETIVOS PARTICULARES	
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	14
1. Toma de muestras.	
2. Ensayos experimentales. 2.1. Inmunohistoquímica (IHQ). 2.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR). 2.2.1. Análisis estadístico.	
<u>RESULTADOS</u>	19
1. Inmunohistoquímica (IHQ). 2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).	
<u>DISCUSIÓN</u>	40
<u>CONCLUSIÓN</u>	45
<u>REFERENCIAS</u>	46
<u>APÉNDICE</u>	56
1. Anexos de inmunohistoquímica (IHQ). 2. Anexos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).	

RESUMEN

La cerda, a pesar de ser una especie prolífica, presenta pérdida embrionaria en la peri-implantación, donde la comunicación materno embrionaria, la angiogénesis y ciertos factores de crecimiento son esenciales para un adecuado proceso vascular. El presente estudio determinó la localización y expresión en el endometrio y tejido uterino, respectivamente, de factores de crecimiento proangiogénicos de las familias IGF (IGF-1 e IGF-2) y FGF (FGF2) junto con sus receptores (IGF1R, IGF2R y FGFR2), en cerdas gestantes: 12, 14, 16 y 18 días de gestación (n=8), y cerdas nulíparas en las diferentes etapas del ciclo estral: proestro, estro, metaestro y diestro (n=8). IGF1R e IGF-2 fueron localizados en diferentes estructuras e IGF-1, IGF2R, FGF2 y FGFR2 en las fibras del estroma y en la mucosa del endometrio, principalmente. La expresión de FGFR2 en la fase lútea del ciclo estral fue significativamente mayor en comparación a la expresión a los 14, 16 y 18 días de gestación y en la fase folicular del ciclo estral. Dichos resultados podrían indicar actividad autocrina y paracrina apoyándose por hormonas esteroides a lo largo del periodo de peri-implantación donde IGF-1 e IGF-2 funcionan como principales factores de crecimiento en la angiogénesis tanto placentaria como en la implantación embrionaria junto con FGF2, pero este último solo en momentos de compensación vascular. El presente trabajo ayuda a elucidar la participación de factores y receptores proangiogénicos durante la peri-implantación en el cerdo, apoyando también en la generación de conocimiento aplicable a otras especies, como el humano.

ABSTRACT

Despite being a prolific specie, the swine presents embrionic lost during peri-implantation, problems have been described on the communication between maternal and embrionic tissues. Angiogenesis and certain growth factors are crucial for a success vascular process. The present study shows the localization and expression of proangiogenic growth factors from IGF (IGF-1 and IGF-2) and FGF (FGF2) families with their receptors (IGF1R, IGF2R and FGFR2), in pregnant gilts: 12, 14, 16 and 18 gestation days (n=8) and gilts in the estrus cycle stages: proestrus, estrus, metaestrus and diestrus (n=8) in endometrial and uterine tissue, respectively. IGF-2 and IGF1R were located in different structures and the localization of IGF-1 and IGF2R mainly was in the estromal elastic fibers and mucosa into the endometrial tissue. The FGFR2 expression in the estrus cycle's luteal phase showed a significant increase compared to 14, 16 and 18 gestation days and estrus cycle's proliferative phase expressions. These results may imply autocrine and paracrine activities supported from steroid hormones along the peri-implantation period, where IGF-1 and IGF-2 are main growth factors in angiogenesis of the placental and embryonic implantation along with FGF2, but the latter only in moments of vascular compensation. This study elucidates the action from proangiogenic growth factors along with their receptors during swine peri-implantation supporting also with useful knowledge in other species, such as humans.

INTRODUCCIÓN

En la producción porcina, la reproducción es primordial para el manejo de hembras en servicio y gestación estableciendo como base económica la producción de lechones. Para obtener lechones con un peso óptimo y en perfecto estado de salud es necesario seguir desarrollando conocimiento en diferentes disciplinas de la biología, como biología del desarrollo, biología tisular y biología molecular porque, a pesar de ser una especie prolífica, el número de crías que nacen por gestación en las cerdas se ve directamente afectado por la tasa de ovulación, la tasa de fertilización y la supervivencia de embriones y fetos. La cerda puede tener el potencial genético de presentar en la luz uterina desde 20 hasta 25 óvulos por ciclo estral (Town, et al, 2005) y puede presentarse una tasa de fertilización de los gametos cercana al 95% (Youngs, et al, 1993; Spencer, 2013), es decir, la cantidad de embriones tempranos puede ser alrededor de 20. Sin embargo, la pérdida embrionaria y de conceptos puede ocurrir 1) durante el transcurso del periodo de peri-implantación, entre los días 12 y 30 de gestación, donde se pierde aproximadamente el 25% de los embriones fertilizados (Ross, et al, 2009) o 2) hacia la mitad de la gestación, entre los días 50 y 70 de gestación presentándose una pérdida entre 10 y 15% de los fetos (Pope, 1994; Wilson, et al, 1999; Knauer y Hostetler, 2013). Con esto, el tamaño de la camada se establece en 10.5 lechones al momento del parto (Geisert y Schmitt 2002) dando un total de 23.6 lechones por cerda al año, en promedio (Knauer y Hostetler, 2013). Esto abre una ventana de oportunidad disminuyendo pérdidas económicas en la producción, por lo que se considera que la comunicación materno-embriónica es esencial para el desarrollo

exitoso de la implantación y a lo largo de la gestación en cerdas, donde se requieren condiciones óptimas para que se lleven a cabo diversos procesos. Por lo anterior, es necesario generar conocimiento que contribuya a esclarecer la problemática que se presenta para mantener el número y heterogeneidad de crías en las camadas durante el desarrollo embrionario, considerando la peri-implantación como una ventana de tiempo clave por el desarrollo y crecimiento de las membranas placentarias y el embrión, en el cual se logra una interacción adecuada con el tejido materno al finalizar la implantación, así como definir los mecanismos de comunicación críticos en el establecimiento de la gestación en cerdas.

MARCO TEÓRICO

1. El desarrollo embrionario en el cerdo.

a) El periodo de peri-implantación y la comunicación materno-embionaria.

La comunicación que se lleva a cabo entre los tejidos materno y embrionario es crítica a lo largo del periodo de peri-implantación (primer tercio de la gestación) para el desarrollo embrionario y de las membranas placentarias con una posterior implantación del concepto. A lo largo de este proceso de comunicación entre tejidos también se llevan a cabo diversos procesos como la reorganización celular del embrión para su elongación. Para esto, el trofoblasto se desarrolla a través de diferentes fases: una esférica alrededor del día 10 (Bazer y Johnson, 2014), una ovoide, una tubular y, por último, una filamentosa hacia el día 12 de gestación (Ross, et al, 2009; Bazer y Johnson, 2014). A partir de la expansión del trofoblasto en filamento y del corion, inicia la implantación del concepto con la formación de pliegues placentarios hacia el día 13 y 14 de gestación (Bazer y Johnson, 2014) dándose por completo la implantación alrededor del día 15 junto con un buen

desarrollo del corion y el desarrollo completo de los pliegues placentarios alrededor del día 18 de gestación (Geisert y Schmitt, 2002). Durante el periodo de peri-implantación, el endometrio y los embriones secretan diversos factores para llevar a cabo un diálogo que establece una red interconectada de comunicación (Bazer y Johnson, 2014). Entre estos factores que facilitan el diálogo se contemplan quimosinas, citosinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y hormonas esteroides y peptídicas. Dichos factores pueden estar presentes en dos diferentes mecanismos que han sido descritos en mamíferos euterios para que se logre la transferencia de componentes nutricionales desde la madre hacia el embrión/feto. El primero es un material extracelular derivado de las glándulas endometriales uterinas denominado histotrofo, el cual se acumula en el espacio que existe entre el tejido materno y embrionario para ser absorbido por las areolas, estructuras especializadas y localizadas en el epitelio glandular del endometrio; y el segundo es la nutrición hematotrófica caracterizada por el intercambio sanguíneo entre la circulación materna y embrionaria/fetal facilitada por una íntima aposición de ambos tejidos. Dicho mecanismo de nutrición es predominante cuando se establece la formación de la placenta, donde un desarrollo exitoso de vasos sanguíneos es esencial para el transporte de factores y elementos nutricionales hacia los embriones en crecimiento (Wei, et al, 2009; Edwards, et al, 2011).

b) El proceso de angiogénesis.

Se han establecido hipótesis respecto a la relación que puede existir entre la pérdida embrionaria durante el periodo de peri-implantación y un inadecuado desarrollo de vasos sanguíneos, lo cual puede determinar la supervivencia de los embriones y fetos por fallas en la interacción entre los tejidos materno y embrionario (Edwards,

et al, 2012). Además, durante este periodo se llevan a cabo procesos relacionados a la reorganización celular del blastocisto, el desarrollo embrionario y la formación de las membranas placentarias donde participan factores de crecimiento que apoyan el proceso de angiogénesis. La angiogénesis se define como la formación de vasos sanguíneos a partir de los ya existentes y se lleva a cabo en la interacción materno-embrionaria/fetal durante el periodo de peri-implantación regulado por un balance entre factores de crecimiento proangiogénicos y sus receptores promoviendo el crecimiento, migración, sobrevivencia y diferenciación de células endoteliales a través de la modulación de cascadas de señalización intracelular (Wei, et al, 2009), apoyando el desarrollo y crecimiento embrionario y de la placenta.

2. Factores potencialmente relacionados con la angiogénesis durante el periodo de peri-implantación en la gestación de cerdas.

El periodo de peri-implantación es crítico durante el desarrollo de los conceptos en la especie porcina. La elongación y expansión de los conceptos permiten un mejor intercambio de nutrientes durante toda la gestación (Ross, et al, 2009). La gestación temprana está asociada a cambios morfológicos y funcionales en el útero acompañado de una remodelación vascular. Una de las primeras reacciones en la señal estrogénica derivada del embrión es el incremento del suministro de sangre uterina. En los porcinos, el incremento del flujo de sangre arterial en el útero se ha observado entre los 11 y 13 días de gestación (Ford y Christenson, 1979; Ford, et al, 1982). Además, las etapas tempranas en la implantación embrionaria se caracterizan por el incremento de la permeabilidad vascular endometrial en varias

especies, incluyendo primates (Enders, et al, 1983), roedores, (Psychoyos, 1973), oveja (Boshier, 1970) y cerdo (Keys y King, 1988). La interrupción de alguno de estos eventos puede provocar la pérdida y, por lo tanto, la reducción en el tamaño de la camada y la heterogeneidad en el peso de los conceptos y fetos. La angiogénesis es crítica en la especie porcina a lo largo del periodo de peri-implantación, donde la implantación final sucede a partir del día 15 de gestación, esto en preparación para la angiogénesis dado que hay un incremento en los requerimientos de nutrientes e intercambio de gases por el crecimiento de los conceptos, considerando que su placentación es epiteliocorial no invasiva y su desarrollo ocurre en sincronía específicamente con los sitios en donde se dará la implantación (Miese-Looy, et al, 2012).

a) El factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF).

El factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF – Vascular Endotelial Growth Factor – por sus siglas en inglés) es uno de los principales factores proangiogénicos en la placenta del cerdo (Reynolds y Redmer, 1998; Reynolds, et al, 2000) y su expresión está relacionada con la angiogénesis uterina durante el ciclo menstrual en humanos (Reynolds y Redmer, 2001). Estudios en ratones knock-out han demostrado que la delección de los genes de los receptores para VEGF (VEGFR1 y VEGFR2) causa muerte embrionaria hacia el día 8 de gestación (Fong, et al, 1995). En el cerdo, VEGFR1 se encontró expresado en mayor cantidad en los sitios de unión, mientras que VEGFR2 se encontró con mayor expresión en el trofoblasto a lo largo del periodo de peri-implantación; esto indica distintos mecanismos de la regulación de angiogénesis tanto en los sitios maternos como fetales (Wessels, et

al, 2007). Hay otros factores que pueden apoyar la expresión de VEGF, como la presencia de estrógenos en el ambiente uterino: al aplicar estrógenos de manera exógena en ratones y ovejas ovariectomizadas, la expresión del ARN mensajero (ARNm) de VEGF se regula positivamente poco después de la administración de estrógenos en relación al incremento de la vascularización y el fluido sanguíneo uterino. Durante la gestación en cerdas, el VEGF se encuentra activamente transcrito tanto en el tejido materno como en el trofoblasto del embrión.

b) La familia de factores de crecimiento parecidos a la insulina: IGF-1 e IGF-2.

Otras moléculas que regulan la angiogénesis son los Factores de Crecimiento parecidos a la Insulina uno y dos (IGF, por sus siglas en inglés – Insuline-like Growth Factor): IGF-1 e IGF-2. Junto con sus receptores, son consideradas moléculas proangiogénicas ya que promueven la expresión de VEGF (Denley, et al, 2005; Pringle y Roberts, et al, 2007; Kaczmarek, et al, 2008; Kaczmarek, et al, 2008). Los IGFs son polipéptidos de cadena sencilla con un 62% de similitud respecto a la secuencia de la proinsulina y, a diferencia de otras hormonas peptídicas, pueden ser producidos por casi cualquier célula del organismo y no solo producidos y almacenados en un tejido en específico. El IGF-1 es un polipéptido de 70 aminoácidos (Denley, et al, 2005) con un peso molecular de 7.5 kDa, organizado dentro de 4 dominios denominados A, B, C, y D. En relación a la insulina, los dominios A y B tienen un 49% de similitud en su secuencia entre los mismos dominios. Aunque el hígado es, por mucho, el sitio principal de la producción de IGF-1, también puede ser producido por casi cualquier tejido del organismo (Rosen, 1999) y se encuentra mayormente implicado en el desarrollo embrionario,

específicamente durante el periodo de peri-implantación. La transcripción de IGF-1 se encuentra elevada al día 12 de la gestación en cerdas, aproximadamente, estimulada por la producción de estrógenos por parte del embrión (Green, et al, 1996). El IGF-2 es un polipéptido de 67 aminoácidos (Denley, et al, 2005) con un peso molecular de 7.4 kDa, su secuencia de aminoácidos es idéntica a la del IGF-1 en un 70% (DeChiara, et al, 1991; Reik, et al, 2000) y su transcripción incrementa a lo largo de la gestación sugiriendo una mayor relevancia en los eventos de crecimiento tanto embrionario como fetal (Simmen, et al, 1992; Geisert, et al, 2001).

c) Los receptores de la familia IGF: IGF1R e IGF2R.

IGF-1 e IGF-2 interactúan dos receptores en diferentes superficies celulares, dichos receptores pueden presentarse solos o juntos en las células objetivo (Dupont y Holzenberger, 2003). Al activarse ambos receptores inician una cascada de señalización que resulta en la regulación de un gran número de respuestas biológicas (Denley, et al, 2005). El receptor para el factor de crecimiento parecido a la insulina uno (IGF1R) es una glicoproteína heterotetramérica que consiste de dos subunidades alfa extracelulares y dos subunidades beta ligadas a su enlace disulfuro, este receptor presenta una similitud del 70% al receptor para la insulina (IR) y sus vías de señalización se han asociado estrechamente con la diferenciación y migración celular y, en algunos casos, en procesos de apoptosis. A lo largo de la gestación en cerdas, el IGF1R se encuentra ligeramente presente en células endometriales a los 20 días, pero se ha encontrado en mayor cantidad en fetos más pequeños en comparación a aquellos de 65 a 100 días (Tilley, et al, 2007). El receptor para el factor de crecimiento parecido a la insulina dos (IGF2R), aunque se

une preferentemente al IGF-2, la forma en que actúa con dicho factor de crecimiento en ciertas células sigue en debate. El IGF2R es un receptor monomérico con un dominio extracelular inusual, compuesto por casi 15 repeticiones basadas en cisteína exclusivamente (Kornfeld, 1992; Dupont y Holzenberger, 2003), su unión a IGF-1 o IGF-2 se da por degradación lisosomal sin inducir una respuesta lisosomal específica y es muy diferente al IGF1R en cuanto a su estructura. IGF2R tiene 100 veces más afinidad por IGF-2 a diferencia de IGF-1, no tiene actividad tirosinasa intrínseca, presenta mayor expresión que el IGF1R tanto en tejido fetal como materno, pero es variable entre el tamaño de los embriones porcinos (Chastant, et al, 1994).

d) El factor de crecimiento de fibroblastos dos: FGF2, y receptor dos: FGFR2.

Otra molécula considerada proangiogénica es el Factor de Crecimiento de Fibroblastos dos (por sus siglas en inglés – Fibroblast Growth Factor): FGF2, el cual es un potente mitógeno de células endoteliales y provee los estímulos iniciales necesarios para la angiogénesis (Presta, et al, 2005). Este factor de crecimiento se ha encontrado altamente expresado en el endometrio durante la gestación de rata en la decidua endometrial y a los 11 días de la pseudogestación (Srivastava, et al, 1998), a lo largo del ciclo ovulatorio en humano (Rusnati, et al, 1990), en la lámina basal del epitelio uterino de primate (Samathanam, et al, 1998) y en el epitelio endometrial a los 6 y en la decidua a los 7 y 8 días de gestación en ratón (Wordinger, et al, 1994). En el endometrio porcino, el FGF2 y sus dos receptores uno y dos (FGFR1 y FGFR2) están expresados al inicio de la gestación, alrededor del día 10 cuando está ocurriendo una extensiva angiogénesis. El FGF2 junto con el FGFR1

se han localizado en el lumen, estroma y glándulas del endometrio porcino (Welter, et al, 2004; Wollenhaupt, et al, 2005).

3. La cerda como modelo de estudio del proceso de angiogénesis durante el periodo de peri-implantación.

En el presente trabajo de investigación se determinó la localización y expresión de los factores de crecimiento IGF-1, IGF-2 y FGF2 junto con los receptores IGF1R, IGF2R y FGFR2 en el endometrio y en todo el tejido uterino, respectivamente, que participan en la interacción materno-embrionaria y presumiblemente en el proceso de angiogénesis para apoyar en el conocimiento sobre la gestación de cerdas relacionando la formación de vasos sanguíneos durante el periodo de peri-implantación. Además, respecto a la no invasión de tejidos durante la implantación y placentación, esta especie puede considerarse como un excelente modelo para el estudio de los procesos de implantación y angiogénesis, así como el intercambio materno-embrionario ya que ambos tejidos son claramente distinguibles uno de otro, por lo que pueden ser estudiados de manera independiente como diferentes tipos celulares (Tayade, et al, 2006), e incluso de utilizar esta especie animal como modelo en el estudio de mecanismos que no han sido completamente descritos en otras especies y que puedan favorecer en despejar algunas incógnitas para la especie humana, ya que con este último se comparten ciertas similitudes en anatomía, genética, aparatos cardiovascular y gastrointestinal y patofisiología, donde los modelos animales clásicos pueden tener usos limitados en cuanto la representación de la morfología y desarrollo embrionario humano para diversos estudios (Walters, et al, 2012).

HIPÓTESIS

Identificar la localización y expresión de IGF-1, IGF-2, IGF1R, IGF2R, FGF2 y FGFR2 en los tejidos materno-embriionario de cerdas, permitirá establecer su participación en la angiogénesis durante el periodo de peri-implantación en esta especie.

OBJETIVO

Determinar la localización y expresión de IGF-1, IGF-2, IGF1R, IGF2R, FGF2 y FGFR2 tanto en tejido materno como embriionario presente en cerdas durante el periodo de peri-implantación a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación en comparación con cerdas durante el ciclo estral.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar la localización de factores de crecimiento proangiogénicos IGF-1, IGF-2 y FGF2 y los receptores IGF1R, IGF2R y FGFR2 en el endometrio de cerdas durante el periodo de peri-implantación a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación en comparación con el endometrio de cerdas en las diferentes etapas del ciclo estral, por medio de pruebas de inmunohistoquímica (IHQ).
- b) Determinar la expresión de factores de crecimiento proangiogénicos IGF-1, IGF-2 y FGF2 y los receptores IGF1R, IGF2R y FGFR2 en el tejido uterino de cerdas durante el periodo de peri-implantación a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación en comparación con el tejido uterino de cerdas en las diferentes fases del ciclo estral, por medio de pruebas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).

- c) Obtener la descripción y comparación de la localización de los factores de crecimiento proangiogénicos y los receptores estudiados por medio de pruebas de IHQ entre endometrios de cerdas gestantes, entre endometrios de cerdas en las diferentes etapas del ciclo estral y entre endometrios de cerdas gestantes y cerdas en las diferentes etapas del ciclo estral.

- d) Obtener la descripción y análisis de la expresión de los factores de crecimiento proangiogénicos y los receptores estudiados por medio de pruebas de qRT-PCR entre tejidos uterinos de cerdas gestantes, entre tejidos uterinos de cerdas en las diferentes fases del ciclo estral y entre tejidos uterinos de cerdas gestantes y cerdas en las diferentes fases del ciclo estral.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Toma de muestras.

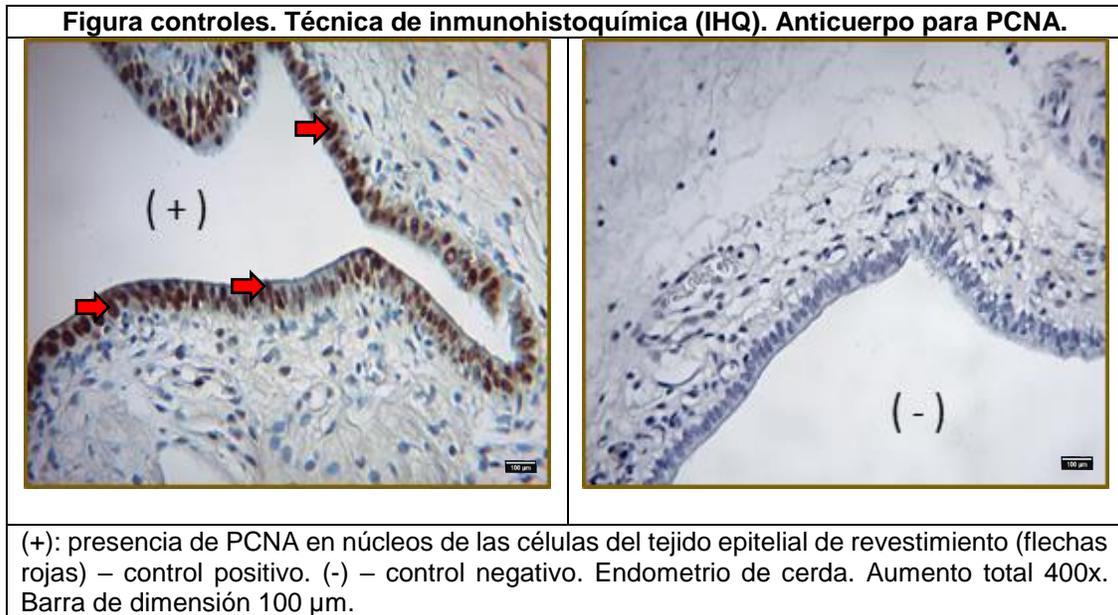
El desarrollo de este proyecto inició en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), instalaciones que forman parte de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), localizadas en el municipio de Jilotepec, Edo. Méx. Se obtuvieron muestras del tracto reproductor de 16 hembras nulíparas con un rango de peso de 120 a 130 kg. Los animales fueron divididos en 2 grupos (n=8): El primer grupo correspondiente a cerdas gestantes (Gx) y el segundo grupo correspondiente a cerdas en diferentes etapas del ciclo estral (CE). El manejo del grupo Gx se estableció en 4 subgrupos considerando cada uno a partir del día de la inseminación artificial (día 0) hasta el día de su eutanasia: subgrupo 1, a los 12 días; subgrupo 2, a los 14 días; subgrupo 3 a los 16 días y subgrupo 4 a los 18 días de gestación (n=2). Las cerdas del grupo CE fueron divididas en subgrupos conforme a la fase y etapa del ciclo estral: fase folicular correspondiendo a las etapas de proestro y estro y la fase lútea correspondiendo a las etapas de metaestro y diestro (n=2, n=1). Las hembras fueron eutanasiadas de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014 – Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres (DOF – *Diario Oficial de la Federación*, 2015). Cada uno de los cuernos uterinos de los aparatos reproductores, tanto de las cerdas gestantes (Gx) como en ciclo estral (CE), fueron separados y destinados como cuernos derechos y cuernos izquierdos: los derechos fijados en paraformaldehído al 4% y los izquierdos para congelación en nitrógeno líquido (-80°C) para procesos de IHQ y qRT-PCR, respectivamente.

Se consideró que con los días seleccionados sea suficiente para cubrir en gran medida la ventana del proceso de peri-implantación en la gestación temprana en comparación al ciclo estral. Posteriormente, las muestras fueron enviadas a la FMVZ-UNAM para realizar los ensayos experimentales y, posteriormente, conocer la localización y expresión de los factores de crecimiento y sus receptores contemplados en el estudio.

2. Ensayos experimentales.

2.1. Inmunohistoquímica (IHQ).

El procesamiento de muestras, posterior a la fijación en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, se llevó a cabo en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM (anexo 1.1). Las muestras se incluyeron en parafina con su identificación respecto al grupo y subgrupo correspondiente utilizando una estación de inclusión en parafina modelo *HistoCore* de *Leica*®. Al tener listos los cassetes con las muestras de tejido uterino en parafina, se dispuso el corte de los mismos en un microtomo *MICROM HM 355 S* a 4 µm de grosor. El número de laminillas, la cantidad de cortes en cada una y el número de pases entre cada corte se establecieron bajo un protocolo (anexo 1.2); previo a los procesos de IHQ, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina (H-E) de algunas laminillas para poder corroborar su arquitectura histológica íntegra (datos no mostrados). Posteriormente, teniendo la estandarización de las diluciones de los anticuerpos (anexo 1.2 – cuadro 1.1 y cuadro 1.2) y del protocolo para las pruebas (anexo 1.3) se desarrollaron los ensayos experimentales definitivos con el anticuerpo de proliferación PCNA como control para cada uno de los ensayos (figura controles).



2.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).

Se realizaron varios procesos previamente a las pruebas de qRT-PCR, cada uno con un protocolo establecido:

- Extracción de ARN.
- Obtención de ADN complementario (ADNc) (RT-PCR).
- Reacción en cadena de la polimerasa en punto final (PCR).

La extracción de ARN para cada muestra de tejido uterino se realizó mediante un protocolo con trizol (anexo 2.1). Las extracciones de ARN fueron llevadas a un espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000* para poder conocer la concentración en ng/ml y la pureza de cada una de las muestras y poder obtener un ADNc de calidad. Posteriormente, se obtuvo ADNc de cada una de las muestras mediante un kit *Omniscript RT* de *Qiagen®* (anexo 2.2 – cuadro 2.1) para posteriormente realizar la

reacción en cadena de la polimerasa en punto final con un kit *ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mlx* de *Sigma-Aldrich®* (anexo 2.3 – cuadro 2.2). Bajo la recomendación de temperaturas de cada una de los indicadores de oligonucleótidos (anexo 2.3 – cuadro 2.3) se corrieron PCR en punto final en gradientes utilizando ADNc de riñón de cerda como tejido control y β -actina como indicador de oligonucleótidos control en cada una de las pruebas para obtener las temperaturas óptimas y corroborando los pesos moleculares de cada una de los indicadores de oligonucleótidos por medio de geles de agarosa al 2% (anexo 2.4 – imagen 2.1). Como paso final antes de las qRT-PCR, se corroboró los indicadores de oligonucleótidos, con las temperaturas óptimas en el gel anterior con β -actina como control, pero utilizando una muestra de ADNc de tejido uterino de cada uno de los subgrupos destinados para el estudio: grupo Gx: subgrupos: 1) 12 días, 2) 14 días, 3) 16 días y 4) 18 días de gestación; grupo CE: subgrupo fase folicular: 1) proestro, 2) estro; y subgrupo fase lútea: 3) metaestro y 4) diestro (anexo 2.4 – imágenes 2.2 a 2.7), agregando el indicador de oligonucleótidos RPS20 que funcionó como control en pruebas de qRT-PCR (anexo 2.4 – imagen 2.8). Finalmente, se destinaron los indicadores de oligonucleótidos a los procesos de qRT-PCR con un kit *QuantiNova Probe PCR* de *Qiagen®* (anexo 2.5). Respecto a las muestras analizadas para los subgrupos del grupo Gx – 1) 12 días, 2) 14 días, 3) 16 días y 4) 18 días de gestación: se tomó una muestra de 2 diferentes sitios del tejido uterino por cada cerda, es decir, 4 diferentes sitios de tejido uterino por cada 2 cerdas de cada subgrupo; para el grupo CE se tomó en cuenta los dos subgrupos por cada fase y también considerando las 4 etapas del ciclo estral: se tomó una muestra de 2 sitios del tejido uterino de cada una de las cerdas en las diferentes etapas del ciclo estral y se tomaron en cuenta 4 muestras

en cada fase: folicular (proestro y estro) y lútea (metaestro y diestro) (anexo 2.5 – cuadro 2.4).

2.2.1. Análisis estadístico

Los resultados de qRT-PCR fueron analizados por medio del programa SAS en relación al gen de referencia RPS20 por medio de un modelo estadístico enfocado en efectos mixtos, considerando los valores de las expresiones relativas de cada uno de los genes analizados como variable aleatoria y el tiempo a lo largo de la gestación y durante las fases del ciclo estral como variable fija, junto con el método de máxima verosimilitud residual; posteriormente, se realizó una prueba de Tukey para conocer las diferencias estadísticas de las medias obtenidas entre grupos y subgrupos ($p < 0.05$).

RESULTADOS

1. Inmunohistoquímica (IHQ).

Se desarrolló IHQ para cada uno de los 3 factores de crecimiento y 3 receptores: IGF-1, IGF-2, IGF1R, IGF2R, FGF2 y FGFR2. Las figuras muestran el inmunomarcado de los mismos tanto en el tejido epitelial de revestimiento, en el tejido conjuntivo ordinario denso irregular del estroma compuesto por fibras elásticas y en el tejido epitelial glandular de la mucosa del endometrio respecto a los grupos de animales gestantes y animales durante el ciclo estral en los subgrupos 12, 14, 16 y 18 días de gestación, así como en las diferentes etapas, respectivamente. La presencia de IGF-1 destaca en el citoplasma y membrana celular del tejido epitelial de revestimiento de la mucosa del endometrio durante la etapa de diestro del ciclo estral; para este mismo factor de crecimiento, destaca su presencia en las fibras elásticas que componen el tejido conjuntivo ordinario denso irregular (estroma) en la lámina propia de la mucosa a los 16 y 18 días de gestación y durante las etapas de metaestro y diestro del ciclo estral (figura 1). La presencia de IGF2 destaca en el citoplasma celular del tejido epitelial de revestimiento de la mucosa del endometrio en los 4 subgrupos de la gestación, con presencia en el citoplasma celular del trofoblasto a los 16 días de gestación, y durante las cuatro etapas del ciclo estral y en la membrana celular del tejido epitelial de revestimiento de la mucosa durante las etapas del ciclo estral (figura 2.1); también se localiza en el citoplasma celular del tejido epitelial glandular a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante las cuatro etapas del ciclo estral excepto en la etapa de estro, y en las fibras elásticas de la lámina propia en los 4 subgrupos de la gestación, con

menor presencia a los 18 días de gestación (proximal al epitelio de revestimiento), y durante las cuatro etapas del ciclo estral, con menor presencia en las etapas de proestro y estro (proximal al epitelio de revestimiento); respecto a su localización en los vasos sanguíneos de la lámina propia, destaca en las células del endotelio en los 4 subgrupos de la gestación, junto con presencia nuclear a los 18 días de gestación, y en la etapa de proestro del ciclo estral, y en las células de la capa muscular de los mismos a los 12 y 16 días de gestación y durante la etapa de metaestro del ciclo estral (figura 2.2).

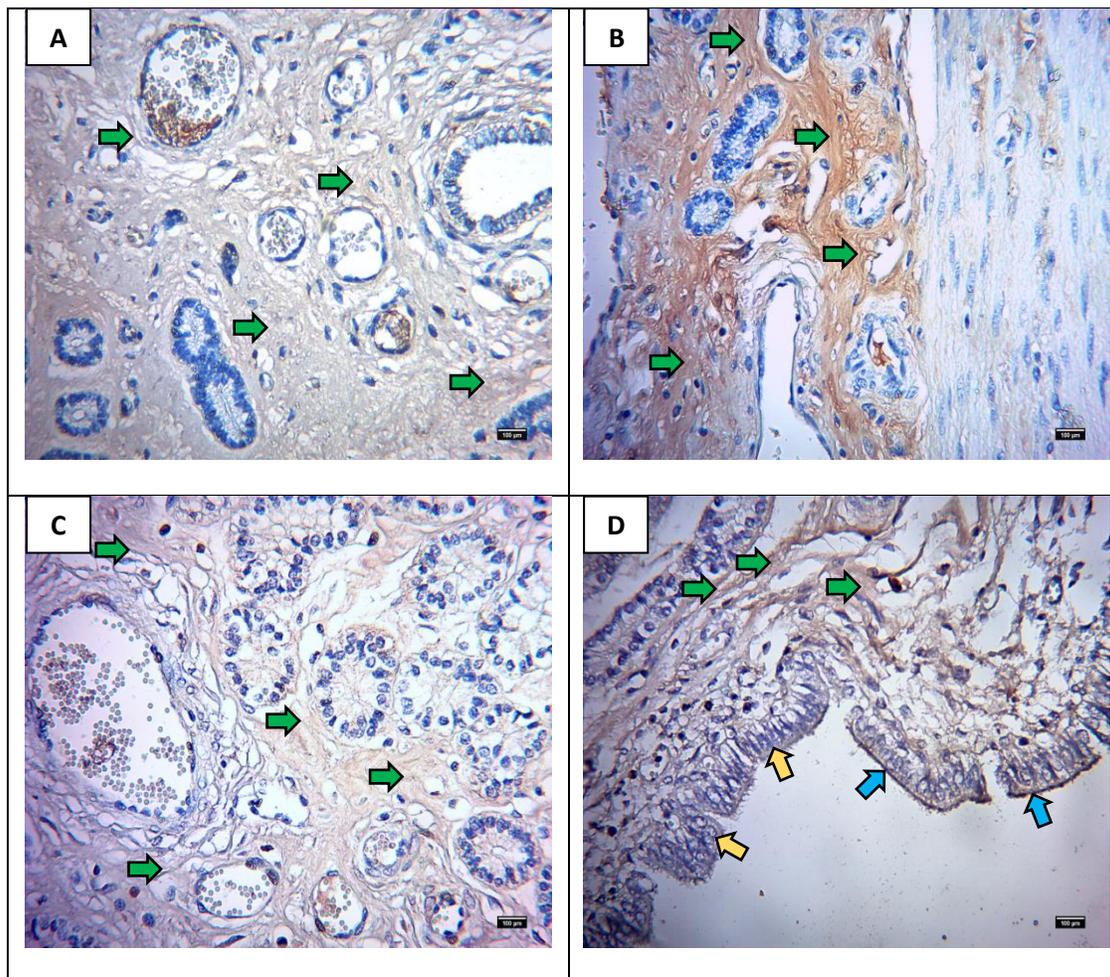
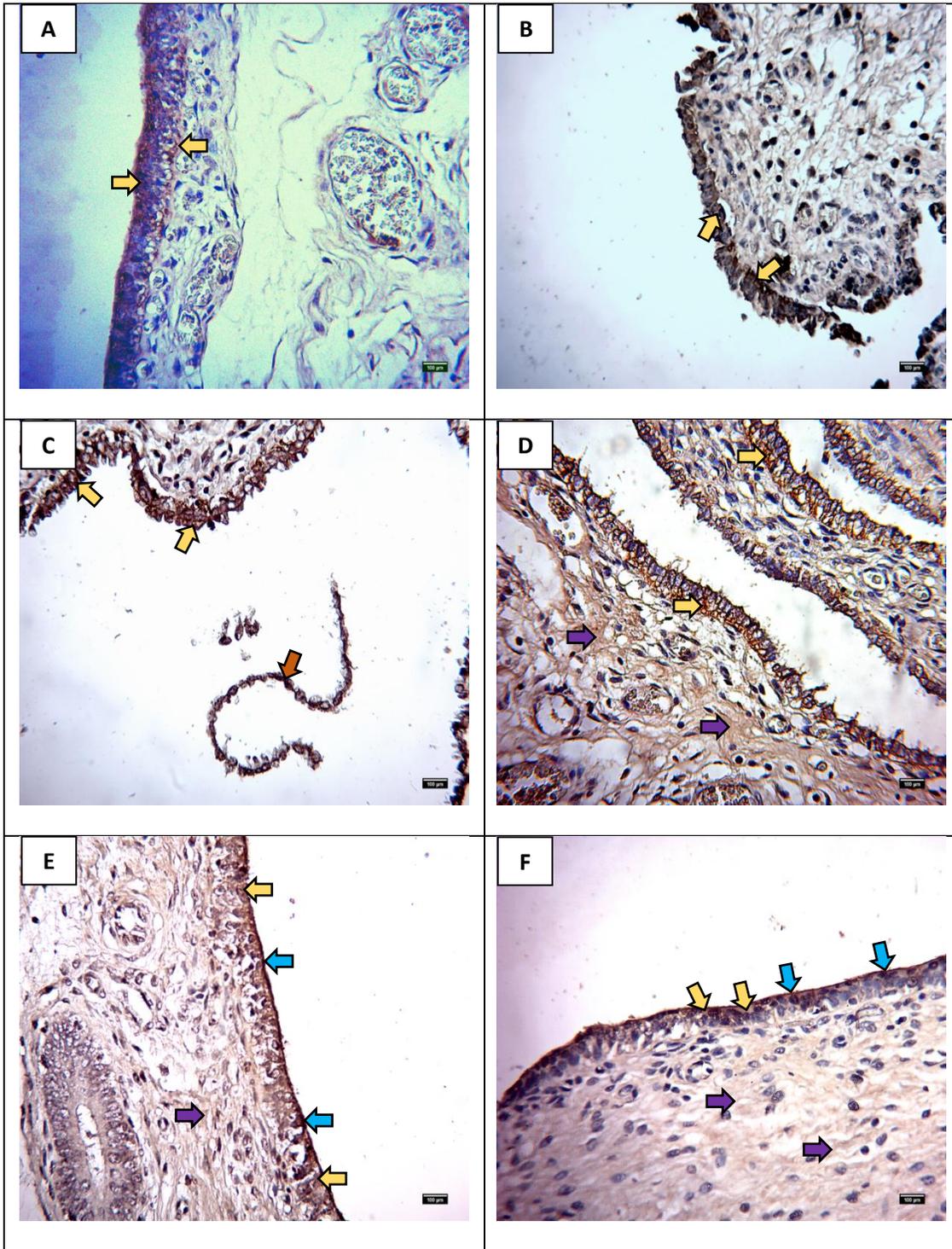


Figura 1. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Presencia de IGF-1 en las fibras elásticas que componen el tejido conjuntivo ordinario denso irregular de la lámina propia (flechas verdes), en el citoplasma (flechas amarillas) y membrana celular (flechas azules) del tejido epitelial de revestimiento columnar simple de la mucosa. Endometrio de cerca a los 16 (A) y 18 (B) días de gestación y en la etapa de metaestro (C) y diestro (D) del ciclo estral. Aumento total 400x. Barra de dimensión 100 µm.



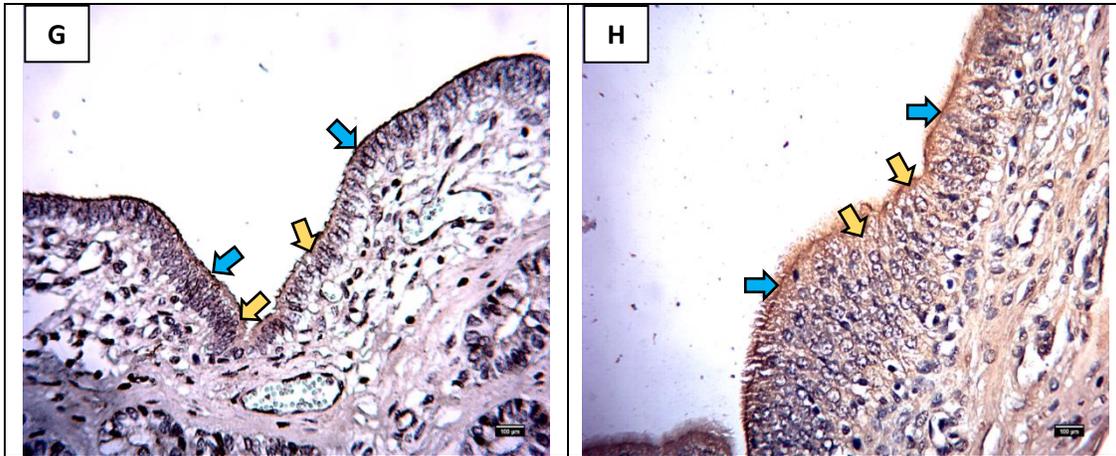
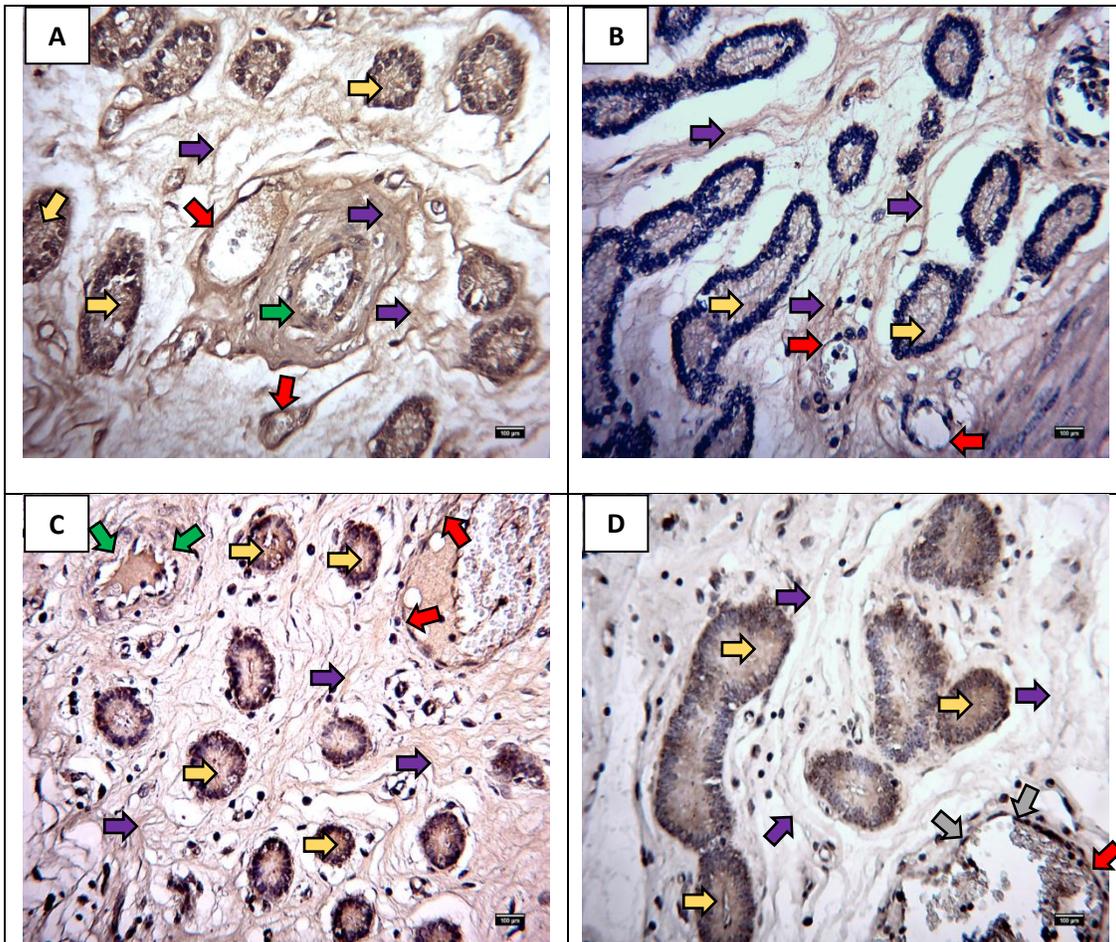
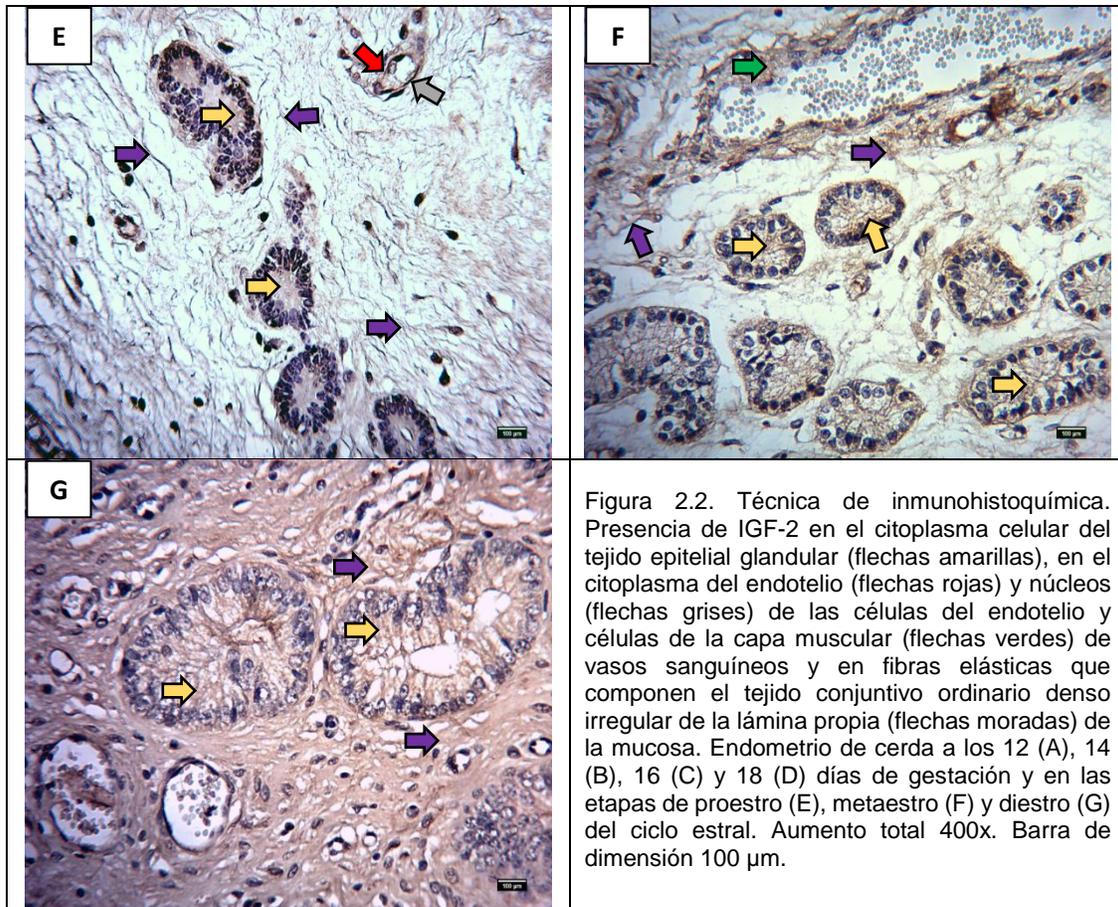


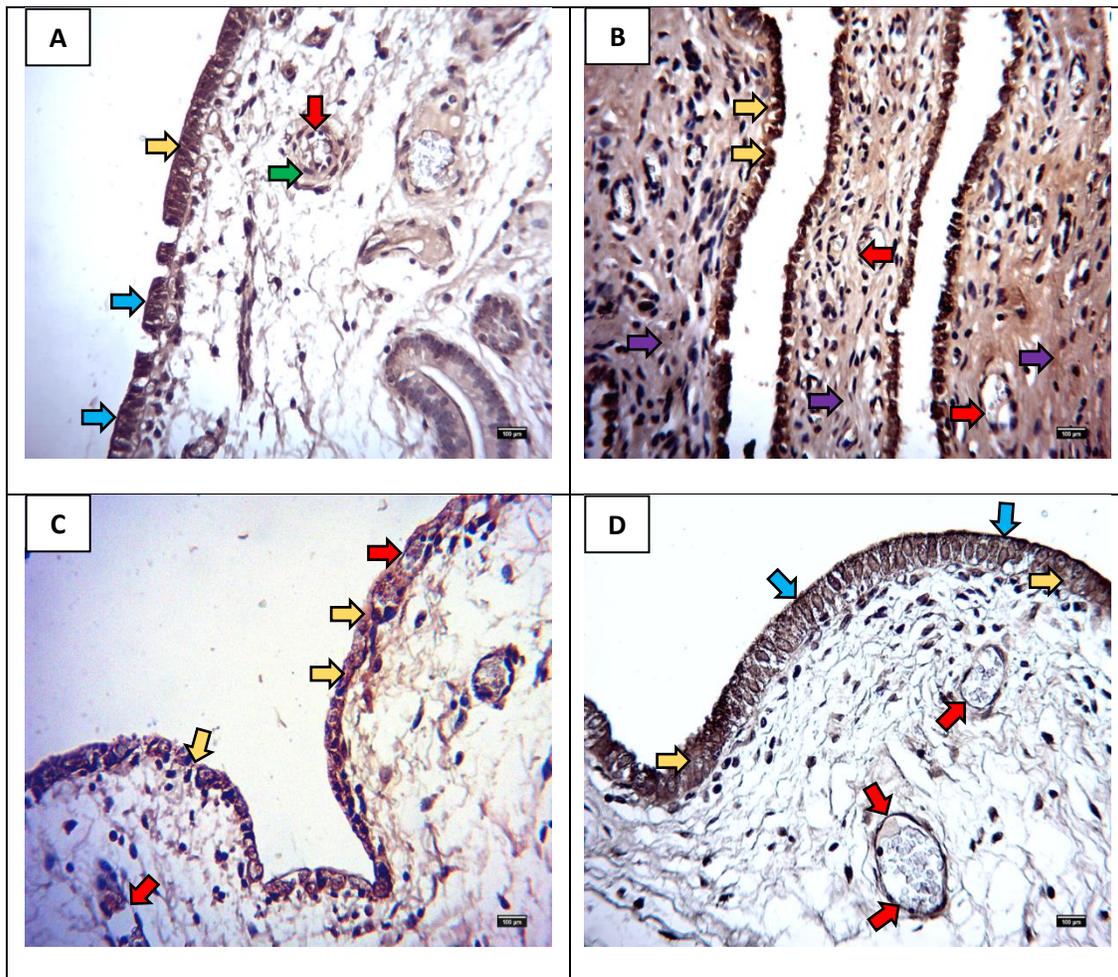
Figura 2.1. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Presencia de IGF-2 en el citoplasma celular (flechas amarillas) del tejido epitelial de revestimiento columnar simple y pseudoestratificado de la mucosa (presencia en el citoplasma de las células del trofoblasto a los 16 días de gestación (flecha café)), en la membrana celular del mismo tejido (flechas azules) y en fibras elásticas del tejido conjuntivo ordinario denso irregular (flechas moradas) de la lámina propia de la mucosa. Endometrio de cerda a los 12 (A), 14 (B) 16 (C) y 18 (D) días de gestación y en las etapas de proestro (E), estro (F), metaestro (G) y diestro (H) del ciclo estral. Aumento total 400x. Barra de dimensión 100 μ m.





La presencia de IGF1R destaca en el citoplasma celular del tejido epitelial de revestimiento de la mucosa del endometrio a los 12, 16 y 18 días de gestación y durante las etapas de proestro, estro y diestro del ciclo estral; siguiendo en la membrana celular del mismo tejido, resalta su localización a los 12 días de gestación y durante las etapas de proestro, estro y diestro del ciclo estral (figura 3.1); este factor de crecimiento también se localiza en el citoplasma celular del tejido epitelial glandular y en las fibras de la lámina propia del estroma a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante las etapas del ciclo estral, pero solo en las fibras del estroma durante la etapa de metaestro; siguiendo con los vasos sanguíneos, destaca su presencia en las células del endotelio a los 12, 14, 16 y 18 días de la

gestación y en la etapa de proestro del ciclo estral, acompañada de una presencia nuclear a los 12 días de gestación y en la etapa de proestro del ciclo estral, y en las células de la capa muscular de los mismos a los 12, 14 y 18 días de gestación (figura 3.2). La presencia de IGF2R se muestra en las fibras elásticas de la lámina propia del estroma de la mucosa del endometrio a los 14 y 16 días de gestación y durante las etapas de proestro, estro y diestro del ciclo estral (figura 4).



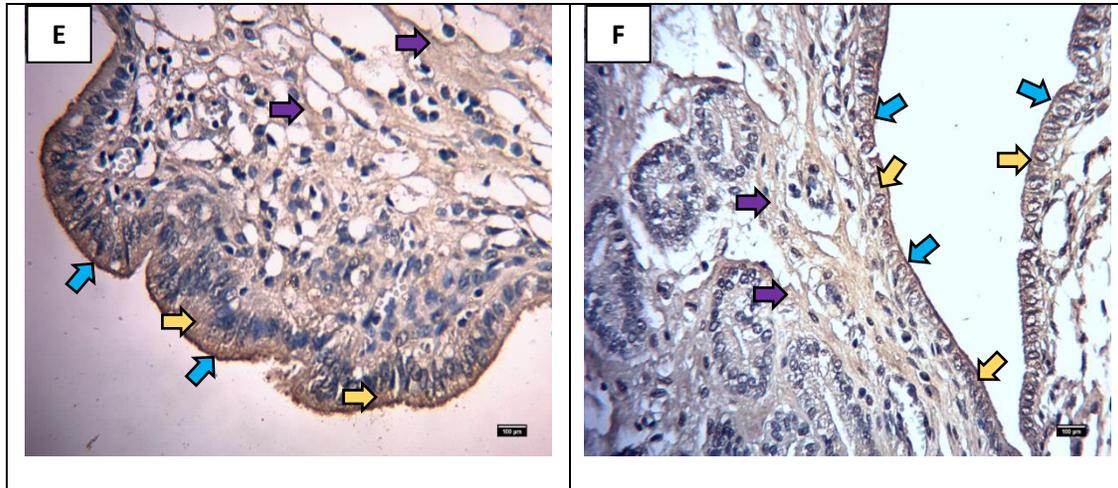
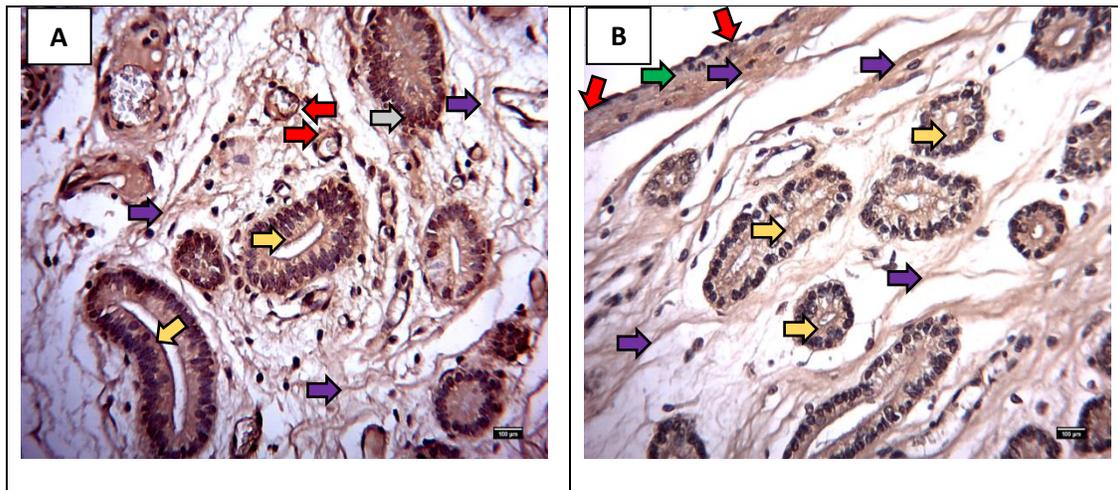


Figura 3.1. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Presencia de IGF1R en el citoplasma (flechas amarillas) y membrana celular (flechas azules) del tejido epitelial de revestimiento columnar simple y pseudoestratificado de la mucosa, en las células del endotelio (flechas rojas) y capa muscular (flechas verdes) de vasos sanguíneos y en las fibras elásticas que componen el tejido conjuntivo ordinario denso irregular de la lámina propia (flechas moradas) de la mucosa. Endometrio de cerda a los 12 (A), 16 (B) y 18 (C) días de gestación y en las etapas de proestro (D), estro (E) y diestro (F). Aumento total 400x. Barra de dimensión 100 μ m.



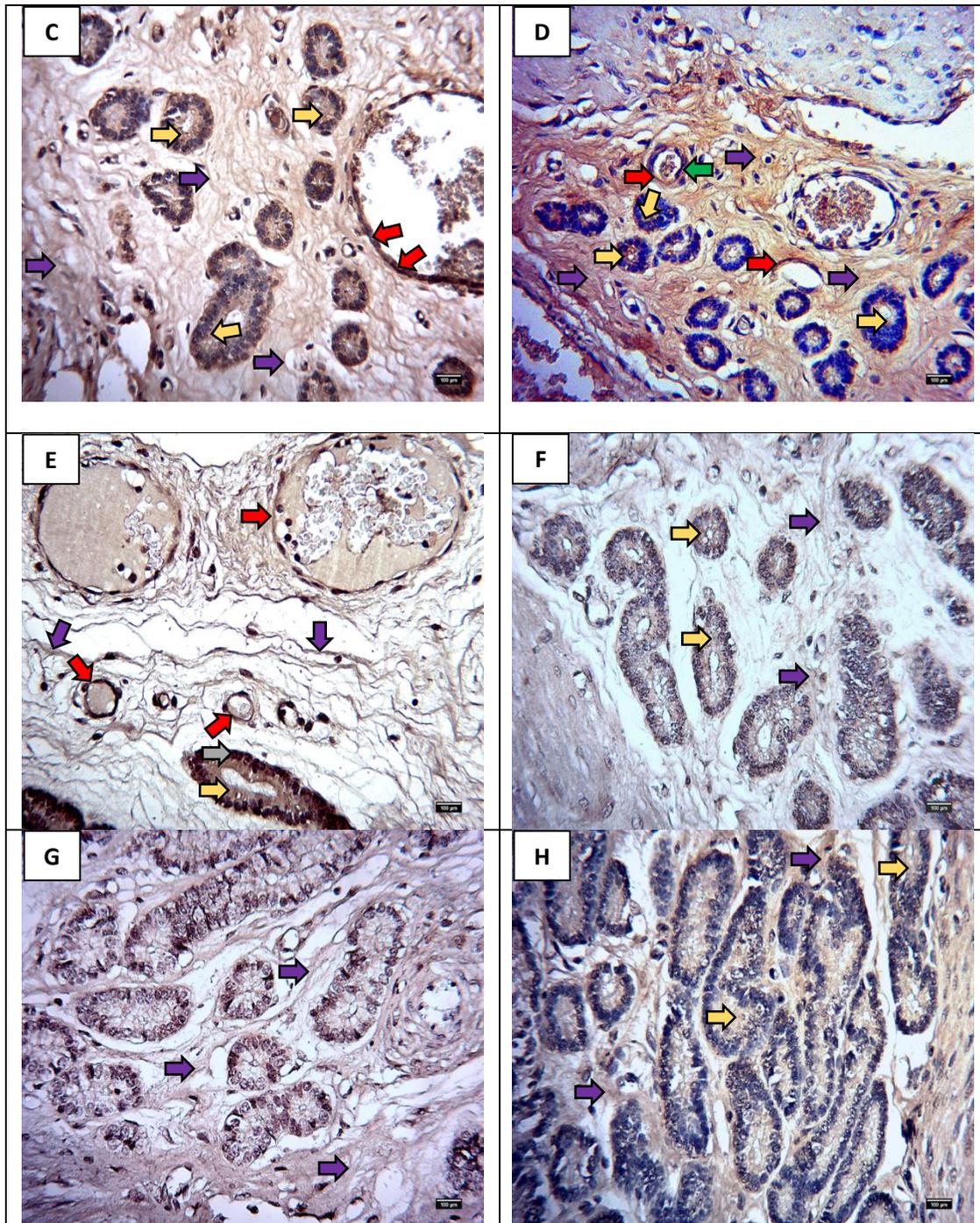
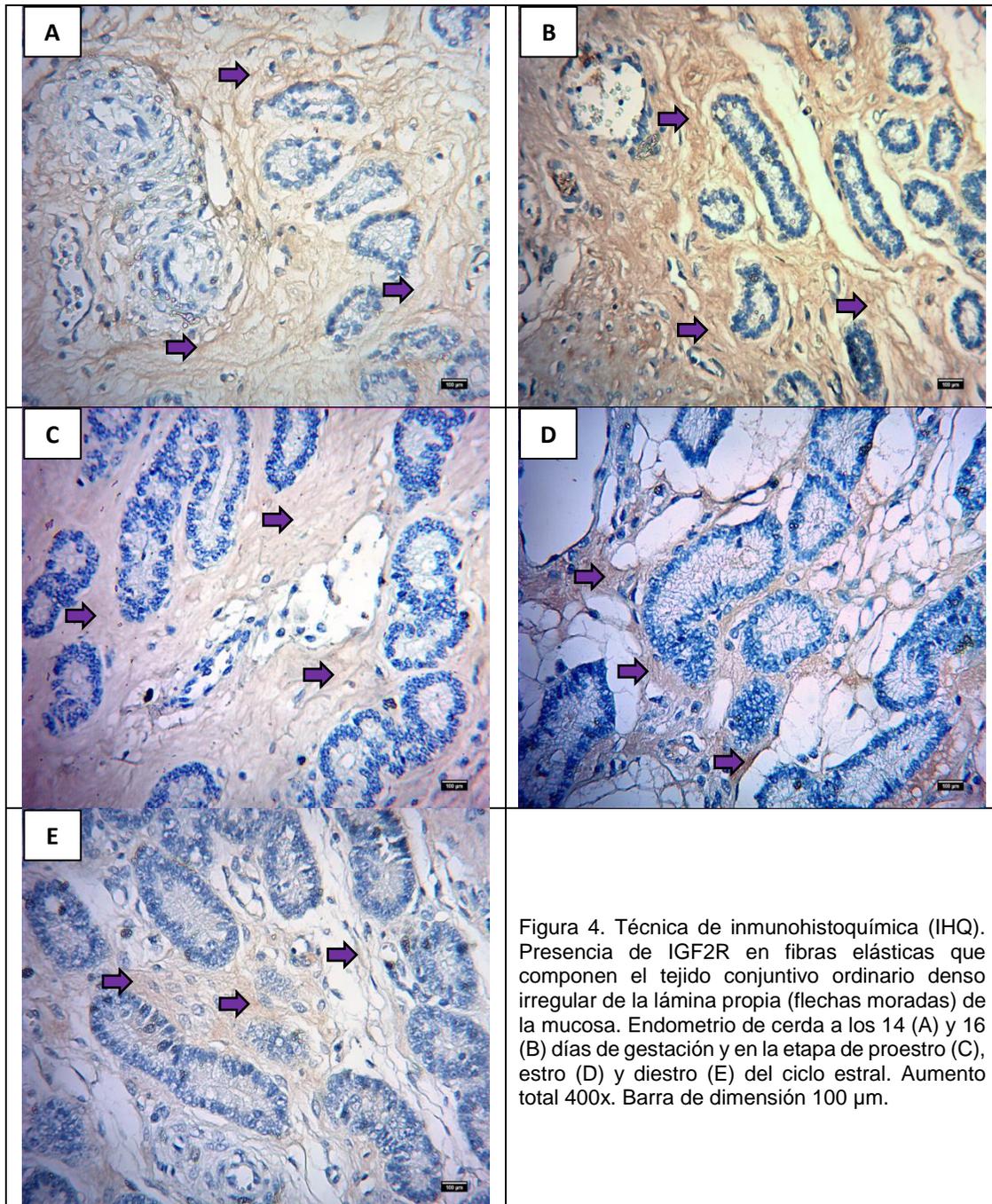
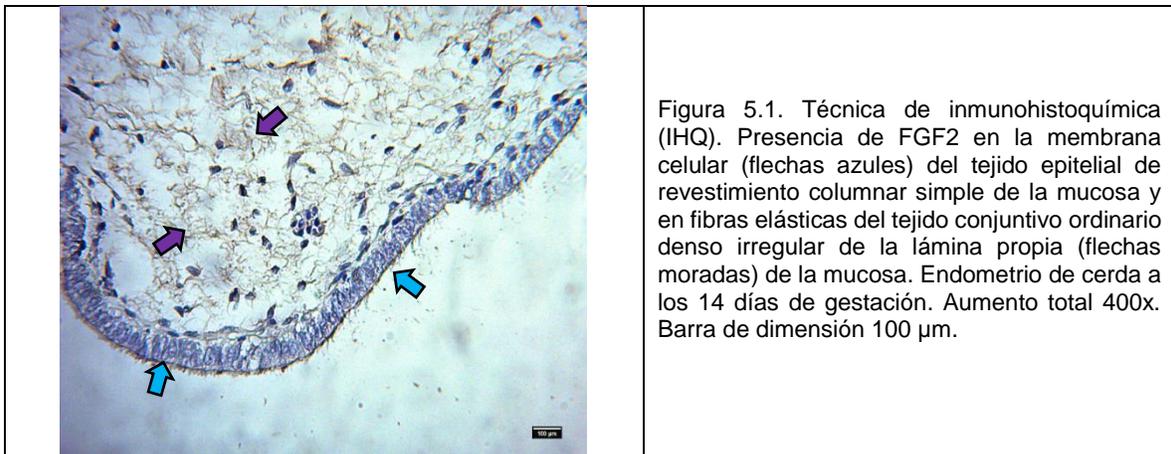


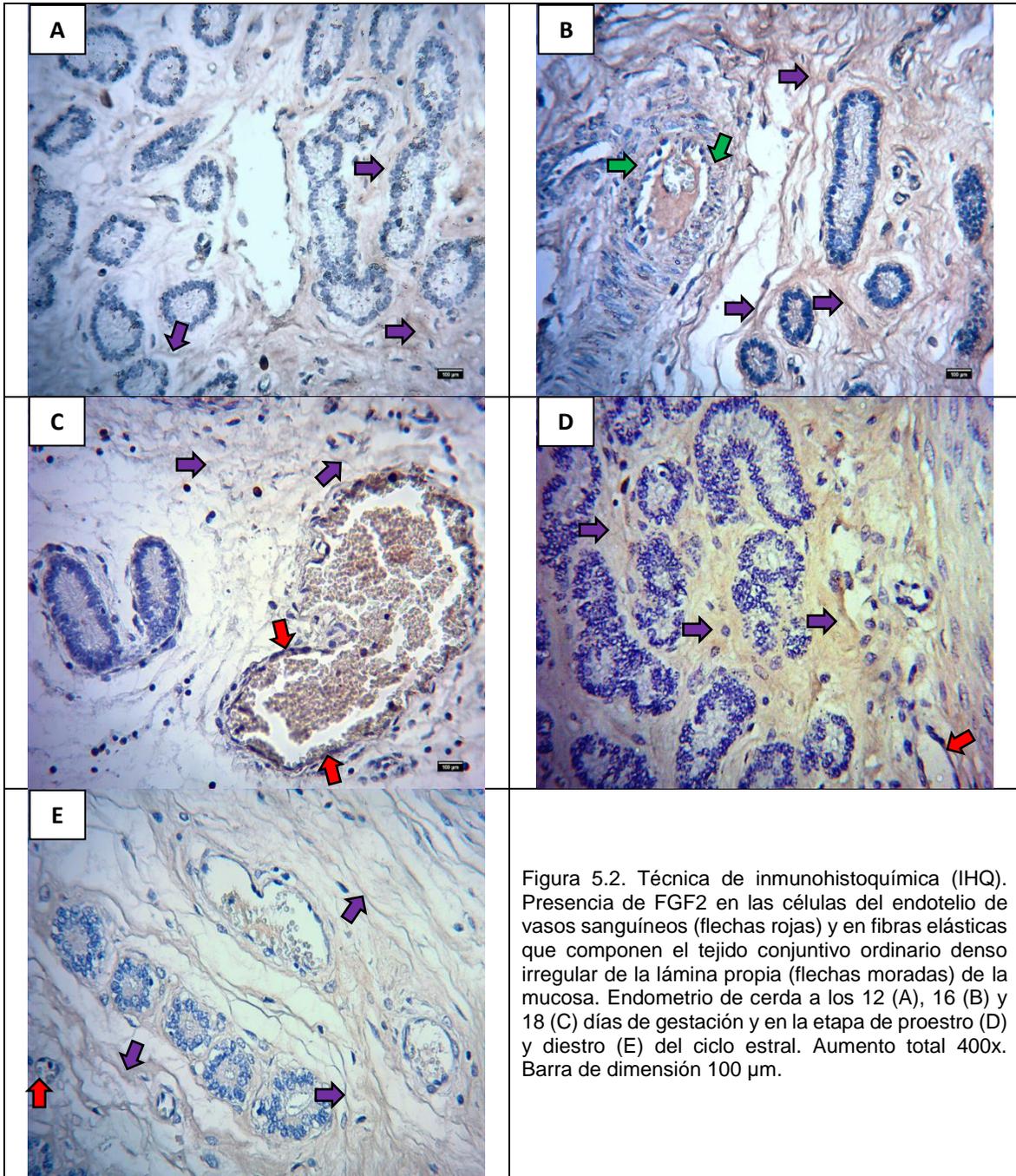
Figura 3.2. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Presencia de IGF1R presente en el citoplasma celular del tejido epitelial glandular (flechas amarillas), en el citoplasma (flechas rojas) y núcleos (flechas grises) de las células del endotelio y células de la capa muscular (flechas verdes) de vasos sanguíneos y en fibras elásticas que componen el tejido conjuntivo ordinario denso irregular de la lámina propia (flechas moradas) de la mucosa. Endometrio de cerda a los 12 (A), 14 (B), 16 (C) y 18 (D) días de gestación y en las etapas de proestro (E), estro (F), metaestro (G) y diestro (H) del ciclo estral. Aumento total 400x. Barra de dimensión 100 µm.

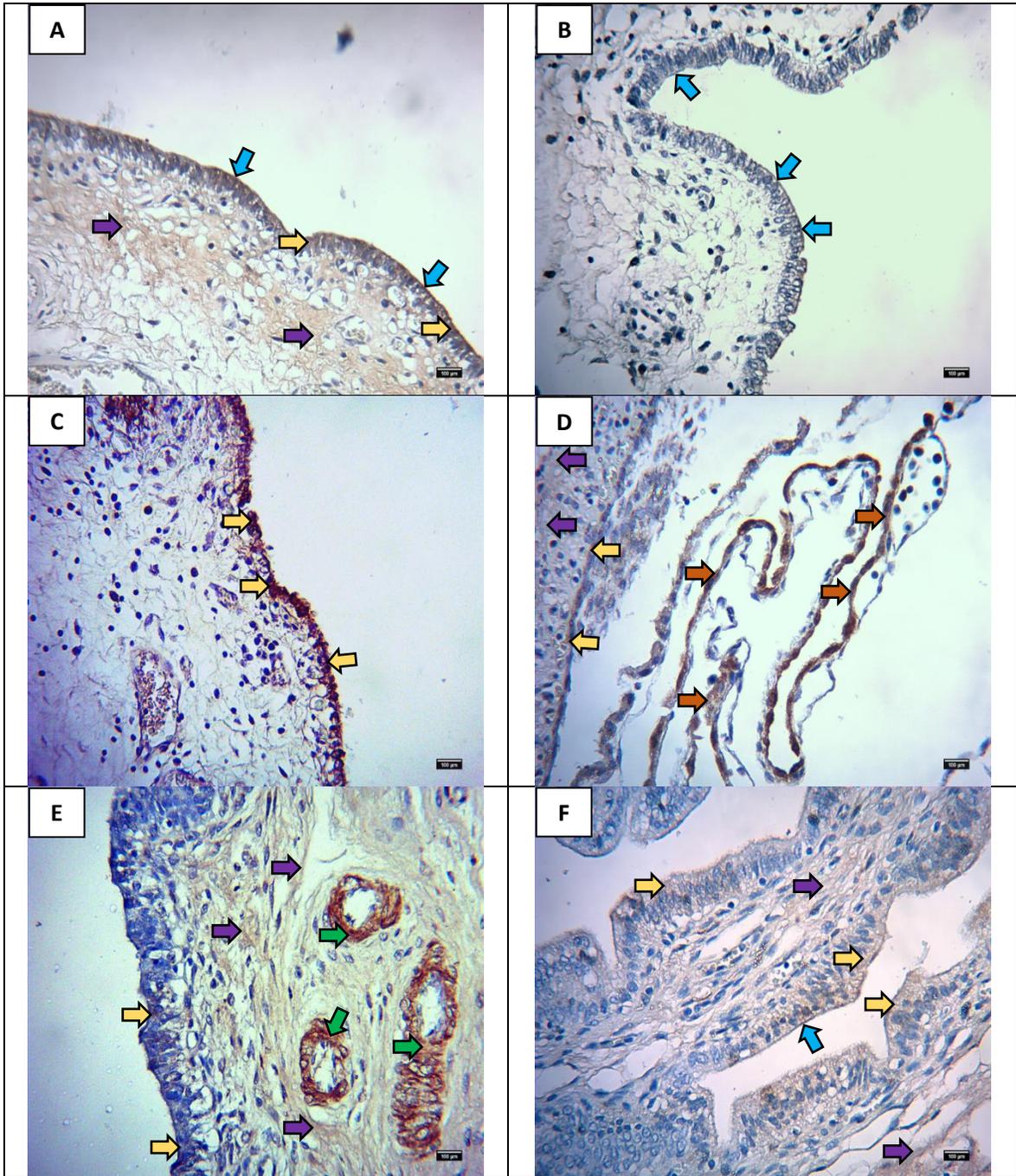


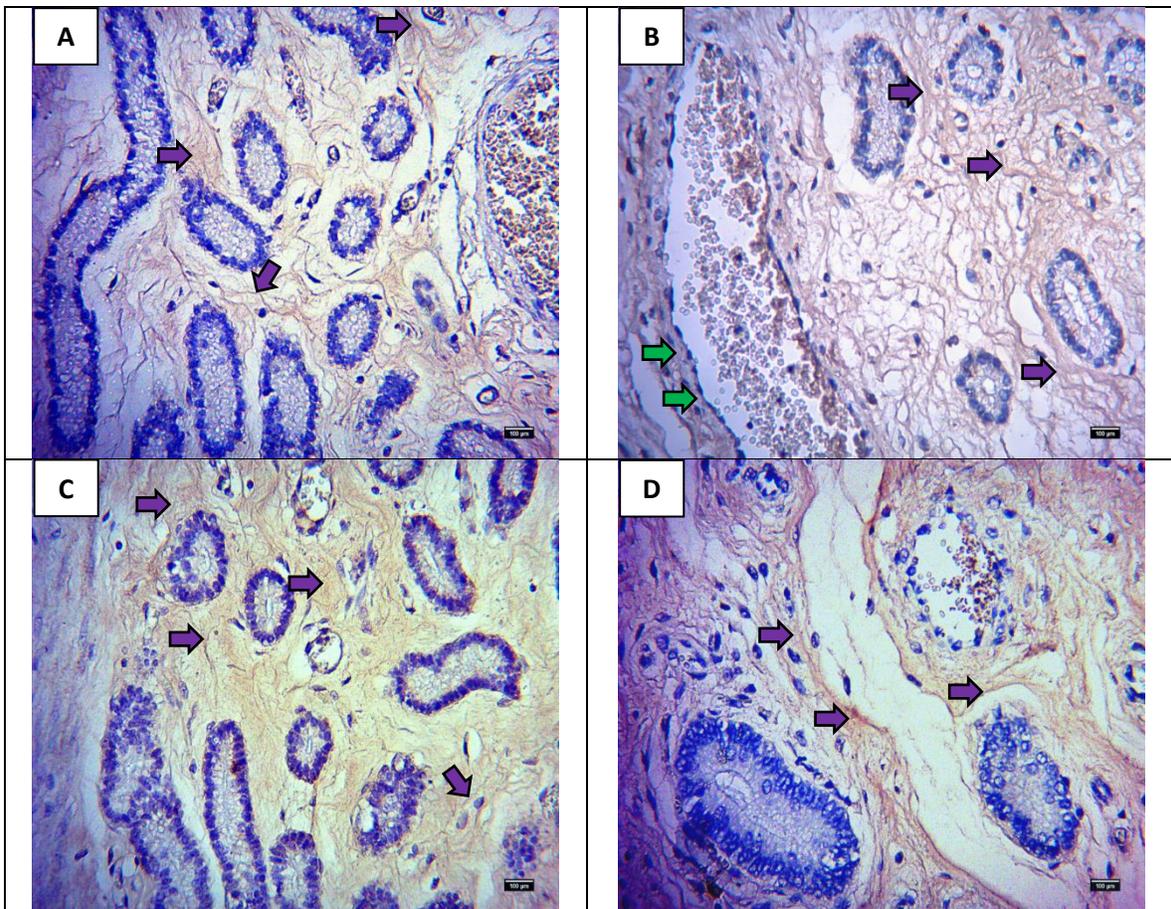
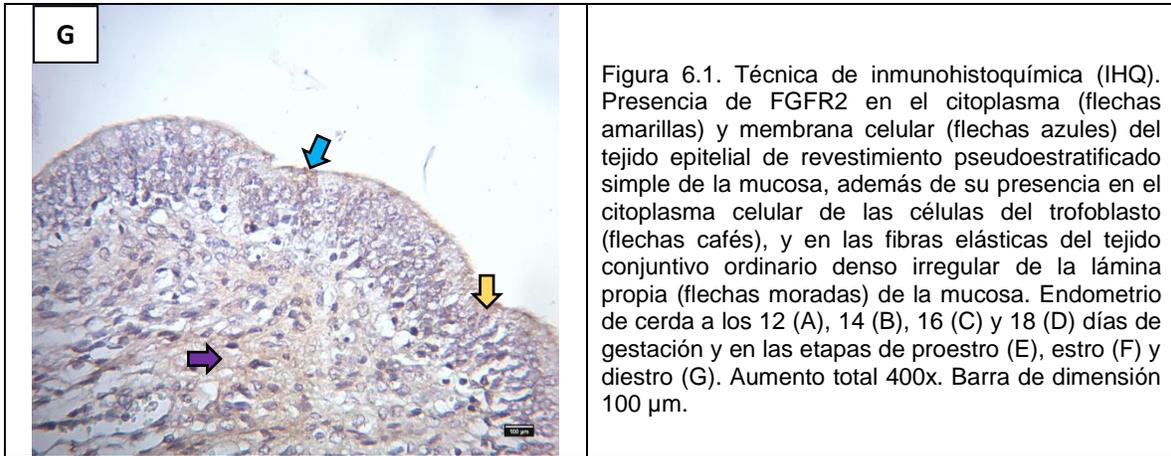
La presencia de FGF2 destaca en la membrana celular del tejido epitelial de revestimiento de la mucosa del endometrio a los 14 días de gestación (figura 5.1); al igual que en las fibras del estroma a los 12, 14 (proximal a la mucosa), 16 y 18 días de gestación y durante las etapas de proestro y diestro del ciclo estral; respecto

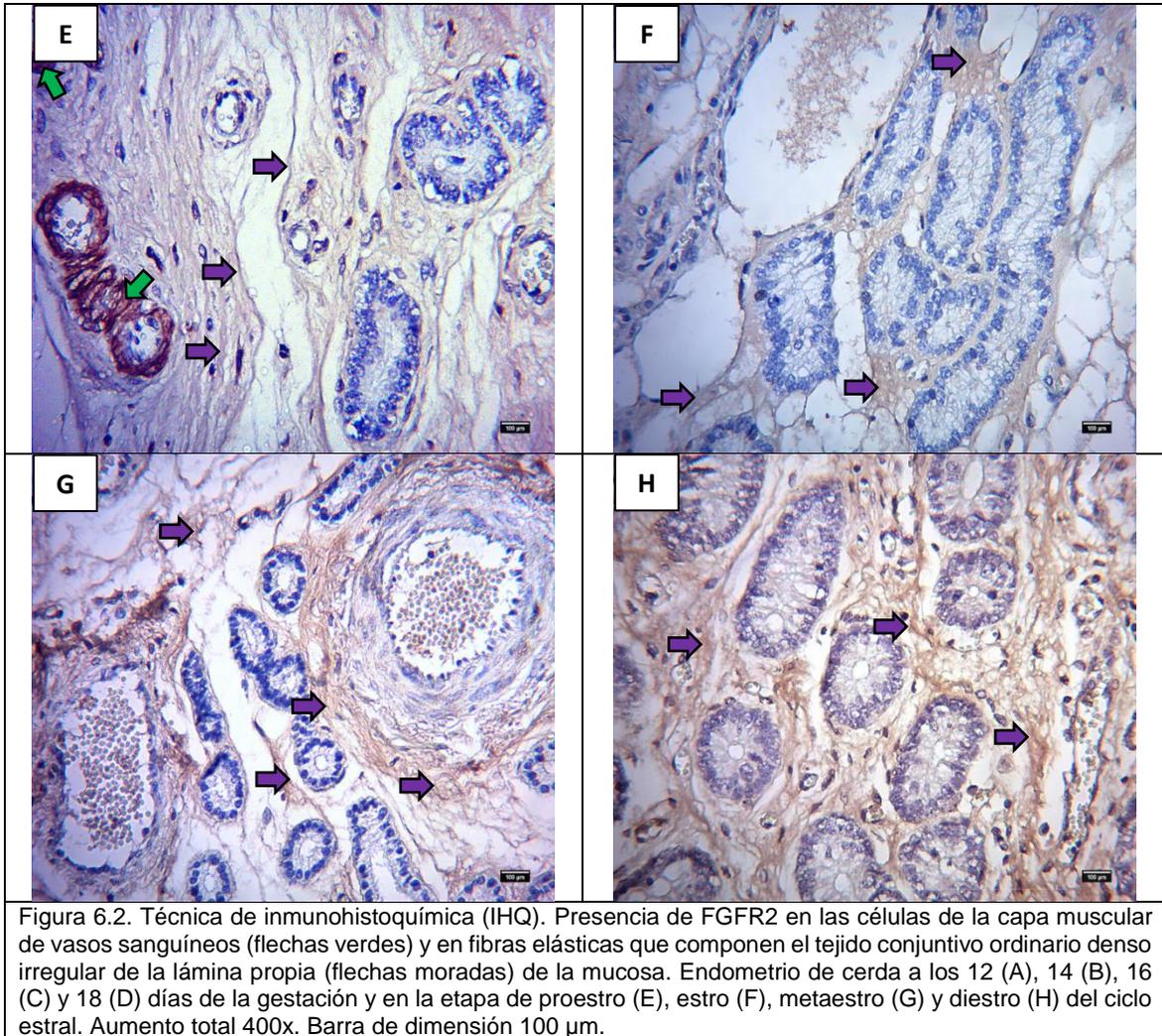
a los vasos sanguíneos, se localiza en las células del endotelio a los 18 días de gestación y durante las etapas de proestro y diestro del ciclo estral, y también en las células de la capa muscular de los mismos a los 16 días de gestación (figura 5.2). La presencia de FGFR2 destaca en el citoplasma celular del tejido epitelial de revestimiento de la mucosa del endometrio a los 12, 16 y 18 días de gestación y, adicionalmente, en el citoplasma celular del trofoblasto a los 18 días de gestación, y durante las etapas de proestro, estro y diestro del ciclo estral; siguiendo con el mismo tejido, destaca su localización en la membrana celular a los 12 y 14 días de gestación y durante las etapas de estro y diestro del ciclo estral (figura 6.1); este mismo factor de crecimiento se localiza ampliamente en las fibras del estroma en los 4 subgrupos de la gestación y en las cuatro etapas del ciclo estral, y en las células del endotelio y capa muscular de vasos sanguíneos presentes en la lámina propia a los 14 días de gestación y con una mayor presencia en la etapa de proestro (figura 6.2).









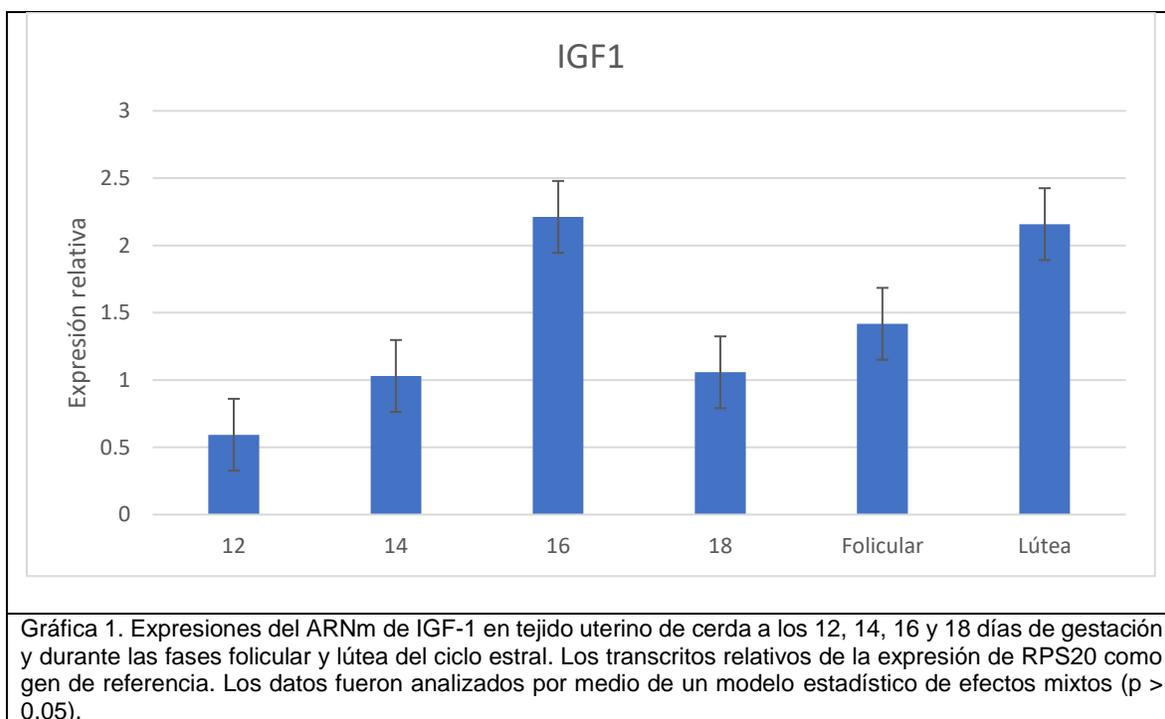


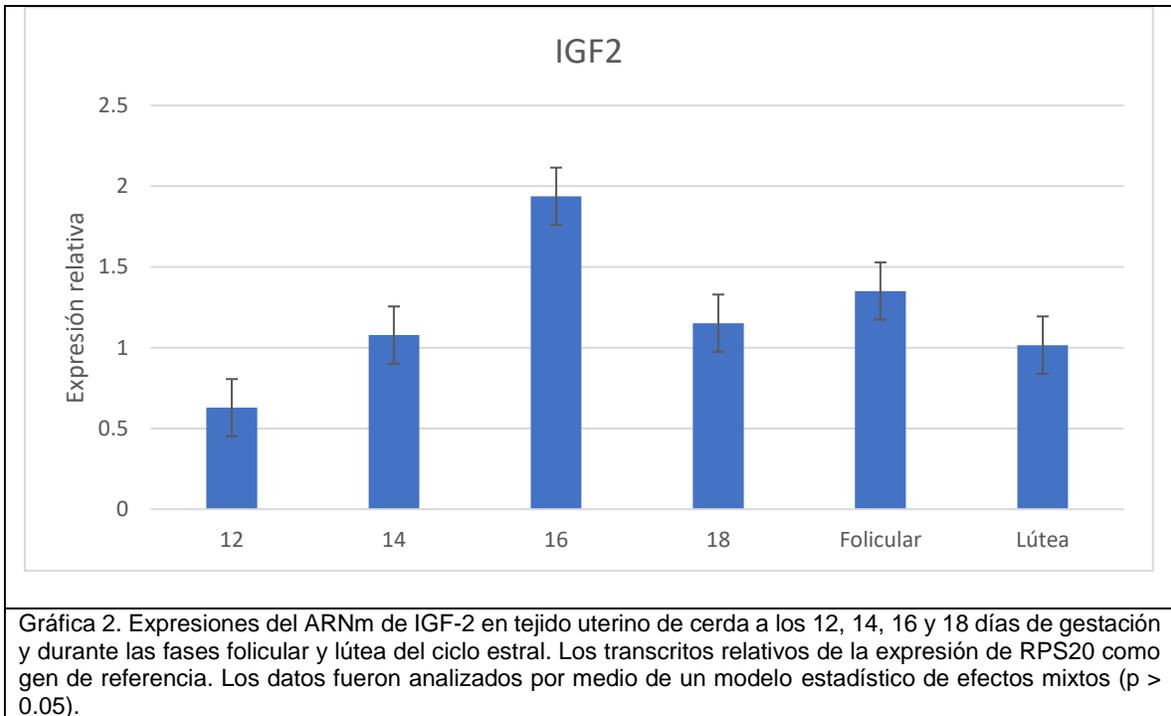
El siguiente cuadro resume la localización inmunohistoquímica de los anticuerpos para cada uno de los factores de crecimiento y receptores del estudio (cuadro IHQ).

Cuadro IHQ. Resumen de la localización inmunohistoquímica en el endometrio de cerda.										
Factor	Localización en la mucosa del endometrio		Gestación (día)				Ciclo estral (etapa)			
			12	14	16	18	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
IGF-1	Epitelio de revestimiento	membrana	-	-	-	-	-	-	-	+
		citoplasma	-	-	-	-	-	-	-	+
	Fibras del estroma		-	-	+	+	-	-	+	+
IGF-2	Epitelio de revestimiento	membrana	-	-	-	-	+	+	+	+
		citoplasma	+	+	+	+	+	+	+	+
	Fibras del estroma		+	+	+	+	+	+	+	+
	Epitelio glandular		+	+	+	+	+	-	+	+
	Vasos sanguíneos		+	+	+	+	+	-	+	-
IGF1R	Epitelio de revestimiento	membrana	+	-	-	-	+	+	-	+
		citoplasma	+	-	+	+	+	+	-	+
	Fibras del estroma		+	+	+	+	+	+	+	+
	Epitelio glandular		+	+	+	+	+	+	-	+
	Vasos sanguíneos		+	+	+	+	+	-	-	-
IGF2R	Fibras del estroma		-	+	+	-	+	+	-	+
FGF2	Epitelio de revestimiento		-	+	-	-	-	-	-	-
	Fibras del estroma		+	+	+	+	+	-	-	+
	Vasos sanguíneos		-	-	+	+	+	-	-	+
FGFR2	Epitelio de revestimiento	membrana	+	+	-	-	-	+	-	+
		citoplasma	+	-	+	+	+	+	-	+
	Fibras del estroma		+	+	+	+	+	+	+	+
	Vasos sanguíneos		-	+	-	-	+	-	-	-

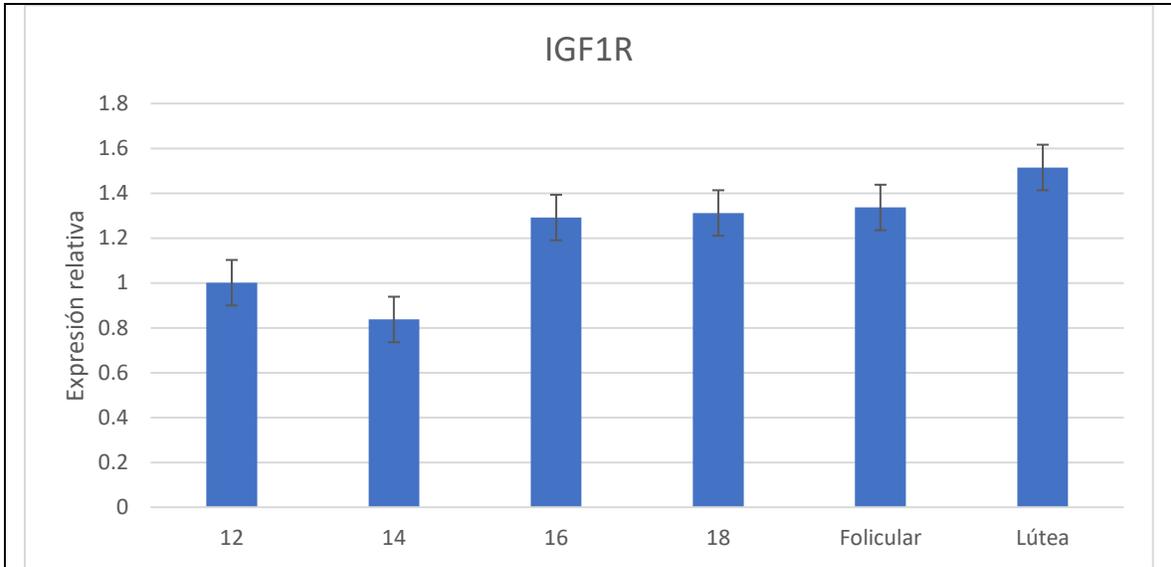
2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).

La expresión de IGF-1 e IGF-2 se muestra menor a los 12 días en comparación a los demás días de gestación e incrementó hasta llegar al día 16 donde muestra su mayor expresión sin mostrar diferencia estadísticamente significativa para ambos factores; respecto a la expresión durante el ciclo estral, IGF-1 muestra una mayor expresión en la fase lútea, pero no hubo diferencia estadísticamente significativa en comparación a la fase folicular, e IGF-2 muestra una mayor expresión en la fase folicular, pero no hubo diferencia estadísticamente significativa en comparación a la fase lútea. Además, no hubo diferencia estadísticamente significativa de los días de gestación en comparación con las fases del ciclo estral para ambos factores (gráfica 1 y 2).

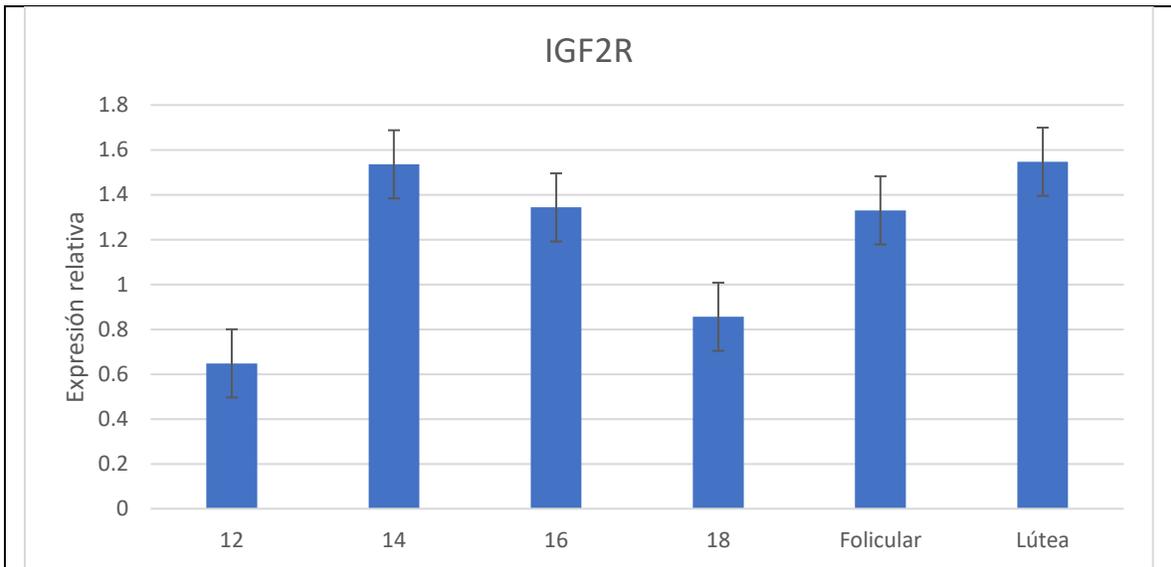




La expresión de IGF1R se muestra menor a los 14 días de gestación en comparación a los demás días de gestación sin mostrar diferencia estadísticamente significativa en comparación a la mayor expresión a los 16 días de gestación. La expresión de IGF2R se muestra mayor a los 14 días de gestación sin mostrar diferencia estadísticamente significativa en comparación a la menor expresión a los 12 días de gestación. En ambos factores se muestra una expresión mayor durante la fase lútea, pero sin ser significativamente diferente a la expresión durante la fase folicular del ciclo estral. Además, no hubo diferencia estadísticamente significativa de los días de la gestación en comparación a las fases del ciclo estral para ambos receptores (gráfica 3 y 4).

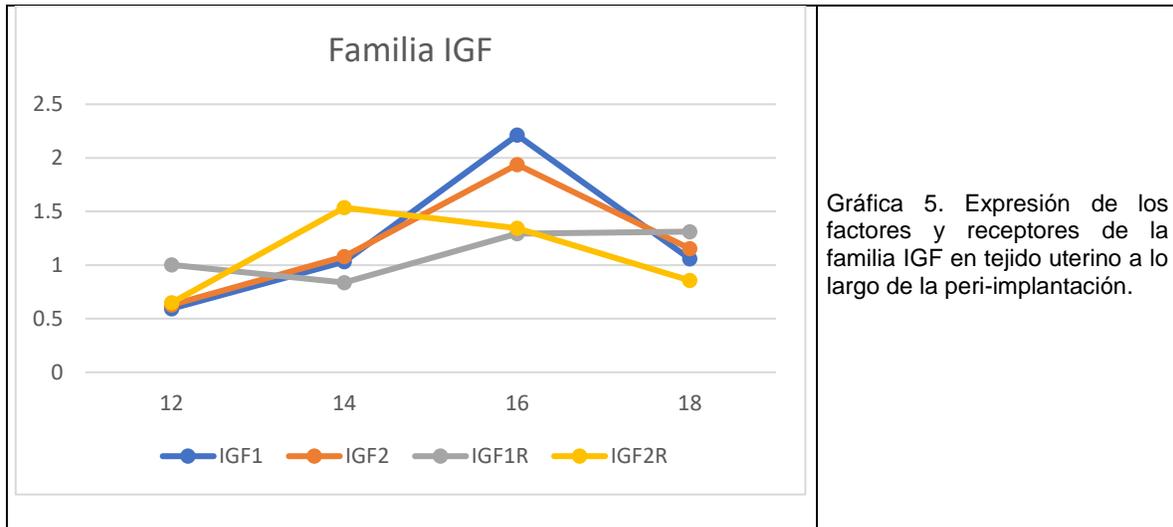


Gráfica 3. Expresiones del ARNm de IGF1R en tejido uterino de cerda a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante las fases folicular y lútea del ciclo estral. Los transcritos relativos de la expresión de RPS20 como gen de referencia. Los datos fueron analizados por medio de un modelo estadístico de efectos mixtos ($p > 0.05$).



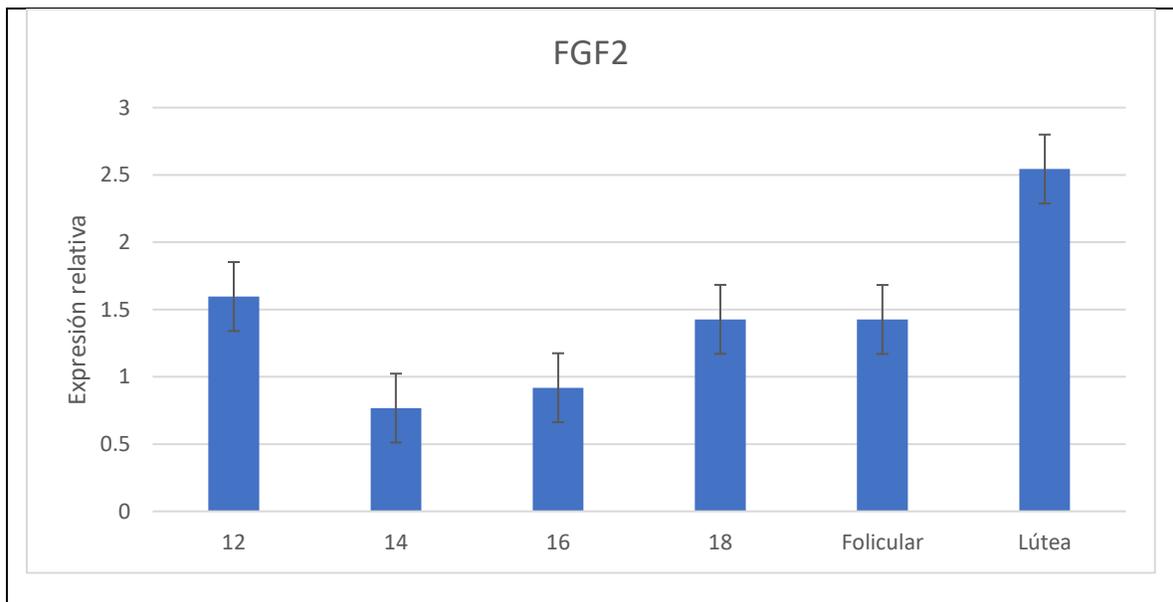
Gráfica 4. Expresiones del ARNm de IGF2R en tejido uterino de cerda a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante las fases folicular y lútea del ciclo estral. Los transcritos relativos de la expresión de RPS20 como gen de referencia. Los datos fueron analizados por medio de un modelo estadístico de efectos mixtos ($p > 0.05$).

La tendencia de IGF-1 e IGF-2 muestran un pico hacia el día 16 de gestación, pero no sucede lo mismo con los receptores de la misma familia, esto puede relacionarse con la localización de cada uno en un aspecto espacio-tiempo (gráfica 5).

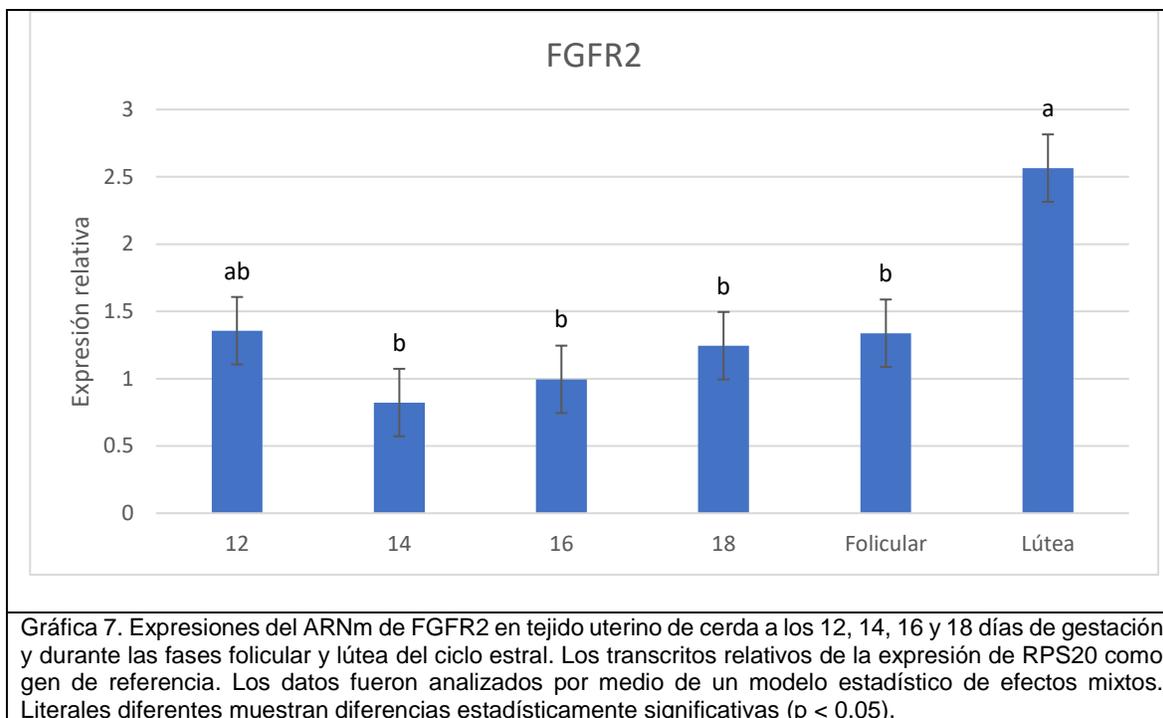


La expresión de FGF2 muestra su menor expresión a los 14 días de gestación sin mostrar diferencia estadísticamente significativa en comparación a la mayor expresión a los 12 días de gestación; respecto a la expresión de FGF2 durante el ciclo estral, se muestra una mayor expresión durante la fase lútea, pero sin mostrar diferencia estadísticamente significativa en comparación a la fase folicular. Además, no hubo diferencia estadísticamente significativa de los días de la gestación en comparación a las fases del ciclo estral (gráfica 6). La expresión de FGFR2 muestra su menor expresión a los 14 días de gestación sin mostrar diferencia significativa en comparación a la mayor expresión a los 12 días de gestación; respecto a la expresión de FGFR2 durante el ciclo estral, se muestra una mayor expresión durante la fase lútea mostrando diferencia estadísticamente significativa en comparación a la fase folicular. Además, la expresión en la fase lútea presenta

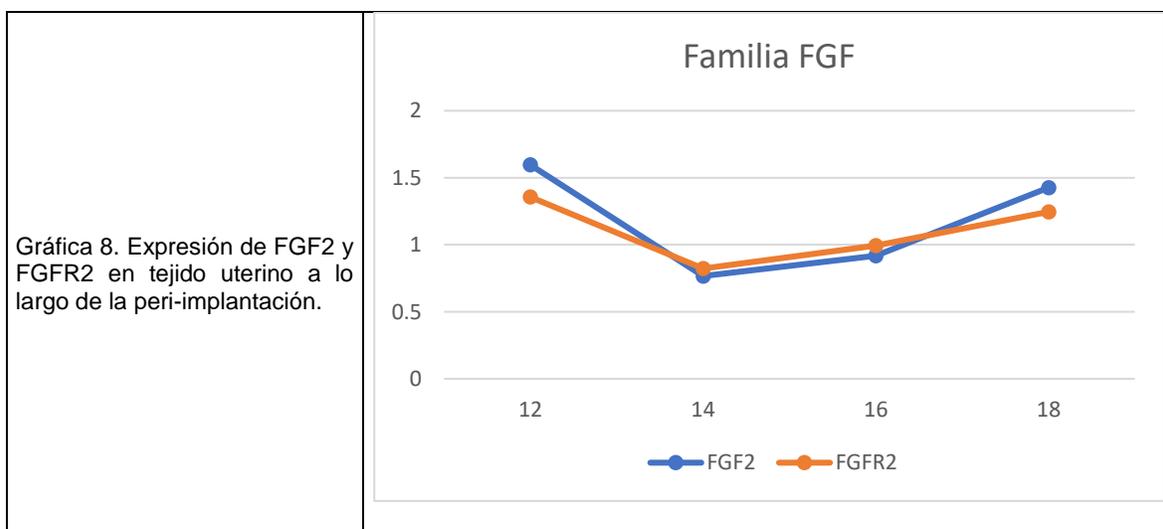
diferencia mayor estadísticamente significativa en comparación a los 14, 16 y 18 días de gestación y no hubo diferencia estadísticamente significativa entre dichas expresiones de la gestación ni en comparación a la expresión a los 12 días de gestación (gráfica 7).



Gráfica 6. Expresiones del ARNm de FGF2 en tejido uterino de cerda a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante las fases folicular y lútea del ciclo estral. Los transcritos relativos de la expresión de RPS20 como gen de referencia. Los datos fueron analizados por medio de un modelo estadístico de efectos mixtos ($p > 0.05$).



La tendencia de FGF y FGFR2 se muestra prácticamente igual, esto quiere decir que la expresión de ambos está íntimamente relacionada en cuanto a la función que desempeñan a lo largo de la peri-implantación (gráfica 8).



DISCUSIÓN

Aunque IGF-1 no se presenta en la luz uterina a los 12 y 14 días en el presente estudio, este factor de crecimiento participa en la síntesis de estrógenos apoyando la expresión de la aromatasa en el trofoblasto (Green, et al, 1995) y a VEGF durante la gestación temprana en cerdos (Kaczmarek, et al, 2008) mejorando la expresión de este último en el epitelio endometrial durante la elongación del concepto y la liberación de estrógenos (Ashworth, et al, 2005) predisponiendo la permeabilidad por su cercanía a la vascularización uterina (Rodríguez-Sallaberry, et al, 2001). La ausencia de IGF-1 en el endometrio y su expresión a los 12 días de gestación reportada en este estudio (la cual se presentó probablemente porque se consideró un margen de expresión en todo el tejido uterino en comparación a lo reportado por Letcher, et al, 1989, quien reporta un pico de IGF-1 durante el mismo momento, pero en la luz uterina y mucosa del endometrio) puede relacionarse, junto con los estrógenos, en la angiogénesis placentaria (Reynolds y Redmer, 2001). Entonces, IGF-1 se considera un factor de crecimiento clave con actividad autocrina apoyando la producción de estrógenos entre los días 10 y 12 de gestación (Klotz, et al, 2002) destacando a los 12 días de gestación en la angiogénesis (Letcher, et al, 1989; Green, et al, 1996) de las membranas placentaria considerando la expansión de los conceptos cubriendo la superficie a lo largo de los cuernos uterinos para el reconocimiento materno regulando dicho proceso vascular (Geisert, et al, 2014) tomando en cuenta que una insuficiente vascularización de la placenta puede incrementar su resistencia provocando muerte embrionaria en humanos (Reynolds y Redmer, 1995; Hildebrandt, et al, 2001; Reynolds y Redmer, 2001). Además, la

localización de IGF-1 en fibras del estroma a los 16 y 18 días de gestación en el presente estudio se relaciona con células vasculares estromales fetales que inducen a IGF-1 como un potente mitógeno (Chen, et al, 1996). Aunque los estrógenos y la progesterona en cerdas inmaduras y cerdas maduras ovariectomizadas acumulan el ARNm de IGF-1 en el útero sin afectar la expresión de IGF-2 (Simmen, et al, 1990; Carlsson y Billig, 1991; Simmen, et al, 1992), existen varias órdenes que pueden modificar la expresión de IGF-2 en tiempos indefinidos (Simmen y Simmen, 1990; Simmen, et al, 1992). La actividad paracrina por parte de IGF-1 en la angiogénesis también se relaciona por su localización en las fibras del estroma durante la peri-implantación participando en la permeabilidad vascular e interactuando indirectamente en la expresión y localización de IGF-2 en los vasos sanguíneos para participar en la angiogénesis. Por lo tanto, además de su participación en la angiogénesis placentaria (Geisert, et al, 2014), IGF-1 participa en un desarrollo vascular constante apoyando, junto con IGF-2, la expresión de VEGF. Así, IGF-2 se considera un factor proangiogénico en mayor cantidad al momento de ser necesario (considerando su mayor expresión a los 20 días de gestación cuando hay restricciones en el desarrollo vascular fetal en comparación a fetos saludables y relacionando la elongación del blastocisto a los 12 días de gestación (Keys, et al, 1986)) con actividad paracrina, junto con los estrógenos, durante los días 12 y 14 de la gestación participando en la angiogénesis durante la implantación y hacia la parte final de dicho proceso destacando su expresión junto con IGF-1 a los 16 días de gestación. Respecto al IGF1R, conocido como el receptor de las acciones biológicas esenciales para IGF-1 e IGF-2 (Dupont y Holzenberger, 2003), su expresión puede verse afectada por las hormonas esteroideas siendo algo

determinante en diferentes momentos durante la peri-implantación, ya que se ha reportado la existencia de homólogos de IGF1R que pueden efectuar actividades tanto de IGF-1 como de IGF-2. Por lo tanto, los homólogos para ambos factores se muestran por diferentes condiciones, considerando que IGF-1 participa en la angiogénesis del endometrio a partir del día 15 de gestación para su implantación final relacionando también su presencia en las fibras del estroma e IGF-2 es un factor de crecimiento que puede generar una señal que cruza la membrana celular por la unión a IGF1R (LeRoith, et al, 1995) relacionando su presencia en la mucosa entre los 12 y 18 días de gestación en el presente estudio y ambos muestran una mayor expresión hacia el día 16 de gestación. IGF2R puede también relacionarse a procesos angiogénicos durante la implantación entre los 14 y 16 días de gestación por su disposición en las fibras del estroma y su expresión donde IGF-2 puede unirse y, así, IGF-1 se une a sus homólogos de IGF1R apoyando a IGF-2 en dicho proceso, pero la expresión de IGF2R en las fases del ciclo estral no puede asegurar su dependencia por los estrógenos o progesterona en el ambiente uterino durante el periodo de peri-implantación. Tomando en cuenta que los estrógenos y la progesterona aparecen como reguladores principales en la función vascular, incluyendo la angiogénesis, en todos los mamíferos (Hyder y Stencel, 2000; Reynolds y Redmer, 2001), la familia de FGF son considerados mediadores clave en el proceso de angiogénesis junto con VEGF (Ferrara y Davis-Smyth, 1997; Neufeld, et al, 1999) participando en el mantenimiento vascular y la función celular en diferentes tejidos del aparato reproductor en humanos (Redmer y Reynolds, 1996; Reynolds, et al, 2000). Respecto a FGF2, a pesar de su mayor expresión en la fase lútea del ciclo estral, no muestra diferencias significativas entre sus

expresiones reportadas en el presente estudio, es decir, no puede asegurarse la influencia directa por parte de la progesterona; su presencia tanto en las fibras del estroma como en los vasos sanguíneos a los 12, 16 y 18 días de gestación indica que es un factor de crecimiento que participa en la angiogénesis dentro del ambiente uterino. La expresión del ARNm de FGFR2 en la fase lútea del ciclo estral mostró diferencias significativas en comparación a la menor expresión a los 14, 16 y 18 días de gestación y durante la fase folicular del ciclo estral; con esto, una menor expresión significativa del receptor puede estar relacionada a procesos angiogénicos compensatorios apoyándose por la presencia de FGF2 en el mismo momento de la gestación y, además, se ha visto que ambos factores pueden ser apoyados por los estrógenos a lo largo de la peri-implantación participando en la angiogénesis de forma compensatoria sobre las membranas placentarias (Edwards, et al, 2011) tomando en cuenta la disposición de FGFR2 en el tejido epitelial de revestimiento de la mucosa a los 12 días de gestación. Además, por la disposición tanto de FGF2 como FGFR2 en las fibras del estroma, pueden apoyar el término de la implantación como un proceso compensatorio en la angiogénesis en relación a la expresión de ambos a los 18 días de gestación en el presente estudio y la presencia de FGF2 puede coincidir entre su expresión y su presencia en los vasos sanguíneos a los 16 y 18 días de gestación al igual que en las fibras del estroma. Con esto, el proceso compensatorio por parte de factores de la familia FGF, específicamente FGF2, FGFR1 y FGFR2, apoyan la angiogénesis cuando se presentan restricciones en la permeabilidad y en el establecimiento adecuado de los vasos sanguíneos en la parte final de la implantación embrionaria (Edwards, et al, 2011), considerando que las glándulas pueden ser un buen sustituto para la producción de FGF2

(Reynolds y Redmer, 2001), lo cual se demuestra al estar ausente en dicho tejido en el presente estudio considerando su participación en la angiogénesis al presentarse restricción en la formación de vasos sanguíneos y la permeabilidad junto con la presencia de FGFR2 en las fibras del estroma entre los 12 y 18 días de gestación.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio, se logró describir la localización y expresión de ciertos factores de crecimiento y receptores proangiogénicos durante el periodo de peri-implantación donde otros procesos biológicos se desarrollan a lo largo de la interacción materno-embionaria durante esta ventana de tiempo considerando la angiogénesis como un proceso clave para mantener la gestación y el tamaño heterogéneo de los conceptos. Así, se logró describir una participación directa e indirecta por medio de acciones autocrina y paracrina en el caso de la familia IGF (IGF-1, IGF-2, IGF1R e IGF2R), conocidos como factores de crecimiento destinados al desarrollo de vasos sanguíneos en momentos clave durante la gestación de la cerda en comparación con otras especies. Y para los factores de crecimiento de la familia FGF estudiados (FGF2 y FGFR2), este trabajo refuerza el conocimiento sobre su apoyo vascular compensatorio, principalmente por conocer los tejidos clave para su producción al momento de presentarse una permeabilidad deficiente y una acción limitada por parte de otros factores proangiogénicos. Respecto a la especie porcina como modelo experimental, este trabajo aporta conocimiento clave respecto a la participación de los factores de crecimiento y receptores proangiogénicos estudiados por medio de su localización y expresión considerando la similitud que presenta el cerdo con el humano para entender ciertos procesos biológicos con mayor detalle por medio de comparativos en análisis histológicos cualitativos y la expresión genética para conocer con mayor detalle el proceso de angiogénesis durante la peri-implantación donde otras especies presentan ciertas limitantes para poder generar mayor conocimiento.

REFERENCIAS

Ashworth, M.D., Ross, J.W., Allen, D.T., Stein, D.R., Spicer, L.J. y Geisert, R.D., 2005. Endocrine disruption of uterine insulin-like growth factor (IGF) expression in the pregnant gilt. *Reproduction*, 130, p.545–551.

Bazer, F.W. y Johnson, G.A., 2014. Pig blastocyst-uterine interactions. *Differentiation*, 87, p.52–65.

Boshier, D.P., 1970. The pontamine blue reaction in pregnant sheep uteri. *J. Reprod. Fertil.*, 22, p.595–596.

Carlsson, B. y Billig, H., 1991. Insulin-like growth factor-I gene expression during development and estrous cycle in the rat uterus. *Mol. Cell Endocrinol.*, 77, p.175–180.

Chastant. S., Monget, P. y Terqui, M., 1994 Localization and quantification of insuline-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II/mannose-6-phosphate (IGF-II/M6P) receptors in pig embryos during early pregnancy. *Biol. Reprod.*, 51, p.588–596.

Chen, N. X., Hausman, G.J. y Wright, J.T., 1996. Hormonal regulation of insulin-like growth factor binding proteins and insulin-like growth factor I (IGF-I) by inference, a similar scenario may apply to women and secretion in porcine stromal-vascular cultures. *J. Anim Sci.*, 74, p.2369–2375.

DeChiara, T.M., Robertson, E.J. y Efstratiadis, A., 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64, p.849–859.

Denley, A., Cosgrove, L.J., Booker, G.W., Wallace, J.C. y Forbes, B.E., 2005. Molecular interaction of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16, p.421–439.

Dupont, J. y Holzenberger, M., 2003. Biology of insulin like-growth factors in development. *Birth Defects Research*, 69, p.257–271.

Edwards, A.K., Van den Heuvel, M.J., Wessels, J.M., Lamarre, J., Croy, B.A. y 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. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 17(9), p.9–15.

Edwards, A.K., Wessels, J.M., Kerr, A. y Tayade, C., 2012. An Overview of Molecular and Cellular Mechanisms Associated with Porcine Pregnancy Success or Failure. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4), p.394–401.

Enders, A.C., Hendrickx, A.G. y Schlafke, S., 1983. Implantation in the rhesus monkey: initial penetration of endometrium. *Am. J. Anat.*, 167, p.275–298.

Ferrara, N. y Davis-Smyth, T., 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev.*, 18, p.4–25.

Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. y Breitan, M.L., 1995. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376, p.66–70.

Ford, S.P. y Christenson, R.K., 1979. Blood flow to uteri of sows during the estrous cycle and early pregnancy: local effect of the conceptus on the uterine blood supply. *Biol. Reprod.*, 21, p.617–624.

Ford, S.P., Reynolds, L.P. y Magness, R.R., 1982. Blood flow to the uterine and ovarian vascular beds of gilts during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.*, 27, p.878–885.

Geisert, R.D., Chamberlain, C.S. Vonnahme, K.A., Malayer, J.R. y Spicer, L.J., 2001. Possible role of kalikrein in proteolysis of insuline-like growth factor binding proteins during the oestrous cycle and early pregnancy in pigs. *Reproduction*, 121, p.719–728.

Geisert, R.D., Lucy, M.C., Whyte, J.J., Ross, J.W. y Mathew, D.J., 2014. Cytokines from the pig conceptus: roles in conceptus development in pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5, p.1–12.

Geisert, R.D. y Schmitt, R.A.M., 2002. Early embryonic survival in the pig: can it be improved? *J. Anim. Sci.*, 80, p.54–65.

Green, M.L., Blaeser, L.L., Simmen, F.A. y Simmen, R.C., 1996. Molecular cloning of spermidine/spermine N1-acetyltransferase from the periimplantation porcine uterus by messenger ribonucleic acid differential display: temporal and conceptus-modulated gene expression. *Endocrinology*, 137, p.5447–5455.

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, p.3961–3970.

Hildebrandt, V.A., Babischkin, J.S., Koos, R.D., Pepe, G.J. y Albrecht, E.D., 2001. Developmental regulation of vascular endothelial growth/permeability factor

Messenger ribonucleic acid levels in and vascularization of the villous placenta during baboon pregnancy. *Endocrinology*, 142, p.2050–2057.

Hyder, S.M. y Stencel, G.M., 2000. Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones. *Histol. Histopathol.*, 15, p.325–334.

Kaczmarek, M.M., Blitek, A., Kaminska, K., Bodek, G., Zygmunt, M., Schams, D. y Ziecik, A.J., 2008. Assessment of VEGF-system expression in the porcine endometrial stromal cells in response to insuline-like growth factor-I, relaxin, oxytocin and prostaglandin E2. *Mol. Cell Endocrinol.*, 291, p.33–41.

Kaczmarek, M.M., Blitek, A., Schams, D. y Ziecik, A.J., 2008. The effect of insuline-like growth factor-I, relaxin and luteinizing hormone on vascular endothelial growth factor secretion by cultured endometrial stromal cells on different days of early pregnancy in pigs. *Reprod. Biol.*, 8, p.163–170.

Kaczmarek, M.M., Waclawik, A., Blitek, A., Kowalczyk, A.E., Schams, D., Ziecik, A.J., 2008. Expression of the vascular endothelial growth factor-receptor system in the porcine endometrium throughout the estrous cycle and early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.*, 75, p.362–372.

Keys, J.L., King, G.J. y Kennedy, T.G., 1986. Increased uterine vascular permeability at the time of embryonic attachment in the pig. *Biol. Reprod.*, 34, p.405–411.

Keys, J.L. y King, G.J., 1988. Morphological evidence for increased uterine vascular permeability at the time of embryonic attachment in the pig. *Biol. Reprod.*, 39, p.473–487.

Klotz, D.M., Hewitt, S.C., Ciana, P., Raviscioni, M., Lindzey, J.K., Foley, J., Maggi, A., DiAugustine, R.P. y Korach, K.S., 2002. Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J. Biol. Chem.*, 277, p.8531–8537.

Knauer, M.T. y Hostetler, C.E., 2013. US swine industry productivity analysis, 2005 to 2010. *J. Swine Health Prod.*, 21, p.248–252.

Kornfeld, S., 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insuline-like growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, 61, p.307–330.

LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. y Roberts, C.T. Jr., 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev.*, 16, p.143–163.

Letcher, R., Simmen, R.C., Bazer, F.W., Simmen, F.A., 1989. Insulin-like growth factor-I expression during early conceptus development in the pig. *Biol. Reprod.*, 41, p.1143–1151.

Miese-Looy, G., Van den Heuvel, M.J., Edwards, A.K., Lamarre, J. y Tayade, C., 2012. Expression of insulin-like growth factor (IGF) family members in porcine pregnancy. *J. Reprod. Dev.*, 58(1), p.51–60.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, 13, p.9–22.

Psychoyos, A., 1973. Endocrine control of egg implantation: Greep, R.O., Astwood, E.G. y Geiger, S.R., editores, *Handbook of Physiology*. Washington: American Physiology Society, p.187–215.

Pope, W., 1994. Embryonic mortality in swine: Zavy, M.T. y Geisert, R.D., editores. *Embryonic mortality in domestic species*. Florida: CRC Press, p.53–78.

Presta, M., Dell'era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R. y Rusnati, M., 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16, p.159–178.

Pringle, K.G. y Roberts, C.T., 2007. New lights on early post-implantation pregnancy in the mouse: roles for insuline-like growth factor-II (IGF-II)? *Placenta*, 28, p.286–297.

Redmer, D.A. y Reynolds, L.P., 1996. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.*, 1, p.182–192.

Reik, W., Constancia, M., Dean, W., Davies, K., Bowden, L., Murrell, A., Feil, R., Walter, J. y Kelsey, G., 2000. IGF-2 imprinting in development and disease. *Int. J. Dev. Biol.*, 44, p.145–150.

Reynolds, L.P., Grazul-Bilska, A.T. y Redmer, D.A., 2000. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine*, 12, p.1–9.

Reynolds, L.P. y Redmer, D.A., 1995. Utero placental vascular development and placental function. *J. Anim. Sci.* 73, p.1839–1851.

Reynolds, L.P. y Redmer, D.A., 1998. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor (β FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), in the ovary. *J. Anim. Sci.*, 76, p.1671–1681.

Reynolds, L.P. y Redmer, D.A., 2001. Angiogenesis in the placenta. *Biology of Reproduction*, 64, p.1033–1040.

Rodríguez-Sallaberry, C., Simmen, F.A., y Simmen, R.C., 2001. Polyamine- and insulin-like growth factor-I-mediated proliferation of porcine uterine endometrial cells: a potential role for spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase during periimplantation. *Biol. Reprod.*, 65, p.587–594.

Rosen, C.J., 1999. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins: clinical implications. *Clin. Chem.*, 45, p.1384–1390.

Ross, J.W., Ashworth, M.D., Stein, D.R., Couture, O.P., Tuggle, C.K. y Geisert, R.D., 2009. Identification of differential gene expression during porcine conceptus rapid trophoblastic elongation and attachment to uterine luminal epithelium. *Physiol. Genomics*, 36, p.140–148.

Rusnati, M., Casarotti, G., Pecorelli, S., Ragnotti, G., Bresta, M., 1990. Basic fibroblast growth factor in ovulatory cycle and postmenopausal human endometrium. *Growth Factors*, 3, p.299–307.

Samathanam, C.A., Adesanya, O.O., Zhou, J., Wang, J. y Bondy, C.A., 1998. Fibroblast growth factors 1 and 2 in the primate uterus. *Biol. Reprod.*, 59, p.491–496.

Simmen, R.C.M., Simmen, F.A., Hotig A, Farmer, S.J. y Bazer, F.W., 1990. Hormonal regulation of insulin-like growth factor gene expression in pig uterus. *Endocrinology*, 127, p.2166–2174.

Simmen, F.A., Simmen, R.C., Geisert, R.D., Martinat-Botte, F., Bazer, F.W. y Terqui, M., 1992. Differential expression, during estrous cycle and pre and postimplantation conceptus development, of ribonucleic acid encoding components of the pig uterine insuline-like growth factor system. *Endocrinology*, 130, p.1547–1556.

Simmen, R.C.M. y Simmen, F.A., 1990. Regulation of uterine and conceptus secretory activity in the pig. *J. Reprod. Fertil.*, 40, p.279–292.

Spencer, T.E., 2013. Early pregnancy: concepts, challenges, and potential solutions. *Anim. Front.*, 3, p.48–55.

Srivastava, R.K., Gu, Y., Ayloo, S., Zilberstein, M. y Gibori, G., 1998. Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line. *J. Mol. Endocrinol.*, 21, p.355–362.

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. *J. Immunol.*, 176(1), p.148–156.

Tilley, R.E., McNeil, C.J., Ashworth, C.J., Page, K.R. y McArdle, H.J., 2007. Altered muscle development and expression of the insuline-like growth factor system in the growth retarded fetal pigs. *Domest. Anim. Endrocrinol.*, 32, p.167–177.

Town, S.C., Patterson, J.L., Pereira, C.Z., Gourley, G. y Foxcroft, G.R., 2005. Embryonic and fetal development in a commercial dam-line genotype. *Anim. Reprod. Sci.*, 85, p.301–316.

Walters, E.M., Wolf, E., Whyte, J.J., Mao, J., Renner, S., Nagashima, H., Kobayashi, E., Zhao, J., Wells, K.D., Crister, J.K., Riley, L.K., Prather, R.S., 2012. Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Med. Genomics*, 15, p.5–55.

Wei, G., Srinivasan, R., Cantemir-Stone, C.Z., Sharma, S.M., Santhanam, R., Weinstein, M., Muthusamy, N., Man, A.K., Oshima, R.G., Leone, G. y Ostrowski M.C., 2009. Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis. *Blood*, 114(5), p.1123–1130.

Welter, H., Wollenhaupt, K. y Einspanier, R., 2004. Developmental and hormonal regulated gene expression of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) and its receptors in porcine endometrium. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 88, p.295–304.

Wessels, J.M., Linton, N.F., Croy, B.A. y Tayade, Ch., 2007. A review of molecular contrasts beetwen arresting and viable porcine attachment sites. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 58, p.470–480.

Wilson, M.E., Biensen, N.J. y Ford, S.P., 1999. Novel insight into the control of litter size in pigs, using placental efficiency as a selection tool. *J. Anim. Sci.*, 77, p.1654–1658.

Wollenhaupt, K., Welter, H., Brüssow, K.P. y Einspanier, R., 2005. Regulation of endometrial fibroblast growth factor 7 (FGF-7) and its receptor FGFR2IIIb in gilts

after sex steroid replacements, and during the estrous cycle and early gestation. *J. Reprod. Dev.*, 51, p.509–519.

Wordinger, R.J., Smith, K.J., Bell, C. y Chang, I.F., 1994. The immunolocalization of basic fibroblast growth factor in the mouse uterus during the initial stages of embryo implantation. *Growth Factors*, 11, p.175–186.

Youngs, C.R., Ford, S.P., McGinnis, L.K., Anderson, L.H., 1993. Investigations into the control of litter size in swine: I. Comparative studies on in vitro development of Meishan and Yorkshire preimplantation embryos. *J. Anim. Sci.*, 71, p.1561–1565.

APÉNDICE

1. Anexos de inmunohistoquímica (IHQ).

Anexo 1.1 – Procesamiento automáticos de muestras, Departamento de Patología, FMVZ-UNAM. Los pasos secuenciales que se describen como parte del esquema de procesamiento son para biopsias pequeñas, especímenes de rutina y bloque de mayor tamaño. Para el paso de deshidratación se utilizaron alcoholes etílicos. El uso de alcoholes graduados que vayan de la concentración más baja hasta la más alta es de rutina. El procesador automático perfecciona el procesamiento de los tejidos mediante el uso del calor, vacío, presión y agitación y, por lo tanto, es ideal porque se llevan a cabo sin la presencia del personal. El xileno, uno de los muchos agentes aclarantes, es generalmente usado para la inclusión rutinaria en parafina por su compatibilidad con muchos tipos y tamaños de especímenes. Para el procesamiento de las muestras, se utilizó el esquema nocturno (procesamiento de 14 a 16 horas):

1. Alcohol etílico al 80%	1 hora
2. Alcohol etílico al 96%, 3 cambios	1 hora c/u
3. Alcohol absoluto, 3 cambios	1 hora c/u
4. Xileno, 3 cambios	1 hora c/u
5. Parafina, 3 cambios	1 hora c/u
6. Parafina, al vacío	1 hora

Anexo 1.2 – Planeación para cortes histológicos – utilizando cassettes del segundo tercio del cuerno uterino de cada una de las cerdas.

2 cerdas/subgrupo = 8 cerdas/grupo = 16 cerdas en total.

1 cassette/cerda = 16 cassettes en total.

2 cortes histológicos/ cassette – 15 pases entre cada corte = 1 laminilla.

3 campos/corte histológico = 6 campos/laminilla.

2 estratos de la mucosa del endometrio - tejido epitelial de revestimiento, tejido epitelial glandular superficial y tejido epitelial glandular profundo.

1 imagen representativa de los 2 estratos de la mucosa.

3 imágenes/subgrupo, 6 anticuerpos.

Cuadro 1.1. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica (IHQ).

Anticuerpo	Dilución
IGF-1 – monoclonal de ratón ((W18): sc-74116 – Santa Cruz Biotechnology, INC.)	1:100
IGF1R – monoclonal de ratón (3C8B1 – NOVUS Biologicals)	1:1000
IGF-2 – policlonal de ratón (NBP1-18707 – NOVUS Biologicals)	1:100
IGF2R – monoclonal de ratón ((29): sc-136321 – Santa Cruz Biotechnology, INC.)	1:500
FGF2 (β FGF) – policlonal de conejo ((Ab-2) (40-63) – Merck)	1:50
FGFR2 – monoclonal de ratón ((C-8): sc-6930 – Santa Cruz Biotechnology, INC.)	1:100

Cuadro 1.2. Anticuerpos secundarios utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica (IHQ).

Anticuerpo	Dilución
Anti-conejo biotinilado – Vector laboratories	1:100
Anti-ratón biotinilado – Vector laboratories	

Anexo 1.3 – Protocolo para experimentos de inmunohistoquímica (IHQ).

Desparafinado.

1. Colocar las laminillas a trabajar en una termoplatina previamente caliente, a 55 °C durante 30 minutos.
2. Introducir las laminillas en el Xilol 1 durante 10 minutos.
3. Introducir las laminillas en el Xilol 2 durante 5 minutos.
4. Realizar la hidratación de las laminillas
 - a. Alcohol etílico al 96%
 - b. Alcohol etílico al 80%
 - c. Alcohol etílico al 70%
5. Enjuagar las laminillas en agua destilada durante 10 minutos.
6. Enjuagar las laminillas en PBS 1x durante 10 minutos.

Desenmascaramiento.

7. Agregar 400 ml de agua destilada a la olla de presión para microondas.
8. Precalear la olla de presión para microondas durante 5 minutos a máxima potencia. Dejar enfriar hasta que baje el pibote de presión indicando que la olla puede abrirse.
9. Preparar citrato al 0.5x a partir de una concentración a 20x, en agua destilada y colocarlo dentro de la olla de presión para microondas.
10. Calentar el citrato dentro de la olla de presión para microondas durante 3 minutos al 60% de potencia. Abrir la olla de presión con cuidado y colocar las

laminillas dentro del citrato. Colocar un vaso coplin con agua destilada para nivelar la presión del citrato junto con las laminillas dentro de la olla.

11. Calentar la olla de presión para microondas al 60% de potencia del microondas durante 3 minutos.
12. Abrir la olla con cuidado y observar la integridad de los tejidos (esperar a que el pibote indicador de presión baje para poder abrir la olla, si es necesario).
13. Calentar la olla de presión para microondas al 40% de potencia del microondas por un minuto. Hacer este paso un par de veces.
14. Abrir la olla con cuidado y observar la integridad de los tejidos (esperar a que el pibote indicador de presión baje para poder abrir la olla, si es necesario).
15. Dejar enfriar las laminillas dentro del citrato a temperatura ambiente. Procurar que la temperatura óptima después de enfriarse sea entre 28 y 30 °C.
16. Enjuagar las laminillas en tres pasos: 10 minutos en PBS 1x, 5 minutos en PBSt 0.1x y 5 minutos en PBS 1x.

Bloqueo de peroxidasas.

17. Colocar las laminillas en peróxido de hidrógeno al 0.9% a partir de una concentración 30x, durante 5 minutos.
18. Enjuagar las laminillas en tres pasos: 10 minutos en PBS 1x, 5 minutos en PBSt 0.1x y 5 minutos en PBS 1x.

Aplicación del anticuerpo primario.

19. Colocar las laminillas en BSA 1x durante 30 minutos.

20. Aplicar el anticuerpo primario. Dejar incubar por una noche a temperatura de refrigeración, 4°C., en una cámara húmeda.

Aplicación del anticuerpo secundario.

21. Dejar reposar la cámara húmeda a temperatura ambiente durante 45 minutos.

22. Enjuagar las laminillas en tres pasos: 10 minutos en PBS 1x, 5 minutos en PBSt 0.1x y 5 minutos en PBS 1x.

23. Aplicar el anticuerpo secundario y dejar incubar durante 60 minutos.

24. Enjuagar las laminillas en tres pasos: 10 minutos en PBS 1x, 5 minutos en PBSt 0.1x y 5 minutos en PBS 1x.

Aplicación del complejo actina-biotina.

25. Preparar el complejo actina-biotina -complejo AB- (se recomienda prepararlo durante la incubación del anticuerpo secundario 30 minutos antes de su aplicación).

26. Aplicar el complejo AB y dejar incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

27. Enjuagar las laminillas en tres pasos: 10 minutos en PBS 1x, 5 minutos en PBSt 0.1x y 5 minutos en PBS 1x. Mantener las laminillas en PBS 1x.

Revelado, deshidratación y montaje de las laminillas.

28. Preparar el colorante diaminobencidina (DAB) bajo las recomendaciones del fabricante.

29. Secar la laminilla a revelar teniendo cuidado con los cortes histológicos.

30. Colocar la laminilla en la platina del microscopio óptico.
31. Colocar el DAB con la ayuda de una pipeta de 1 ml.
32. Observar la reacción al microscopio.
33. Después del tiempo deseado del revelado, frenar la reacción con agua destilada e inactivar el DAB en cloro.
34. Aplicar hematoxilina en la laminilla y dejar reposar de 30 a 45 segundos.
35. Enjuagar la laminilla con agua destilada.
36. Deshidratar la laminilla por medio de 10 pases en alcoholes etílicos de forma ascendente:
 - a. Alcohol etílico al 70%
 - b. Alcohol etílico al 80%
 - c. Alcohol etílico al 96%
37. Dejar secar la laminilla. Posteriormente, realizar el montaje con resina y observar al microscopio.

2. Anexos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).

Anexo 2.1 – Protocolo para extracción de ARN con trizol.

1. Colocar 1 ml de trizol en un tubo de 2 ml de capacidad con tapa de rosca.
2. Obtener un tamaño de 1 cm³, aproximadamente, y macerarlo.
3. Colocar en el homogeneizador automático durante 5 segundos (no permitir que se caliente demasiado la muestra). Repetir hasta lograr un homogeneizado uniforme.
4. Incubar el homogeneizado durante 5 minutos a temperatura ambiente, esto permite la disociación del complejo núcleo-proteico completa.

5. Añadir 200 μ l de cloroformo, cerrar el tubo y agitar durante 15 segundos. Posteriormente, dejar reposar por 3 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar las muestras a 12,000 rpm durante 5 minutos, a temperatura de refrigeración.
7. Recuperar la fase acuosa y llevarlo a un nuevo tubo previamente identificado (el restante orgánico puede almacenarse para aislar ADN y proteínas).
8. Añadir 500 μ l de isopropanol para la precipitación del ARN. Posteriormente, dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar las muestras a 12,000 rpm durante 10 minutos, a temperatura de refrigeración.
10. Remover el sobrenadante solo dejando el pellet del fondo.
11. Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 75% y mezclar en vórtex.
12. Centrifugar las muestras a 7,500 rpm durante 5 minutos, a temperatura de refrigeración.
13. Remover el sobrenadante y dejar secar procurando que no seque el pellet (mantiene la solubilidad del ARN).
14. Disolver el ARN en 50 μ l de agua libre de RNAsas o en agua DEPC, por medio de pipeteo (puede dejar incubarse a 55°C durante 10 minutos para mejorar la solubilidad).

Anexo 2.2 – Protocolo para la obtención de ADNc a partir de ARN.

Cuadro 2.1. Kit *Omniscript RT* de *Qiagen*®.

Componente	Volumen (µl)
10x Buffer RT	1
dNTP Mix	1
Random Primers 10 µM	1
RNAase inhibitor	0.25
Omniscript	0.5
RNA (ajustar a 2,000 ng)	Variable por cada muestra
Agua libre de ARNasas	Cbp 10
Volumen Total	10

Termociclador *Eppendorf Mastercyclergradient*: 95°C, 60 minutos.

Anexo 2.3 – Protocolo reacción en cadena de la polimerasa en punto final.

Se utilizó un Kit ReadyMix - *Taq PCR Reaction Mix* de *Sigma-Aldrich*® (201443), el cual se ajustó a un volumen de 10 µl por reacción y una concentración total de 2 µg de ADNc. Se ajustaron los siguientes componentes en un volumen de 10 µl del master mix.

Cuadro 2.2. Kit ReadyMix - *Taq PCR Reaction Mix* de *Sigma-Aldrich*®

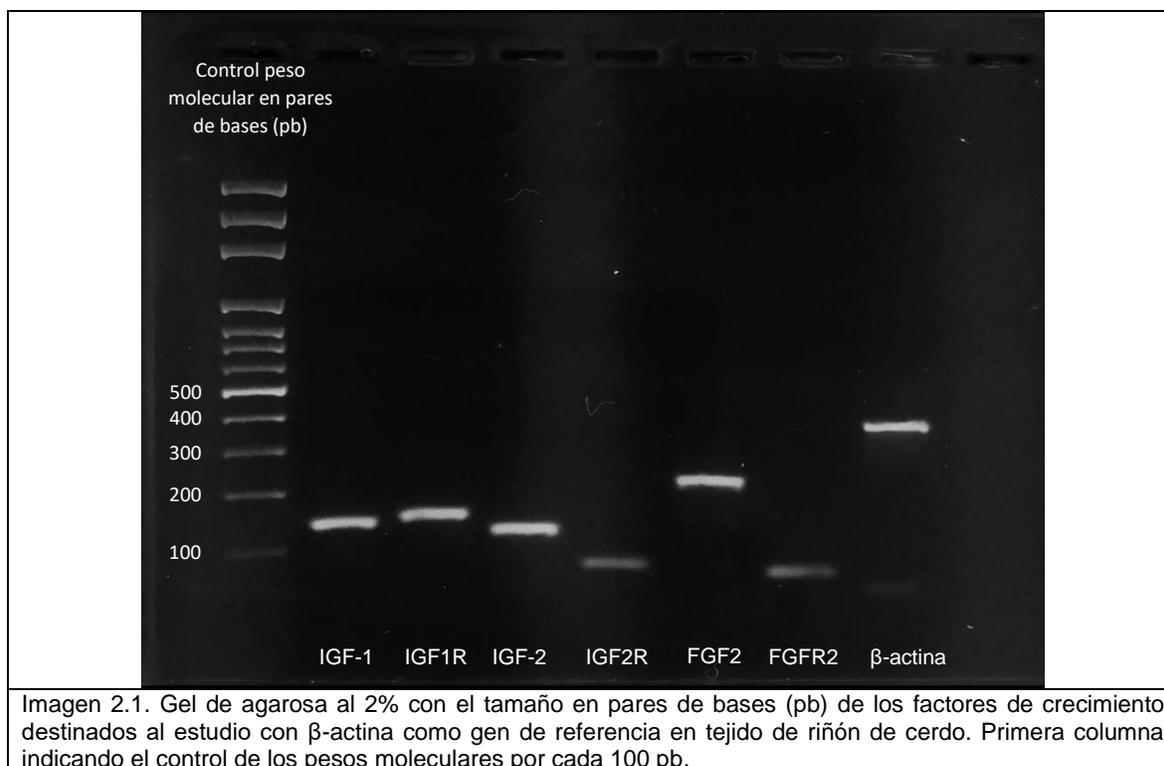
Componente	Volumen
Taq PCR Master Mix, 2x	5
Indicador de oligonucleótidos Forward (2.5 µM)	0.25
Indicador de oligonucleótidos Reverse (2.5 µM)	0.25
Agua libre de ARNasas	3.5
ADNc de la muestra (2 µg)	1
Volumen total de la reacción	10

Termociclador: *Eppendorf Mastercyclergradient*.

Cuadro 2.3. Indicadores de oligonucleótidos de genes específicos de los factores de crecimiento utilizados para PCR en punto final y en tiempo real (qRT-PCR).

Genes	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)
IGF-1	Forward: ATCGTGGATGAGTGCTGCTT Reverse: CTTCAAATGTACTTCCTTCTGAGC	147
IGF1R	Forward: ACGAGTGGAGAAATCTGCGG Reverse: TGAGCTTGGGAAAGCGGTAG	154
IGF-2	Forward: CTGCTCGTCTTCTTGGCCTT Reverse: GGCCTGCTGAAGTAGAAGCC	131
IGF2R	Forward: GCCCCCCAGCAGGAATC Reverse: ACGTGACTTGGGAAATTGCAT	98
FGF2	Forward: GAAGAGCGACCCTCACATCAA Reverse: CAGTGCCACATACCAACTGGA	219
FGFR2	Forward: AACACGTGGAAAAGAACGGC Reverse: CCCTGAGTGCTTCAGAACCTT	74
β-Actina	Forward: ACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACG Reverse: AGGGGCGATGATCTTGATCTTCA	365
RPS20	Forward: CGCTCCTGGCTCACCGCTGTT Reverse: TGCGGCTGGTGAGGGTGATCC	148

Anexo 2.4 – Expresión del ADNc de genes de los factores de crecimiento para PCR en tiempo real (qRT-PCR).



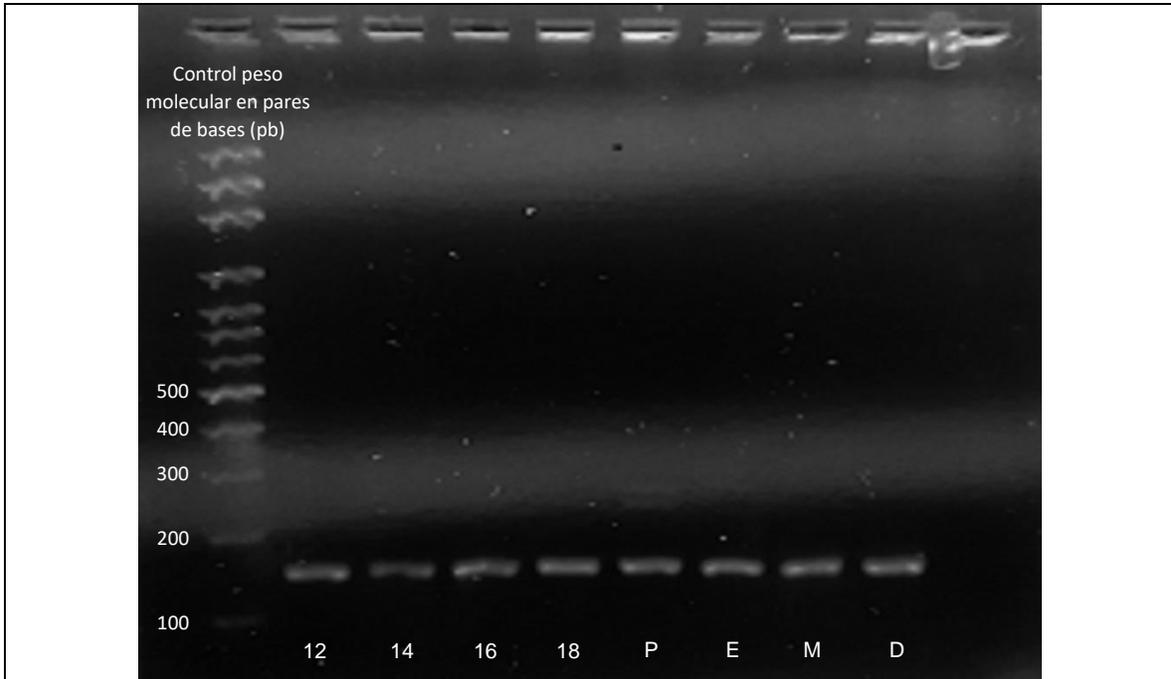


Imagen 2.2. Gel de agarosa al 2%. Tamaño en pares de bases (pb) del factor de crecimiento IGF-1 en tejido uterino de cerda a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante el proestro, estro, metaestro y diestro del ciclo estral. La primera columna indica el control de los pesos moleculares por cada 100 pb.

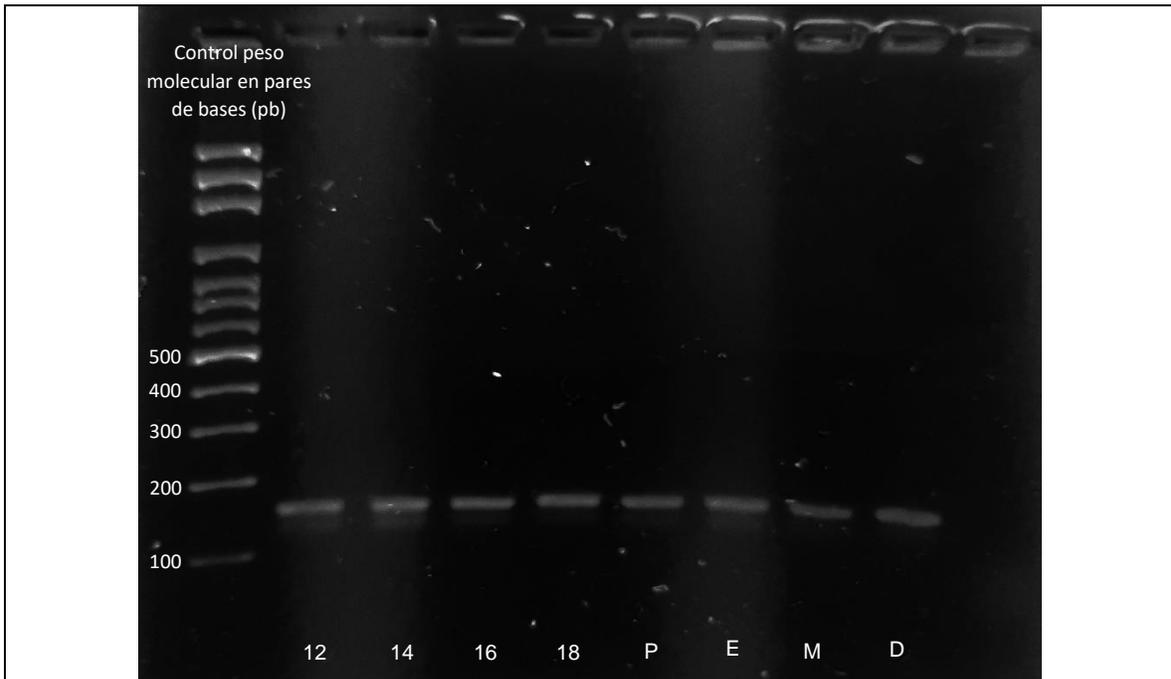


Imagen 2.3. Gel de agarosa al 2%. Tamaño en pares de bases (pb) del factor de crecimiento IGF1R en tejido uterino de cerda a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante el proestro, estro, metaestro y diestro del ciclo estral. La primera columna indica el control de los pesos moleculares por cada 100 pb.

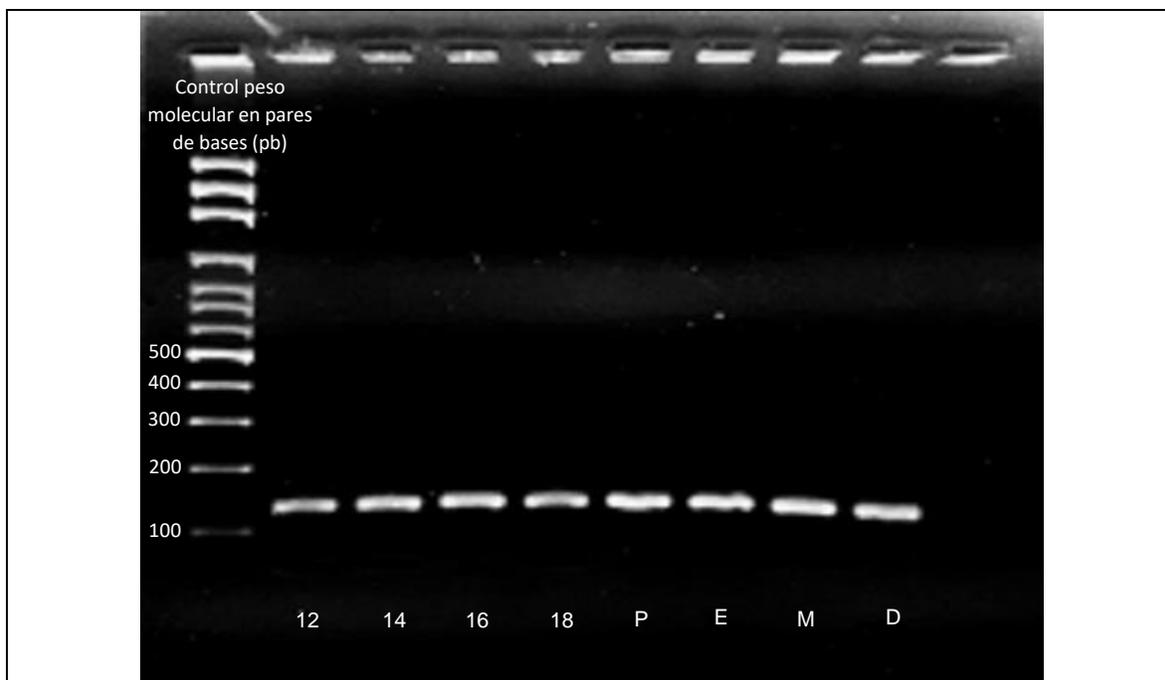


Imagen 2.4. Gel de agarosa al 2%. Tamaño en pares de bases (pb) del factor de crecimiento IGF-2 en tejido uterino de cerda a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante el proestro, estro, metaestro y diestro del ciclo estral. La primera columna indica el control de los pesos moleculares por cada 100 pb.

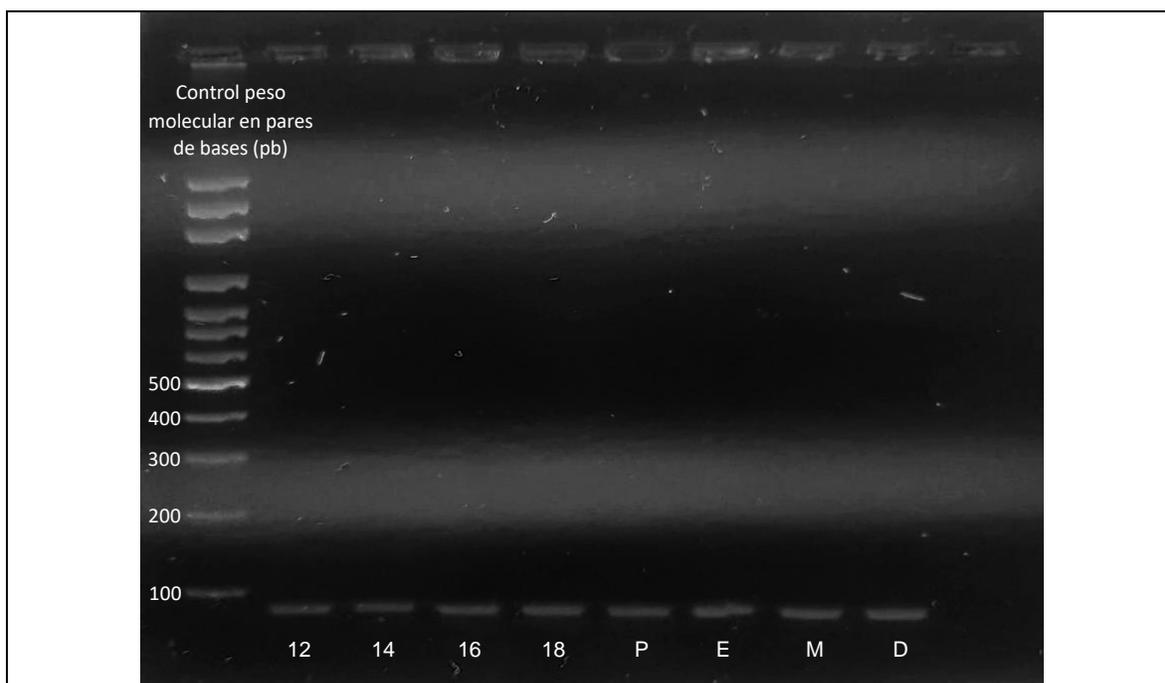


Imagen 2.5. Gel de agarosa al 2%. Tamaño en pares de bases (pb) del factor de crecimiento IGF2R en tejido uterino de cerda a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante el proestro, estro, metaestro y diestro del ciclo estral. La primera columna indica el control de los pesos moleculares por cada 100 pb.

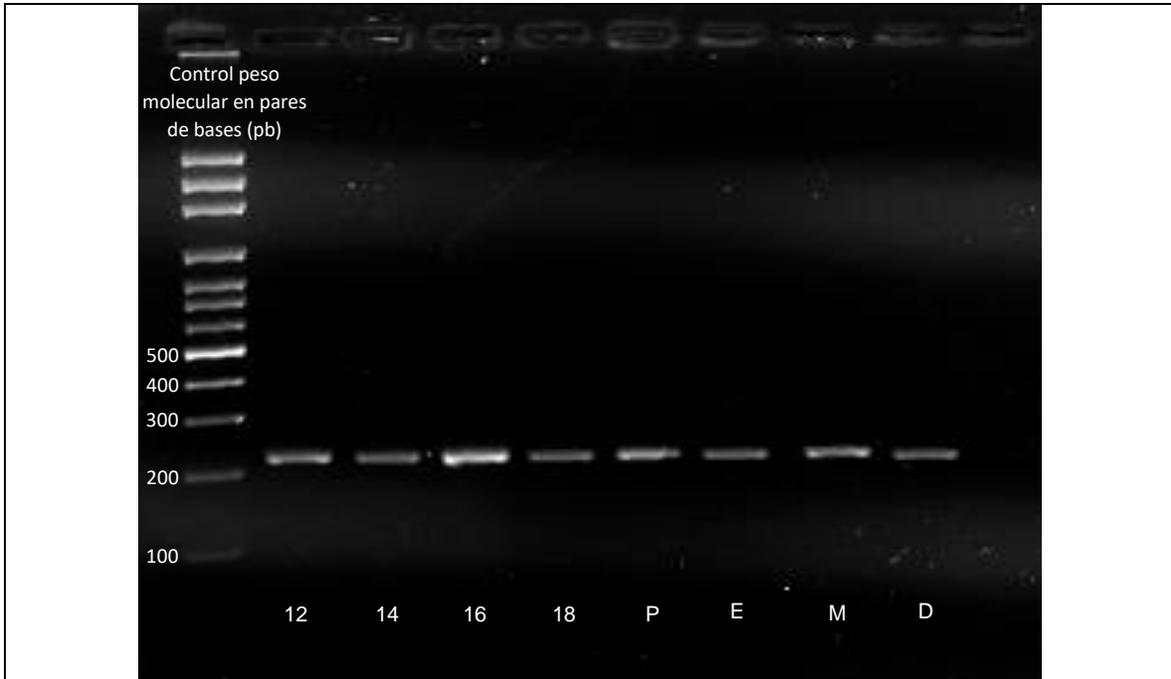


Imagen 2.6. Gel de agarosa al 2%. Tamaño en pares de bases (pb) del factor de crecimiento FGF2 en tejido uterino de cerda a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante el proestro, estro, metaestro y diestro del ciclo estral. La primera columna indica el control de los pesos moleculares por cada 100 pb.

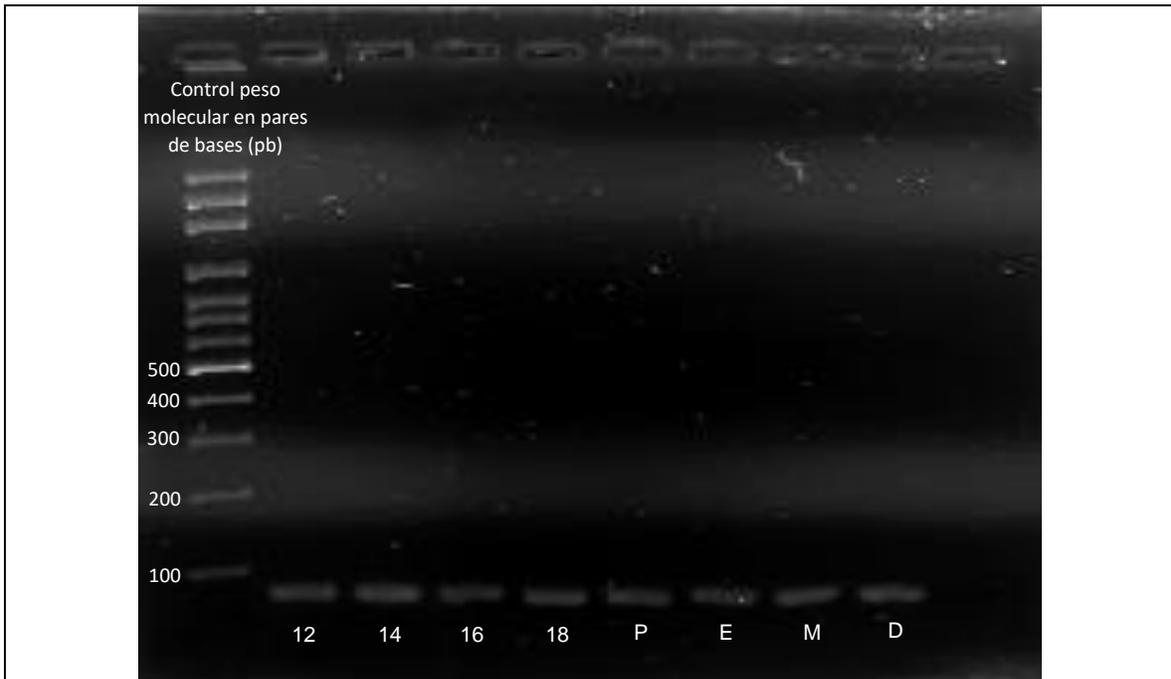
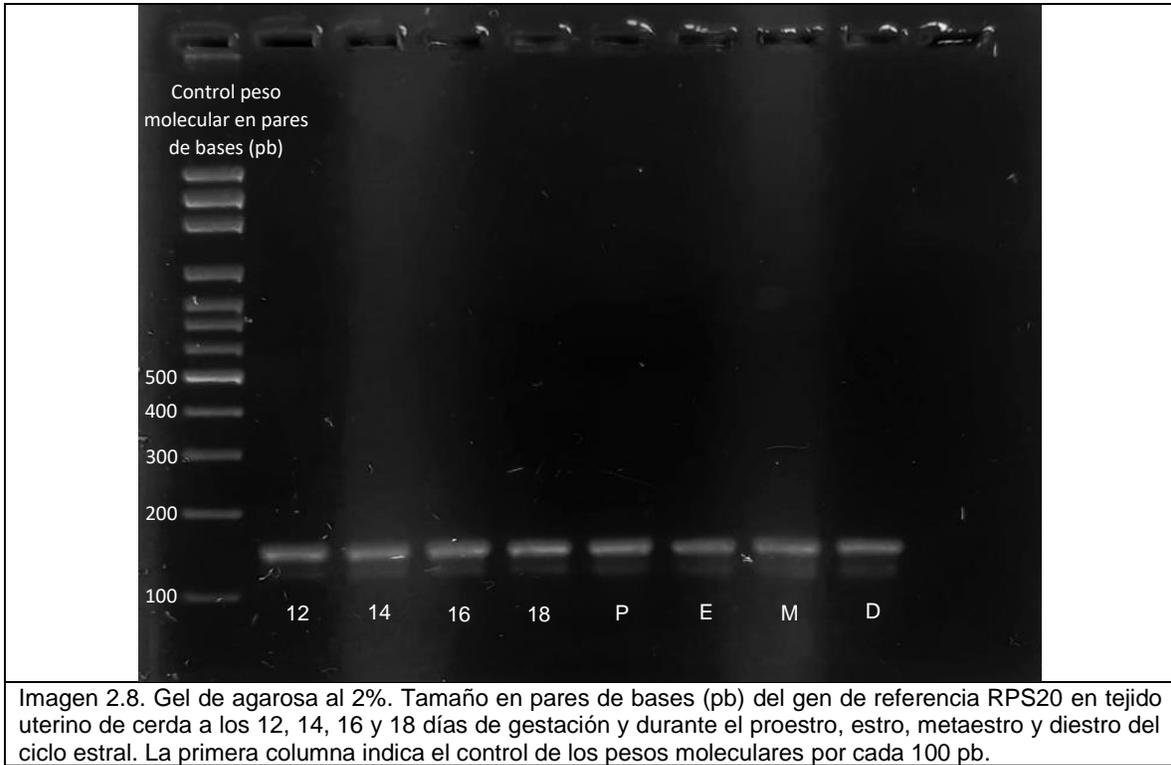


Imagen 2.7. Gel de agarosa al 2%. Tamaño en pares de bases (pb) del factor de crecimiento FGFR2 en tejido uterino de cerda a los 12, 14, 16 y 18 días de gestación y durante el proestro, estro, metaestro y diestro del ciclo estral. La primera columna indica el control de los pesos moleculares por cada 100 pb.



Anexo 2.5 – Protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).

Cuadro 2.4. Kit *QuantiNova Probe PCR* de Qiagen®.

Componente	Volumen (µl)
SYBR Green PCR Master Mix, 2x	5
Indicador de oligonucleótidos Forward (1µM)	0.7
Indicador de oligonucleótidos Reverse (1µM)	0.7
Agua libre de ARNasas	2.6
ADNc de la muestra	1
Volumen total de reacción	10