



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE  
FIBROBLASTOS 10 Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE  
HEPATOCITOS DURANTE LA IMPLANTACIÓN DEL BLASTOCITO  
EN CERDO DOMÉSTICO (*Sus scrofa domesticus*)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**

**MARIA MARGARITA MORALES VÁZQUEZ**

Asesores:

MVZ MC PhD Griselda Valdez Magaña

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2019



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

“Actualmente hemos descubierto una manera eficaz y elegante de comprender el universo: un método llamado ciencia”.

*Carl Sagan. Cosmos*

Carl Sagan dice que la mayor parte del Cosmos está vacío, lo que predomina entonces, es la noche perpetua del espacio intergaláctico, un lugar tan desolado, que en comparación, los planetas, las estrellas y las galaxias son algo dolorosamente raro y precioso.

La Tierra es tan fascinante e importante dentro del universo que es el único planeta conocido que ha desarrollado diversas y numerosas especies de seres vivos cuya naturaleza poco a poco se va descubriendo a través de la ciencia. Es en este punto donde se complican las cosas, y es que, investigar los procesos biológicos de la vida es sumamente complicado ya que para mí, cada ser vivo guarda un gran y complicado cosmos, por ejemplo, los animales de una forma muy general se componen de sistemas de órganos, los órganos de tejidos, los tejidos de células, las células de organelos, los organelos de moléculas, y las moléculas de elementos, los cuales se enlazan de manera tan específica para cumplir funciones determinadas, y no solo eso, en ocasiones, las moléculas o las células se mueven por grandes tuberías de transporte hasta llegar a espacios remotos, con señales, en ocasiones, tan esenciales que determinan la vida o muerte de un nuevo ser.

Por ello, dedico esta tesis, como un intento por desenredar un poco de los secretos guardados dentro de la reproducción de mamíferos a todos los investigadores científicos de México y sobre todo a los divulgadores de la ciencia, que estoy segura, uno de sus objetivos es comunicar lo extraordinaria que es la vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todos mis profesores que me aconsejaron y guiaron para tomar a la tesis como elemento de titulación, sin ustedes, no habría conocido lo hermoso que es la investigación.

A mi familia, que me brindó la paciencia ante mi decisión necia de tomar una modalidad de titulación con un camino sinuoso y lleno de obstáculos, y tal vez, con un futuro incierto por delante.

A mi tutora, que no solo me orientó, si no que me apoyó durante todos los problemas que surgieron.

Al personal del departamento de Fisiología y Farmacología y del departamento de Patología de la FMVZ, así como del laboratorio del doctor Gabriel Gutiérrez Ospina del IIBO y del laboratorio de la doctora Rosa María Viguera Villaseñor del INP, que invirtieron de su tiempo para capacitarme, ustedes son parte importante de la ciencia y tecnología mexicana y por consiguiente, del desarrollo del país.

Al proyecto PAPITT IA208516 IPVS MÉXICO 2014 que financió esta investigación.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 El embrión.....	2
1.1.1 Segmentación .....	3
1.1.2 Formación del blastocito .....	5
1.1.3 Diferenciación del trofoblasto y del embrioblasto.....	6
1.1.3.1 <i>Día 8 de gestación</i> .....	6
1.1.3.2 <i>Días 11 y 12 de gestación</i> .....	7
1.1.3.3 <i>Día 13 de gestación</i> .....	8
1.1.4 Elongación de embriones de cerdo .....	8
1.1.5 Diferenciación del epiblasto y del hipoblasto .....	10
1.1.5.1 <i>Gastrulación</i> .....	10
1.1.5.2 <i>Diferenciación del ectodermo: Neurulación</i> .....	13
1.1.5.2.1 <i>Formación del tubo neural</i> .....	13
1.1.5.2.2 <i>Crestas neurales</i> .....	13
1.1.5.3 <i>Diferenciación del mesodermo</i> .....	14
1.1.5.4 Diferenciación del endodermo .....	17
1.2 El tejido materno. Caso específico de la cerda domestica ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	18
1.2.1 Requerimientos hormonales.....	20
1.3 Implantación de embriones de cerdo doméstico ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) .....	20
1.3.1 Placenta tipo epiteliochorial .....	21
1.3.2 Ventana de Implantación.....	23
1.3.3 Cascada de implantación.....	24
1.4 Importancia del FGF y del HGF en la cascada de implantación.....	24
1.4.1 Receptores tipo tirosina cinasa (RTK) .....	27
2. HIPÓTESIS .....	30
3. OBJETIVO GENERAL.....	30
3.1 Objetivos específicos .....	30
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31

4.1 Muestras.....	31
4.2 Procesamiento de muestras de tejido .....	35
4.2.1 Tinción Hematoxilina-Eosina .....	36
4.2.2 Técnica de inmunohistoquímica.....	37
4.3 Estandarización de anticuerpos primarios y controles positivos.....	41
4.3.1 Estandarización para el anticuerpo de FGF10 .....	41
4.3.2 Estandarización para el anticuerpo de HGF .....	42
4.3.3 Controles positivos .....	44
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	45
5.1 Caracterización histológica .....	45
5.2 Inmunohistoquímica .....	46
6. RESULTADOS.....	48
6.1 Caracterización histológica .....	48
6.1.1 Longitud del endometrio y del miometrio en el ciclo estral .....	48
6.2.1 Histología del endometrio durante el día 12 del ciclo estral .....	48
6.2.2 Histología del endometrio durante el día 17 del ciclo estral .....	50
6.2.3 Histología del endometrio durante el día 21 del ciclo estral .....	51
6.1.4 Histología del endometrio durante el día 12 de gestación.....	53
6.1.5 Histología del endometrio durante el día 16 de gestación.....	56
6.1.6 Histología del endometrio durante el día 18 de gestación.....	58
6.2 Localización del FGF 10 y HGF en el útero de cerdo durante la ventana de implantación .....	59
6.2.1 FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 10 (FGF10).....	60
6.2.2 FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF) .....	68
7. DISCUSIÓN .....	77
7.1 Cambios histológicos y patrones de señalización de FGF10 y HGF en el ciclo estral .....	77
7.2 Cambios histológicos y patrones de señalización del FGF10 y HGF en gestación temprana.....	79
7.3 Interacción de FGF10 y HGF con otras moléculas .....	83
8. REFERENCIAS .....	85
9. APÉNDICE .....	91
9.1 Apéndice protocolos.....	92

9.1.1 Trenes de soluciones.....	92
9.1.2 Soluciones .....	93
9.2 Atlas de embriones observados .....	97

## RESUMEN

MORALES VÁZQUEZ MARÍA MARGARITA. Participación del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 10 y del Factor de Crecimiento de Hepatocitos durante la implantación del blastocito en cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*) (Bajo la dirección de: MVZ MC PhD Griselda Valdez Magaña).

La implantación es el proceso a través del cual el blastocito se adhiere al útero. Esta adhesión permite que el embrión desarrolle una placenta funcional que mantenga una comunicación materna y que soporte la gestación.

Con el objetivo de evaluar la interacción del embrión con las células uterinas durante la implantación se estudió el desarrollo embrionario temprano en porcinos. En cerdos, una vez que el embrión ha eclosionado de la zona pelúcida y se ha elongado, el trofoblasto se extiende dentro de los cuernos uterinos, el útero se remodela y se incrementa la secreción de citocinas, así como de Factores de Crecimiento (FC). Algunos FC como el FGF10 y HGF durante la ventana de implantación están involucrados en la proliferación y la migración celular, sin embargo, esto no ha sido esclarecido en el cerdo.

La metodología consistió en sincronizar e inseminar artificialmente a un grupo de cerdas, para luego obtener los cuernos uterinos, disecar los sitios de implantación y analizarlos a través de inmunohistoquímica. Los resultados muestran que FGF10 y HGF están localizados principalmente en la región cercana a la luz uterina y fueron proporcionalmente más abundantes en animales con una gestación entre los días 12 a 16, por lo que la presencia de estos FC indica su participación en la sobrevivencia del embrión y en el éxito de la implantación en cerdos, sin embargo, estudios funcionales son necesarios para identificar su posible actividad en esta etapa.

# **Participación del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 10 y del Factor de Crecimiento de Hepatocitos durante la implantación del blastocito en cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*)**

## **1. INTRODUCCIÓN**

La implantación embrionaria consiste en el contacto entre las células del trofoblasto del blastocito y las células endometriales maternas, dicha interacción es mediada por señales moleculares complejas cuyo objetivo es establecer una comunicación materna fetal. La implantación representa el paso más crítico del proceso reproductivo, siendo en humanos la causa del 75% de todos los embarazos perdidos. En vacas, el 50% y en cerdos el 30% de los embriones se pierden durante los primeros 16 días después de la fertilización, cuya causa puede ser fallas en la implantación. <sup>(1,2)</sup>

Cuando se habla de implantación, es necesario visualizar un embrión que está en desarrollo y en constante actividad física y molecular, antes, durante y después de la interacción con el tejido materno, por ello, y con el objetivo de recrear una imagen, a continuación se describirán los fundamentos para entender este fenómeno fisiológico.

### **1.1 El embrión**

El momento de implantación es diferente según la especie, así, mientras en cerdos hay un rango para la implantación entre los 11 y los 20 días de gestación, en perros es en el día 20 y en humanos tan solo entre los días 8-15. Es por ello que tratando de integrar el tiempo de desarrollo de los mamíferos, podemos deducir que una vez finalizada la implantación, el embrión ha terminado de adquirir su forma corporal y presenta somitas, esto significa que ha finalizado el proceso de neurulación, lo cual ocurre aproximadamente a la tercera semana de gestación, pero, ¿Cómo es que una célula termina originando un individuo pluricelular capaz de interactuar con un tejido materno? <sup>(3,4)</sup>

Una vez fecundado un ovocito podemos referirnos a la estructura que engloba el pronúcleo femenino y al pronúcleo masculino como huevo o cigoto.

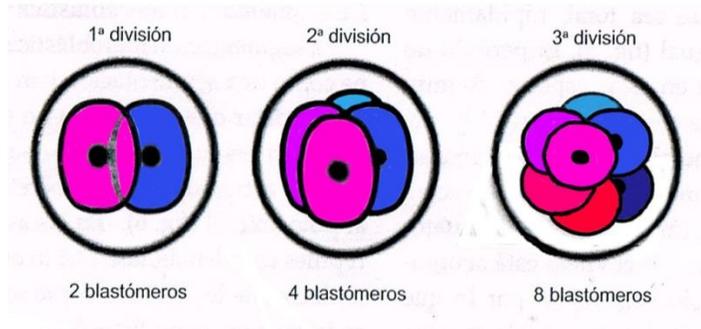
El huevo o cigoto de los mamíferos permanece con las mismas estructuras del ovocito al momento de la ovulación, es decir: una típica membrana citoplasmática, una capa de glucoproteínas denominada zona pelúcida, y por encima de esta, a una capa de células foliculares llamada corona radiada.

El cigoto cuenta con dos tipos de citoplasma; el plasma germinativo, que no tiene diferencia con el citoplasma típico de toda célula y el plasma nutritivo o vitelo. Según la cantidad y distribución de vitelo, los huevos se pueden clasificar en: oligolecitos (microlecitos), mesolecitos y polilecitos (megalolecitos), siendo los primeros los que contienen la menor cantidad de vitelo, y los últimos gran cantidad del mismo. Los huevos de mamíferos son oligolecitos.<sup>(5)</sup>

A partir de la estructura denominada cigoto, inician las divisiones celulares por mitosis, proceso llamado segmentación.

### **1.1.1 Segmentación**

La segmentación consiste en una serie de mitosis del cigoto sin pausas intermedias, por lo que las células son más pequeñas en cada división. Las células hijas resultantes se denominan blastómeros y al conjunto de blastómeros, blástula. En mamíferos se lleva a cabo una segmentación holoblástica equitativa, esto significa que las divisiones celulares afectan la totalidad del cigoto y además, el material del huevo se distribuye equitativamente entre las células hijas, como resultado se desarrolla una blástula esférica regular, sin embargo, la orientación de cada división es diferente, así: la primera división es una mitosis normal, la segunda división sigue el mismo plano longitudinal, pero la tercera se realiza en un plano perpendicular al anterior eje de polaridad (**Figura 1**). A la estructura resultante del conjunto de 9 a 16 células en humanos y de 16 a 64 blastómeros en otros mamíferos se denomina mórula, estructura que podemos observar de los 4 a los 8 días post- fertilización.



**Figura 1. Distribución de las mitosis durante una segmentación.** Se observa como la segunda división sigue un plano longitudinal a la primera división, mientras que la tercera se realiza en un plano perpendicular al eje de polaridad. (Modificado a partir de García M. et.al; 2013).

En humanos, roedores y cerdos durante la etapa de 8 a 16 blastómeros y de 16 a 32 en rumiantes, los embriones entran en una fase llamada compactación de la mórula, donde los blastómeros de la superficie se adhieren íntimamente perdiendo su forma (**Figura 2**). Esto es resultado de la expresión de moléculas de adhesión como la E-cadherina que se manifiesta en la superficie apical de los blastómeros y cuyo resultado es la separación de las células internas de las células externas. Ahora las células internas constituyen la masa celular interna mientras que las externas, la masa celular externa.<sup>(6,7)</sup>



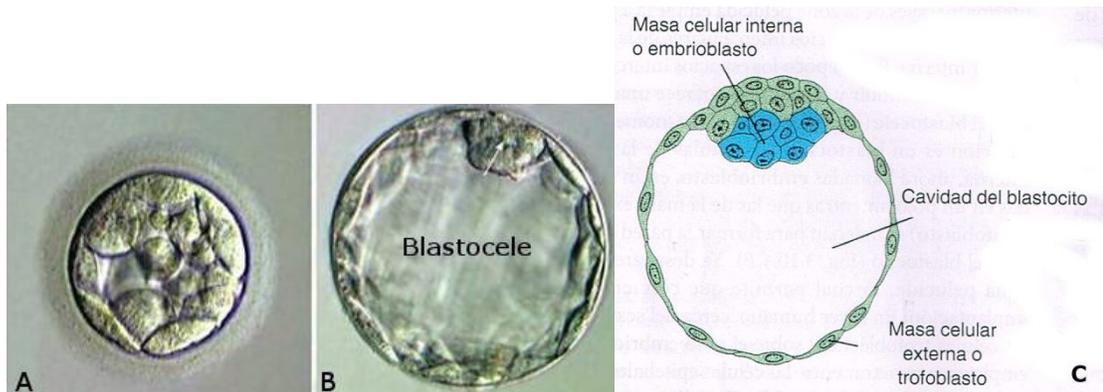
**Figura 2. Compactación de la mórula.** A la izquierda una mórula sin compactar, a la derecha se muestra como los blastómeros de la superficie pierden su forma, constituyendo la masa celular interna y la masa celular externa. (Carlson B.M, 2014).

La formación de la mórula tiene lugar durante el descenso del embrión por el oviducto, trayecto por el cual la corona radiada se desprende pero la zona

pelúcida se mantiene intacta, pues es esta estructura la que prohíbe que el embrión se adhiera al oviducto.<sup>(4)</sup>

### 1.1.2 Formación del blastocito

Al tiempo en que la mórula entra a la cavidad uterina, las células de la masa celular externa a través de un sistema de transporte de  $\text{Na}^+$  basado en  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -adenosina trifosfatasa (ATPasa) permite que el  $\text{Na}^+$  y el agua penetren por la zona pelúcida y las blastómeras externas, acumulándose en los espacios intercelulares de las blastómeras internas (cavitación) formando una cavidad: el blastocele. A partir de este momento, el embrión es denominado blastocito, las células de la masa celular interna embrioblasto, y las células de la masa celular externa trofoblasto (**Figura 3**). El trofoblasto, entonces, se refiere a células periféricas de morfología epitelial ligadas con uniones estrechas que darán origen a las estructuras extraembrionarias, por el contrario, el embrioblasto son células de mayor tamaño y de forma globular cuyos citoplasmas se conectan directamente por uniones intersticiales o de hendidura, ubicadas en la superficie interna del trofoblasto y que darán lugar al embrión. En el cerdo la etapa de blastocito se alcanza en el día 5 de gestación.<sup>(8)</sup>



**Figura 3. Formación del blastocito.** (A) Entrada de agua a los espacios intercelulares de las blastómeras internas formando una cavidad, el blastocele (B), esto provoca un desplazamiento celular, que establece al embrioblasto en una ubicación apical y al trofoblasto en la periferia del ahora denominado blastocito (C). (A y B Carlson B.M, 2014, C Sadler T.W, 2016).

Una vez formado el blastocito, en el día 7 u 8 la zona pelúcida desaparece por la acción de la proteasa estripsina, requisito para que inicie el proceso de implantación.<sup>(3,8)</sup>

Es justo en esta etapa que los embriones tienen diferentes estrategias para asegurarse un lugar de implantación, así, por ejemplo, pueden ocurrir migraciones transuterinas en especies en donde ambos cuernos uterinos se conectan, como en la vaca, la oveja y la cerda. De hecho, las migraciones transuterinas son muy frecuentes en la cerda, en donde un blastocito en desarrollo a partir de un ovocito fertilizado en el oviducto derecho puede migrar e implantarse en el cuerno uterino izquierdo.<sup>(9)</sup>

Una vez distribuidos los embriones, el trofoblasto de los blastocitos prolifera, es decir, el blastocito se elonga, sin embargo, en especies como los primates y los roedores donde el embrión penetra en el tejido materno esto no ocurre, mientras que en especies como los caballos, el perro y el gato la proliferación del trofoblasto es mínima (véase Elongación de embriones de cerdo). En los rumiantes y en cerdos la elongación del embrión desde una forma esférica a una tubular es muy marcada, en cerdos por ejemplo, el embrión puede alcanzar hasta un metro de longitud.<sup>(10)</sup>

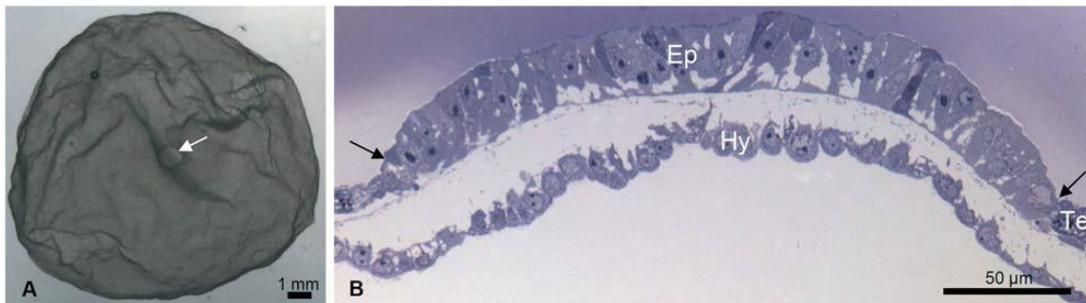
### **1.1.3 Diferenciación del trofoblasto y del embrioblasto**

#### **1.1.3.1 *Día 8 de gestación***

En el día 8 de gestación, el embrioblasto se diferencia en dos capas. Las células más profundas del embrioblasto se desprenden y se expanden formando una lámina que rodea a una nueva cavidad por dentro del blastocele. Esta lámina se denomina hipoblasto, y la nueva cavidad formada gastrocele, estomago primitivo, cavidad exocelómica o saco vitelino primitivo. Cabe mencionar que existe una nomenclatura que denomina hipoblasto solo a la pared superior de la cavidad exocelómica, mientras que el resto de la estructura se denomina, membrana exocelómica o de Hauser.

Por su parte, las células superficiales del embrioblasto también forman una lámina denominada epiblasto (**Figura 4**).

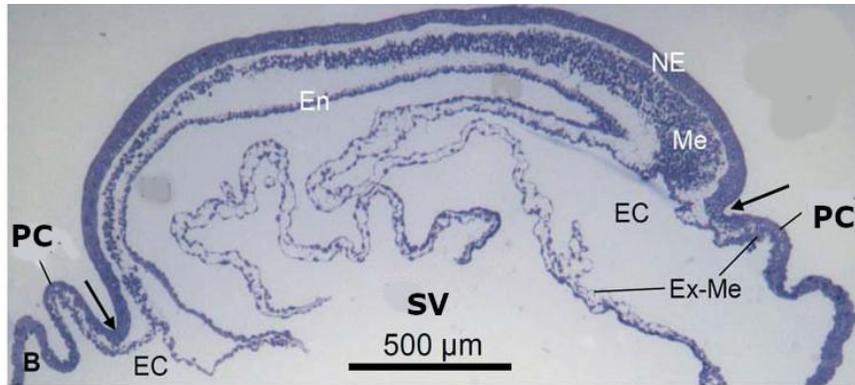
Finalmente, en las especies domésticas, el trofoblasto que rodea a la blástula debe romperse para que el disco embrionario emerja. En ungulados el trofoblasto es muy resistente por lo que las células epiblasticas se contraen formando una cavidad temporal, el embriocisto. Esta cavidad termina por desgarrar el trofoblasto.<sup>(3,5)</sup>



**Figura 4. Embrión porcino de 10 días de gestación. A:** Embrión de tipo esférico, la flecha indica la posición del disco embrionario. **B:** El embrioblasto se diferencia en dos capas: la capa más superficial se denomina epiblasto (Ep) y la capa más profunda hipoblasto (Hy). Las flechas indican la continuación del epiblasto con el trofoblasto (Te) (Traducido al español de Hyttel P. et al; 2011)

#### **1.1.3.2 Días 11 y 12 de gestación**

En estos días una nueva población de células aparece entre la superficie interna del trofoblasto y la cara externa de la cavidad exocelómica, estas células constituyen el mesodermo extraembrionario (**Figura 5**), que a su vez, formará una nueva cavidad, la cavidad extraembrionaria. La cavidad extraembrionaria rodea a la cavidad exocelómica, excepto en donde el disco embrionario se une al trofoblasto mediante el pedículo de fijación.



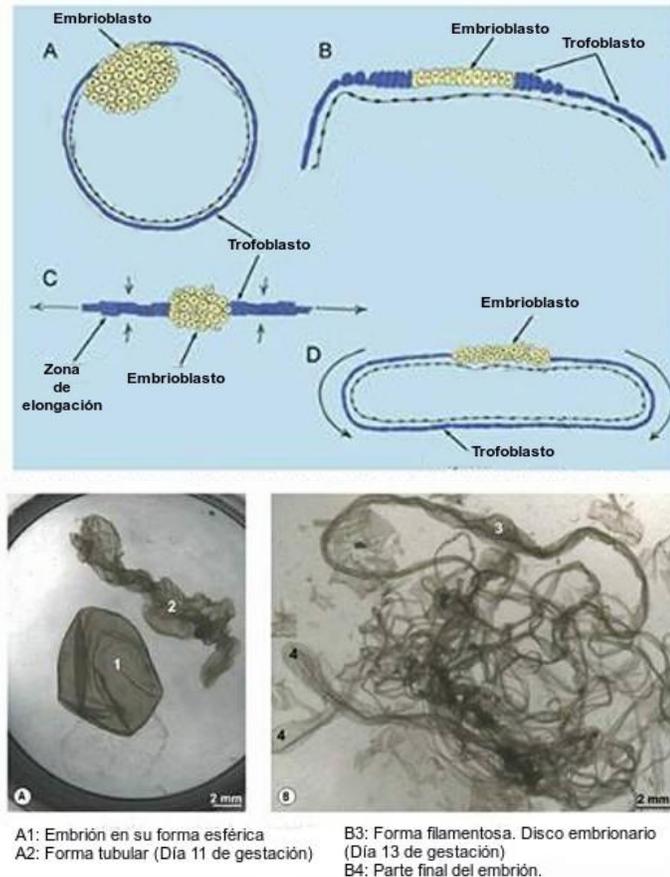
**Figura 5. Embrión porcino 14 días de gestación.** El mesodermo extraembrionario formará una nueva cavidad entre el trofoblasto y la cavidad exocelómica denominada cavidad coriónica, que posteriormente, al expandirse la cavidad exocelómica, la cavidad coriónica se contrae, denominándose ahora placa corionica. NE: neuroectodermo, Me: Mesodermo, En: Endodermo, SV: Saco vitelino, PC: Placa coriónica. Ex-Me: Mesodermo extraembrionario, Flechas: Límites entre el epiblasto y el trofoblasto. (Traducido al español de Hyttel P. et al; 2011)

### 1.1.3.3 *Día 13 de gestación*

El hipoblasto produce células que migran al interior de la membrana exocelómica desarrollándose una nueva cavidad, el saco vitelino definitivo, que es mucho más pequeño que el saco vitelino primitivo. Al mismo tiempo que se forma el saco vitelino definitivo, la cavidad exocelómica se expande para formar una gran cavidad, la cavidad coriónica, esto significa que el mesodermo extraembrionario se contrae, dejando de ser una cavidad, denominándose ahora placa coriónica (**Figura 5**).<sup>(3)</sup>

### 1.1.4 **Elongación de embriones de cerdo**

El tipo de placentación de los cerdos es epiteliocorial (véase implantación de embriones de cerdo), esto significa que la unión del trofoblasto con el epitelio uterino es muy superficial, por ello, es de gran relevancia que los embriones desarrollen estrategias para asegurar un reconocimiento, implantación y conexión materna exitosa. El aumento de superficie de contacto por elongación del trofoblasto es la estrategia a seguir, de esta manera, los embriones tendrán que pasar desde una fase esférica, a una filamentosa.



**Figura 6. Elongación de embriones de cerdo. Arriba:** Formación de la zona de elongación adyacente al embrioblasto y por la cual el trofoblasto se elonga hasta que el embrión alcanza su forma filamentosa. **Abajo:** Fotografías de embriones en sus tres formas: esférica, tubular y filamentosa. La parte final de un embrión filamentoso desarrolla un ensanchamiento (Arriba: Modificado a partir de Bazer F.W. et al; 2014. Abajo: Traducido al español de Hyttel P. et al; 2010).

Los embriones de cerdo migran del oviducto al útero por estimulación de estrógenos y prostaglandinas en fase de cuatro células, esto ocurre aproximadamente a las 60-72 horas después del comienzo del estro y alcanzan la fase de blastocito al día 5. Para esta fecha, el blastocito aún está en forma esférica y mide de 0.5 a 1mm de diámetro. Entre los días 7 a 8 de gestación, el embrión se libera de la zona pelúcida, se posiciona a nivel del centro de la luz uterina y empieza a elongarse por hiperplasia alcanzando al día 10, de 2-6 mm de diámetro. Del día 10 al 12 el blastocito se expande 0.25 mm/h hasta alcanzar una forma esférica de 4-9 mm de diámetro. Cuando un blastocito mide 10mm de diámetro desarrolla una banda densa de células que se extiende desde la masa

celular interna hasta la punta del embrión, esta banda celular se denomina zona de elongación y es a partir de la cual el blastocito pasa a una forma filamentosa que alcanza los 1000 mm de diámetro al día 16 de gestación (**Figura 6**). Cabe mencionar que la velocidad de elongación a partir de un blastocito de 10mm de diámetro aumenta hasta los 30-40mm/h.<sup>(11)</sup>

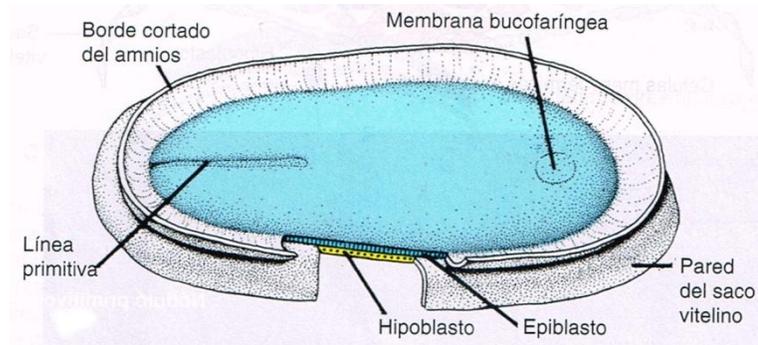
### **1.1.5 Diferenciación del epiblasto y del hipoblasto**

#### **1.1.5.1 Gastrulación**

Una vez que el embrioblasto se ha diferenciado, el siguiente objetivo es la formación de tres hojas germinativas, ectodermo, mesodermo y endodermo. En mamíferos se lleva a cabo en la tercera semana de gestación, aproximadamente en el día 18.<sup>(6)</sup>

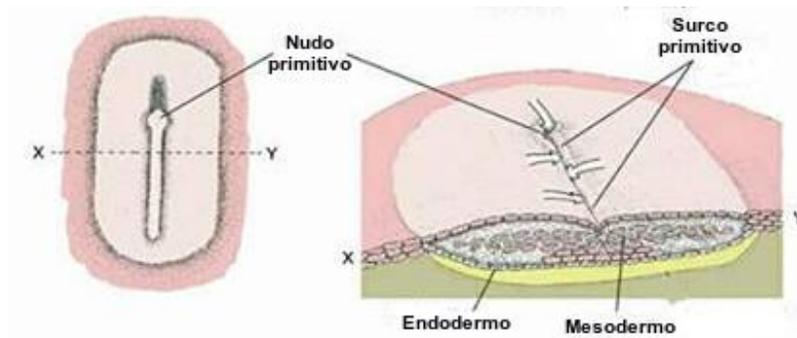
Ahora las células del epiblasto se desplazan hacia los márgenes caudales del disco embrionario formando un engrosamiento. A partir de este engrosamiento las células epiblasticas seguirán migrando cranealmente y por línea media formando una línea celular, la línea primitiva (**Figura 7**). El extremo craneal de la línea termina en una zona de engrosamiento celular, denominado nudo primitivo, que será el centro señalizador de las siguientes migraciones celulares. Al mismo tiempo que se forma la línea primitiva, el propio disco embrionario se alarga. Con la aparición de la línea primitiva ya se pueden diferenciar los ejes anteroposterior y derecha-izquierda del embrión.<sup>(6)</sup>

La línea primitiva en su desarrollo completo alcanza solo dos tercios de la longitud total del disco embrionario pues es limitada por dos membranas, en el extremo craneal por la membrana bucofaríngea y en el caudal por la membrana cloacal. Estas membranas son células ectodérmicas fuertemente unidas a células endodérmicas, es decir, sin mesodermo entre ellas.



**Figura 7. Formación de la línea primitiva.** Corte al nivel del amnios que muestra como un grupo de células epiblasticas se desplazan en dirección cráneo caudal formando la línea primitiva (Sadler T.W, 2016).

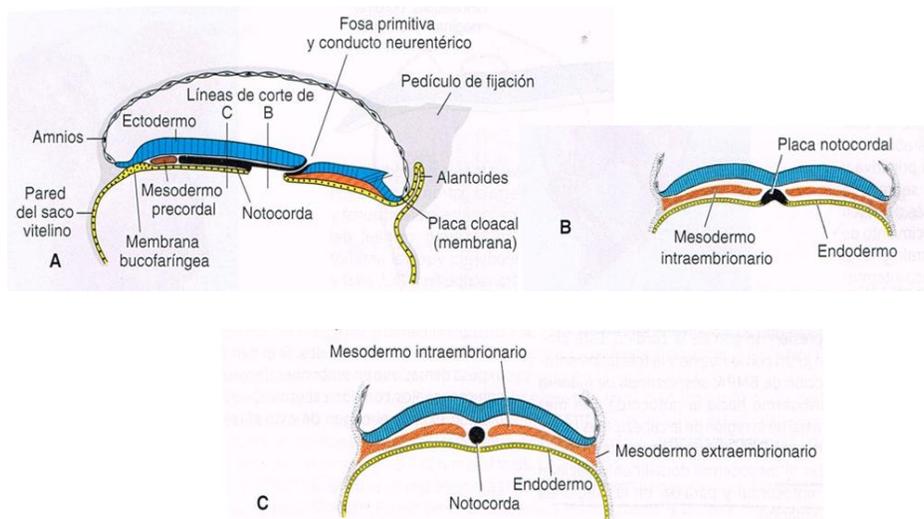
La línea primitiva se hunde (surco primitivo) provocado por la migración de células epiblasticas hacia el hipoblasto relleno el espacio entre estas dos capas celulares, formando el mesodermo (**Figura 8**). Una vez formado el mesodermo, el epiblasto se denomina ectodermo, y al hipoblasto se le llama endodermo.



**Figura 8. Formación del mesodermo.** Vista lateral: la línea primitiva se hunde, formando un surco que sirve como guía para la migración de células epiblasticas hacia el hipoblasto, estableciendo el mesodermo (Carlson M.B, 2014).

La migración celular a partir del nudo primitivo continúa, así, por ejemplo, las células que migran entre el ectodermo y el endodermo usan como límites la membrana bucofaringea y la futura notocorda para desarrollar la placa precordial. También existe un grupo de células que migran desde el nudo primitivo, denominadas células prenotocordales, que se depositan en la placa precordial, las cuales después se mezclan con células hipoblásticas, formando la placa notocordal, sin embargo, cuando se diferencia el endodermo, la placa notocordal

se separa y se diferencia en un cordón de células que recorre en forma longitudinal al embrión, la notocorda definitiva (**Figura 9**). La parte más caudal de la notocorda se fusiona con el endodermo desarrollando una conexión con el epiblasto a través del conducto neuroentérico (**Figura 9**), que comunica de forma temporal la cavidad amniótica con el saco vitelino, más tarde, las células de la notocorda se separan del endodermo, por lo que esta sigue su desarrollo de forma continua entre la capa ectodérmica y endodérmica del embrión en desarrollo. Una vez formada la notocorda, la línea primitiva degenera en dirección cráneo caudal. (3,6)



**Figura 9. Formación de la notocorda.** La migración de células epiblasticas hacia el hipoblasto también forma una estructura denominada placa precordial, lugar en donde se seguirán depositando células en migración hasta constituir la placa notocordal. Finalmente, la placa notocordal se desprende del endodermo, estableciendo la notocorda definitiva (Sadler T.W, 2016).

Por su parte, una vez formada la membrana cloacal, el saco vitelino produce un divertículo que se extiende al pedículo de fijación, llamado divertículo aloentérico o alantoides.

La migración y diferenciación de células en esta etapa está controlado por el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8), sintetizado por las propias células de la línea primitiva y que disminuye la actividad de la molécula cadherina E que une a las células epiblasticas. (3)

### **1.1.5.2 Diferenciación del ectodermo: Neurulación**

La notocorda es la estructura base que induce el desarrollo del tejido neural a través de la formación del tubo neural. Estamos todavía en la tercera semana de gestación, donde el ectodermo que se ubica por encima de la notocorda se diferencia en una placa gruesa y alargada de células epiteliales denominada placa neural. Ahora, a las células ectodérmicas de la placa neural se les denomina neuroectodermo.<sup>(6)</sup>

La placa neural se desarrolla a partir de la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) junto con la inhibición de la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) la cual pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ).<sup>(3)</sup>

#### **1.1.5.2.1 Formación del tubo neural**

Una vez formada, los bordes laterales de la placa neural se elevan (pliegues neurales) mientras la región medial se hunde (surco neural), esto lleva al acercamiento de los pliegues neurales hasta su fusión a nivel dorsal formando un tubo, el tubo neural (**Figura 10**). El cierre de la placa neural hasta un tubo ocurre aproximadamente a los 20-21 días de gestación. El tubo neural permanecerá abierto temporalmente y en contacto con la cavidad amniótica en sus extremos a través de los neuroporos craneal y caudal. El neuroporo craneal se cerrará en un embrión de 18-20 somitas (25 días de gestación), mientras que el neuroporo caudal en un embrión de 25 somitas (27 días de gestación).<sup>(6)</sup>

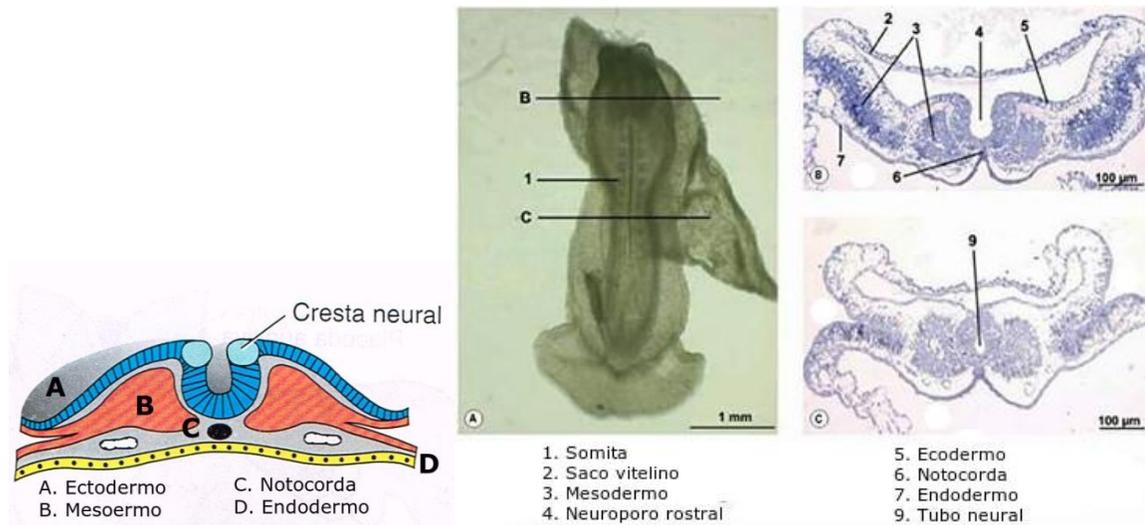
El extremo cefálico del tubo neural se dilatará en vesículas, las vesículas cefálicas, que darán origen al encéfalo. El resto del tubo se diferenciará en la medula espinal.<sup>(3,5)</sup>

#### **1.1.5.2.2 Crestas neurales**

Las crestas neurales son un grupo de células de los pliegues neurales que se desprenden en la formación del tubo neural. Se localizan dorsalmente al tubo neural (**Figura 10**).

Las células de la cresta saldrán del neuroectodermo y migran en dos vías, una dorsal hacia el ectodermo para producir melanocitos y una vía ventral para

convertirse en ganglios sensoriales, neuronas simpáticas y entéricas, así como en células de la medula suprarrenal.<sup>(3)</sup>

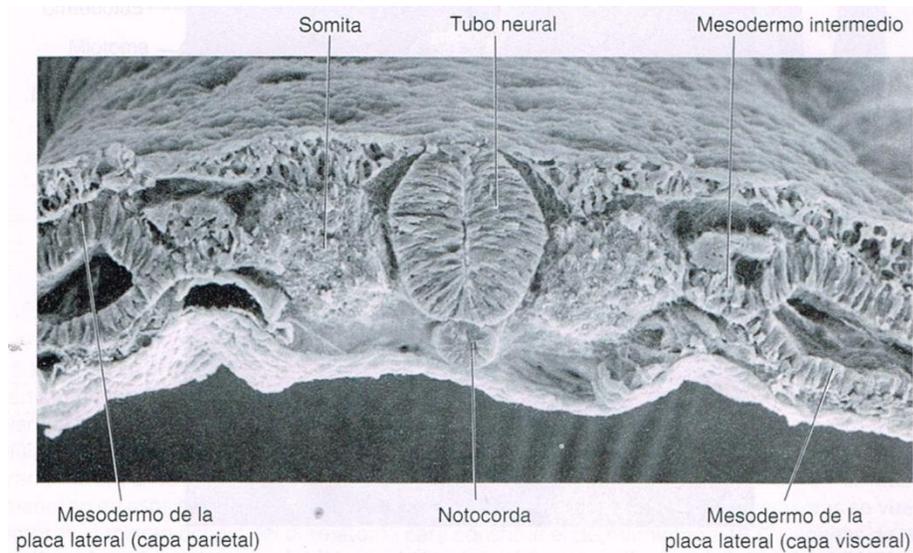


**Figura 10. Formación del tubo neural.** Los bordes laterales de la placa neural se elevan (pliegues neurales) mientras la región medial se hunde (surco neural). Los pliegues neurales se fusionan a nivel dorsal formando el tubo neural. Durante el cierre del tubo neural unas células de los pliegues neurales se desprenden formando las crestas neurales. Las células de la cresta migran para formar, melanocitos, ganglios sensoriales, neuronas simpáticas y entéricas, así como células de la medula suprarrenal (A la izquierda, modificado a partir de Sadler T.W, 2016. A la derecha, traducido al español de Hyttel P. et al; 2010).

### 1.1.5.3 Diferenciación del mesodermo

El mesodermo se diferencia en forma de láminas, proceso que también ocurre en la tercera semana de gestación.

Las células cercanas a la línea media proliferan dando origen a una placa llamada mesodermo paraxial. Lateralmente al mesodermo paraxial, el mesodermo no se engruesa y se llama placa lateral. El mesodermo lateral se diferencia según dos rutas: una capa que recubre al amnios en mesodermo somático o parietal y una capa que recubre al saco vitelino en mesodermo esplánico o visceral. Juntas revisten la cavidad intraembrionaria. Finalmente, el mesodermo que conecta al mesodermo paraxial con el lateral se denomina mesodermo intermedio (**Figura 11**).



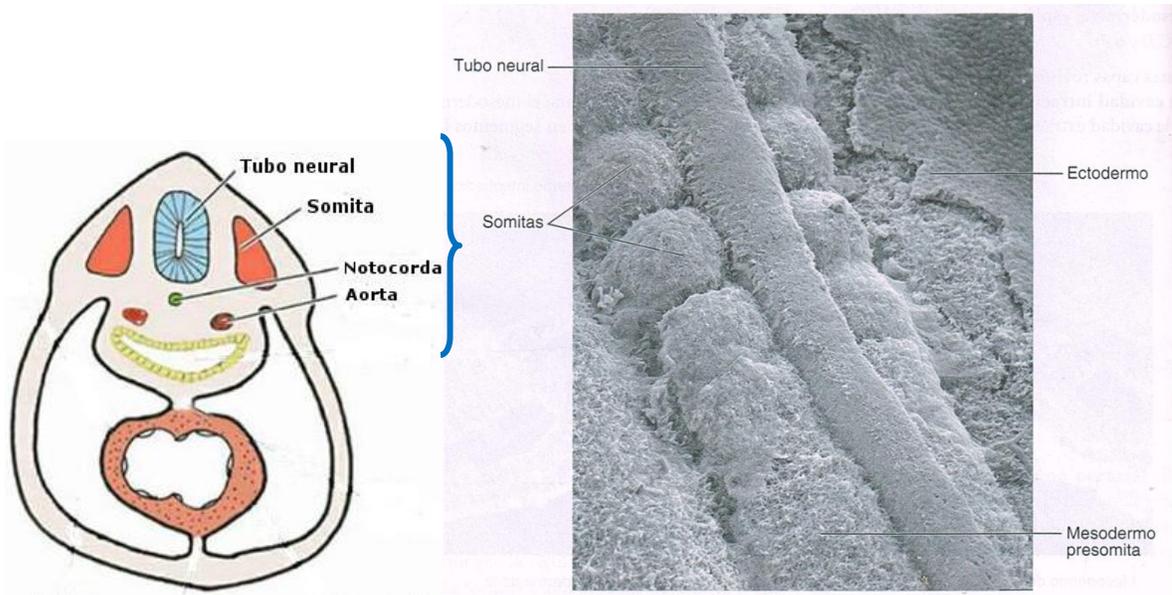
**Figura 11. Diferenciación del mesodermo.** A nivel medial las células mesodérmicas dan origen al mesodermo paraxial y lateralmente a la placa lateral. El mesodermo lateral, a su vez, se diferencia en mesodermo somático o parietal y mesodermo esplánico o visceral. Finalmente, el mesodermo que conecta al mesodermo paraxial con el lateral se denomina mesodermo intermedio (Sadler T.W, 2016).

El mesodermo paraxial se organiza en segmentos llamados somitómeros (**Figura 12**). Los somitómeros se desarrollan en dirección cefalocaudal. En la región cefálica los somitómeros se convierten en neurómeros, sin embargo, a partir de la región occipital y hacia caudal, los somitómeros se diferencian en somitas. <sup>(3)</sup>

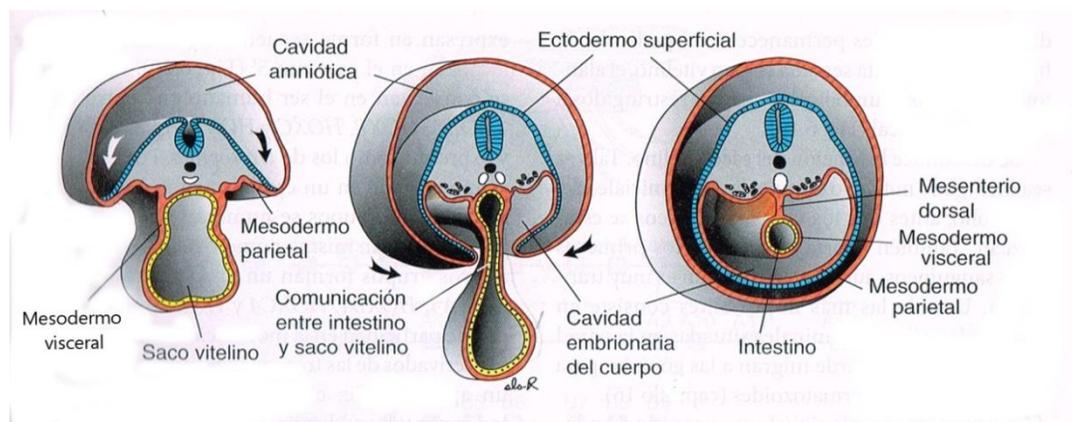
El mesodermo intermedio que conecta temporalmente el mesodermo paraxial a la placa lateral se diferencia en las estructuras urogenitales.

El mesodermo de la placa parietal junto con el ectodermo suprayacente crean los pliegues de la pared lateral de cuerpo (**Figura 13**), estos pliegues, junto con los cefálicos y caudales (véase diferenciación del ectodermo), cierran la pared ventral del cuerpo, luego, la misma capa parietal da origen a la dermis de la pared corporal, a los huesos, y al tejido conectivo de las extremidades. <sup>(3)</sup>

Por su parte, la capa visceral junto con el endodermo embrionario, produce la pared del tubo intestinal.



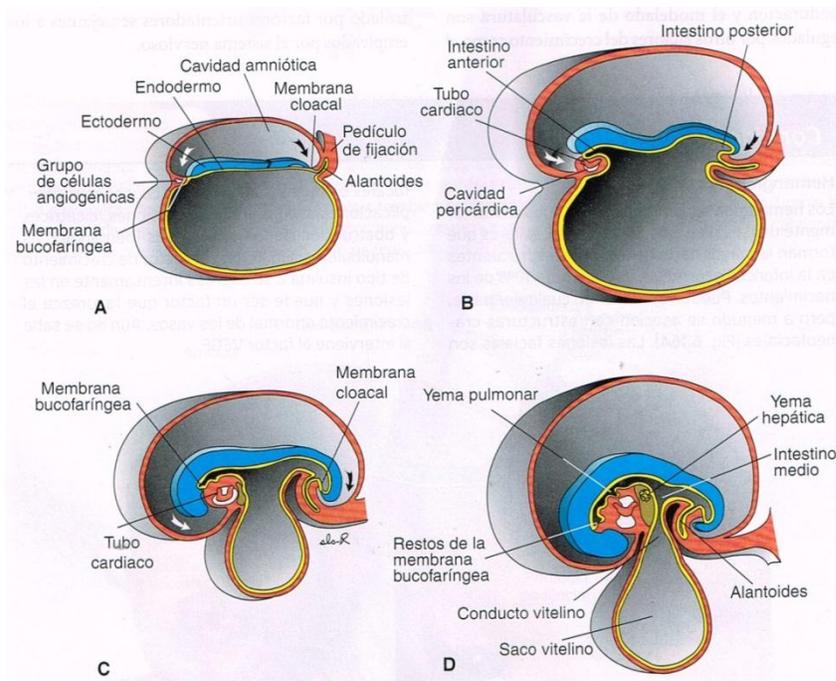
**Figura 12. Diferenciación del mesodermo paraxial.** El mesodermo paraxial se organiza en segmentos llamados somitómeros y los somitómeros se diferencian en somitas. Se muestra la ubicación en un corte transversal de los somitas, donde se puede observar que corren en pares y de forma paralela al tubo neural. (A la izquierda, modificado a partir de McGeady T.A 2017 Izquierda Sadler T.W, 2016).



**Figura 13. Pliegue lateral.** Secciones transversales a nivel del intestino que muestran cómo se cierra la pared abdominal (Sadler T.W, 2016).

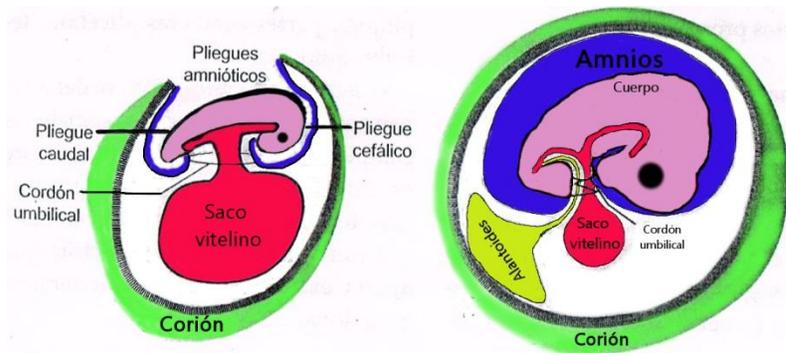
#### 1.1.5.4 Diferenciación del endodermo

El endodermo se ubica en la parte ventral del embrión, formando el techo del saco vitelino, sin embargo, con el alargamiento del tubo neural, la región cefálica y caudal del embrión se desplazan hacia ventral (plegamiento cefalocaudal. **Figura 14**), juntándose con los plegamientos laterales antes descritos (véase Diferenciación del mesodermo) cerrando la pared ventral del cuerpo, excepto en la región umbilical.<sup>(3)</sup>



**Figura 14. Plegamiento cefalocaudal.** Secciones sagitales que muestran cómo en conjunto con el plegamiento lateral, se logra el cierre de la pared ventral del cuerpo, este plegamiento logra también, la internalización de tubo cardiaco (Sadler T.W, 2016).

El plegamiento cefalocaudal, en ungulados, carnívoros y aves forma al amnios (**Figura 15**). El cierre corporal provoca, además, en todos los mamíferos, que el endodermo se incorpore al cuerpo del embrión formando el tubo intestinal, que el embrión ahora se ubique dentro de la cavidad amniótica y la incorporación parcial del alantoides al cuerpo del embrión donde forma la cloaca.<sup>(5)</sup>

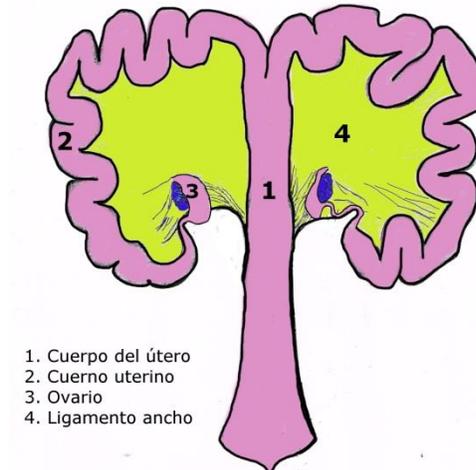


**Figura 15. Formación del amnios.** En ungulados, carnívoros y aves, el plegamiento cefalocaudal provoca la formación del amnios (Modificado a partir de García M. et.al; 2013).

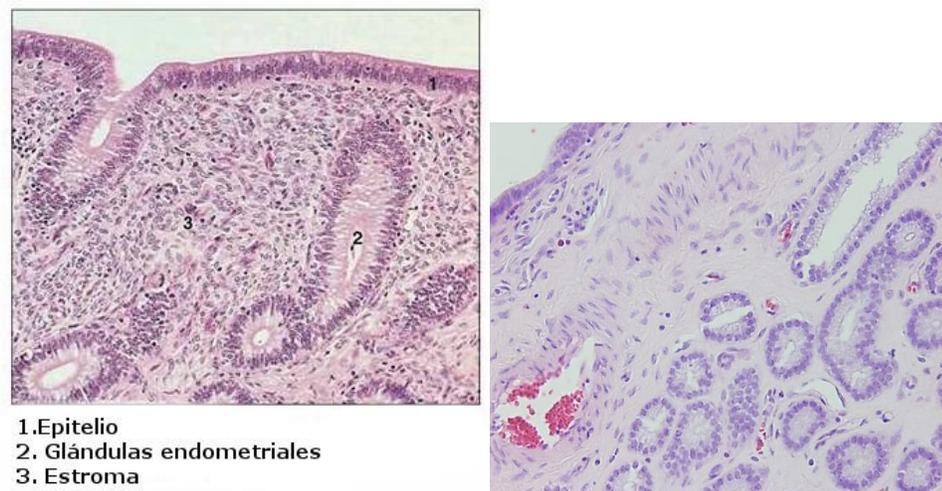
## 1.2 El tejido materno. Caso específico de la cerda doméstica (*Sus scrofa domesticus*)

Hasta ahora, se ha descrito el desarrollo del embrión, sin embargo, también es importante conocer cómo está constituido el tejido materno que establecerá una unión y comunicación con el embrión para constituir y mantener una gestación exitosa.

El útero, es sin duda, el órgano materno clave para el proceso de implantación, anatómicamente se pueden diferenciar dos segmentos: el cuerpo del útero y un par de cuernos uterinos. En la cerda doméstica, el cuerpo del útero es corto, aunque da la apariencia de ser más largo, sin embargo, esto no es más que el efecto de una proyección craneal dentro de un revestimiento común de músculo longitudinal de los cuernos uterinos. En la unión entre el cuerpo y cada uno de los cuernos uterinos podemos encontrar un esfínter, esta estructura funciona de tal manera que, cuando la entrada a un cuerno se cierra, se abre del otro; este mecanismo es crucial al momento del parto, pues de esta forma se regula la presentación de los fetos en la entrada pélvica, evitando el choque de lechones que se produciría si los dos cuernos se contraen al mismo tiempo. Sin embargo, este esfínter no impide que los embriones a su llegada desde la tuba uterina migren de un cuerno a otro.



**Figura 16. Útero de cerda.** En la cerda doméstica el cuerpo del útero es corto, mientras que los cuernos uterinos son muy largos y sinuosos que dan una apariencia de asas intestinales (Modificado a partir de Popesko P, et al; 2003).



**Figura 17. Endometrio. Izquierda:** El endometrio desde la luz uterina se compone de un epitelio de revestimiento, de una gruesa lamina propia submucosa (estroma) y entre estas dos capas podemos encontrar las glándulas endometriales (Traducido al español de Aughey E, et al, 2001). **Derecha:** Endometrio porcino 12 días ciclo estral (Tinción H-E 200X).

Por el contrario del cuerpo, los cuernos uterinos son muy largos (**Figura 16**). En estado no gestante alcanzan un metro de longitud, mientras que en estado gestante, pueden medir hasta dos metros de longitud, es por ello y a su naturaleza sinuosa que tienen un parecido con las asas del intestino delgado.<sup>(9)</sup>

Histológicamente, el útero consta, desde su luz, de una mucosa, una muscular y una serosa. A la mucosa se le denomina endometrio, a la muscular miometrio y a la serosa perimetrio. De las tres estructuras, el endometrio es el responsable de comenzar la interacción con el embrión.

El endometrio, en cerdas, se compone de un epitelio de revestimiento pseudoestratificado, y por debajo de este de una gruesa lamina propia submucosa de tejido conjuntivo laxo areolar. Al tejido conjuntivo también se le denomina estroma. Entre estas dos capas podemos encontrar las glándulas endometriales que histológicamente son glándulas tubulares simples (**Figura 17**). Estas glándulas se extienden hasta la profundidad del estroma donde terminan en un saco ciego cerca del miometrio y se abren directamente hacia la superficie mucosa.<sup>(12,13)</sup>

### **1.2.1 Requerimientos hormonales**

En cerdos, la hormona que soporta la implantación es la progesterona ( $P_4$ ) ovárica, ya que esta permite la producción de moléculas como citoquinas, factores de crecimiento, interferones, prostaglandinas, hormonas y otras moléculas que actúan en forma paracrina y autocrina durante la implantación. Los estrógenos ováricos en esta especie no son necesarios ya que desde la elongación de los embriones, el trofoblasto produce estrógenos ( $E_2$ ), en específico estradiol-17 $\beta$  en los días 11 y 12 y luego en los días 15 a 30 de gestación, estos estrógenos son los responsables del reconocimiento materno, pues, ocasionan que la prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) se secrete en la luz uterina en vez de la vasculatura uterina, previniendo la luteólisis. Además, estimulan al epitelio endometrial para incrementar la expresión de factores de crecimiento que estimularán al trofoblasto para el crecimiento y proliferación celular.<sup>(14,15)</sup>

### **1.3 Implantación de embriones de cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*)**

Una vez descrito como es que un embrión se va desarrollando al paso de los días y como están conformadas las estructuras maternas claves para el proceso de implantación, finalmente podemos crear una imagen más clara de dicho proceso,

es por ello, que a continuación se describirá de forma específica los requerimientos necesarios para establecer una comunicación materna embrionaria.

A nivel histológico, la implantación, puede dividirse en tres fases: aposición, adhesión y penetración.

La aposición, en roedores, comienza con la aparición de un edema generalizado en el tejido conjuntivo endometrial, luego, se cierra la luz uterina y se expresan microvellosidades en el trofoblasto del blastocito y el epitelio de revestimiento endometrial. Lo anterior lleva a un acercamiento entre el embrión y el tejido materno, dando inicio a la fase de adhesión.

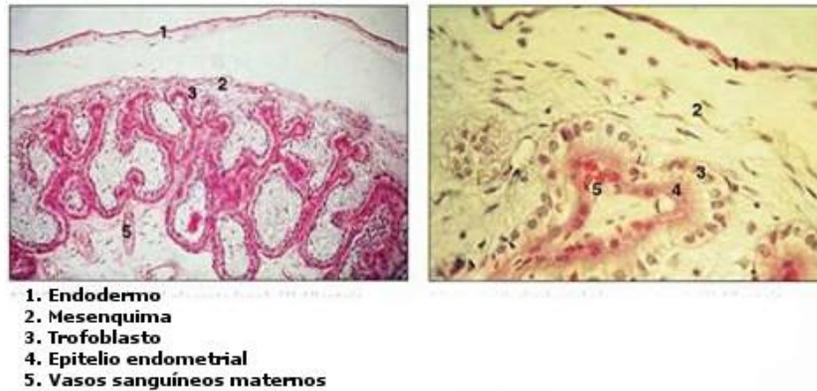
La adhesión embrionaria consiste en un incremento de la permeabilidad vascular uterina en el sitio donde se ubica el blastocito y en la interacción de heterodímeros de integrinas transmembranales que conectan la matriz extra celular (ECM) con la actina del citoesqueleto celular, por ejemplo, en cerdos, a través de la molécula SSP1, la subunidad de integrina  $\alpha v$  (ITGAV) y la subunidad  $\beta 6$  (IGTB6) forman el heterodímero ITGAV: IGTB6 que se localiza en el trofoblasto y que conecta con las subunidades ITGAV y  $\beta 3$  (IGTB3) en el epitelio uterino. La unión de integrinas forma una red de moléculas que sirven como medio de transporte de señales celulares, es decir, contribuyen a la comunicación entre células. En el cerdo, los primeros signos de adhesión ocurren en el día 13 y hasta el día 18 de gestación.<sup>(16)</sup>

La fase de penetración ocurre cuando el embrión invade el tejido conjuntivo materno, sin embargo, en cerdos esto no ocurre, pues, el tipo de implantación que se presenta es epiteliocorial.<sup>(14)</sup>

### **1.3.1 Placenta tipo epiteliocorial**

Cuando se establece una comunicación sanguínea entre la madre y el embrión, a nivel histológico se pueden apreciar varias capas celulares, las capas celulares del endometrio incluyen: el endotelio de los vasos uterinos, tejido conjuntivo del útero y el epitelio uterino, mientras que para la porción embrionaria desde su parte más

externa se encuentran: El epitelio del corión (trofoblasto), el mesodermo del alantocori6n (mes6nquima) y el endotelio de los vasos embrionarios. En una placenta epiteliorial no se conectan directamente los vasos sangu6neos embrionarios con los maternos destruyendo las capas restantes, al contrario, se mantienen integras todas las capas celulares, esto significa que solo existe un contacto entre el epitelio del 6tero y el epitelio embrionario (**Figura 18**).<sup>(5)</sup>



**Figura 18. Placenta epiteliorial.** En una placenta epiteliorial solo existe un contacto entre el epitelio del 6tero y el epitelio embrionario (Traducido al espa6ol de Aughey E, et al, 2001).

En la placenta tipo epiteliorial de los cerdos, en un desarrollo temprano, el trofoblasto y el epitelio de revestimiento materno que ya est6n en contacto est6n plegados y los capilares se encuentran en una ubicaci6n subepitelial, pero cuando la gestaci6n avanza el epitelio materno como el embrionario aumenta de volumen, las c6lulas columnares reducen su altura, los plegamientos se hacen m6s complejos y se interconectan, adem6s, los capilares endometriales y embrionarios en algunas zonas se proyectan hacia el epitelio (capilares intraepiteliales) y se desarrollan las areolas en el trofoblasto. Las areolas son 6reas en donde las c6lulas epiteliales son muy altas y est6n especializadas en la absorci6n de leche uterina, esto es muy importante, ya que las gl6ndulas endometriales secretan sus productos en el espacio entre el cori6n y el endometrio. No debemos olvidar, que en esta fase tambi6n los embriones de cerdo sufren una elongaci6n.<sup>(13)</sup>

### **1.3.2 Ventana de Implantación**

A nivel molecular para que ocurra una implantación exitosa, y como se ha mencionado, se requiere que el embrión liberado de la zona pelúcida y en fase de blastocito inicie una cascada de adhesión celular con el tejido uterino, sin embargo, todos los eventos que acontecen durante esta cascada deben ocurrir justo en un periodo llamado ventana de implantación, si durante este tiempo el embrión no puede establecer una comunicación con el endometrio, la implantación falla.

La ventana de implantación tiene como base la expresión de receptores para estrógenos y para progesterona a nivel endometrial.

En una cerda, tanto en un ciclo estral normal como en gestación, los receptores para estrógenos ESR1 se expresan en el tejido conjuntivo uterino y en el epitelio de revestimiento uterino en el día 1, pero para el día 5 y hasta el 15 cambian su expresión solo a las células epiteliales. A partir de los día 15 a 18 los ESR1 incrementan en el epitelio uterino en el ciclo estral pero no en gestación.

El epitelio y tejido conjuntivo endometrial también expresan receptores para progesterona PGR entre el día 0 y 5 del ciclo estral y gestación, luego, entre los días 10 a 18 solo se expresan en el tejido conjuntivo.

La expresión de PGR solo en el tejido conjuntivo se asocia con la disminución de la molécula antiadhesión mucina 1 (MUC1) tanto en el epitelio de revestimiento como en el epitelio glandular endometrial, esto descubre moléculas como las selectinas o galactinas que inician con la adhesión embrionaria para después ser sustituidas por la interacción de integrinas. Además, el cese de receptores para progesterona en el epitelio, también permite a la P<sub>4</sub> vía PGR en tejido conjuntivo incrementar la expresión de progestamedinas como el factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF-7) y 10 (FGF10) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en la oveja y FGF, HGF y ácido retinoico en primates. Estas moléculas junto con la expresión de los receptores FGFR2IIIb para FGF-7 y FGF10 y c-MET para HGF ejercen efectos paracrinós en el epitelio endometrial y en el trofoblasto.<sup>(16)</sup>

### **1.3.3 Cascada de implantación**

Como su nombre lo indica, la cascada de implantación embrionaria es un proceso fisiológico complejo estructurado por numerosas interacciones moleculares en forma de red, esto quiere decir que cada molécula involucrada puede estar interactuando con dos o más moléculas distintas al mismo o en diferente tiempo.

Diferentes factores de crecimiento, interleucinas, interferones y moléculas de adhesión interactúan entre sí para establecer la implantación embrionaria, por ejemplo, en cerdos, la Interleucina 1 $\beta$ 2 (IL-1 $\beta$ 2) se secreta solo en los días 10 y 12 de la gestación y se ha postulado como un mediador de la inflamación en el endometrio que permite la expresión de moléculas como : Factor de crecimiento insulínico (IGF), Factor de crecimiento epidermal (EGF), Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG), Factor de crecimiento transformante (TGF), Factor de inhibición a leucemia (LIF), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Factor de crecimiento hepático (HGF) e interferones (INF), cada uno involucrado durante la implantación. Entonces, si existen un número considerable de moléculas que actúan para establecer la interacción materna embrionaria, ¿Cuál es la importancia del FGF y del HGF? <sup>(11,17)</sup>

### **1.4 Importancia del FGF y del HGF en la cascada de implantación**

La familia de proteínas del Factor de Crecimiento de Fibroblastos cuenta con 23 miembros y dos clases de receptores, los de alta afinidad (FGFR 1-4) y los de baja afinidad (heparina) que juntos suman siete diferentes receptores (FGFR).

Los FGFR cuentan con una región extracelular de unión con tres dominios tipo inmunoglobulinas (Ig I, II, III) y un dominio intracelular tirosina quinasa. Los receptores FGFR1, FGFR2 y FGFR3 pueden, en su dominio tipo IgIII variar de secuencia de aminoácidos dando como resultado las siguientes combinaciones:

- FGFRIIIa, FGFR2IIIa, FGFR3IIIa
- FGFRIIIb, FGFR2IIIb, FGFR3IIIb
- FGFRIIIc, FGFR2IIIc, FGFR3IIIc

Esta mezcla de secuencia de aminoácidos le proporciona al receptor diferentes propiedades de afinidad, así, por ejemplo, el FGF7 tiene la mayor afinidad con el receptor FGFR2IIIb.<sup>(18)</sup>

Los FGF se ven involucrados en la síntesis de ácidos biliares, glucosa, colesterol y vitamina D, así como en la señalización de la homeostasis de lípidos y del metabolismo del fosfato. En la embriogénesis de vertebrados, los FGF además de regular la implantación, señalizan: la especificación del trofoblasto y endodermo, el mantenimiento del trofoblasto, la migración de células ectodérmicas durante la gastrulación para la formación del mesodermo, la diferenciación del mesodermo a mesodermo paraxial y la formación del neuroectodermo.<sup>(19,20)</sup>

El Factor de Crecimiento Hepático es una proteína ligando de heparina que se produce de forma inactiva, pero que al ser activada toma la forma de un heterodímero capaz de unirse a enlaces disulfuro. El receptor del HGF se denomina c-MET y al igual que el FGFR es de tipo tirosina cinasa.<sup>(18)</sup>

El mecanismo de acción del HGF es mitogénesis, angiogénesis, morfogénesis, aumento de la motilidad celular y antiapoptosis, principalmente en células epiteliales, así como en diferentes tejidos en el desarrollo embrionario (hígado, riñón, pulmón, glándula mamaria, músculo y tejido neuronal). También es un factor organótrofico en la regeneración y protección del hígado, riñón, estómago, páncreas, corazón y cerebro.<sup>(21)</sup>

Como se ha mencionado, la nula presencia de receptores para progesterona en el epitelio de revestimiento endometrial, la presencia de interleucina 1 $\beta$  y la secreción de E<sub>2</sub> embrionario favorecen la expresión de progestamedinas como FGF7, FGF10 y HGF que ejerce efectos paracrinos. Esto mismo ocurre en ovejas, cerdos, monos Rhesus y la mujer (**Figura 19**).

En cerdos, la expresión de FGF7 ocurre entre los días 12 y 15 tanto del ciclo estral como de la gestación por las células del epitelio de revestimiento, mientras que su receptor FGFR2IIIb se expresa tanto en el epitelio de revestimiento como en el trofoblasto, por lo tanto, FGF7 es un factor que regula la proliferación celular tanto

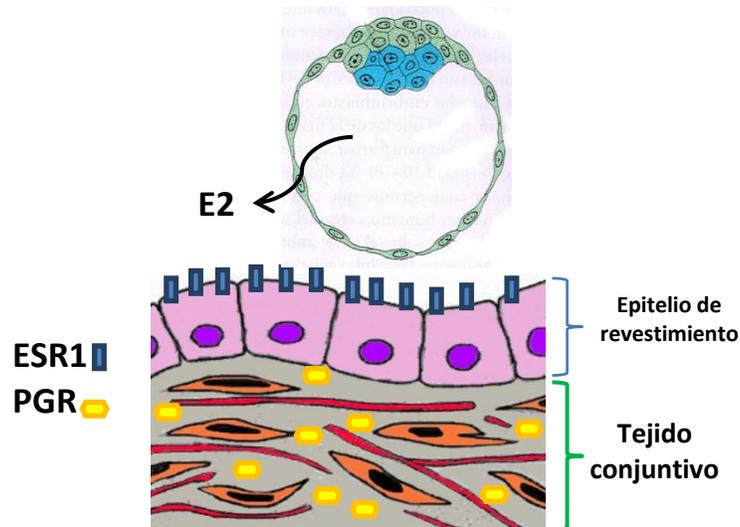
endometrial como trofoblástica. También puede participar en la protección del trofoblasto al estrés oxidativo y apoptosis.<sup>(22)</sup>

A partir del día 20 de la gestación el FGF7 se expresa en el epitelio glandular en respuesta de P<sub>4</sub> y se presume que continua estimulando al epitelio uterino y el desarrollo del embrión.<sup>(11,16)</sup>

Otro FGF que se ha descrito como participante en la gestación temprana es el FGF4 que ha sido ampliamente estudiado en embriones de ratón y es el responsable del mantenimiento de las células madre del trofoblasto, además, en embriones de bovino cultivados *in vitro*, adicionar al diluyente FGF4 combinado con FGF2 ayuda al desarrollo y mantenimiento del blastocito para su posterior transferencia. En el cerdo el FGF4 se expresa en el embrión de 10 a 12 días de edad en el trofoblasto y en el mesodermo extraembrionario.<sup>(22,23)</sup>

En cerdos y bovinos la dosificación de FGF10 *in vitro* mejora la maduración de los ovocitos, la expresión de genes, la organización de la cromatina y del huso y aumenta el número de células del cúmulus, mientras que disminuye el porcentaje de ovocitos apoptóticos.<sup>(24,25)</sup>

Por su parte, el HGF y su receptor (c-MET) en el ovino, se expresan también durante el ciclo estral y gestación. El HGF es expresado por las células del tejido conjuntivo endometrial mientras que el mRNA de su receptor c-MET se localiza exclusivamente en el epitelio de revestimiento y glandular endometrial, esta localización indica que el HGF puede estimular la morfogénesis y diferenciación epitelial requeridas para el establecimiento y mantenimiento de la gestación.<sup>(16)</sup>



**Figura 19. Condiciones para la expresión de progestamedinas.** Para que se puedan expresar moléculas como FGF y HGF, se requiere que los receptores PGR se expresen de forma exclusiva en tejido conjuntivo y una producción de E2 embrionario.

#### 1.4.1 Receptores tipo tirosina cinasa (RTK)

Tanto el receptor para FGF10 como para el HGF son de tipo tirosina cinasa (RTK). La unión de un ligando, en este caso el FGF o el HGF a un receptor RTK provoca que las cadenas de dicho receptor dimericen, juntando entre sí los dominios cinasa de dos receptores fosforilandose de forma cruzada sobre varias tirosinas, a esto se le denomina transfosforilación. La fosforilación de residuos de tirosina genera lugares de unión de alta afinidad para proteínas señalizadoras intracelulares a través de interacciones proteína-proteína dependientes de dominios de interacción modular. Algunas de estas proteínas son enzimas, como la fosfolipasa C (PLC) que aumenta los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólicos, o la tirosina citoplasmática Src que fosforila tirosinas de otras proteínas señalizadoras, o la fosfatidil inositol 3´cinasa que fosforila lípidos.

##### 1.4.1.1 Proteínas señalizadoras intracelulares Src

Las proteínas señalizadoras intracelulares Src se unen a residuos de fosfotirosina tanto de RTK como de otras proteínas de unión. Por lo general comparten dominios de unión a fosfotirosinas altamente conservados llamados dominios SH2, PTB o SH3. Algunas proteínas señalizadoras están formadas casi completamente por dominios SH2 y SH3 y actúan como adaptadoras, acoplando

proteínas fosforiladas en tirosina con otras proteínas que no tienen sus propios dominios SH2, como la proteína adaptadora Grb2 en la señalización del FGF. La proteína adaptadora Grb2 a través de su unión a otra proteína denominada Sos ayuda a acoplar a los RTK activados a una proteína señalizadora muy importante, denominada Ras.

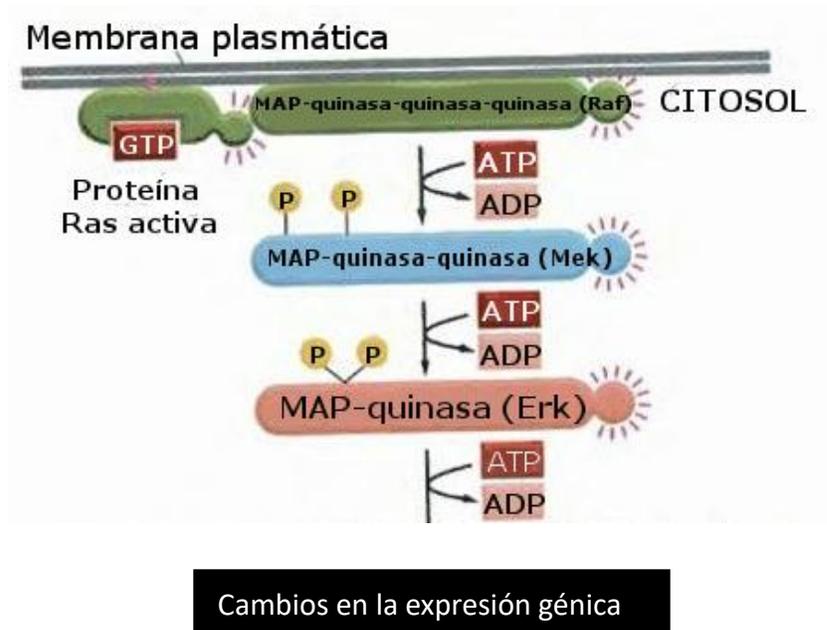
La superfamilia de proteínas Ras incluye a las proteínas Ras y Rho, que dentro de la familia, son las únicas que transmiten señales a partir de receptores de superficie celular y funcionan como centro de señalización.

Una Ras activada, se une a una proteína de señalización denominada Raf que a su vez, activa el módulo de proteína quinasa activada por mitogéno (módulo MAP-quinasa), este módulo sufre dos fosforilaciones para finalmente formar a la MAP quinasa (MAPK), la MAPK viajará al núcleo donde modula el patrón de la expresión génica, por ejemplo, estimula a los genes que codifican a las ciclinas G1, que tienen un papel importante en la proliferación celular (**Figura 20**).

La familia Rho tienen como objetivo regular los citoesqueletos de actina y los microtúbulos controlando la polaridad, la motilidad y la adhesión celular.<sup>(26,27)</sup>

En conclusión, la pérdida de embriones ocurre de forma importante durante la gestación temprana, es por ello que conocer las señalizaciones moleculares antes y durante la implantación, así como las consecuencias de la falla o ausencia de estas es de suma importancia, esto incluye a los factores de crecimiento. Como ejemplo se expone al FGF10 y al HGF que han sido teorizados o bien, localizados durante la implantación en otras especies pero sin conocer de forma específica su función, sin embargo, la existencia de estas moléculas desde los primeros días de gestación supone que participan en el desarrollo y establecimiento temprano de los embriones en el útero materno, esto incluye a los blastocitos de cerdo. El conocimiento a detalle de las señales moleculares por factores de crecimiento, podrá mejorar el entendimiento de cuál es el ambiente idóneo *in vivo* para los embriones y así diseñar mejores condiciones *in vitro* que ayudarán al

mejoramiento de técnicas de reproducción asistida como la fertilización *in vitro* o la transferencia de embriones.



**Figura 20. Módulo de proteína quinasa activada por mitogéno (módulo MAP quinasa).** El módulo MAP quinasa viaja al núcleo donde, por ejemplo, modulará la expresión génica. MAP quinasa es activada por la proteína Ras, que a su vez fue activada por la unión de FGF o HGF a su receptor tipo RTK en la superficie celular (Modificado a partir de Alberts B. et.al; 2010).

## **2. HIPÓTESIS**

El FGF10 y el HGF están presentes durante la implantación temprana (11 a 20 días de gestación), por lo que su producción se encontrará en las células endometriales maternas de la cerda.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la inmunolocalización de los factores de crecimiento FGF10 y HGF en las células del endometrio durante la implantación temprana en la cerda doméstica (*Sus scrofa domesticus*).

### **3.1 Objetivos específicos**

- Determinar la inmunolocalización de los factores de crecimiento FGF10 y HGF en las células del endometrio durante el ciclo estral.
- Describir si la inmunolocalización del FGF10 y HGF es diferente en las distintas estructuras histológicas uterinas durante la implantación temprana (11 a 20 días de gestación) y el ciclo estral.
- Describir si hay cambios histológicos en el tejido uterino conforme avanza el ciclo estral y la implantación temprana (11 a 20 días de gestación).

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 Muestras**

El experimento se realizó con el apoyo del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO) UNAM y del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Muestras de útero provenientes de animales gestantes en los días: 12 (D12), 16 (D16) y 18 (D18) y muestras de útero de animales en los días 12, 17 y 21 del ciclo estral fueron colectados de la siguiente manera:

Se seleccionaron dos cerdas nulíparas por cada día a analizar de raza York/Landrace propiedad del CEIEPP con las siguientes características: que hubieran presentado su primer estro a partir de los 6 meses de edad alcanzando un peso vivo de 60 kg como mínimo; se observó la manifestación de los dos estros subsecuentes como indicativos de un buen estado reproductivo. Para la detección del estro se utilizó un macho celador. Una vez que se comprobó que todas las hembras presentan ciclos estrales regulares fueron sometidas a un tratamiento de sincronización con un progestágeno de origen sintético (Altrenogest- Regumate®) a una dosis de 20 mg cada 24 horas durante 18 días.

Una vez concluido el tratamiento de sincronización, se diagnosticó el estro y se realizó la inseminación artificial transcervical a tiempo fijo, fijando como requisito un peso vivo aproximado de 90 kg. Se utilizaron 3 dosis de semen fresco (propiedad del CEIEPP) previamente evaluado a una concentración de 300 millones de espermatozoides, las cuales se aplicaron a las cero, a las doce y a las 24 horas después de iniciada la presentación el estro. El día de la primera inseminación se contó como día cero.

Una vez cumplidos los días de gestación y del ciclo estral antes descritos (D12, D18 y D22 de gestación y D12, D17 y D21 del ciclo estral) los animales fueron

enviados a rastro y se colectó el tracto reproductivo completo, el cual fue llevado al laboratorio.

En el laboratorio se eligió la tuba uterina destinada para tratamiento de fijación con Paraformaldehído 4% (PFA 4%) y se procedió a separarla del resto de las estructuras a través de un corte lo más cercano posible a la inserción del cuerno uterino con el cuerpo del útero (**Figura 21**). Para este proyecto, se prefirió la tuba uterina del lado más desarrollado en comparación con la otra, esto con el propósito de encontrar el mayor número de embriones posibles.



**Figura 21.** Útero de cerdo, 12 días de gestación. Se muestra el área de corte del cuerno uterino.

El siguiente paso, fue la resección del ligamento ancho tratando de no involucrar vasos sanguíneos que contaminaran el tejido con sangre (**Figura 22**).

Para las cerdas con una gestación de 12 días, y una vez disecado el tejido, se realizó un lavado pasando a través de la luz de la tuba uterina un aproximado de 100 mL de Amortiguador Fosfato Salino (PBS), con el objetivo de recolectar los embriones que se encontraran flotando y así, confirmar la gestación (**Figura 22**). Una vez colectados los embriones se abrieron las tubas uterinas longitudinalmente, siguiendo una línea por el lado contrario de la inserción del ligamento ancho, es decir, antimesometrialmente, de tal manera que no se dañó al corte la zona de implantación embrionaria (**Figura 23**).<sup>(28)</sup>

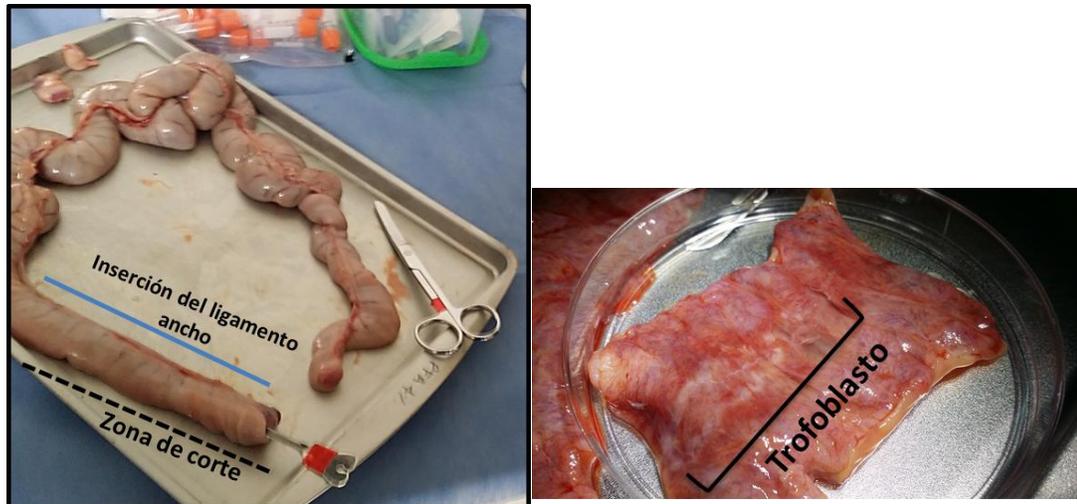


**Figura 22. Derecha:** Corte del ligamento ancho. **Izquierdo:** Lavado uterino con PBS utilizado para coleccionar embriones de 12 días de gestación.

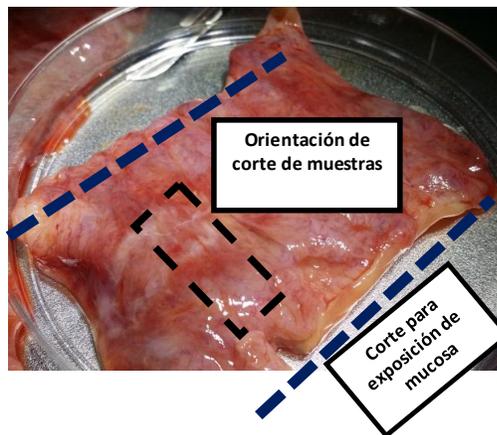
A los úteros provenientes de cerdas con gestaciones de 16 y 18 días no se les realizó un lavado uterino, en cambio, una vez expuesta la mucosa con la técnica antes descrita (**Figura 23**) se observó la existencia de embriones. Debido al estado de desarrollo de estos, son claramente visibles, en específico, el trofoblasto, que se pudo identificar como estructuras alargadas de color blanquecino (**Figura 23**).

Igualmente, para las tubas uterinas de cerdas con 12, 17 y 21 días de ciclo estral se expuso la mucosa con la técnica mostrada en la **Figura 23** sin realizar lavado.

Una vez expuesta la mucosa uterina, se coleccionaron muestras de tejido que involucraran mucosa y muscular, en forma rectangular, de aproximadamente 1cm de ancho por 2 cm de largo, de tal forma que las fibras musculares se presentaran perpendicularmente al lado más largo del rectángulo (**Figura 24**).

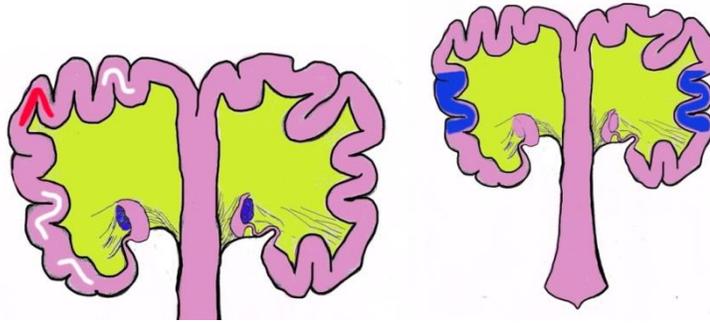


**Figura 23. Izquierda:** Tuba uterina sin ligamento ancho, mostrando la ubicación de este y la zona de corte correcta para la exposición de la mucosa endometrial y los embriones. **Derecha:** Corte de tejido uterino con un desarrollo de 18 días de gestación mostrando la posición del trofoblasto que indica la presencia de un embrión.



**Figura 24.** Ejemplo de orientación del corte que involucra trofoblasto, mucosa y muscular.

En los úteros procedentes de cerdas de 12 días de gestación con colección embrionaria previa y de cerdas sin gestación (ciclo estral) se colectó la parte central del tejido (**Figura 25**). Para el caso de cerdas con 16 y 18 días de gestación se colectó en donde fue evidente el desarrollo de los embriones, de tal manera que, el muestreo involucró embrión y/o trofoblasto, endometrio y miometrio (**Figura 24**). Se colectaron alrededor de 10 secciones por cuerno uterino.



**Figura 25. Izquierda:** Mapeo de embriones para los días 16 y 18 de gestación, las muestras utilizadas fueron las centrales, que se muestran en color rojo, mientras que los embriones de color blanco no se utilizaron. **Derecha:** En color azul se muestra la zona de muestreo para tejido con 12 días de gestación y sin gestación.

## 4.2 Procesamiento de muestras de tejido

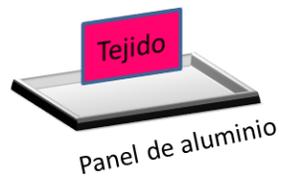
Las muestras de tejido que se usaron como controles positivos (riñón humano, riñón de rata y riñón de cerdo), así como las secciones de útero fueron fijadas con PFA 4% en tubos cónicos de 50 mL por 24 horas a 4°C. En el caso del útero, se apoyó la parte muscular del tejido sobre la pared de un abatelenguas con el objetivo de mantener el endometrio lo más extendido posible. Una vez terminado el tiempo de fijación, cada tejido se lavó con PBS, solución en que cada muestra permaneció por lo menos 24 horas a 4°C, hasta su inclusión en el procesador de tejidos (histoquinette).<sup>(29)</sup>

Para la inclusión en parafina cada muestra de tejido se colocó en cápsulas de inclusión, y se ingresaron al histoquinette con el siguiente programa: deshidratación de tejidos en concentraciones de etanol de 70%, 80%, 96% y 100% por 2 horas en cada uno. Posteriormente, las muestras fueron clareadas en una solución de 50%:50% xilol/etanol y 100% xilol por dos horas en cada una, seguido de dos baños de parafina a 56°C-63°C por dos horas.

Al término del programa del histoquinette, los tejidos fueron extraídos de las cápsulas y se montaron sobre paneles de aluminio (**Figura 26**). Con ayuda del centro de inclusión de tejidos se formaron bloques de parafina. Finalmente, cada bloque, con un tejido inmerso, fue cortado con un micrótopo en secciones de 5

micras de grosor. Cada corte fue extendido en un baño de flotación de agua destilada a 45°- 52°C y montados en laminillas gelatinizadas.

Para cada día del ciclo estral y de la gestación, así como para los controles positivos, se utilizaron 10 cortes de tejido por cada factor de crecimiento a analizar. En el caso del tejido uterino y para este proyecto se eligió la muestra colectada en la parte central del cuerno uterino para todos los días del ciclo estral y gestación analizados (**Figura 25**). Asimismo, por la posición en la que las muestras fueron procesadas, en el corte histológico resultante se pudo observar las capas muscular, mucosa y, según el caso, trofoblasto.



**Figura 26.** Posición del tejido para inclusión en bloques de parafina.

#### **4.2.1 Tinción Hematoxilina-Eosina**

Previo a la realización de la técnica de inmunohistoquímica se realizaron tinciones con Hematoxilina-Eosina (H-E) para visualizar los posibles cambios histológicos en cada día de gestación o del ciclo estral estudiados.

Las secciones fueron desparafinizadas con xilol al 100% y rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%) por 4 minutos en cada solución (Apéndice). Posteriormente, se lavaron con H<sub>2</sub>O y se realizó la tinción H-E (Apéndice) (**Figura 27**).



**Figura 27.** Tren de reactivos para desparafinización de laminillas previo a la tinción H-E. Se muestran las laminillas dentro de una caja coplin de vidrio.

#### **4.2.2 Técnica de inmunohistoquímica**

El protocolo de inmunohistoquímica utilizado fue de tipo indirecto, basado en los métodos de Nagy (2003).

Se probaron distintas diluciones para el anticuerpo primario en un rango desde 1/250 hasta 1/50, siendo esta última (la más concentrada) la que rindió los mejores resultados en el tejido de cerdo.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- 1.- Desparafinización. Las secciones fueron desparafinizadas exponiéndolas a 60°C por 30 minutos y posteriormente a xilol 100% y xilol-OH. Además, se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%), dejándolas durante 5 minutos en cada solución (Apéndice).
- 2.- Exposición de epítopes. Se realizó con el amortiguador citrato de sodio al 0.01M utilizando una olla de presión para microondas (**Figura 28**).



**Figura 28.** **Izquierda:** Olla a presión para microondas utilizada junto con la solución de citratos durante la exposición de los epítipes. **Derecha:** Se muestra las laminillas aun expuestas en el citrato dentro de una caja coplin de plástico dentro de agua con hielo.

3.- Posteriormente se hidrató cada sección delimitada previamente con lápiz hidrofóbico (Pap pen) utilizando H<sub>2</sub>O y PBS por 5 minutos (**Figura 29**).



**Figura 29.** Se muestran las laminillas con las secciones de tejido delimitadas y que serán expuestas a PBS y al resto de elementos que componen la técnica de inmunohistoquímica.

4.- Preparación de la solución de bloqueo. La solución de bloqueo está compuesta por Albúmina de suero Bovino (BSA) (Euro Clone®, Albumin Fraction V EMR086050) al 10%, más Suero de Burro (Jackson Immuno Research® Normal Donkey Serum 017-000-121) en una dilución 1/10. La solución final tuvo una proporción 1:1 usando como diluyente PBS-Tween para ambos reactivos (Apéndice). La incubación fue por 2 horas en cámara húmeda (**Figura 30**).



**Figura 30.** Posición de las laminillas dentro de la cámara húmeda. En el fondo de la cámara se deposita agua destilada.

5.- Incubación con Anticuerpo primario (Ab 1<sup>o</sup>), FGF10 y HGF (Anti-HGF antibody Abcam® ab24865/ anti-FGF-10 antibody MyBiosource® MBS551017) diluidos 1/50 en la solución de bloqueo. La incubación fue por 24 horas a 4°C y 24 horas a temperatura ambiente.

6.- El siguiente paso fue realizar dos lavados de 5 minutos con PBS y dos lavados de 5 minutos con PBS-Tween.

7.- Incubación con el anticuerpo secundario (Ab 2<sup>o</sup>) a una concentración de 1/200 usando como diluyente PBS-Tween. Ambos Ab 1<sup>o</sup> son anti-Rabbit, por lo que el Ab 2<sup>o</sup> a usar fue Anti Rabbit biotinilado (Vector Laboratories ® BA-1000). La incubación fue por 2 horas.

8.- Lavado de cada sección de tejido 3 veces con PBS-Tween por 5 minutos.

9.- Incubación con Avidina-Biotina (AB) (Vector Laboratories® PK-6100). El complejo AB se preparó con una hora de anticipación bajo la siguiente proporción: para 1 mL en PBS-Tween: 2.5 µL de A y 2.5 µL de B. Dejar incubar por 1 hora a temperatura ambiente.

10.- Cada sección de tejido fue lavada 3 veces con PBS-Tween por 5 minutos.

11.- Revelado con Diaminobencidina (DAB) (Apéndice) **(Figura 31)**.



**Figura 31.** Reacción y tinción resultante de la exposición de los tejidos al revelado por DAB

12.- Tinción de contraste (H-E) (Apéndice) **(Figura 32).**<sup>18</sup>



**Figura 32.** Laminillas a las que se les ha realizado la tinción de contraste y que son expuestas a xilol.

Con la finalidad de evaluar la especificidad del anticuerpo secundario, el primer anticuerpo fue sustituido por suero de conejo y la incubación de IgG en sustitución de anticuerpo primario.

**Cuadro 1.-** Anticuerpos y concentraciones utilizadas

	Marca- Catálogo- Concentración	Concentración por sección
<b>Anticuerpo primario</b>		
<b>Factor de crecimiento de fibroblastos 10</b>	MyBiosource®MBS551017 200µg/mL	1:50
<b>Factor de crecimiento de hepatocitos</b>	Abcam ® ab24865 200µg/mL	1:50
<b>Anticuerpo secundario</b>		
<b>Anti Rabbit biotinilado</b>	Vector Laboratories ® BA-1000 1.5mg/mL	1:200

### **4.3 Estandarización de anticuerpos primarios y controles positivos**

Previo a la realización de la inmunohistoquímica, en el tejido uterino se verificó que los anticuerpos elegidos funcionaran correctamente a través de controles positivos dirigidos al anticuerpo primario.

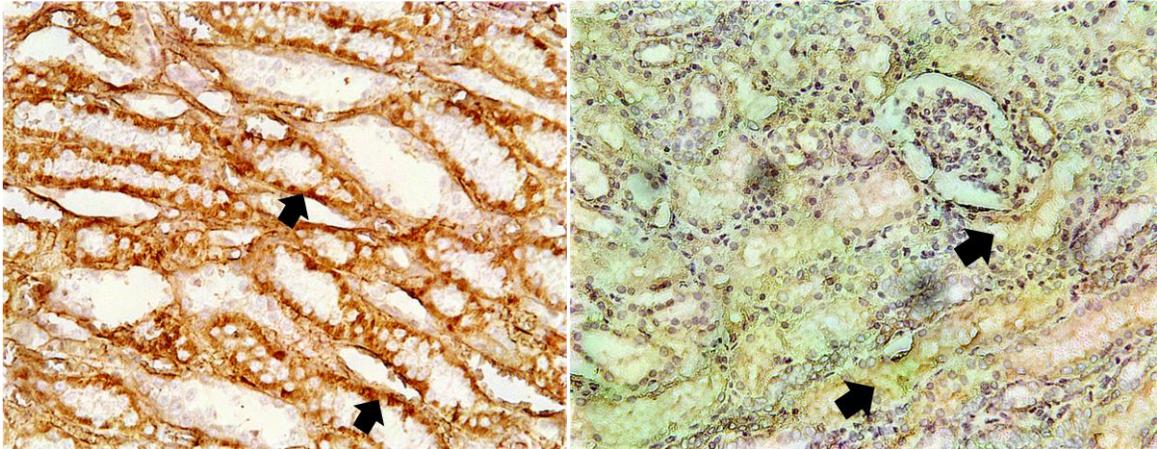
#### **4.3.1 Estandarización para el anticuerpo de FGF10**

El tejido control positivo utilizado para asegurar que el anticuerpo para FGF10 funcionaba correctamente fue riñón, esto de acuerdo a la ficha técnica del propio anticuerpo y a la literatura, que comprueba su presencia en dichos tejidos.<sup>(30,31)</sup>

Con base en el control negativo que se muestra en la **Figura 33**, el tejido de riñón de rata mostró una señal positiva de tipo citoplasmática para el anticuerpo FGF10 ubicada en la zona de los túbulos colectores (**Figura 34**). Una vez comprobada la presencia de FGF10 en riñón de rata, se procedió a realizar el mismo procedimiento pero en un corte de riñón de cerdo, con señal positiva en zona de túbulos colectores (**Figura 34**). Con ello, también se comprobó que el anticuerpo para FGF10 a utilizar funcionaba en tejido porcino sin problemas, sin embargo, la intensidad del color de la señal es menor.



**Figura 33.** Control negativo corte de riñón de rata 10X.



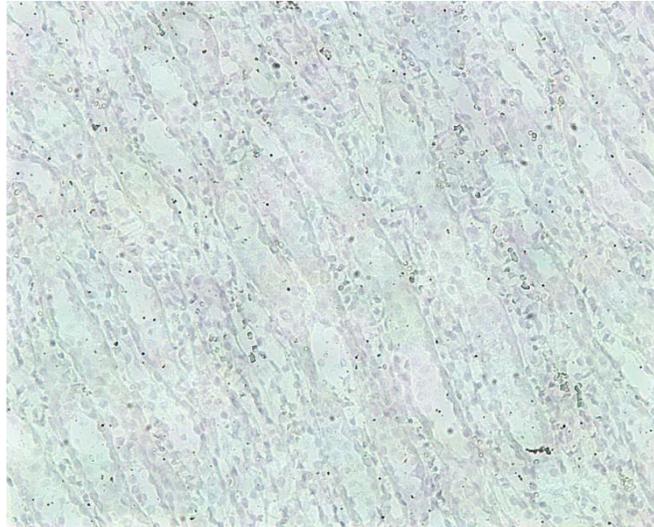
**Figura 34.** **Izquierda:** Fotomicrografía de corte de riñón de rata 20X por inmunohistoquímica para la localización de FGF 10 con señal positiva ubicada en la zona de los túbulos colectores (Flechas). **Derecha:** Fotomicrografía de corte de riñón de cerdo 20X con señal positiva en zona de túbulos colectores (Flechas).

#### 4.3.2 Estandarización para el anticuerpo de HGF

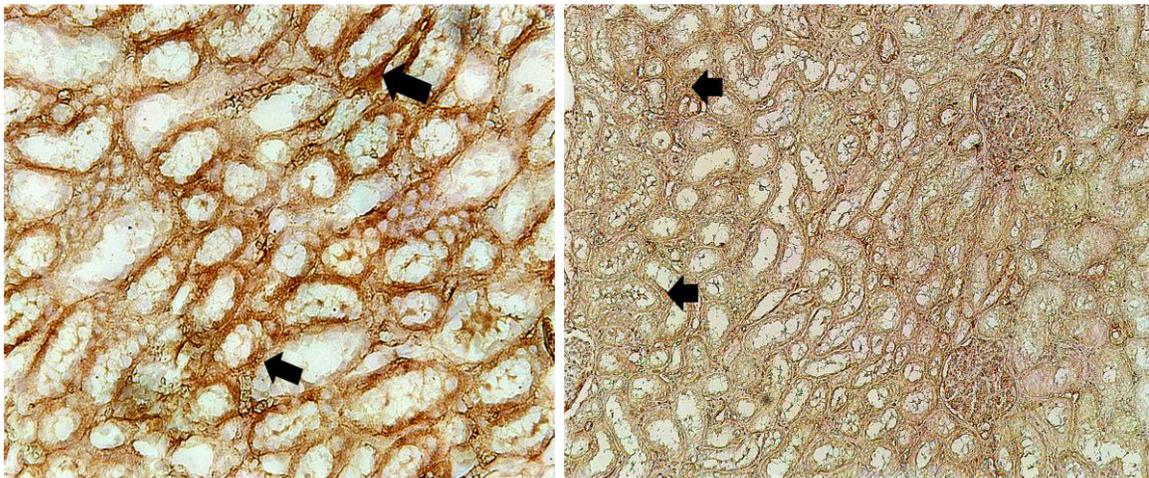
El tejido control positivo utilizado para asegurar que el anticuerpo para HGF funcionaba correctamente fue riñón, esto de acuerdo a la literatura que comprueba su presencia en el tejido. <sup>(30,32)</sup>

Con base en el control negativo que se muestra en la **Figura 35**, el tejido de riñón de rata mostró una señal positiva de tipo citoplasmática para el anticuerpo HGF ubicada en la zona de los túbulos colectores (**Figura 36**). Una vez comprobada la presencia de HGF en riñón de rata, se procedió a realizar el mismo procedimiento

pero en un corte de riñón de cerdo, con señal positiva en zona de túbulo colectores (**Figura 36**). Con ello, también se comprobó que el anticuerpo para HGF a utilizar funcionaba en tejido porcino sin problemas.



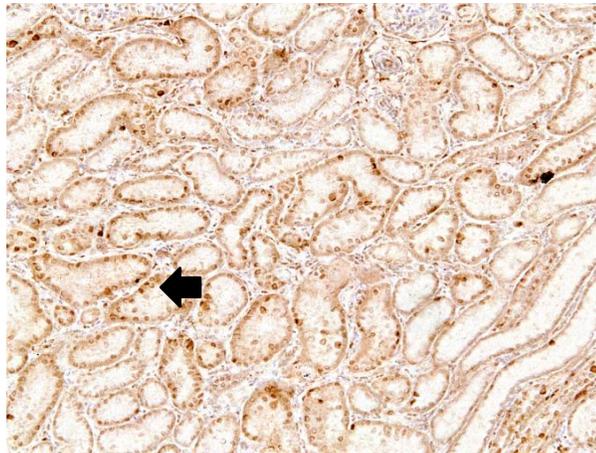
**Figura 35.** Control negativo corte de riñón de rata 10X



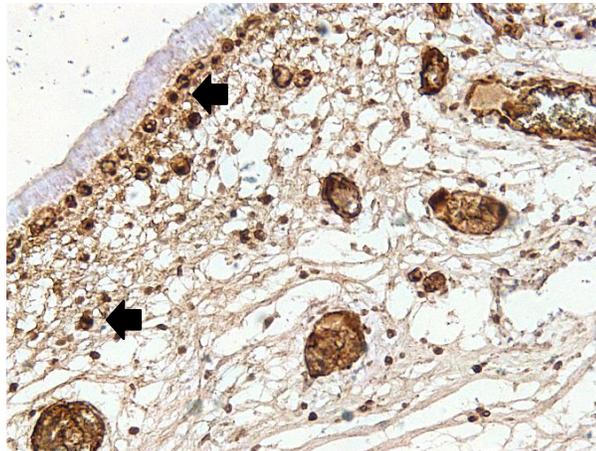
**Figura 36. Izquierda:** Fotomicrografía de corte riñón de rata 20X al que se le aplicó la técnica de inmunohistoquímica para la localización de HGF con señal positiva ubicada en la zona de los túbulo colectores (Flechas). **Derecha:** Fotomicrografía de corte de riñón de cerdo 10X con señal positiva en zona de túbulo colectores (Flechas).

### 4.3.3 Controles positivos

Una vez comprobado que los anticuerpos primarios funcionaban correctamente, se comprobó que el tejido uterino a analizar presentará un buen estado funcional para la correcta ejecución de la inmunohistoquímica, para ello, se utilizó como anticuerpo primario al antígeno nuclear de células en proliferación PCNA, tanto en el tejido uterino (**Figura 38**) como en el tejido control positivo (riñón de cerdo **Figura 37**) a su vez, este anticuerpo se utilizó como control positivo en todas las inmunohistoquímicas realizadas, de tal forma que se aseguró el proceso de cada una de ellas.



**Figura 37.** Fotomicrografía de corte de riñón de cerdo 10X por inmunohistoquímica con EDTA para la identificación de la proteína PCNA con señal positiva de tipo nuclear en las células de los túbulos colectores (Flecha).



**Figura 38.** Fotomicrografía de corte de útero 12 días de Gx 20X por inmunohistoquímica para la identificación de la proteína PCNA con señal positiva de tipo nuclear en las células ubicadas en el tejido conjuntivo laxo areolar (Flechas).

## 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

### 5.1 Caracterización histológica

Para determinar las diferencias histológicas encontradas al comparar cada día de ciclo estral o gestación a través de la tinción H-E, a cada corte de tejido teñido se le tomaron fotomicrografías digitales que posteriormente se analizaron a través del software Imagej. Para ello, cada sección de tejido se dividió en: diferencias en epitelio de revestimiento, diferencias en zona subepitelial, y límites entre mucosa y muscular.

Se le denomina zona subepitelial al espacio ocupado por el tejido conjuntivo ubicado entre el epitelio de revestimiento y la presentación de las glándulas.

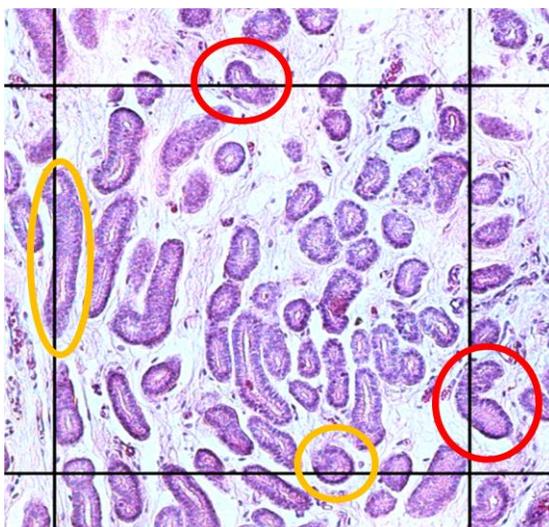
A través de la calibración de imágenes usando Imagej se pudieron medir longitudes totales tanto del endometrio como del miometrio, así como de la zona subepitelial, la zona glandular y el diámetro de los vasos sanguíneos.

Para el análisis del número de glándulas y vasos sanguíneos, se determinó un área compatible con un campo de una fotomicrografía tomada a 10X. De esta manera se determinó un área de  $240,000\mu\text{m}^2$  ( $0.24\text{mm}^2$ ).

Dentro del área cuadrante de análisis existen estructuras que cruzan la línea límite, por lo que se contabilizaron las estructuras que cruzan las líneas izquierda e inferior, mientras que se descartaron estructuras que cruzaran la línea derecha e superior (**Figura 39**).

Se contabilizaron el número total de vasos sanguíneos por área, pero también se determinó a través de la medición de longitudes los vasos sanguíneos superiores a 20 micras de diámetro, es decir, vasos sanguíneos superiores a los capilares sanguíneos.<sup>(33)</sup>

Todas las mediciones y conteos finales son medias de una muestra acompañadas con el error estándar.



**Figura 39.** Campo de  $0.24 \text{ mm}^2$ . Los círculos delimitan glándulas que cruzan las líneas del cuadrante. Las estructuras que cruzan la línea izquierda e inferior se contabilizan (círculos amarillos), mientras que las que cruzan las líneas derecha y superior se descartan (círculos rojos).

## 5.2 Inmunohistoquímica

Una vez que aseguramos que la técnica, tejidos y reactivos funcionaran correctamente se procedió a la realización de la inmunohistoquímica para identificar la presencia y localización de los factores de crecimiento FGF10 y HGF en los tejidos de útero a analizar, es decir, tejidos uterinos de 12, 17 y 21 días del ciclo estral, así como de los días 12, 16 y 18 de gestación.

Al igual que para la caracterización histológica, se tomaron fotomicrografías digitales, por cada día de ciclo estral y gestación. Las tomas en 10X se analizaron a través del software ImajeJ con la herramienta multipuntos.

Para la evaluación de la señal, el tejido se dividió en 3 secciones: zona muscular, zona glandular y zona epitelio de revestimiento. En cada una de estas se expresó en un conteo de 100 estructuras cuántas presentaban señal. Las estructuras que se contaron por sección fueron:

- **Zona muscular:** Número de núcleos teñidos por cada 100 células.
- **Zona subepitelial:** Número de núcleos localizados en el tejido conjuntivo laxo areolar adyacente al borde basal de las células epiteliales de revestimiento teñidos por cada 100 células.
- **Zona glandular:** Número de glándulas teñidas por cada 100 glándulas

En el caso de las células del epitelio de revestimiento y glandular, al presentar una señal de tipo citoplasmática, también se describe de forma cualitativa como señal ligera, moderada o señal intensa.<sup>(34)</sup>

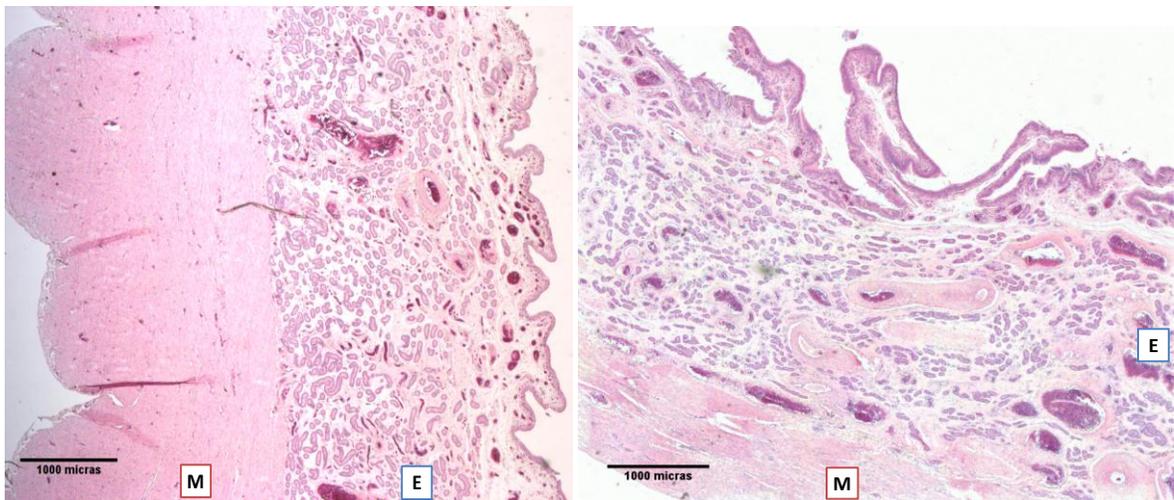
Cabe destacar que las evaluaciones son independientes entre los dos factores de crecimiento analizados, esto debido a que la estandarización del anticuerpo primario mostró que el FGF10 emite una señal más intensa que el HGF en tejido de cerdo.<sup>(35)</sup>

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Caracterización histológica

#### 6.1.1 Longitud del endometrio y del miometrio en el ciclo estral

Como primera observación de los cortes histológicos del ciclo estral en el área de estudio analizada se obtuvo que el grosor del endometrio aumenta del día 12 del ciclo al día 21, pasando de  $744\pm 4$  micras, a una media de  $2682\pm 73$  micras. Al contrario, el miometrio pasa de  $2066\pm 37$  micras a una media de  $1198\pm 14$  (**Figura 40**).

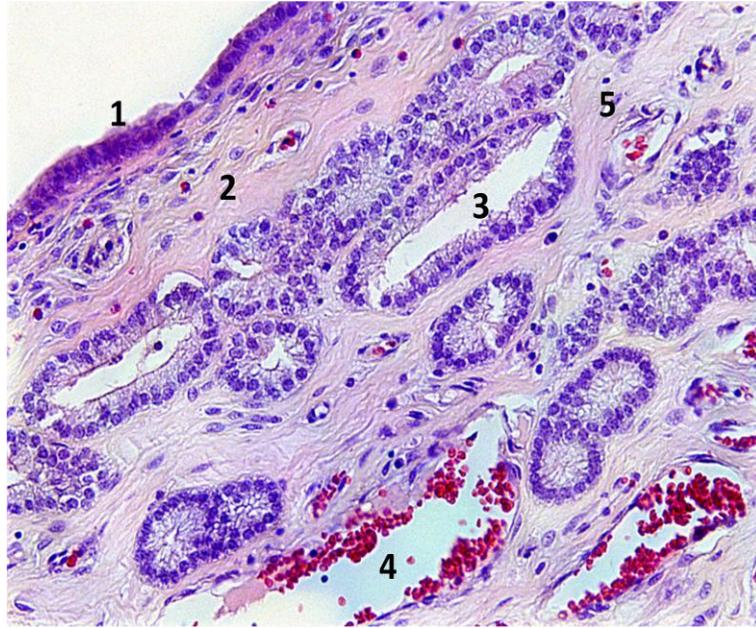


**Figura 40.** Fotomicrografía de corte de útero 17 días CE (Izquierda) y 21 días CE (Derecha) a 2.5X en tinción H-E. Comparación entre dos días del ciclo que muestra como el grosor del miometrio disminuye en el día 21 del ciclo. **M:** Miometrio **E:** Endometrio

Lo anterior tiene impacto y relación con el número de glándulas y vasos sanguíneos por área que se analizan más adelante.

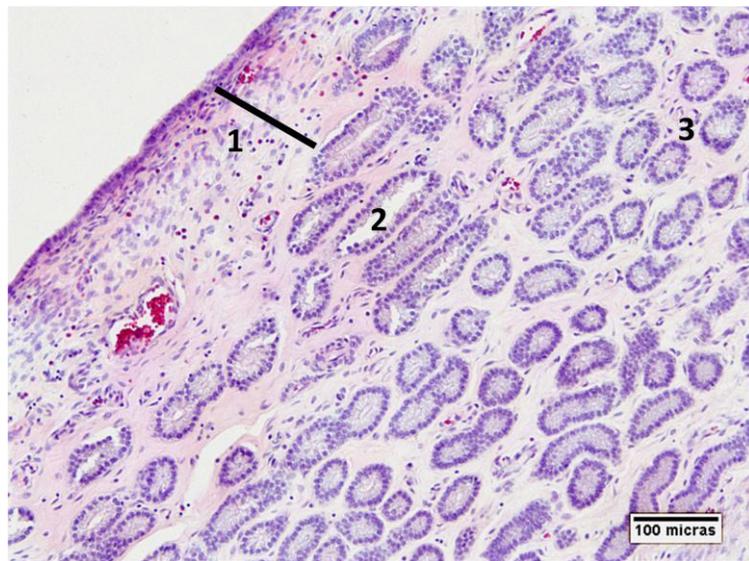
#### 6.2.1 Histología del endometrio durante el día 12 del ciclo estral

Durante este día del ciclo, el epitelio de revestimiento se observó de tipo simple cilíndrico en la mayor parte de la superficie, a pseudoestratificado (**Figura 41**). El número celular en esta zona no es muy alto en comparación con los estadios de ciclo estral (CE) y gestación (Gx) que se presentan más adelante. Nótese la ubicación de las glándulas con respecto a los vasos sanguíneos.



**Figura 41.** Fotomicrografía de corte de útero 12 días CE a 20X en tinción H-E. 1. Epitelio de revestimiento simple cilíndrico 2. Lámina propia submucosa 3. Glándulas endometriales 4. Vaso sanguíneo mayor a 100 micras de diámetro 5. Vaso sanguíneo por encima de las 20 micras de diámetro.

La zona subepitelial ocupa un menor espacio en comparación con la zona glandular (**Figura 42**). A su medición el resultado fue:  $119 \pm 10$  micras contra  $665 \pm 26$  micras en promedio, respectivamente. Se observan  $41 \pm 4$  glándulas en un área de  $0.24 \text{ mm}^2$ . Dichas glándulas se presentan en forma enroscada (forma de dona) en la parte central del corte, mientras que las glándulas localizadas cerca de la zona subepitelial y en los límites entre la mucosa y la muscular tienen forma contorneada (plegada). Una media de  $20 \pm 4$  vasos sanguíneos en un área cercana a la luz uterina de  $0.24 \text{ mm}^2$  fueron contabilizados, de los cuales, solo  $9 \pm 2$  miden más de 20 micras de longitud, alcanzando, individualmente medidas de hasta 101 micras de diámetro.

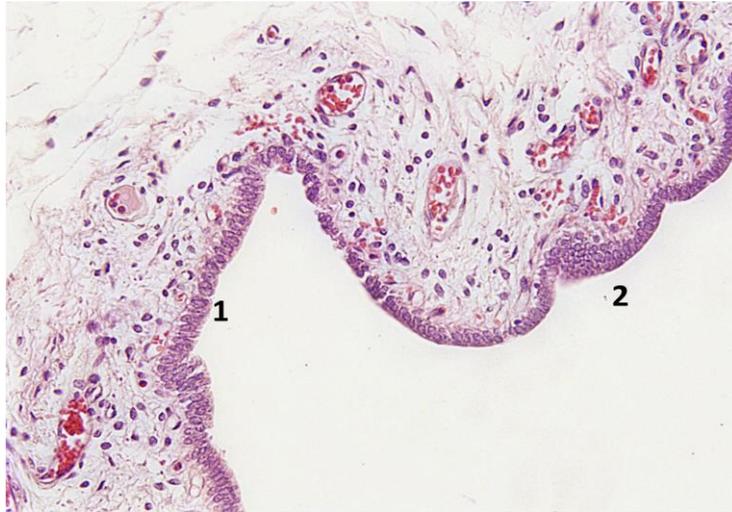


**Figura 42.** Fotomicrografía de corte de útero 12 días CE a 10X en tinción H-E. 1. Zona subepitelial 2. Glándula contorneada 3. Glándula enroscada.

### 6.2.2 Histología del endometrio durante el día 17 del ciclo estral

El epitelio va desde cilíndrico simple a pseudoestratificado, siendo este último el de mayor prevalencia. Esta variación depende de la disposición de las estructuras subepiteliales. Por ejemplo, se observaron ciertas zonas en donde las glándulas endometriales se desplazan hacia la zona muscular y los vasos sanguíneos hacia el epitelio de revestimiento. En estas zonas el epitelio de revestimiento se observa pseudoestratificado, sobre todo en los plegamientos de tejido donde se presenta con un mayor desarrollo, esto es, con una apariencia de un epitelio más alto (**Figura 43**).

La zona subepitelial permanece menor en comparación con la zona glandular, midiendo  $451 \pm 29$  micras contra  $1587 \pm 32$  micras, respectivamente, sin embargo, el número de glándulas disminuye, observándose una media de  $18 \pm 5$  glándulas en  $0.24 \text{mm}^2$  (**Figura 44**), e incluso en zonas cercanas a la luz uterina no hay presencia de glándulas, como se muestra en la figura 43. Se observa un ligero aumento de vasos sanguíneos, logrando una aparición de  $22 \pm 3$  vasos en un área de  $0.24 \text{mm}^2$  cerca de la luz uterina, de los cuales una media de  $7 \pm 1$  alcanzan diámetros mayores a 20 micras, pudiéndose observar longitudes de hasta 171 micras de diámetro. La localización de los vasos sanguíneos mayores alcanza a la zona subepitelial, sobre todo en zonas cercanas a la luz que carecen de glándulas (**Figura 44**).



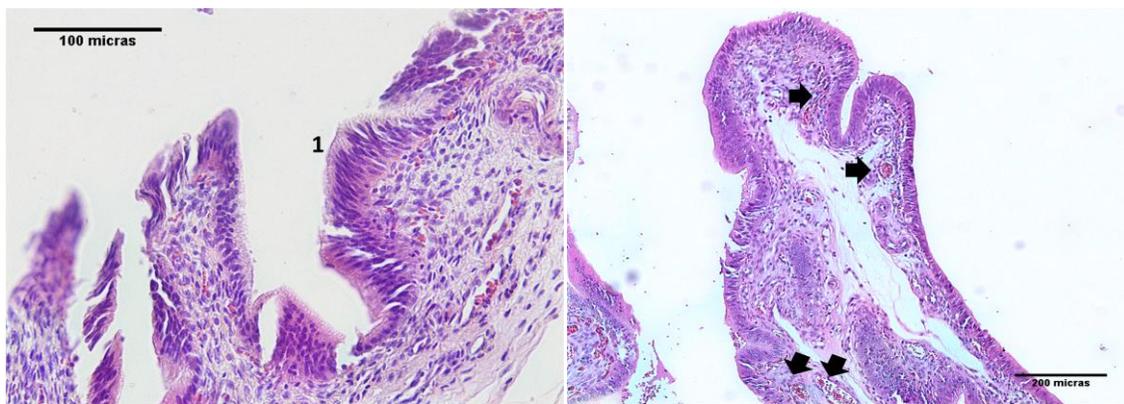
**Figura 43.** Fotomicrografía endometrio 17 días CE a 20X en tinción H-E. Nótese que no hay presencia de glándulas endometriales. 1. Epitelio de revestimiento pseudoestratificado 2. Plegamiento de tejido con un epitelio de revestimiento más alto.



**Figura 44.** Fotomicrografía endometrio 17 días CE a 10X en tinción H-E. Los vasos sanguíneos presentan un mayor calibre y alcanzan a la zona subepitelial (flechas), mientras que las glándulas disminuyen su número.

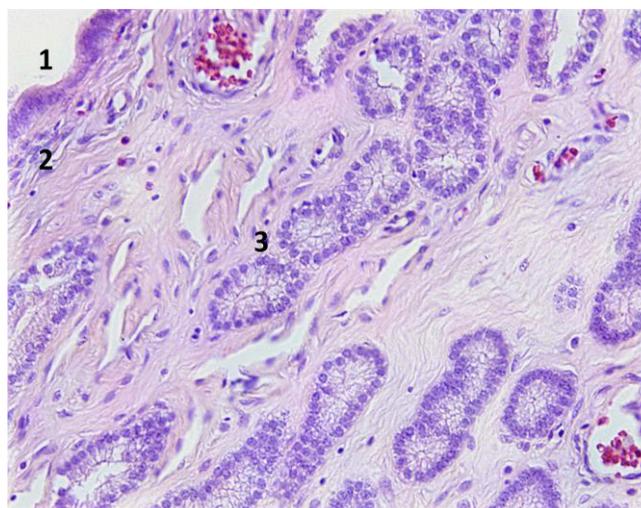
### 6.2.3 Histología del endometrio durante el día 21 del ciclo estral

Los plegamientos del tejido durante el día 21 del CE son más pronunciados, alcanzando medidas superiores a las 1000 micras. El epitelio de revestimiento se observa pseudoestratificado con células muy altas en comparación con otros días del ciclo estral analizados hasta ahora (**Figura 45**). Los vasos sanguíneos parecen alinearse por debajo del borde basal epitelial. Cabe destacar que las zonas de plegamientos carecen de glándulas (**Figura 45**).



**Figura 45. Derecha:** Fotomicrografía plegamientos de tejido 21 días CE a 20X en tinción H-E. Plegamiento de tejido 1. Epitelio de revestimiento pseudoestratificado. **Izquierda:** Fotomicrografía de corte de útero 21 días CE a 10X en tinción H-E. Plegamiento de tejido. Los vasos sanguíneos parecen alinearse por debajo del borde basal de las células epiteliales (Flechas).

También existen áreas sin plegamientos, en donde el epitelio de revestimiento pseudoestratificado no parece tener un número celular alto (**Figura 46**).

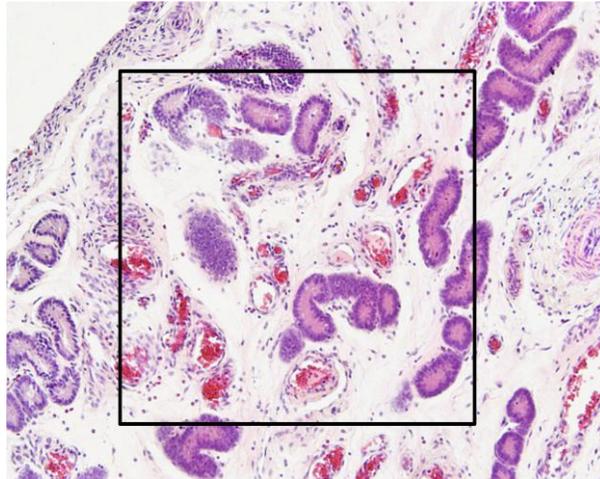


**Figura 46.** Fotomicrografía endometrio 21 días CE a 20X en tinción H-E. Zona sin plegamiento. 1. Epitelio de revestimiento 2. Lámina propia submucosa 3. Zona glandular.

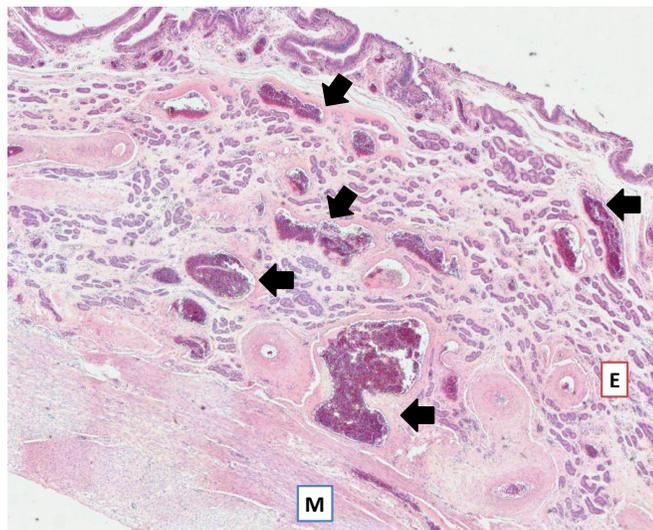
La zona subepitelial, en zonas fuera de pliegues endometriales, mide  $365 \pm 21$  micras contra  $1624 \pm 30$  micras de la zona glandular. Por su parte, los plegamientos alcanzan una media alrededor de las 1000 micras.

El número de glándulas en un área de  $0.24 \text{mm}^2$  sigue disminuyéndose, alcanzando en este día una media de  $11 \pm 2$  (**Figura 47**). Los vasos sanguíneos en el área antes mencionada y cerca de la luz uterina alcanzan un número medio de  $18 \pm 1$ , pero solo  $13 \pm 1$  alcanzan un diámetro mayor a las 20 micras de longitud. En

un corte con un objetivo menor, se puede apreciar el gran desarrollo de los vasos sanguíneos en toda la mucosa endometrial (**Figura 45**).



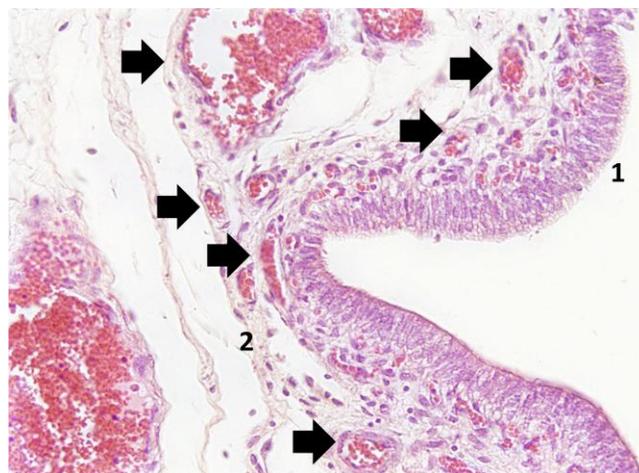
**Figura 47.** Fotomicrografía endometrio 21 días CE a 10X en tinción H-E. El cuadrado marca el área aproximada de  $0.24\text{mm}^2$  en donde se puede apreciar una disminución en el número de glándulas.



**Figura 48.** Fotomicrografía de corte de útero 21 días CE a 2.5X en tinción H-E. Las flechas indican el gran desarrollo de vasos sanguíneos, algunos, incluso alcanzan la mitad del espacio de la mucosa endometrial. **M:** Miometrio **E:** Endometrio

#### 6.1.4 Histología del endometrio durante el día 12 de gestación

La totalidad de la superficie que ocupa el epitelio de revestimiento se observa de tipo pseudoestratificado, con un número celular que da la apariencia de un tejido más desarrollado. Además, los vasos sanguíneos parecen proliferar y localizarse justo por debajo del epitelio de revestimiento (**Figura 49**).



**Figura 49.** Fotomicrografía endometrio 12 días Gx a 20X en tinción H-E. 1. Epitelio de revestimiento pseudoestratificado 2. Lámina propia submucosa Flechas: Vasos sanguíneos rodeando el borde basal de las células epiteliales.

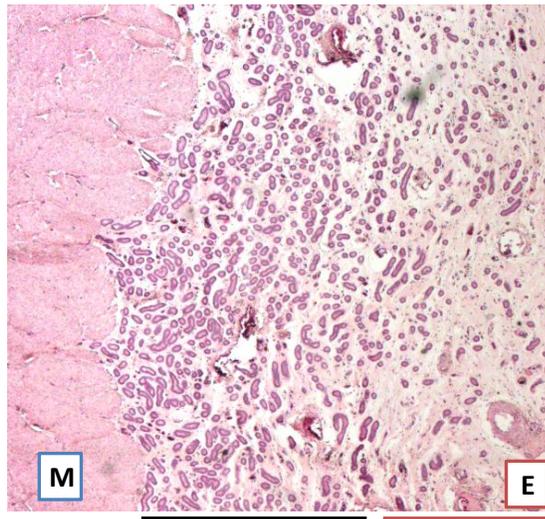
El número de glándulas en un área de  $0.24\text{mm}^2$  depende de la zona del endometrio a analizar, ya que, existen zonas con una media de  $31\pm 3$  glándulas, mientras que en otras zonas la media solo alcanza las  $12\pm 2$  glándulas. En general, se observa que en zonas cercanas al límite entre el endometrio y miometrio el número de glándulas es mayor que cerca de la luz uterina (**Figura 50**).

Las glándulas endometriales se van desplazando hacia la muscular conforme los plegamientos del tejido aparecen para formar vellosidades. Esto implica el aumento de la zona subepitelial, desde una media de  $99\pm 6$  micras a  $518\pm 14$  micras en zonas de desarrollo de plegamientos (**Figura 51**).

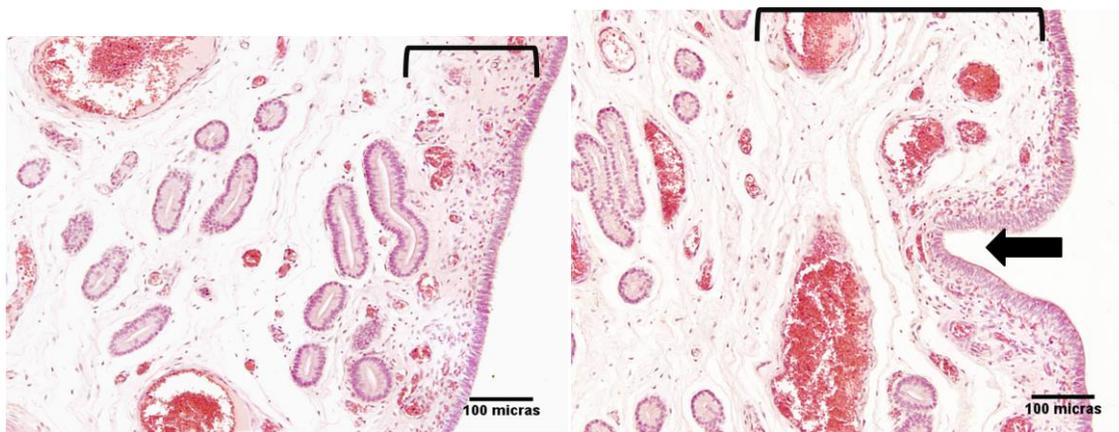
Los vasos sanguíneos fuera de vellosidades uterinas y que están cerca de la luz, crecen, alcanzado un número de  $16\pm 1$  vasos sanguíneos en un área de  $0.24\text{mm}^2$ , de los cuales,  $9\pm 1$  tienen diámetros superiores a las 20 micras. Individualmente se observan vasos superiores a las 300 micras de longitud localizados muy cerca del epitelio de revestimiento.

Finalmente, las vellosidades uterinas (plegamientos de tejido), desarrollan interdigitaciones que también carecen de glándulas, y en su lugar hay una gran proliferación de vasos sanguíneos. Vasos de menor tamaño (diámetro medio de  $11\pm 1$  micras) rodean el borde basal del epitelio de revestimiento, mientras que los

vasos con un calibre mayor (diámetro medio de  $37\pm 4$  micras) se encuentran en el centro de la interdigitación (**Figura 52**).



**Figura 50.** Fotomicrografía de corte de útero 12 días Gx a 2.5X en tinción H-E. La línea de color negro delimita una zona cercana a la muscular en donde el número de glándulas es mayor que las zonas más cercanas a la luz uterina, marcada con la línea de color rojo. **M:** Miometrio **E:**Endometrio



**Figura 51.** Fotomicrografías endometrio 12 días Gx a 10X en tinción H-E. Las glándulas endometriales son desplazadas a la zona muscular conforme se desarrollan los plegamientos de tejido (fecha), mientras que los vasos sanguíneos proliferan cerca del epitelio de revestimiento y la zona subepitelial aumenta (corchetes).



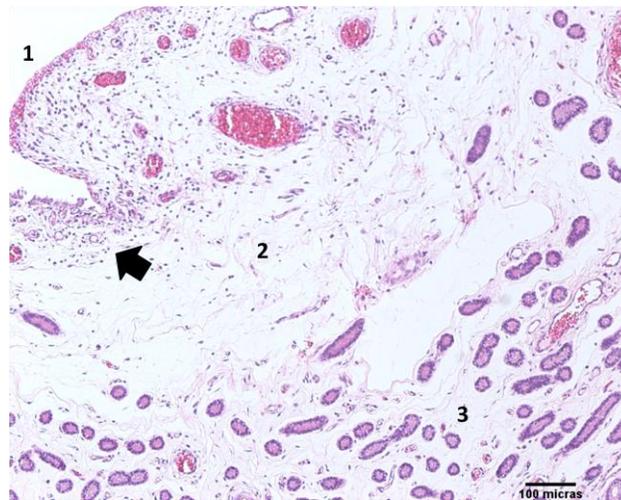
**Figura 52.** Fotomicrografía interdigitación de vellosidad uterina 12 días Gx a 10X en tinción H-E. Vellosidad uterina. Vasos sanguíneos pequeños rodean la cara basa de las células epiteliales de revestimiento, mientras que vasos sanguíneos de un mayor calibre se ubican en el centro de la vellosidad.

#### **6.1.5 Histología del endometrio durante el día 16 de gestación**

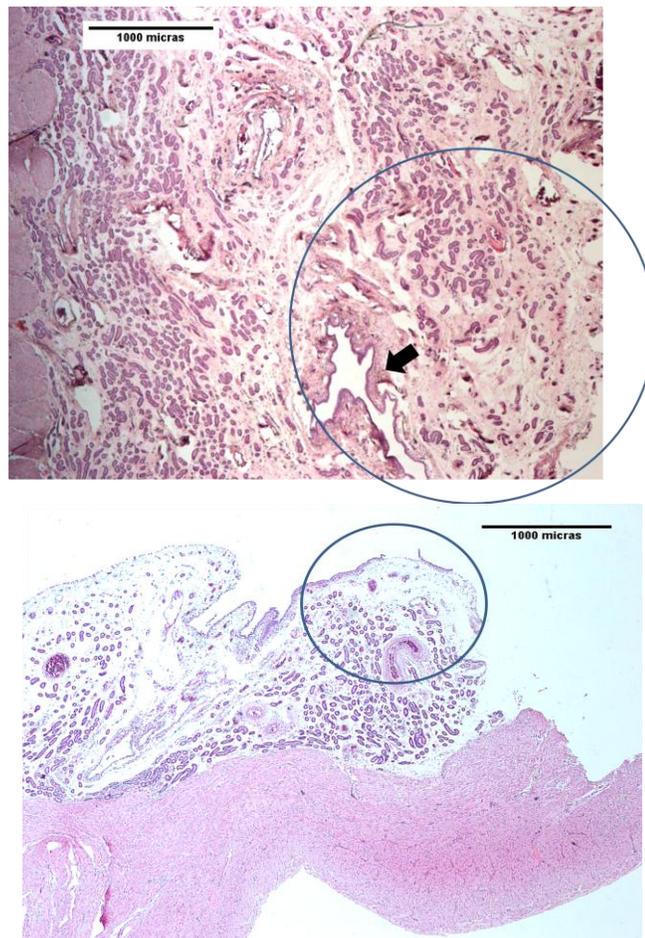
El epitelio de revestimiento se observa de cilíndrico simple, a pseudoestratificado, esto quiere decir que parece de un diseño más simple comparado con el día 12 de Gx. Las glándulas endometriales parecen desplazadas totalmente hacia el miometrio, aumentando la longitud de la zona subepitelial a  $639\pm 37$  micras con respecto a  $542\pm 24$  micras de la zona glandular (**Figura 53**). Las glándulas endometriales, entonces, se agregan cerca del miometrio, contabilizando una media de  $35\pm 4$  glándulas en  $0.24\text{mm}^2$ . Al igual que en el día 12 de gestación, una banda de células correspondientes al tejido conjuntivo laxo areolar se agregan justo por debajo de las células epiteliales (**Figura 53**).

A pesar de que los plegamientos de tejido existen, en su periferia no presentan interdigitaciones de tejido como en el día 12 de gestación, dando la apariencia de un tejido más sencillo. De hecho, a la medición de la longitud del endometrio, se obtuvo que para el día 12 de gestación, este mide  $4345\pm 48$  micras, mientras que en el día 16, solo mide  $1853\pm 78$  micras (**Figura 54**).

El número de vasos sanguíneos en un cercanos a la luz uterina y en un área de  $0.24\text{mm}^2$  es de  $7\pm 2$ , de los cuales  $6\pm 2$  son mayores a 20 micras de longitud. Individualmente se observaron vasos con diámetros de hasta 134 micras.



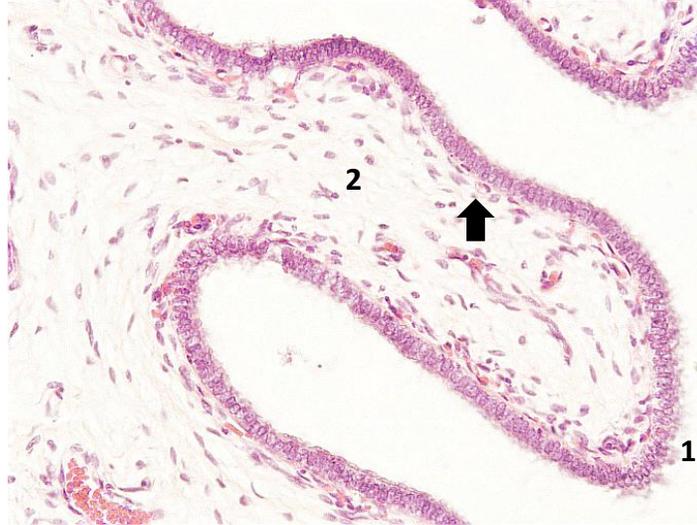
**Figura 53.** Fotomicrografía endometrio 16 días Gx a 10X en tinción H-E. 1. Epitelio de revestimiento 2. Zona subepital 3. Zona glandular Flecha. Células del tejido laxo areolar.



**Figura 54. Arriba:** Fotomicrografía de corte de útero 12 días Gx a 2.5X en tinción H-E **Abajo:** Fotomicrografía de corte de útero 16 días Gx a 2.5X en tinción H-E. En ambas fotomicrografías el círculo delimita un plegamiento de tejido, mientras que la flecha indica la interdigitación de tejido en la periferia del plegamiento.

### 6.1.6 Histología del endometrio durante el día 18 de gestación

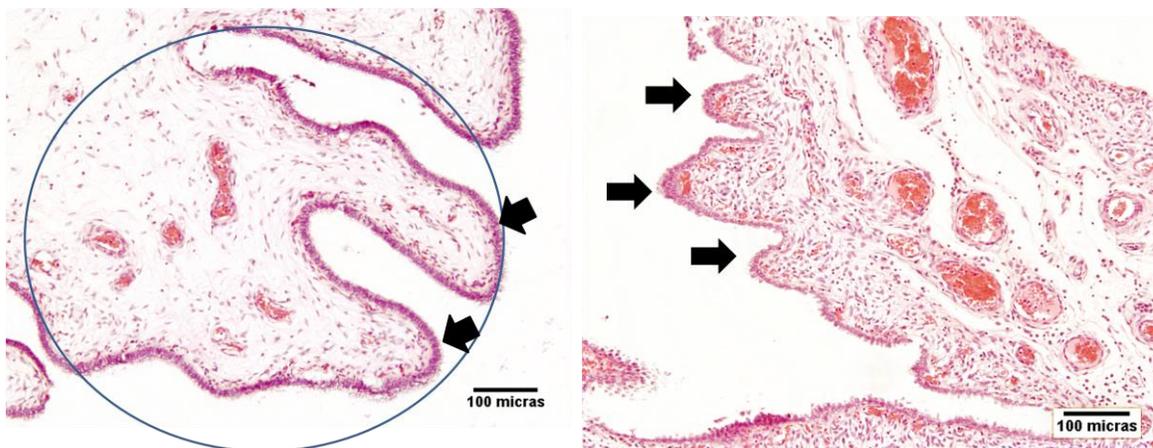
El epitelio de revestimiento que se presenta es de tipo pseudoestratificado. Las células del tejido conjuntivo de la lámina propia ya no aparecen en forma de banda, en cambio, tienen una disposición más generalizada (**Figura 55**).



**Figura 55.** Fotomicrografía interdigitación vellosidad uterina 18 días Gx a 20X en tinción H-E. 1. Epitelio de revestimiento pseudoestratificado 2. Zona subepitelial Flecha. Células del tejido conjuntivo laxo areolar.

Las glándulas endometriales permanecen desplazadas hacia la zona muscular, observándose una media de  $37 \pm 2$  glándulas en  $0.24 \text{mm}^2$ . Los plegamientos de tejido se visualizan más pronunciados que en el día 16 de Gx, estos no presentan glándulas, e incluso, se pudieron observar interdigitaciones en la periferia de los mismos, semejantes a los presentes día 12 de Gx (**Figura 56**).

El número de vasos sanguíneos en un área de  $0.24 \text{mm}^2$  cerca de la luz uterina es de  $8 \pm 1$ , de los cuales  $6 \pm 1$ , tienen diámetros mayores a 20 micras. Individualmente, se pudieron localizar vasos con longitudes de hasta 271 micras. En la zona de interdigitaciones predominan los vasos sanguíneos menores con un diámetro medio de  $20 \pm 2$  micras.



**Figura 56.** Fotomicrografía vellosidad uterina 18 días Gx a 10X en tinción H-E. 1. El círculo delimita la ubicación de un plegamiento de tejido, mientras que las flechas indican las interdigitaciones de los mismos.

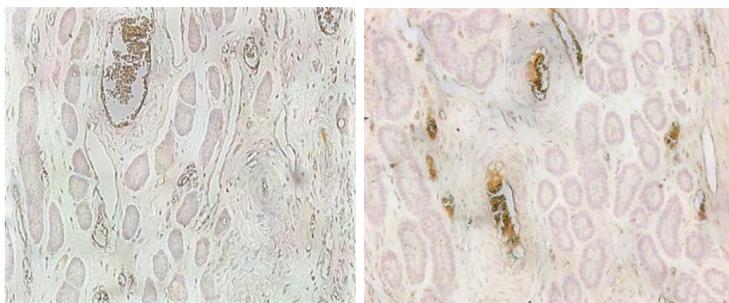
**Cuadro 2.** Número de glándulas y vasos sanguíneos encontrados en los distintos días de ciclo estral y gestación analizados.

DÍA	Epitelio	Glándulas área*	Vasos sanguíneos área*		
			Totales	≥20µm diámetro	Mayor calibre µm
12CE	Simple cilíndrico	41±4	20±4	9±2	101
17CE	Simple cilíndrico a pseudoestratificado	18±5	22±3	7±1	171
21CE	Pseudoestratificado	11±2	18±1	13±1	149
12 Gx	Pseudoestratificado	(M**) 31±3 (L***)12±2	16±1	9±1	300
16 Gx	Simple cilíndrico a pseudoestratificado	35±4	7±2	6±2	134
18 Gx	Pseudoestratificado	37±2	8±1	6±1	271

\*Área: 0.24mm<sup>2</sup> M      \*\*Hacia el miometrio      \*\*\*Hacia la luz uterina

## 6.2 Localización del FGF 10 y HGF en el útero de cerdo durante la ventana de implantación

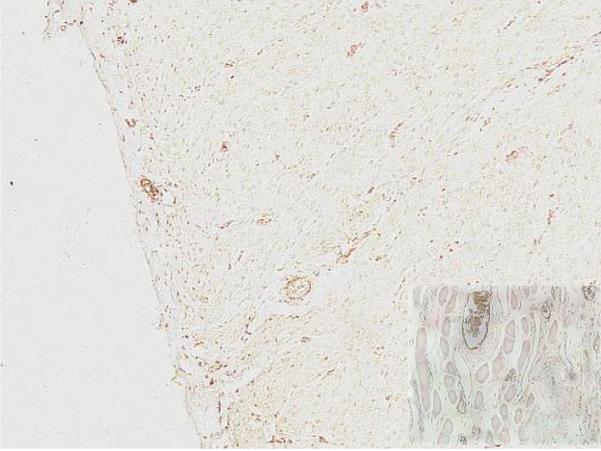
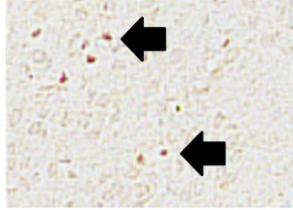
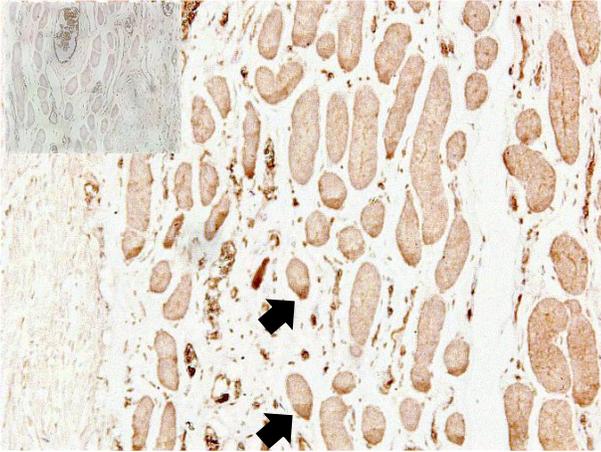
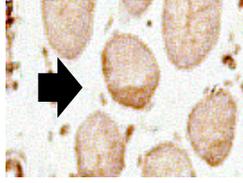
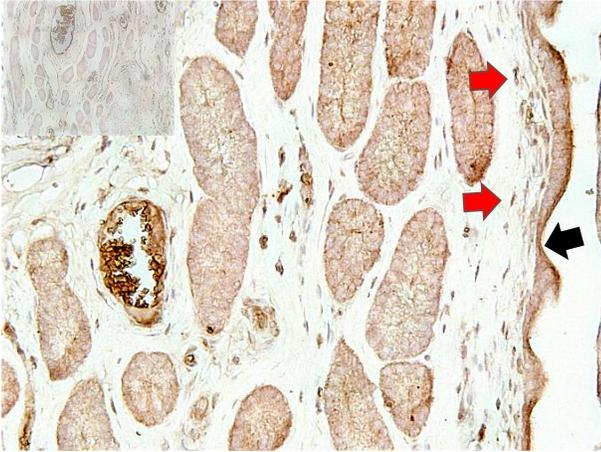
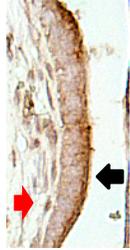
Con base en los controles negativos (**Figura 57**), a continuación se presentan los resultados de la expresión del FGF10 y del HGF en los distintos días analizados.



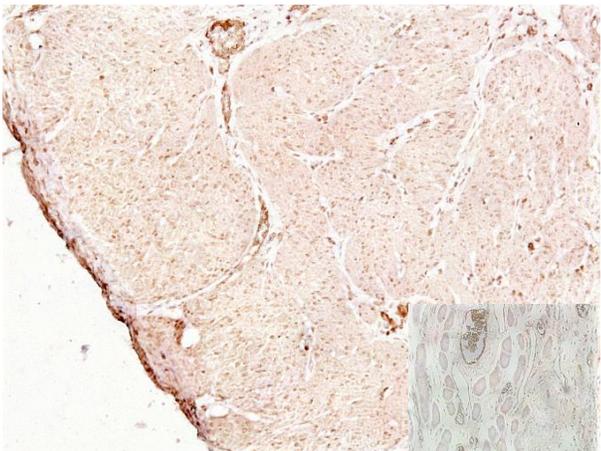
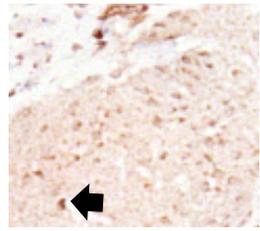
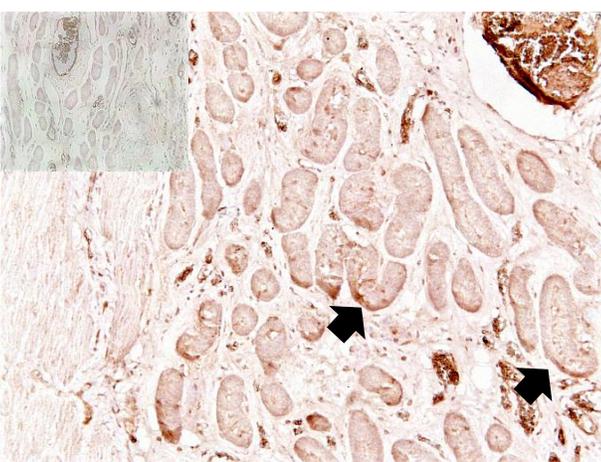
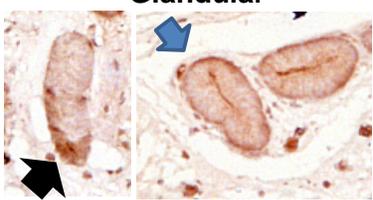
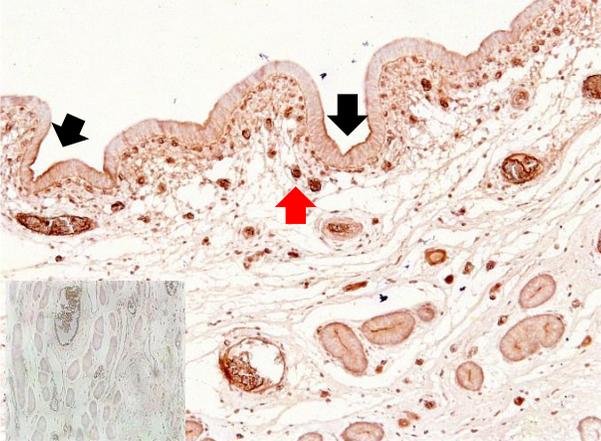
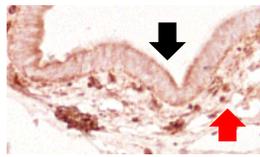
**Figura 57.** Fotomicrografías control negativo útero. **Derecha:** FGF10 20X. **Izquierda:** HGF 10X.

## 6.2.1 FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 10 (FGF10)

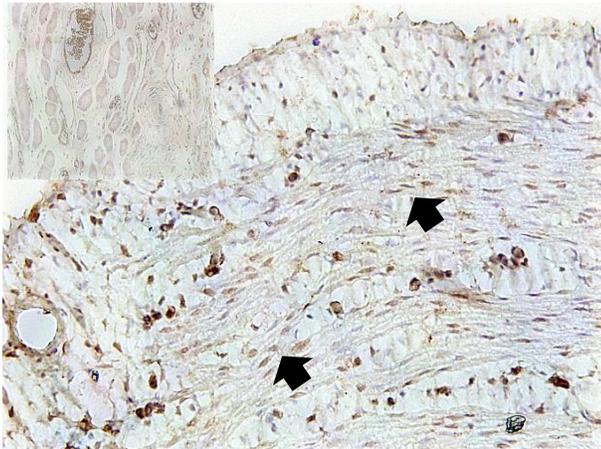
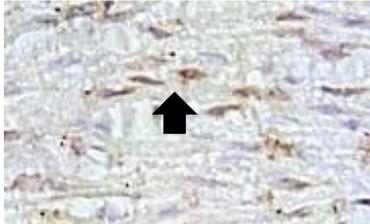
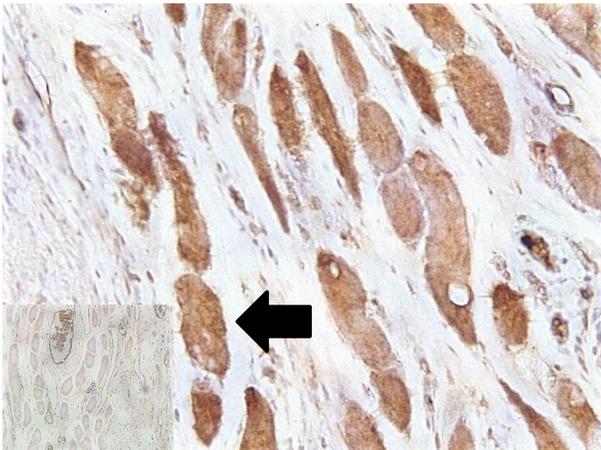
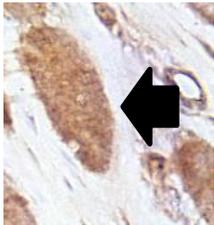
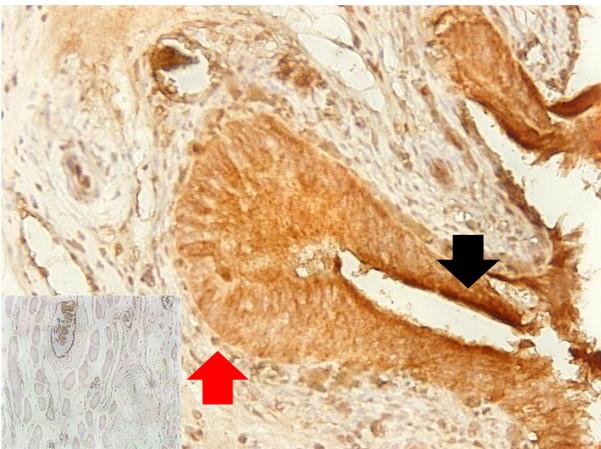
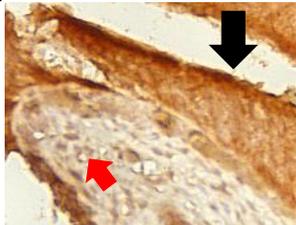
Día 12 del ciclo estral

 <p><b>Figura 58.</b> Fotomicrografía zona muscular 12días CE 10X</p>	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Señal nuclear Media: <b>42/100 células</b></p>
 <p><b>Figura 59.</b> Fotomicrografía zona glandular 12días CE 10X</p>	<p><b>Glandular</b></p>  <p>Señal citoplasmática granular moderada. Media de <b>100/100 glándulas.</b></p> <p>Nótese que la señal es más intensa en un polo glandular (Flechas)</p>
 <p><b>Figura 60.</b> Fotomicrografía epitelio de revestimiento 12días CE 20X</p>	<p><b>Epitelio de revestimiento</b></p>  <p>Señal citoplasmática granular moderada con reforzamiento membranal en el borde apical celular (Flecha negra)</p> <p><b>Tejido conjuntivo subepitelial</b> Señal nuclear. Media <b>42/100 células</b> (Flechas rojas)</p>

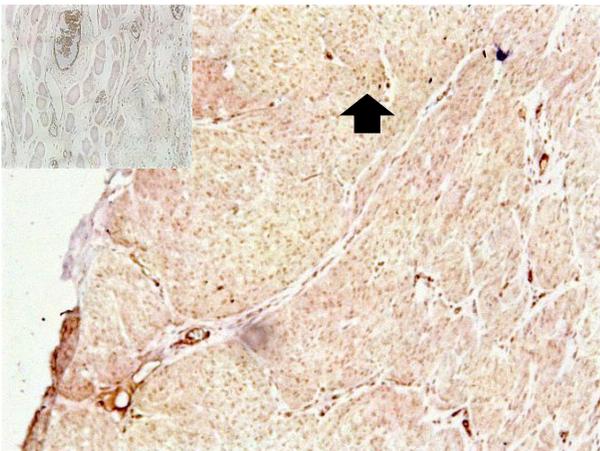
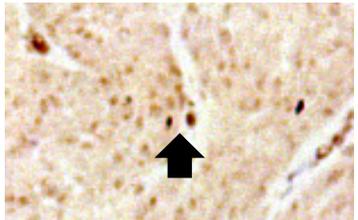
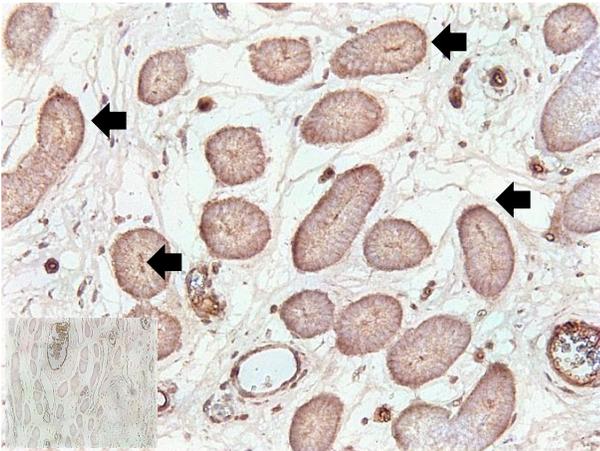
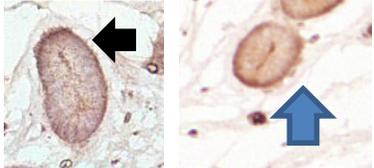
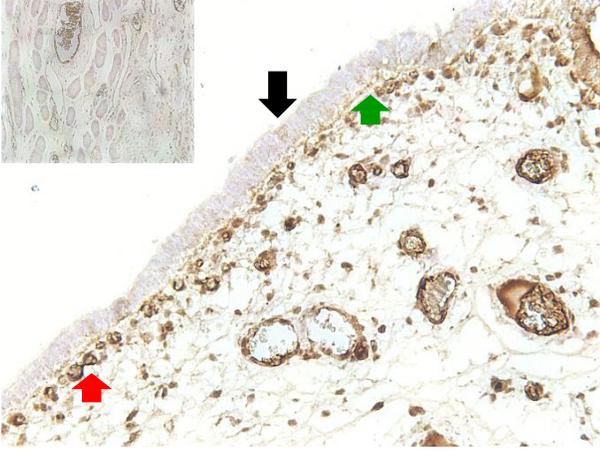
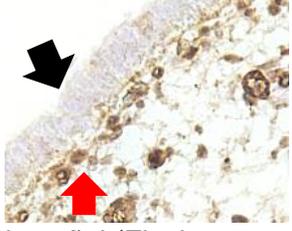
**Día 17 del ciclo estral**

 <p><b>Figura 61.</b> Fotomicrografía zona muscular 17días CE 10X</p>	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Señal nuclear <b>31/100 células</b></p>
 <p><b>Figura 62.</b> Fotomicrografía zona glandular 17días CE 10X</p>	<p><b>Glandular</b></p>  <p><i>Glándulas hacia el miometrio</i> Señal citoplasmática granular tenue con señal más intensa en un polo glandular (Flecha negra). <i>Glándulas hacia la luz uterina:</i> Señal citoplasmática moderada con reforzamiento membranal en el borde apical y lateral. Así como señal extracelular (Flecha azul) <b>100/100 glándulas.</b></p>
 <p><b>Figura 63.</b> Fotomicrografía epitelio de revestimiento 17días CE 10X</p>	<p><b>Epitelio de revestimiento</b></p>  <p>Señal citoplasmática moderada con reforzamiento membranal en el borde apical y lateral celular (Flechas negras)</p> <p><b>Células del tejido conjuntivo subepitelial</b></p> <p>Señal nuclear. <b>43/100 células</b> (Flecha roja)</p>

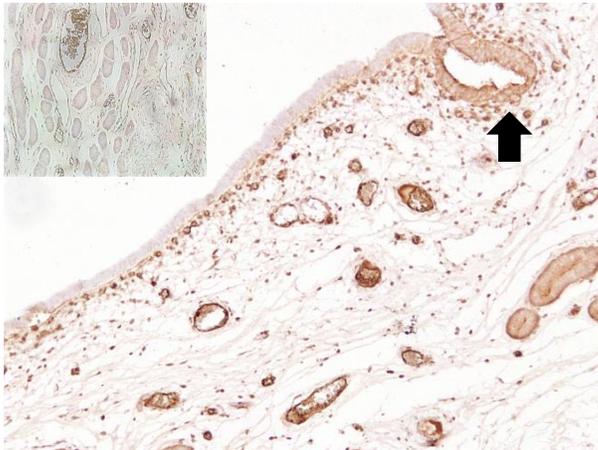
**Día 21 del ciclo estral**

 <p><b>Figura 64.</b> Fotomicrografía zona muscular 21días CE 20X</p>	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Señal nuclear Media: <b>58/100 células</b></p> <p>La señal ha disminuido en comparación con el día 17 del ciclo</p>
 <p><b>Figura 65.</b> Fotomicrografía zona glandular 21 días CE 10X</p>	<p><b>Glandular</b></p>  <p>Señal citoplasmática homogénea intensa. La señal se observa de forma generalizada en la superficie total de las glándulas endometriales. <b>100/100 glándulas.</b></p>
 <p><b>Figura 66.</b> Fotomicrografía epitelio de revestimiento 21días CE 20X</p>	<p><b>Epitelio de revestimiento</b></p>  <p>Señal citoplasmática homogénea intensa con reforzamiento membranar en el borde apical (Flecha negra)</p> <p><b>Células del tejido conjuntivo subepitelial</b></p> <p>Señal nuclear. <b>54/100 células</b> (Flecha roja)</p>

**Día 12 de gestación**

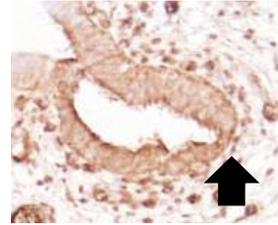
 <p><b>Figura 67.</b> Fotomicrografía zona muscular 12 días Gx 10X</p>	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Señal nuclear <b>29/100 células</b></p>
 <p><b>Figura 68.</b> Fotomicrografía zona glandular 12 días Gx 20X</p>	<p><b>Glandular</b></p>  <p><i>Glándulas hacia el miometrio:</i> Señal citoplasmática granular tenue con reforzamiento membranal en la pared basal y lateral glandular, (Flecha negra). <i>Glándulas hacia la luz uterina:</i> Señal citoplasmática granular moderada con reforzamiento lateral y basal glandular, así como señal extracelular (Flecha azul)</p> <p><b>100/100 glándulas.</b></p>
 <p><b>Figura 69.</b> Fotomicrografía epitelio de revestimiento 12 días Gx 10X</p>	<p><b>Epitelio de revestimiento</b></p>  <p>Sin señal (Flecha negra)</p> <p><b>Células del tejido conjuntivo subepitelial</b></p> <p>Señal nuclear (Flecha roja) <b>100/100 células</b></p> <p>Señal extracelular en la lámina basal (Flecha verde)</p>

### Zona de plegamiento de tejido



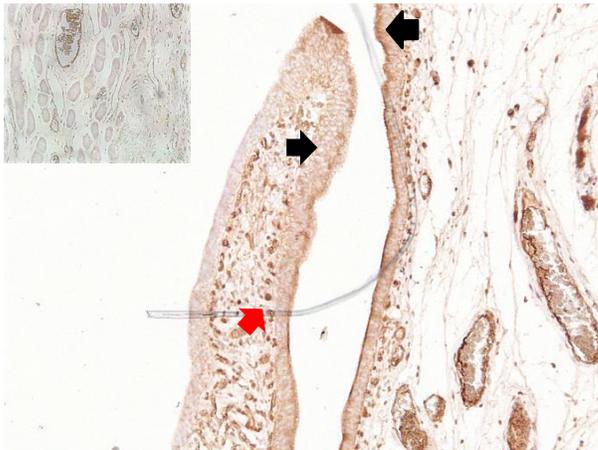
**Figura 70.** Fotomicrografía zona de desarrollo de plegamiento uterino día 12 de Gx 10X

#### Epitelio de revestimiento



Señal citoplasmática granular intensa con reforzamiento total, siendo más intenso en el borde apical y basal celular

### Vellosidad uterina

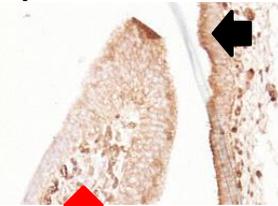


**Figura 71.** Fotomicrografía vellosidad uterina 12 días de Gx 10X

#### Epitelio de revestimiento

Señal citoplasmática granular intensa con reforzamiento en el borde apical y lateral celular (Flecha negra).

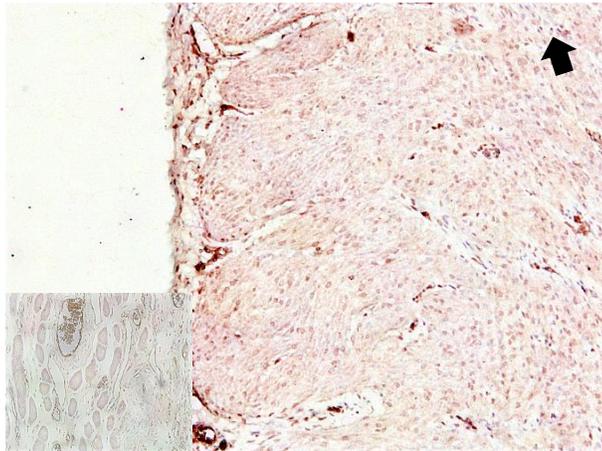
#### Células del tejido conjuntivo subepitelial de la vellosidad



Señal nuclear (Flecha roja)

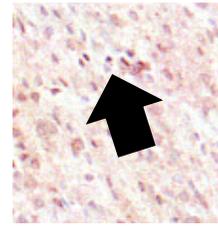
Nótese como se agregan las células del tejido conjuntivo dentro de toda el área ocupada por la digitación de la vellosidad.

**Día 16 de gestación**

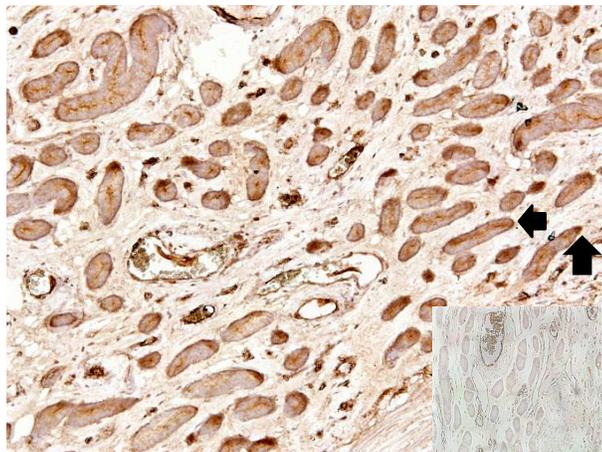


**Figura 72.** Fotomicrografía zona muscular 16 días Gx 10X

**Muscular**

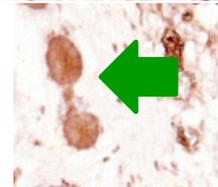
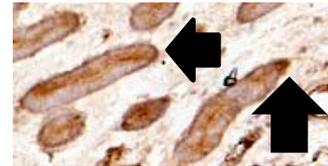


Señal nuclear  
Media: **21/100 células**



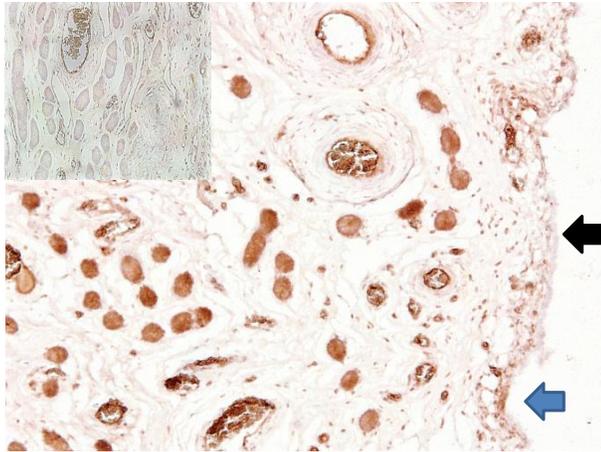
**Figura 73.** Fotomicrografía zona glandular 16 días Gx 10X

**Glandular**



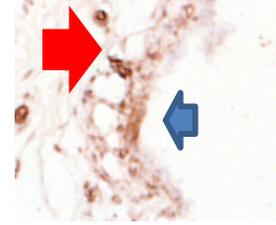
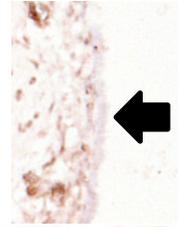
Glándulas hacia el miometrio: Señal citoplasmática granular tenue, con señal más intensa en un polo glandular, además de reforzamiento membranal en el borde basal celular, así como señal extracelular en la luz glandular (Flecha negra). Glándulas hacia la luz uterina, señal extracelular en la luz glandular (Flecha roja) o señal homogénea intensa (Flecha azul).

**100/100 glándulas.**



**Figura 74.** Fotomicrografía epitelio de revestimiento 16 días Gx 10X

**Epitelio de revestimiento**

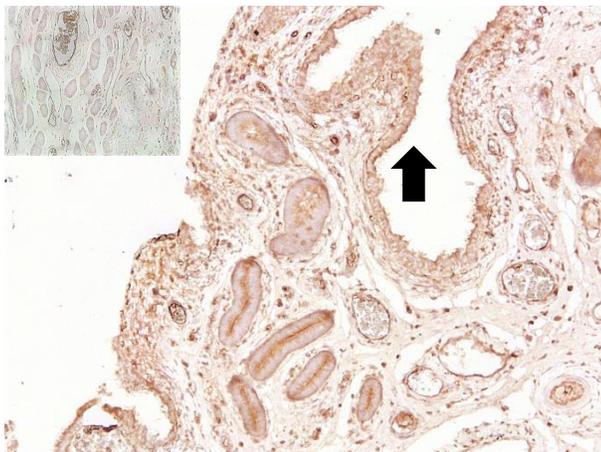


Señal negativa (Flecha negra) a citoplasmática granular moderada lateral en zonas donde se desarrollan plegamientos de tejido (Flecha azul)

**Células del tejido conjuntivo subepitelial**

Señal nuclear. 43/100 células (Flecha roja)

**Vellosidad uterina**



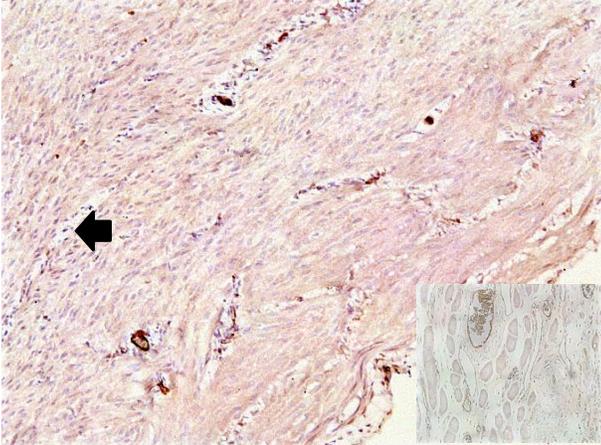
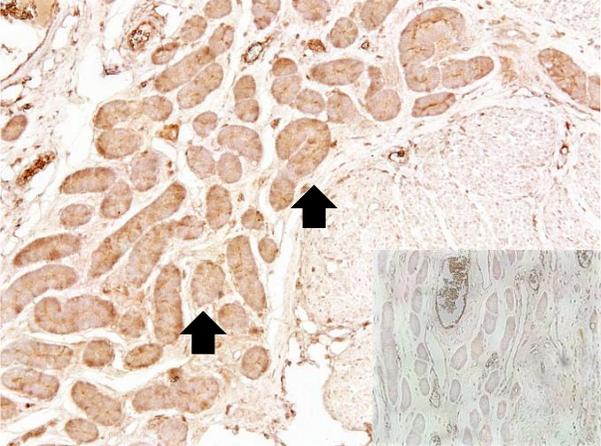
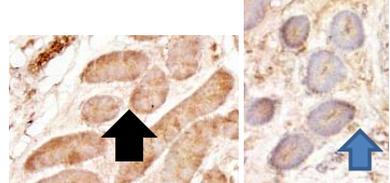
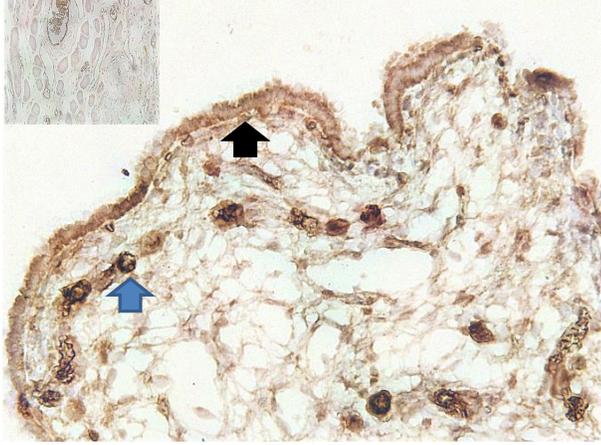
**Figura 75.** Fotomicrografía vellosidad uterina 16 días de Gx 10X

**Epitelio de revestimiento**



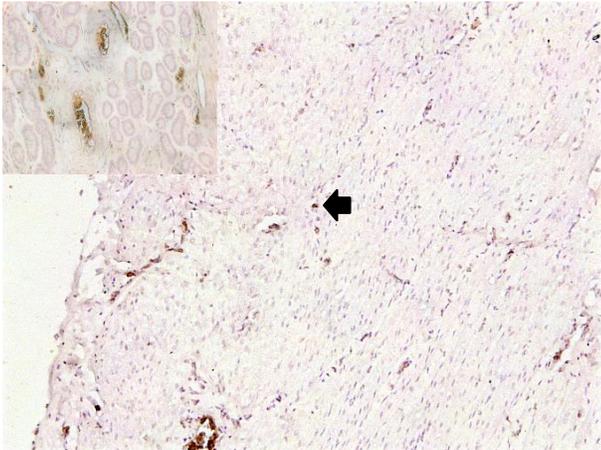
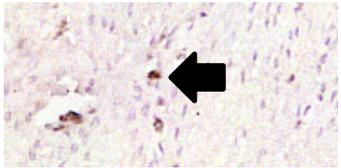
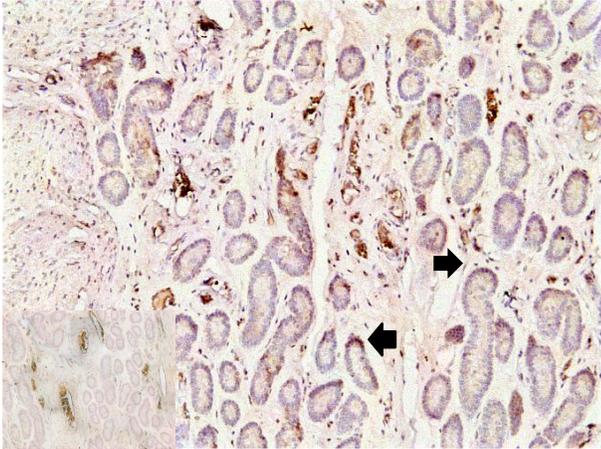
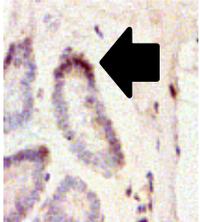
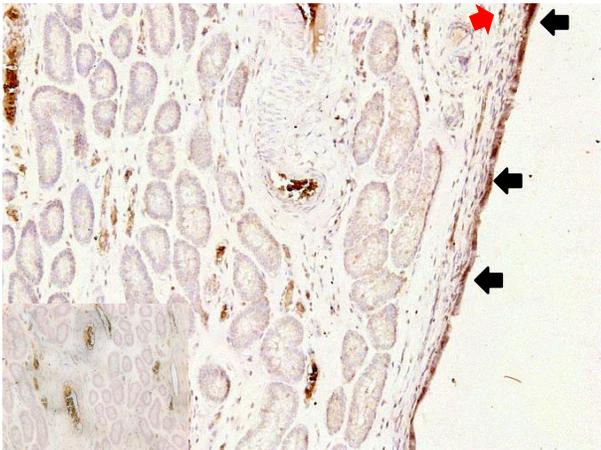
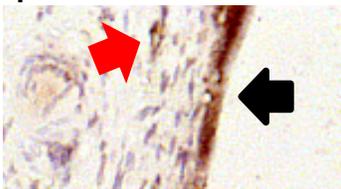
Señal citoplasmática granular intensa con reforzamiento membranar apical y lateral celular

**Día 18 de gestación**

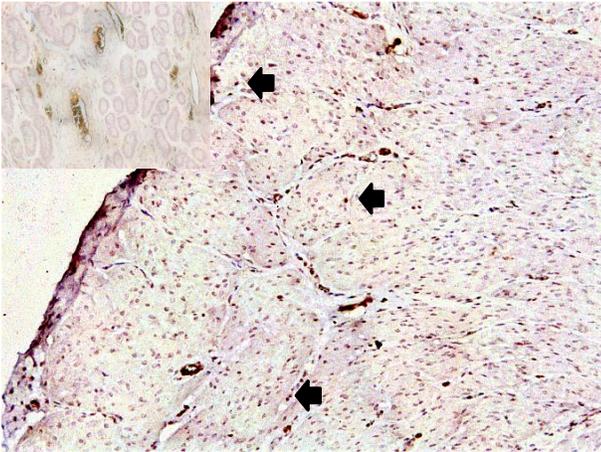
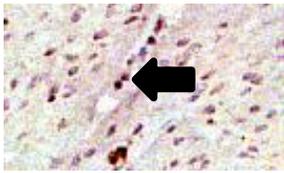
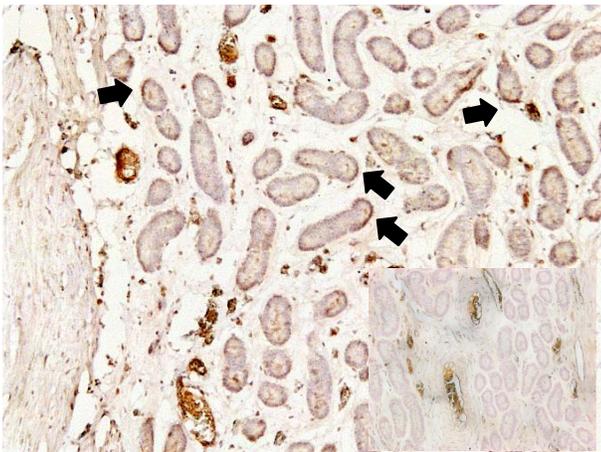
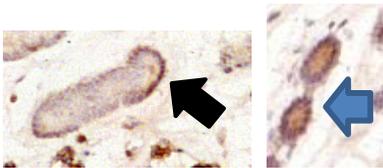
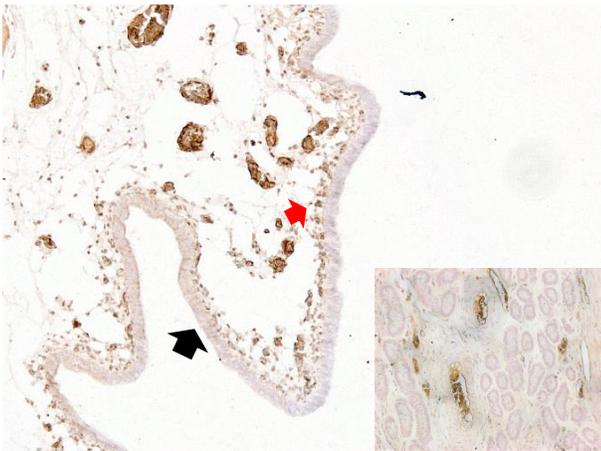
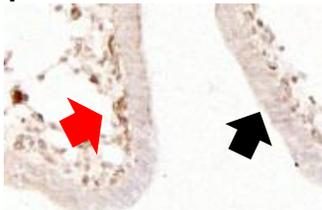
 <p><b>Figura 76.</b> Fotomicrografía zona muscular 18 días Gx 10X</p>	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Señal nuclear Media: <b>8/100 células</b></p>
 <p><b>Figura 77.</b> Fotomicrografía zona glandular 18 días Gx 10X</p>	<p><b>Glandular</b></p>  <p>Señal citoplasmática granular moderada (Flecha negra) Señal citoplasmática granular tenue con reforzamiento membranal basal y señal extracelular glandular (Flecha azul)</p> <p><b>100/100 glándulas</b></p>
 <p><b>Figura 78.</b> Fotomicrografía vellosidad uterina 18 días Gx 20X</p>	<p><b>Epitelio de revestimiento en plegamientos de tejido</b></p>  <p>Señal citoplasmática granular moderada con reforzamiento membranal en el borde apical y basal celular (Flecha negra)</p> <p><b>Células del tejido conjuntivo subepitelial</b> Señal nuclear. Células dispersas adyacentes a las células epiteliales de revestimiento. <b>63/100 células</b> (Flecha azul)</p>

## 6.2.2 FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF)

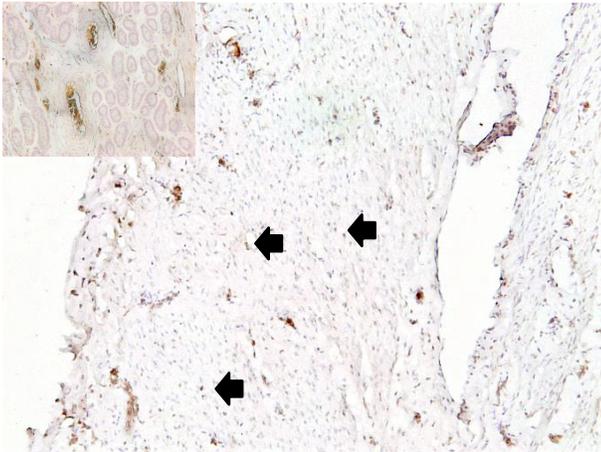
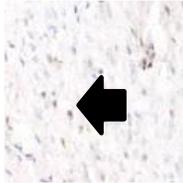
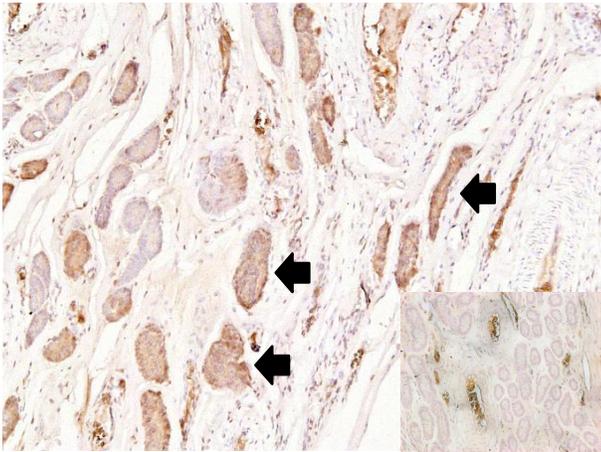
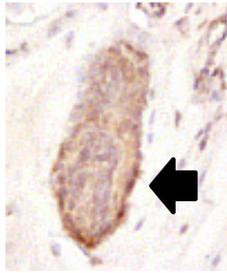
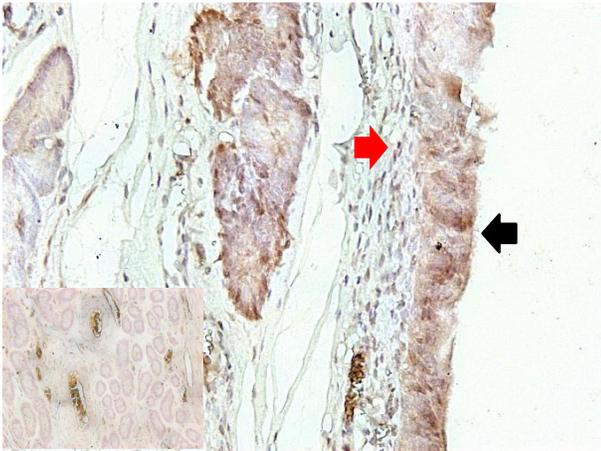
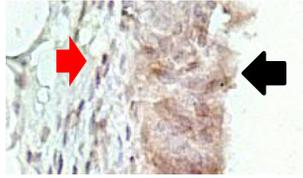
Día 12 del ciclo estral

 <p><b>Figura 79.</b> Fotomicrografía zona muscular 12 días CE 10X</p>	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Señal nuclear Media: <b>5/100 células</b></p>
 <p><b>Figura 80.</b> Fotomicrografía zona glandular 12 días CE 10X</p>	<p><b>Glandular</b></p>  <p>Señal nuclear Media: <b>37/100 glándulas</b></p>
 <p><b>Figura 81.</b> Fotomicrografía epitelio de revestimiento 12 días CE 10X</p>	<p><b>Epitelio de revestimiento</b></p>  <p>Señal citoplasmática homogénea intensa (Flechas negras)</p> <p><b>Células del tejido conjuntivo subepitelial</b></p> <p>Señal nuclear (Flechas rojas) Media: <b>19/100 células</b></p>

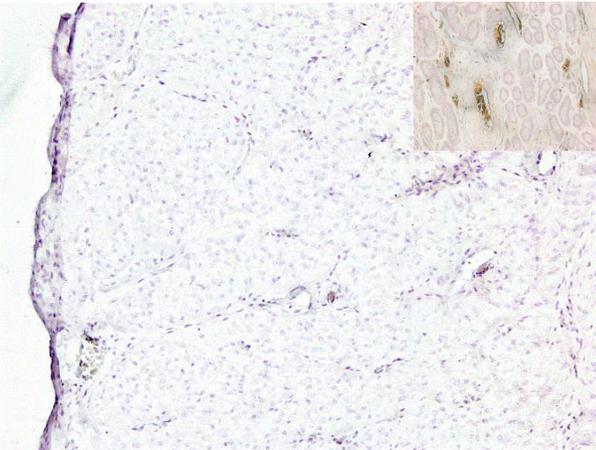
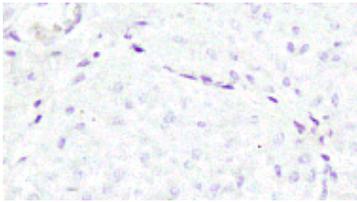
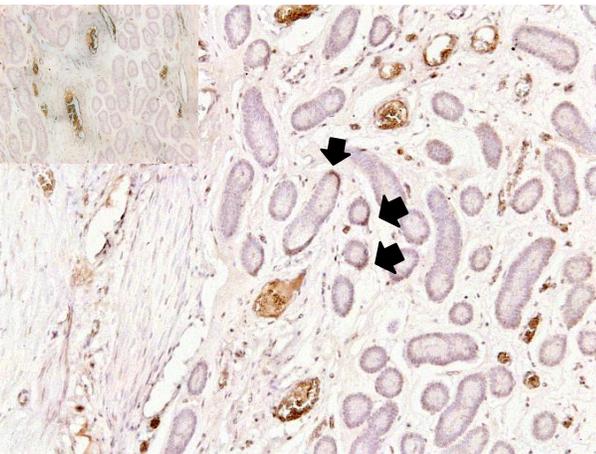
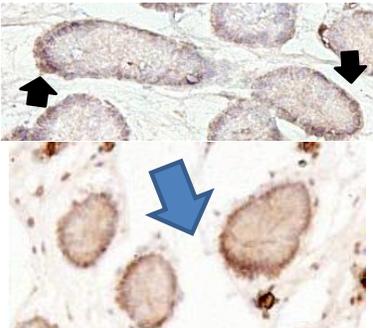
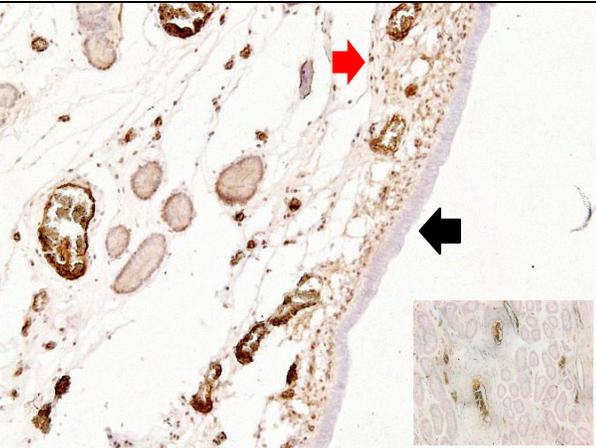
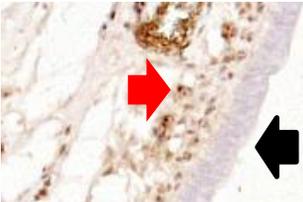
**Día 17 del ciclo estral**

 <p><b>Figura 82.</b> Fotomicrografía zona muscular 17 días CE 10X</p>	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Señal nuclear Media: <b>23/100 células</b></p>
 <p><b>Figura 83.</b> Fotomicrografía zona glandular 17 días CE 10X</p>	<p><b>Glandular</b></p>  <p><i>Glándulas hacia el miometrio:</i> Señal nuclear (Flecha negra) <i>Glándulas hacia la luz uterina:</i> Señal nuclear más señal citoplasmática homogénea moderada y extracelular (Flecha azul) Media: <b>69/100 glándulas</b></p>
 <p><b>Figura 84.</b> Fotomicrografía epitelio de revestimiento 17 días CE 10X</p>	<p><b>Epitelio de revestimiento</b></p>  <p>Señal citoplasmática granular tenua, sobre todo en zona de plegamientos de tejido (Flechas negras)</p> <p><b>Células del tejido conjuntivo subepitelial</b></p> <p>Señal nuclear (Flechas rojas) Media: <b>34/100 células</b></p>

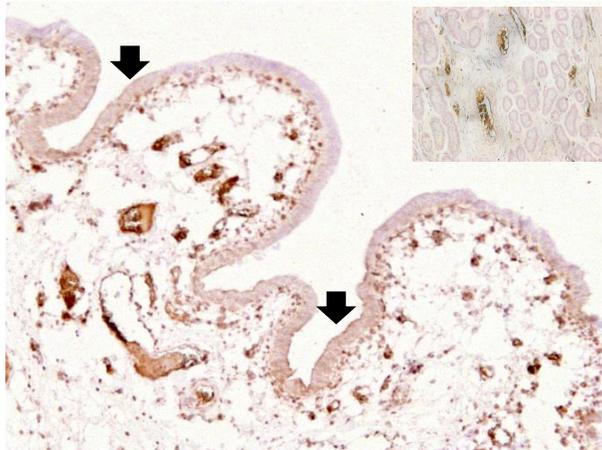
**Día 21 del ciclo estral**

 <p><b>Figura 85.</b> Fotomicrografía zona muscular 21 días CE 10X</p>	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Señal nuclear Media: <b>17/100 células</b></p>
 <p><b>Figura 86.</b> Fotomicrografía zona glandular 21 días CE 10X</p>	<p><b>Glandular</b></p>  <p>Señal nuclear más señal citoplasmática homogénea moderada Media: <b>78/100 glándulas</b></p>
 <p><b>Figura 87.</b> Fotomicrografía epitelio de revestimiento 21 días CE 20X</p>	<p><b>Epitelio de revestimiento</b></p>  <p>Señal citoplasmática homogénea moderada (Flecha negra)</p> <p><b>Células del tejido conjuntivo subepitelial</b></p> <p>Señal nuclear (Flechas rojas) Media: <b>47/100 células</b></p>

**Día 12 de gestación**

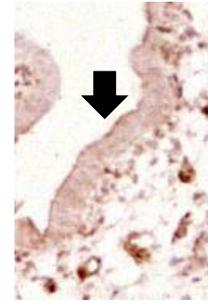
 <p><b>Figura 88.</b> Fotomicrografía zona muscular 12 días Gx 10X</p>	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Sin señal</p>
 <p><b>Figura 89.</b> Fotomicrografía zona glandular 12 días Gx 10X</p>	<p><b>Glandular</b></p>  <p>Glándulas hacia el miometrio: Señal nuclear (Flechas negras).</p> <p>Glándulas hacia la luz uterina: Señal nuclear más señal citoplasmática granular tenue (Flecha azul)</p> <p>Media: <b>77/100 glándulas</b></p>
 <p><b>Figura 90.</b> Fotomicrografía epitelio de revestimiento 12 días Gx 10X</p>	<p><b>Epitelio de revestimiento</b></p>  <p>Sin señal (Flecha negra)</p> <p><b>Células del tejido conjuntivo subepitelial</b></p> <p>Señal nuclear (Flechas rojas)</p> <p>Media: <b>47/100 células</b></p>

### Zona de plegamiento de tejido



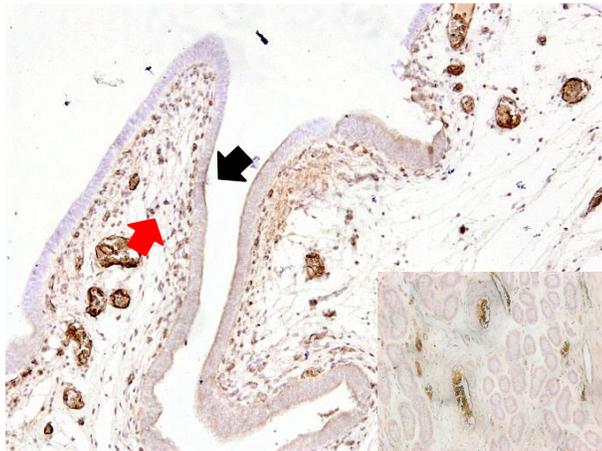
**Figura 91.** Fotomicrografía zona de plegamiento uterino día 12 de Gx 10X

### Epitelio de revestimiento



Señal citoplasmática homogénea tenue con reforzamiento membranal apical.

### Vellosidad uterina



**Figura 92.** Vellosidad uterina 12 días de Gx 10X

### Epitelio de revestimiento



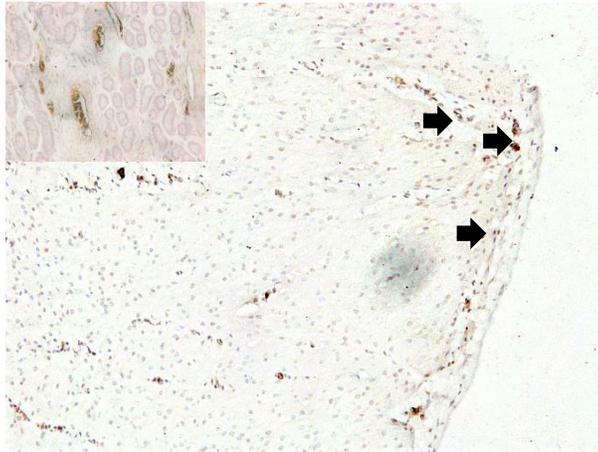
Señal citoplasmática homogénea tenue con reforzamiento membranal apical

### Células del tejido conjuntivo subepitelial

### Señal nuclear (Flecha roja)

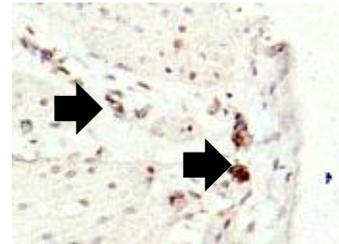
Nótese como se agregan las células del tejido conjuntivo dentro de toda el área ocupada por la digitación de la vellosidad.

**Día 16 de gestación**

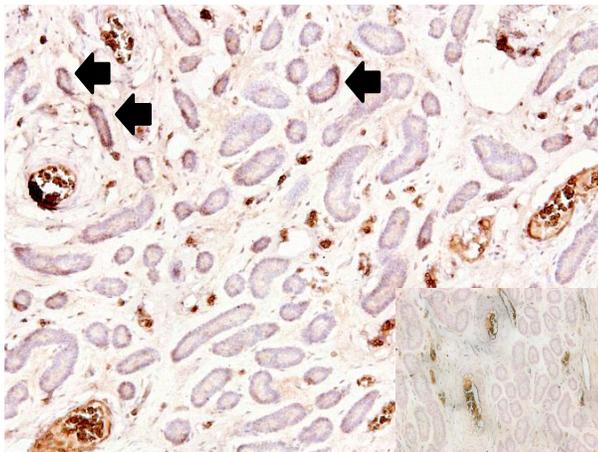


**Figura 93.** Fotomicrografía zona muscular 16 días de Gx 10X

**Muscular**

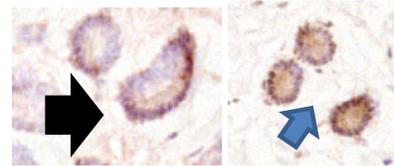


Señal nuclear  
Media: **9/100 células**

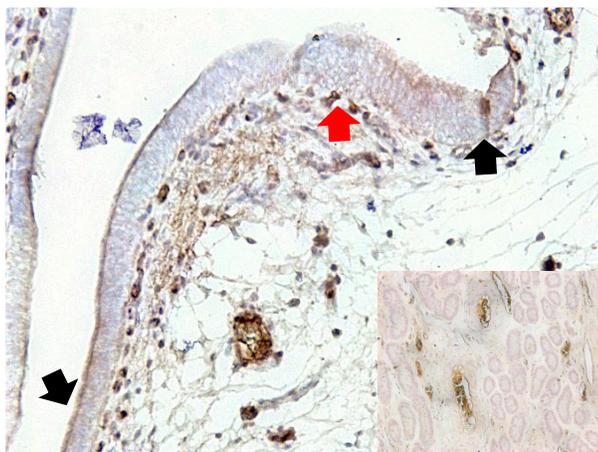


**Figura 94.** Fotomicrografía zona glandular 16 días de Gx 10X

**Glandular**

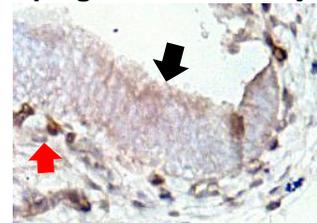


Glándulas hacia el miometrio:  
Señal nuclear (Flecha negra)  
Glándulas hacia la luz uterina:  
Señal nuclear más señal  
citoplasmática homogénea  
moderada (Flecha azul)  
Media: **70/100 glándulas**



**Figura 95.** Fotomicrografía epitelio de revestimiento de plegamiento de tejido 16 días Gx 20X

**Epitelio de revestimiento de los plegamientos de tejido**

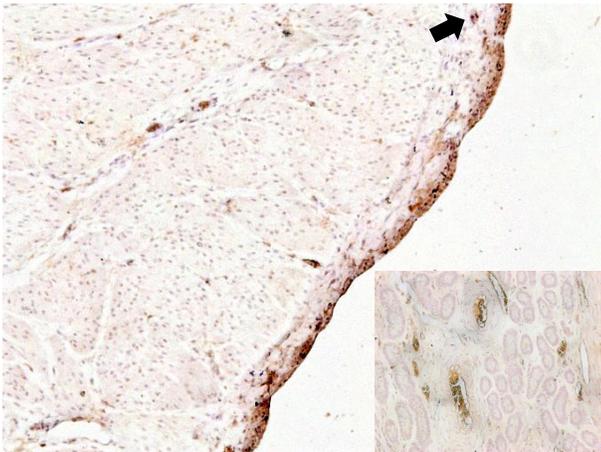
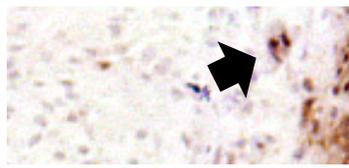
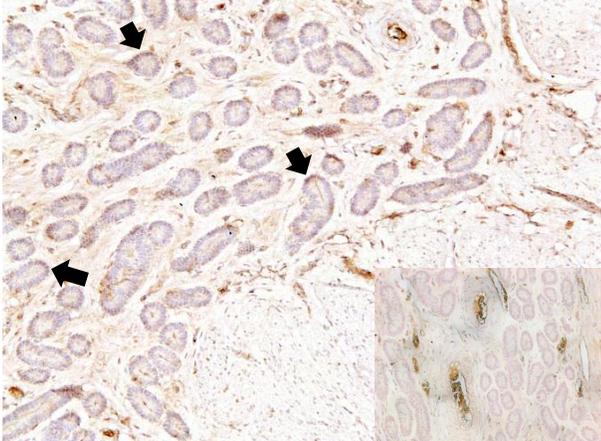
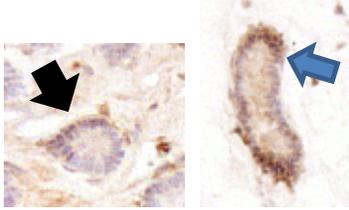
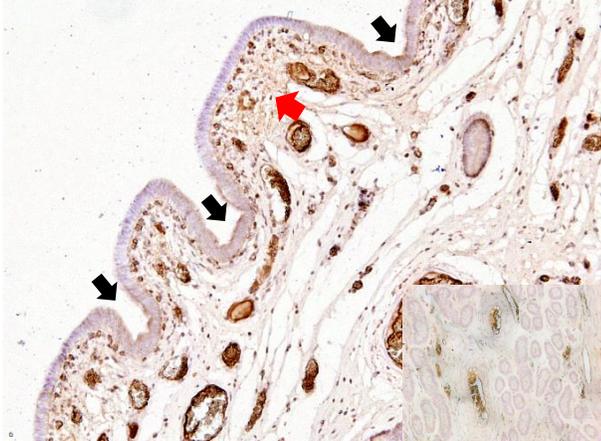
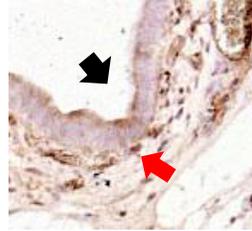


Señal citoplasmática granular tenue más reforzamiento membranal lateral y apical (Flecha negra)

**Células del tejido conjuntivo subepitelial**

Señal nuclear (Flecha rojas)  
Media: **24/100 células**

**Día 18 de gestación**

	<p><b>Muscular</b></p>  <p>Señal nuclear Media: <b>4/100 células</b></p>
	<p><b>Glandular</b></p>  <p><i>Glándulas cercanas al miometrio:</i> Señal nuclear (Flecha negra) <i>Glándulas hacia la luz uterina:</i> Señal nuclear más señal citoplasmática homogénea tenue (Flecha azul) Media: <b>65/100 glándulas</b></p>
	<p><b>Epitelio de revestimiento de los plegamientos de tejido</b></p>  <p>Señal citoplasmática tenue con reforzamiento membranal lateral y apical (Flechas negras)</p> <p><b>Células del tejido conjuntivo subepitelial</b> Señal nuclear (Flecha roja) Media: <b>19/100 células</b></p>

**Cuadro 3.** Distribución de la señal en las distintas estructuras histológicas por factor de crecimiento durante el ciclo estral

ZONA	FGF10			HGF		
	12CE	17CE	21CE	12CE	17CE	21CE
<b>Células musculares</b>						
• Núcleos con señal	++	+	++	+/-	+	+
<b>Glándulas</b>						
• Glándulas con señal	+++	+++	+++	+	++	+++
• Citoplasmática	M	T (MI) M (EP)	I		M(EP)	M
• Nuclear				✓	✓	✓
• Membranal		✓(EP)				
• Extracelular		✓(EP)			✓(EP)	
<b>Células conjuntivas subepiteliales</b>						
• Núcleos con señal	++	++	++	+	+	++
<b>Células epiteliales de revestimiento</b>						
• Citoplasmática	M	M	I	I	T	M
• Membranal	✓	✓	✓			
- sin señal +/- 1 a 10 estructuras + 11 a 40 estructuras ++ 41 a 70 estructuras +++ 71 a 100 estructuras	MI: estructuras hacia el miometrio EP: estructuras hacia la luz uterina (Epitelio de revestimiento) T: señal tenue M: señal moderada I: Señal intensa					

**Cuadro 4.** Distribución de la señal en las distintas estructuras histológicas por factor de crecimiento durante la gestación temprana.

ZONA	FGF10			HGF		
	12Gx	16Gx	18Gx	12Gx	16Gx	18Gx
<b>Células musculares</b>						
• Nucleos con señal	+	+	+/-	-	+/-	+/-
<b>Glándulas</b>						
• Glándulas con señal	+++	+++	+++	+++	++	++
• Citoplasmática	T (MI) M(EP)	T (MI) M(EP)	T o M	T(EP)	M(EP)	T(EP)
• Nuclear				✓	✓	✓
• Membranal	✓	✓	✓			
• Extracelular	✓(EP)	✓	✓			
<b>Células conjuntivas subepiteliales</b>						
• Núcleos con señal	+++	++	++	++	+	++
<b>Células epiteliales de revestimiento*</b>						
• Citoplasmática	-	-	-	-	-	-
<b>VELLOSIDADES UTERINAS</b>						
<b>Células epiteliales de revestimiento</b>						
• Citoplasmático	I	M	M	T	T	T
• Membranal	✓	✓	✓	✓	✓	✓
- sin señal +/- 1 a 10 estructuras + 11 a 40 estructuras ++ 41 a 70 estructuras +++ 71 a 100 estructuras			MI: estructuras hacia el miometrio EP: estructuras hacia la luz uterina (Epitelio de revestimiento) T: señal tenue M: señal moderada I: Señal intensa			

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Cambios histológicos y patrones de señalización de FGF10 y HGF en el ciclo estral

De forma integral, la presencia de las proteínas FGF10 y HGF en el útero de cerda empiezan a aumentar conforme los días del ciclo, así, tenemos una expresión menor en el día 12 y una expresión máxima para el día 21. Este patrón de expresión coincide con estudios realizados por Chen Chen et al (2000), quienes buscaron al HGF y al FGF10 en endometrio de borregas utilizando la técnica de PCR. Ellos reportan para HGF una disminución en los días 7 al 13 del ciclo estral, para luego incrementar en el día 15, y para FGF10 un aumento en el día 5 del ciclo que se mantiene hasta el día 15. <sup>(36,37)</sup>

Los cambios en la presencia e intensidad de la señal para FGF10 y HGF están relacionados con la zona histológica analizada. Bajo esta premisa, tenemos que en el día 12 del ciclo estral el epitelio de revestimiento es cilíndrico simple, pero para el día 17 del ciclo el patrón histológico en el epitelio parece relacionarse con la disposición de las estructuras subepiteliales. De hecho, se observaron zonas en donde las glándulas endometriales se desplazan hacia la zona muscular y los vasos sanguíneos hacia el epitelio de revestimiento el cual es pseudoestratificado, señalando una posible proliferación celular epitelial.

Es probable que el patrón de expresión de los factores de crecimiento (FC) estudiados, corresponda con la dinámica en la morfología del epitelio de revestimiento. Mientras que en el día 12 el FGF10 presenta una señal citoplasmática moderada, para el día 21 del ciclo la señal citoplasmática es intensa. Al contrario de FGF10, HGF muestra en el día 12 una señal homogénea intensa, pero para el día 17 la señal disminuye, sin embargo, para el día 21 del ciclo hay un repunte de producción de ambos FC (FGF10 y HGF) que corresponde con un epitelio muy desarrollado, con células muy altas y abundantes en disposición pseudoestratificada y con vasos sanguíneos igualmente, en desarrollo y en proliferación que han tomado una localización subepitelial o muy cercana a

ella. Con lo anterior se puede inferir que tanto HGF en el día 12 como FGF10 en el día 21, podrían estar involucrados tanto en la proliferación como en la angiogénesis celular. De hecho, ha sido documentado que HGF y FGF7, miembro de la misma familia del FGF10, actúan promoviendo proliferación y diferenciación celular. Adicionalmente, HGF se ha reportado como factor angiogénico, pues en un medio hipóxico, por ejemplo, en el centro de un tumor en crecimiento *tanto in vitro* como *in vivo* se activa su receptor c-MET; he interesantemente es un mecanismo similar por el que se activa el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG).<sup>(37-39)</sup>

En la zona subepitelial se observa la presencia de un conjunto de células estromales cuya agrupación se encuentra muy cercana a la lámina basal de las células epiteliales de revestimiento y que son evidenciadas por la tinción de sus núcleos. Estas células estromales presentan una señal de tipo nuclear para ambos FC analizados. Así, en esta zona, HGF es predominante en el día 21 del ciclo estral, mientras que FGF10 lo es en los tres días del ciclo analizados (12, 17 y 21 días). Cabe recordar que tanto HGF como FGF10 se han reportado como factores producidos por células estromales cuya función es mediar la interacción de forma paracrina con el epitelio de revestimiento. La participación de estos FC dentro del núcleo de las células subepiteliales se detalla más adelante.<sup>(38,40)</sup>

Mientras tanto, en la zona glandular el patrón histológico y de señalización de FC parece aumentar conforme los días del ciclo estral, sobre todo en las glándulas localizadas cerca de la luz uterina, en donde, tanto para FGF10 como para HGF se presenta señal extracelular glandular. Este hecho también pudo observarse en el endometrio de borregas a través de la técnica de hibridización *in situ*, en donde la expresión del mRNA c-MET en las glándulas cercanas a la luz fue similar a la expresión por el epitelio luminal pero menor en las glándulas cercanas al miometrio.<sup>(36)</sup>

## **7.2 Cambios histológicos y patrones de señalización del FGF10 y HGF en gestación temprana**

Cuando se suma la señal total presentada en las distintas zonas histológicas del endometrio podemos concluir que la localización de la proteína del FGF10 se mantiene en un nivel alto de expresión durante el día 12 y 16 de gestación, mientras que para HGF su localización es moderada en el día 12 y en el día 16. Sin embargo, para ambos FC su señalización disminuye en el día 18. Estos resultados coinciden con lo reportado por Chen Chen et al (2000) para el caso de HGF y Hakhyun Ka et al (2000) para FGF10, ambos investigadores buscando la expresión de mRNA. <sup>(36,40)</sup>

En los análisis histológicos durante los días de gestación temprana se observó que la clave en el desarrollo y localización de estructuras histológicas, así como en la distribución e intensidad de la señal de los FC, fueron las proliferaciones endometriales que dan la apariencia de vellosidades uterinas, y que estuvieron presentes desde el día 12 de gestación. Estas proliferaciones endometriales podrían estar implicadas directamente con el proceso de implantación embrionaria, por ejemplo: el epitelio de revestimiento en el día 12 de gestación se observó pseudoestratificado, pero interesantemente en el día 16 de gestación parece tener una regresión hacia cilíndrico simple, excepto en las zonas donde se presentan vellosidades, que permaneció pseudoestratificado. Esta permanencia puede ser explicada gracias a los trabajos de Vibeke Dantzer et al (1985) en donde a través de microscopía electrónica se pudo observar que en muestras uterinas de cerdo estas prolongaciones endometriales son cubiertas por las prolongaciones o vellosidades coriónicas, por lo que se puede inferir que las elongaciones en el endometrio son el sitio de interacción básico con el trofoblasto embrionario. Adicionalmente, Rami T. Kridlise et al (2016) también hace mención que dichas protusiones endometriales sostienen al embrión en su sitio de implantación desde el día 13 y 14 de gestación. <sup>(28,41)</sup>

La regresión del tejido en el día 16 también fue observada por Vibeke, y la explicación que da a este suceso es que para este día la superficie materna y fetal

está ya en contacto íntimo, por lo que ahora las estructuras que deben desarrollarse son interdigitaciones y microvellosidades en cada lado de la interfase materna fetal. <sup>(41)</sup>

Otro ejemplo de cambio histológico relacionado con la presencia de vellosidades uterinas y en forma similar a lo descrito en el ciclo estral es la disposición de las glándulas, así, fuera de zona de vellosidades estas se desarrollan y toman una forma contorneada, mientras que en las zonas de formación de vellosidades las glándulas son desplazadas hacia la muscular, por lo que: la zona subepitelial aumenta, los vasos sanguíneos que estarían ubicados en la zona glandular se desarrollan hasta alcanzar un gran diámetro y parecen migrar hacia la luz uterina, mientras que los vasos sanguíneos que se ubican muy cerca de la lámina basal del epitelio de revestimiento proliferan. De hecho, las vellosidades ya formadas, carecen de glándulas, y en su lugar, cuentan con gran cantidad de vasos sanguíneos en relación íntima y tapizando la lámina basal del epitelio de revestimiento, lo cual coincide con reportes que indican que alrededor de los días 13 a 18 de gestación los mayores cambios vasculares y angiogénicos ocurren en el endometrio para soportar el crecimiento y desarrollo del embrión, este aumento en la angiogénesis endometrial en cerdo se le ha atribuido a la secreción trofoblástica de interferones (INT) en adición a otros factores como el VEGF. Estudios en rumiantes han demostrado que la suplementación de FGF10 en un medio de cultivo de blastocitos estimula la producción del mRNA interferón tau (INT-t) por lo que con los resultados observados no descartamos la participación sinérgica del HGF y del FGF10 en el endometrio, sin embargo se necesitan de estudios complementarios para afirmar o descartar esta hipótesis. <sup>(14, 26,40)</sup>

La señal de FC parece estar secuestrada también por las vellosidades, por ejemplo, para FGF10 y en cierto grado para HGF desde el día 12 de gestación, el epitelio de revestimiento que no es parte de una vellosidad carece de señal, mientras que en la zona de vellosidades la señal en el epitelio de revestimiento es citoplasmática intensa con un reforzamiento apical muy evidente. Este tipo de señalización sostiene la premisa de que las prolongaciones endometriales en

cerdo son las estructuras más importantes para el intercambio molecular con el embrión y la presencia cercana a la luz uterina tanto de FGF10 como de HGF en estas estructuras podrían ser claves en el desarrollo de ciertos procesos celulares determinantes para la implantación y la embriogénesis en general. Con base en esto, cabe destacar las señales dirigidas por HGF y su receptor c-MET.

Fisiológicamente la unión de HGF con c-MET es responsable de la migración celular epitelial, proceso clave durante la embriogénesis. Para lograr dicho proceso, el binomio HGF/ c-MET estimula una pérdida de la tensión de las fibras de actina con una consiguiente pérdida de complejos de unión celular dirigidas por cadherinas, esto ocasiona que las células epiteliales pierdan su polaridad, tomen una morfología tipo fibroblasto y se movilizan, pero interesantemente, y en un proceso contrario, HGF y c-MET están implicados en la adhesión celular a través de la interacción con integrinas, lo cual denota una importante participación en la implantación embrionaria. Por otro lado, por su localización en el epitelio luminal y por la presencia de una señal extracelular en las glándulas inmediatas a las vellosidades se ha propuesto en rumiantes que FGF10 puede ser secretada al lumen uterino, donde estará disponible para su unión con el receptor FGFR2 en el embrión y contribuir con la elongación trofoblástica y la posible producción de otras moléculas como el INT-t. <sup>(36, 40,41)</sup>

Una de las señales más interesantes observadas fue la presentada en las células estromales. Las células estromales particularmente en la zona inmediata a la lámina basal de las células epiteliales de revestimiento formaron una banda celular cuyos núcleos se tiñeron ante la presencia de HGF y de FGF10. La señalización en esta zona del tejido se ha observado también para FGF2 en cerdos y para FGF10 en ovejas. <sup>(37,42,44)</sup>

Como se ha mencionado, tanto FGF10 como HGF son factores que se producen en las células estromales, y es a partir de estas células que se determina la distribución de ambas moléculas en las distintas regiones del tejido. Dicha regulación depende de la interacción de HGF y FGF10 con la membrana extracelular y es que para que se activen sus receptores necesitan unirse a

heparán sulfatos proteoglicanos presentes en la membrana extracelular o en la superficie membranal, como las decorinas, sindecanos y biglicanos. La abundancia de sitios de unión en la matriz extracelular y en las membranas basales permiten una acumulación local de FC y su liberación espacio temporal controlada o bien su almacenamiento, pero además, los heparán sulfatos proteoglicanos estabilizan el binomio FC-receptor protegiéndolo de la degradación por proteasas. <sup>(21,43,45-47)</sup>

Con base en los anterior, se puede especular que las células estromales regulan la presentación y secreción de HGF y FGF10 por las células epiteliales de revestimiento, y estos FC a su vez, regulan la proliferación y morfogénesis epitelial, pero entonces. ¿Cómo se explica la presencia de la proteína HGF y FGF10 dentro del núcleo celular con una señal en ocasiones tan intensa como en el día 12 de gestación que da una apariencia de collar de perlas? Se ha reportado en fibroblastos que el complejo FGF2 con su receptor FGFR1 se transloca hacia el núcleo y dicha translocación se ha relacionado con la proliferación de células gliales en humanos. Welter y colaboradores hacen mención que en cerdos la internalización del complejo FGF2-FGFR1 está envuelta en el control del crecimiento y proliferación de las células estromales y epiteliales endometriales, por lo que no descartamos un proceso similar para HGF y FGF10. Por otro lado, el patrón de collar de perlas que se observó en el día 12 de gestación para FGF10 podría tratarse, además de una señal nuclear, de estructuras de almacenamiento, de forma similar a como se almacena el INT gamma en el endometrio de cerdo; esta molécula se localiza en forma de racimos en membranas perinucleares ocupadas por el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Cabe destacar que para HGF también se presentó señal nuclear en las células epiteliales glandulares. <sup>(11,37,44)</sup>

En el día 16 de gestación las vellosidades parecen tener un menor grado de desarrollo que en el día 12 de gestación. Esta falta de crecimiento podría corresponder con que para FGF10 la señal en vellosidades disminuye, mientras

que para HGF se mantiene muy similar al día 12 de gestación. También, la señal nuclear de las células del tejido conjuntivo disminuye para ambos FC.

Finalmente, en el día 18 de gestación las células estromales subepiteliales han perdido su típica aglomeración subepitelial para presentarse en una forma dispersa. Contrariamente, las vellosidades continuaron su desarrollo y ahora tienen una apariencia ramificada, todas las glándulas se observaron enroscadas y se ven totalmente desplazadas hacia la muscular. A pesar del crecimiento longitudinal de las vellosidades, la señalización de FC, se ve disminuida.

### **7.3 Interacción de FGF10 y HGF con otras moléculas**

Durante el desarrollo de esta discusión se mencionó la interacción del VEGF con HGF, sin embargo, se han reportado otras interacciones, entre ellas encontramos, la interacción de FGF10 con FGF2, miembro de la misma familia, y es que en una producción de embriones *in vivo* FGF1 y FGF10 son detectables si se adiciona FGF2.<sup>(42)</sup>

Otros FC que activan al receptor de HGF c-MET son el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF). El EGF se ha descrito en el epitelio luminal en el sitio de adhesión del blastocito 6-7 horas antes de iniciada la implantación y además estimula la activación de integrinas, moléculas que también interactúan con HGF. <sup>(36, 37,47)</sup>

Otras citoquinas inflamatorias como IL1, IL6 y el TNF podrían afectar positivamente la producción de HGF y su receptor. IL1 está relacionado en porcinos con la elongación de los embriones en el día 12 de gestación y con el aumento de la fluidez de membrana que ayuda a la migración celular, proceso en el que también participa HGF. Por otro lado, el TNF en humanos y ratones se ha asociado con pérdida de la gestación debido a que el TNF es capaz de activar señalizaciones proapoptóticas sin embargo, también es capaz de activar señales antiapoptóticas. <sup>(11,16,28,36)</sup>

En conclusión, enfatizamos que, la placenta tipo epiteliocorial por su nula invasión se ha considerado una forma de placentación primitiva que presenta procesos

celulares conservados para los mamíferos, por lo que su estudio podría impactar no solo en el cerdo si no en la reproducción de las distintas especies domésticas así como silvestres.<sup>(49)</sup>

El presente proyecto tuvo como objetivo el encontrar presencia o ausencia de FGF10 y HGF en las células uterinas de cerda domestica durante la implantación embrionaria temprana, así como de describir la distribución de la señal obtenida por inmunohistoquímica dentro del tejido uterino, sin embargo, estudios posteriores se requieren para conocer la concentración exacta de proteína por factor de crecimiento presente, así como la funcionalidad de los mismos en esta etapa de comunicación materna embrionaria.

## 8. REFERENCIAS

1. Fontana VA. 2008. Citoquinas: el lenguaje del diálogo materno embrionario. *Química Viva*. 7(2):80-102. Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=86370202> [citado el 4 de julio de 2017]
2. Betancourt AM, Flores PF, Rosas VC, Pérez MM. 2006. Papel de las citocinas en la implantación embrionaria en mamíferos domésticos. *Revista Veterinaria México*. 37(3):335-350. Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=42337306> [citado el 4 de julio de 2017]
3. Langman J, Sadler TW, Leland J, Carreras GE, Vigo AM. 2016. *Embriología Médica: Langman*. 13<sup>o</sup>ed. Barcelona, España: Wolters Kluwer Health: 387 p.
4. Galina HC, Valencia MJ. 2012. *Reproducción de los animales domésticos*. 3<sup>o</sup> ed. México: Limusa: 582 p.
5. García MJ, Gil CF. 2013. *Embriología veterinaria: un enfoque dinámico del desarrollo animal*. Buenos Aires, República Argentina: Inter-Medica: 185 p.
6. Carlson BM. 2014. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 5<sup>o</sup>ed. Madrid, España: Elsevier: 527 p.
7. Córdova TA, Navarro MM, García AD. 2008. El proceso de compactación celular en el embrión temprano. *ContactoS*. 67:57-60. Disponible en: <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/index.php/Biblioteca/numeros-antteriores.html> [citado el 21 de octubre de 2018].
8. Hyttel P, Kamstrup KM, 2011. From Hatching into Fetal Life in the Pig. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39(Suppl1):s203-s221. Disponible en: <http://www.ufrgs.br/actavet/39-suple-1/039-s1.html>. [citado el 21 de octubre de 2018].
9. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJ, Palacios MJ. 2007. *Anatomía veterinaria*. 3<sup>o</sup>ed. México, D.F: Manual Moderno: 905 p.
10. Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted. 2010. *Essentials of domestic animal embryology*. China: Elsevier: 455p
11. Bazer FW, Johnson GA. 2014. Pig blastocyst uterine interactions. *Differentiation*. 87(1–2):52–65. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301468113000893> [citado el 5 de mayo de 2017]
12. Geneser F. 2003. *Histología sobre bases biomoleculares*. 3<sup>o</sup>ed. Madrid, España: Médica Panamericana. 813 p.

13. Aughey E, Frye FL, Johnston H. 2001. Comparative veterinary histology: with clinical correlates. Iowa, EUA: Manson Publishing: 296 p.
14. Knobil E, Neill JD, Knobil E. 2006. Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3<sup>o</sup>ed. Amsterdam: Países Bajos: Elsevier. 2684p.
15. Geisert RD, Bazer FW. 2015. Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals: Tribute to 45 Year Anniversary of Roger V. Short's "Maternal Recognition of Pregnancy". EUA: Springer: 271 p.
16. Bazer FW, Song G, Kim J, Dunlap KA, Satterfield MC, Johnson GA, et al. 2012. Uterine biology in pigs and sheep. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 3(1):1-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3436697/> [citado el 15 de mayo de 2017]
17. Geisert RD, Lucy MC, Whyte JJ, Ross JW, Mathew DJ. Cytokines from the pig conceptus: roles in conceptus development in pigs. 2014. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [Internet]. 5(51):1-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4247618/> [citado el 16 de mayo de 2017]
18. Scanes CG. 2003. Biology of growth of domestic animals. Iowa, EUA: Wiley Blackwell: 408 p.
19. Dorey K, Amaya E. 2010. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development*. 137:3731-3742. Disponible en: <http://dev.biologists.org/content/137/22/3731.full> [citado el 16 de mayo de 2017]
20. The Medical Biochemistry Page. 2018. Disponible en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/growth-factors-sp.php> [citado el 13 de abril de 2018]
21. Segura FA, Gálvez GF, Álvarez RA, Armendáriz BJ. 2004. Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y sus aplicaciones terapéuticas. *Revista de Gastroenterología México*. 69(4):243-250. Disponible en: [http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id\\_articulo=29515&id\\_seccion=57&id\\_ejemplar=3020&id\\_revista=10](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=29515&id_seccion=57&id_ejemplar=3020&id_revista=10) [citado el 13 de abril de 2018]
22. Ka H, Al-Ramadan S, Erikson WD, Johnson AG, Burghardt R, Spencer ET, et al. 2007. Regulation of expression of fibroblast growth factor 7 in the pig uterus by Progesterone and Estradiol. *Biology of Reproduction*. 77:172-180 |. Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.106.056309> [citado el 16 de mayo de 2017]

23. Fields SD, Hansen PJ, Ealy AD. 2011. Fibroblast growth factor requirements for in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*. 75(8):172–180. Disponible en: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(10\)00646-1/fulltext](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(10)00646-1/fulltext) [citado el 15 de mayo de 2017]
24. Zhang K, Hansen PJ, Ealy AD. 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction*.140(6):815–826. Disponible en: <http://www.reproduction-online.org/content/140/6/815> [citado el 15 de mayo de 2017]
25. Son YJ, Lee SE, Hyun H, Shin MY, Park YG, Jeong SG. 2017. Fibroblast growth factor 10 markedly improves in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*. 84:67-75. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.22756/full> [citado el 16 de mayo de 2017]
26. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. 2016. *Biología molecular de la célula*. 6º ed. España, Barcelona: Omega: 1350 p.
27. Karp G, Palacios MJ. 2008. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. 5ºed. México: Mc-Graw Hill: 727 p.
28. Kridli RT, Khalaj K, Bidarimath M, Tayade C. 2016. Placentation, maternal fetal interface, and conceptus loss in swine. *Theriogenology*. 85(1):135–144. Disponible en: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(15\)00424-0/fulltext](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(15)00424-0/fulltext) [citado el 15 de mayo de 2017]
29. Schencke C, del Sol M, Rojas M. 2004. Relación útero embrionaria y su variación morfológica durante el período implantacional en el conejo. *International Journal of morphology*. 22(4):313–322. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0717-95022004000400013&lng=es&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0717-95022004000400013&lng=es&nrm=iso&tlng=pt) [citado el 2 de agosto de 2018]
30. The Human Protein Atlas.2018.Disponible en: <http://www.proteinatlas.org/> [citado el 17 de abril de 2018]
31. Trueb B, Amann R, Gerber SD. 2013. Role of FGFR1 and other FGF signaling proteins in early kidney development. *Cellular and Molecular Life Science*. 70(14):2505–2518. Disponible en: <http://link.springer.com/article710.1007%2Fs00018-012-1189-9> [citado el 19 de marzo de 2018]
32. Gattai PP, Maquigussa E, da Silva Novaes A, da Silva Ribeiro R, Varela VA, Ormanji MS, et al. 2018. miR-26a modulates HGF and STAT3 effects on the kidney repair process in a glycerol-induced AKI model in rats. *Journal of Cell Biochemistry*. 1-10 Disponible en:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/29932234/> [citado el 3 de agosto de 2018]
33. BC Open Textbooks Adapted and Created by BC Faculty.2018. Disponible en: <https://opentextbc.ca/>[citado el 21 de octubre de 2018].
  34. Rashev P, Georgieva R, Rees D.2005. Expression of alpha5beta1 integrin and fibronectin during early pregnancy in pigs. *Folia Biologica (Praha)*. 51(5):121–5. Disponible en: <https://fb.cuni.cz/volume-51-2005-no-5#articFB2005A0022> [citado el 21 de octubre de 2018].
  35. Cristofolini A, Merkis C, Barroso F, Vaquer V, Lloret M, Moschetti E, et al. 2008. Detección de fibrinógeno, FAS B-10, FAS ZB4 y FAS C-20 durante la placentación porcina. *REDVET Revista Electrónica Veterinaria*. 9(7):1-10. Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=63617061007> [citado el 3 de agosto de 2018]
  36. Chen C, Spencer TE, Bazer FW. 2000. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*. 62(6):1844–1850. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/10819791/> [citado el 6 de julio de 2018]
  37. Chen C, Spencer TE, Bazer FW. 2000. Fibroblast growth factor-10: a stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*. 63(3):959–966. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/10952944/?i=1&from=fibroblast%20growth%20factor%2010%20a%20stromal%20mediator%20of> [citado el 5 de julio de 2018]
  38. Organ SL, Tsao MS. 2011. An overview of the c-MET signaling pathway. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*.3(1):7–19. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225017/> [citado el 27 de julio de 2018]
  39. Góngora A, Grajales H, Hernández A. 2002. Aspectos morfofisiológicos y endocrinos durante la implantación embrionaria en rumiantes. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 49(1):3–12. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevz/article/view/27932> [citado el 27 de julio de 2018]
  40. Ka H, Spenser ET, Johnson AG, Bazer FW. 2000. Keratinocyte Growth Factor: Expression by endometrial epithelia of the porcine uterus. *Biology of Reproduction*. 62:1772-1778. Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1095/biolreprod62.6.1772> [citado el 16 de mayo de 2017]

41. Dantzer V. Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. 1985. *Anatomy and Embryology*. 172(3):281–93. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00318976> [citado el 12 de julio de 2018]
42. Okumu LA, Forde N, Mamo S, McGettigan P, Mehta JP, Roche JF, et al. 2014. Temporal regulation of fibroblast growth factors and their receptors in the endometrium and conceptus during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. *Reproduction Cambridge England*. 147(6):825–834. Disponible en: <http://m.reproductiononline.org/content/147/6/825.long?view=long&pmid=24554351> [citado el 16 de julio de 2018]
43. Baldanzi G, Graziani A. 2014. Physiological signaling and structure of the HGF receptor MET. *Biomedicines*. 3(1):1–31. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5344233/> [citado el 16 de julio de 2018]
44. 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(3):295–304. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076004000226?via%3Dihub> [citado el 17 de julio de 2018]
45. Price AC. 2016. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *Journal of Endocrinology*. 228(2):31-43. Disponible en: <http://joe.endocrinology-journals.org/content/early/2015/11/05/JOE-15-0414.abstract> [citado el 17 de julio de 2018]
46. Dienstmann R, Rodon J, Prat A, Perez J, Adamo B, Felip E, et al. 2014. Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Annals of Oncology*. 25(3):552–563. Disponible en: <http://academic.oup.com/annonc/article/25/3/552/14384> [citado el 17 de julio de 2018]
47. Li Y, Sun C, Yates EA, Jiang C, Wilkinson MC, Fernig DG. 2016. Heparin binding preference and structures in the fibroblast growth factor family parallel their evolutionary diversification. *Open Biology*. 6(3):1-18. Disponible en: <http://rsob.royalsocietypublishing.org/content/6/3/150275.long> [citado el 17 de julio de 2018]
48. Paria BC, Song H, Dey SK. 2014. Implantation: molecular basis of embryo uterine dialogue. *The International Journal of Development Biology*. 45(3):597–605. Disponible en: <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=11417904> [citado el 28 de julio de 2018]

49. Sandra O. 2016. Hormonal control of implantation. *Annales d' Endocrinologie*. 77(2):63–66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed727172870/> [citado el 17 de julio de 2018]

# **9. APÉNDICE**

## 9.1 Apéndice protocolos

### 9.1.1 Trenes de soluciones

A continuación se presentan los distintos trenes de soluciones utilizados para los diferentes procedimientos dentro de la técnica de inmunohistoquímica.

#### ♣ Programa de histoquinete para parafinización.

Alcohol 70%	2 hrs
Alcohol 80%	2 hrs
Alcohol 96%	2 hrs
Alcohol 96%	2 hrs
Alcohol 96%	2 hrs
Alcohol absoluto	2 hrs
Xilol 50%- Alcohol absoluto 50%	2 hrs
Xileno	2 hrs
Xileno	2 hrs
Parafina 56°C-63°C	2 hrs
Parafina 56°C-63°C	2 hrs

---

#### ♣ Desparafinización para tinción H-E

Xilol 1	15min
Xilol 2	4min
OH-Xilol (1:1)	4min
OH 100%	4min
OH 96%	4min
OH70%	4min
H <sub>2</sub> O <sub>b</sub>	5min

---

#### ♣ Tiempos para tinción H-E

Hematoxilina	10 min
Lavar con agua corriente	5 min
Lavar con H <sub>2</sub> O <sub>b</sub>	5 min
Eosina	5-10 min
OH 70	4 min
OH 80	2 min
OH 96	2 min
OH 100	2 min

Xilol-OH (1:1)	2 min
Xilol sin parafina	Hasta ser montado en resina Entellan, Microscopy® OB 255405

### ♣ Desparafinización para inmunohistoquímica

Las laminillas con los cortes de tejido montados se colocaron en canastillas y se ingresaron a una estufa a 60°C por 30 minutos, posteriormente, fueron expuestas a los siguientes reactivos y tiempos:

Xilol	10 min
Xilol	5 min
OH-Xilol (1:1)	5 min
OH 100	5 min
OH 96	5 min
OH 96	5 min
OH 70	5 min
H <sub>2</sub> O <sub>b</sub>	5 min
H <sub>2</sub> O <sub>b</sub>	5 min

### 9.1.2 Soluciones

A continuación se presentan los protocolos para la elaboración de las distintas soluciones utilizadas durante la colección y tinción de muestras, así como en la inmunohistoquímica.

#### ♣ Paraformaldehído al 4% en PBS

Para preparar 1000mL de PFA4%.

1. Calentar a 60°C 800 mL de aguaMQ en microondas
2. Agregar 40gr de PFA (Aldrich® 441244) en la campana de extracción
3. Agrega una lenteja de NaOH (J.T Baker® 3724-01)
4. Agregar 100mL de PBS10x
5. Ajustar pH a 7.4
6. Aforar a 1000mL
7. Filtrar

## PB 0.2M

			H2Ob
A	Fosfato Na Dibásico Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma® S-7907)	5.5g	200mL
B	Fosfato Na Monobásico (J.T Baker® 381801)	25.4g	900mL

Tomar: de A 190 mL + B 810 mL = 1000mL

Ajustar pH a 7.4

---

## PBS 0.1M

Realizar una dilución 1:1 entre PB y H2Ob

Agregar 0.85% de NaCl (J.T Baker® 362401)

Ejemplo: 50mL PB 0.2M + 50mL H2Ob = 100mL + 0.85g de NaCl

Almacenar a 4°C

---

### ♣ Solución de gelatina.

Agua destilada	500mL
Gelatina nutritiva (Fluka analytical nutrient gelatin® 70151)	2.5 g
Sulfato de cromo y potasio (Fisher Chemicals chromium potassium sulfate® C337)	0.25g

1.- Calentar 500mL de H2Ob a 50°C.

2.- Colocar el agua en un agitador magnético.

3.- Agregar la gelatina.

4.- Agregar el sulfato de doble cromo y potasio.

5.- Filtrar.

6.- Colocar la gelatina en agua con hielo para bajar la temperatura de 50°C a temperatura ambiente.

### Tratamiento portaobjetos.

1.- Colocar las laminillas en canastillas.

2.- Colocar las canastillas bajo el siguiente tren:

- Acetona 2-3 minutos.
- Agua corriente 2 minutos

- Agua destilada 2 minutos
- Agua destilada 2 minutos
- Sumergir en gelatina 2 minutos

3.- Secar en horno a 60°C.

---

♣ **Immunoretriver (Citrato)**

Realizar una dilución 1:20 de Immunoretriver 20X (Bio SB ImmunoDNA Retriever 20X with Citrate® BSB 0020)

---

♣ **Tween 20 al 0.1%**

100mL PBS + 100µL de Tween 20 (Sigma de México® 9005-64-5).

---

♣ **Solución de Bloqueo**

<b>BSA</b> (Euro Clone®, Albumin Fraction V EMR086050)	<b>SUERO DE BURRO</b> (Jackson Immuno Research Normal Donkey Serum® 017-000-121)
0.3g de BSA para 3 mL de PBS-tween. Agitar en vortex	900µL de PBS-tween + 100 µL de suero de burro Agitar en vortex
Mezclar 1:1, por ejemplo, 1mL de suero+1mL de BSA	

---

♣ **Solución de revelado**

<b>Buffer</b> (Biocare medical® DAB Substrate Buffer DS854H)	1mL
<b>Diaminobencidina</b> (Biocare medical® DAB Chromogen DS851D)	1 gota
<b>Peróxido de hidrogeno al 3%</b> (Merck® Hydrogen peroxide 30% 1.07210.1250)	10 µL
<b>Níquel</b> (Vector Laboratories® SK 4100)	20µL

---

♣ **Eosina. Solución madre.**

<b>Eosina Y</b> (Sigma® E-6003)	10g
<b>H2O</b>	200mL
<b>OH96</b>	800mL

Al utilizarse.

Tomar 357mL de OH80% más 125mL de solución madre de eosina y agregar 2.5mL de ácido acético glacial (0.5mL de ácido por cada 100mL de solución).

♠ **Hematoxilina de Gill**

1.- Mezclar 730mL de H<sub>2</sub>O más 250 mL de etilenglicol (J.T Baker® 9300-02). Mezclar 30 minutos.

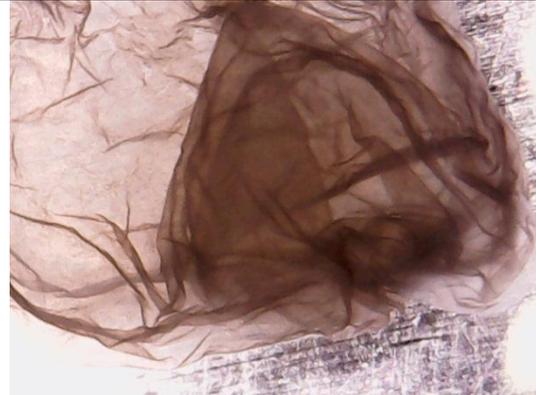
2.- Agregar 2g de hematoxilina anhidra en polvo (Spectrum Chemical® HE115-5GM) y agitar 30 minutos.

3.- Adicionar 0.2g de yodato de sodio (Merck® 106525) y agitar 30 minutos.

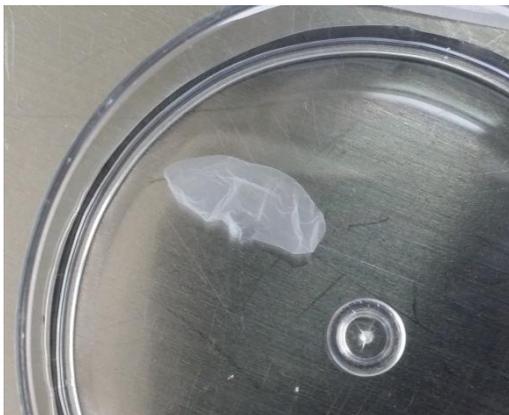
4.- Adicionar 17g de sulfato de amonio (General Chemical división cristal® 1316), mezclar 4 horas, pero a las 3.5 horas agregar 0.2 mL de ácido acético glacial (Merck Ácido acético (glaciale) 100%® 1000631000) y completar las 4 horas en agitación.

## 9.2 Atlas de embriones observados

### Embriones ovoides 8 días de gestación



### Embriones tubulares 8 días de gestación



**Embriones elongados 12 días de gestación**



**Embriones elongados 21 días de gestación (*in situ*)**

