

# **Estudio de Genes Involucrados en el Reconocimiento Materno de la Preñez en Camélidos Sudamericanos**



**Lic. Daniela E. Barraza**

**2018**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN**  
**FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE GENES INVOLUCRADOS  
EN EL RECONOCIMIENTO MATERNO  
DE LA PREÑEZ EN CAMÉLIDOS  
SUDAMERICANOS**

**Daniela Barraza**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN**  
**FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA**

**HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO**

Mag. Adriana Correa Zeballos

Dr. Manuel Javier Aybar

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano

Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra

Dra. María Antonieta Gordillo

Bioq. Esp. Vanesa Estela Quiroga

Sr. Mario Rodríguez

Sr. Joaquín Hernán Vargas

Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez

Srta. Karen Nahir Ríos

**DECANO**

Dr. Edgardo Hugo Cutin

**VICE-DECANA**

Dra. Inés del Carmen Ramos

**SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS**

Dra. Marta Elena Cecilia

**JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO**

Lic. Marta Inés Quinteros

## **DEPARTAMENTO DE POSGRADO**

### **AUTORIDADES:**

#### **DIRECTOR:**

Dr. Sergio Enrique Pasteris

#### **CONSEJO TITULAR:**

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudio

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

#### **Suplentes**

Dra. Maria Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

Dra. Claudia Alejandra Crespo

Dra. María Angélica Véliz

### **REPRESENTANTE DE POSGRADO**

### **ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT**

Dra. Paula Andrea Vincent



**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO  
ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTORA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)  
Resolución n°: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)  
Resolución n°: Resolución 750- CONEAU -13

**Director:**

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

**Vice-Directora:**

Dra. Lucia Claps

**Comité Académico:**


Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Silvina Fadda

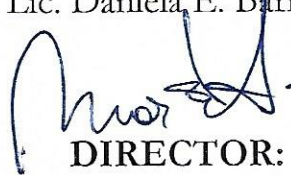
**TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:**

**ESTUDIO DE GENES INVOLUCRADOS EN EL  
RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ EN  
CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS**



**TESISTA:**

Lic. Daniela E. Barraza



**DIRECTOR:**

Dr. Martin E. Argañaraz



**CO-DIRECTORA:**

Dra. Silvana A. Apichela

**COMISION DE SUPERVISION :**

Dr. Federico Bonilla

Dra. María Guadalupe Vizoso Pinto

Dr. Martin E. Argañaraz

Dra. Silvana A. Apichela

Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en:

**Instituto de Biología “Dr. Francisco Barbieri”**

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia

Universidad Nacional de Tucumán

**Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO)**

CONICET-UNT

El apoyo financiero fue otorgado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT)

Los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos científicos.

## **PUBLICACIONES**

Changes in mucins and matrix metalloproteases in the endometrium of early pregnant alpacas (*Vicugna pacos*). (2018). Barraza, D. E., Zampini, R., Apichela, S. A., Pacheco, J. I., & Argañaraz, M. E. *Acta Histochemica*, 120(5), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.05.009>

## **PUBLICACIONES EN GENBANK**

Barraza, D.E., Apichela, S.A. y Argañaraz, M.E. (2016). *Lama glama* metalloprotease 14 (MMP-14) mRNA, parcial cds. Genbank accession number KX302287.

Barraza, D.E., Apichela, S.A. y Argañaraz, M.E. (2016). *Lama glama* mucin 1 (MUC 1) mRNA, parcial cds. Genbank accession number KX302284.

Barraza, D.E., Apichela, S.A. y Argañaraz, M.E. (2016). *Lama glama* basigin (BSG) mRNA, parcial cds. Genbank accession number KX302285.

Barraza, D.E., Apichela, S.A. y Argañaraz, M.E. (2016). *Lama glama* legumain (LGMN) mRNA, parcial cds. Genbank accession number KX302286.

## **PUBLICACIÓN DE RESÚMENES DE CONGRESOS EN REVISTAS INTERNACIONALES**

“Análisis del colágeno endometrial durante el periodo preimplantacional de la preñez en alpacas (*Vicugna pacos*)”. V Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal). Buenos Aires, Argentina. Mayo de 2017.

“Comparación de la Distribución de las fibras de colágeno en los cuernos uterinos (CUs) de Alpacas, durante la preñez temprana”. XXXIII Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. Tañi del Valle, Tucumán, Argentina. Octubre 2016.

“Estudio Diferencial de la Expresión de Genes Involucrados en el Reconocimiento Materno de la Preñez en los Cuernos Uterinos de Llama (Lama glama)”. 3ra Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. Septiembre 2015.

“Estudio Diferencial de la Expresión de Metaloproteasas de Matriz (MMPs) y sus Inhibidores (TIMPs) en los Cuernos Uterinos de Llama”. IV Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal-INITRA. Buenos Aires, Argentina. Octubre de 2014.

*Ciencia significa caminar constantemente por la cuerda floja entre la fe ciega y la curiosidad; entre la experiencia y la creatividad; entre el sesgo y la apertura; entre la experiencia y la epifanía; entre la ambición y la pasión; y entre la arrogancia y la convicción, en resumen, entre el presente y el futuro.*

*Heinrich Rehrer*

*A mis padres, Elsa y Tomás*

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que me acompañaron en este camino.

A la Universidad Pública y Gratuita, que me permitió formarme académicamente.

A mis directores de Tesis Martín Argañaraz y Silvana Apíchela, por darme la oportunidad y creer en mí para desarrollar este trabajo de investigación. Por guiarme, por sus enseñanzas y dedicación.

A Guadalupe Vizoso y Federico Bonilla, miembros de la Comisión de Supervisión de mi Tesis, porque cada uno desde su lugar y formación realizó aportes valiosos que enriquecieron mi trabajo.

A la Dra. Dora Miceli, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y por su colaboración durante mi trabajo de investigación.

A todos mis compañeros de trabajo en especial a Marie, Cris, Andre, Pablo, Gaby, Henry, Nuni y Danchi por ayudarme, por escucharme, por acompañarme y aconsejarme durante la realización de este trabajo. Porque fueron mi familia en estos últimos años.

A Vane y Daniel, por su calidad humana y profesional, gracias por brindarme su colaboración, por sus consejos y sugerencias durante la realización de este trabajo de investigación.

A mis compañeros Luchi y Renato, por acompañarme, ayudarme tanto a nivel personal como durante la realización de este trabajo, por su amistad y por hacer que el ambiente laboral sea agradable.



A mis amigos del primer piso, en especial a Ceci, Jorge y Mariano por bancarme en los momentos más difíciles, por sus consejos, por su calidad humana, por su amistad sincera y por todos los momentos compartidos.

Al personal del INSIBIO y del Instituto de Biología de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia que de una forma u otra contribuyó en mi trabajo

A Georgina Angiono y Daniel Lombardo por su colaboración y asesoramiento en los ensayos histológicos.

A mis compañeras de fútbol por recargarme de buena onda y energía los jueves, por los momentos compartidos y por su amistad.

A Vane, Pía y Joaquín, por su valiosa amistad y por bancarme siempre.

A mi Familia porque a pesar de la distancia, siempre están presentes en mi corazón y yo en el de ellos.

A mis hermanos, Sil y Tomy, por su apoyo incondicional, gracias por estar siempre.

A mis papás Elsa y Tomás por su apoyo incondicional, por animarme siempre a seguir adelante, por creer en mí y por ser siempre ejemplo de que se puede ser mejor persona.

A mi Cachito, mi compañero fiel.

# Índice



<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....</b>	<b>9</b>
<b>I- PARTICULARIDADES REPRODUCTIVAS DE LA HEMBRA DE CSA .....</b>	<b>10</b>
1- Anatomía de los órganos reproductores .....	10
2- Fisiología ovárica y ovulación .....	13
3- Preñez .....	16
3.1. Fertilización y desarrollo embrionario .....	19
3.2. Reconocimiento materno de la preñez y migración embrionaria .....	19
3.3. Implantación y placentación .....	21
<b>II- MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA RECEPTIVIDAD UTERINA Y LA</b>	
<b>IMPLANTACION EN MAMÍFEROS .....</b>	<b>25</b>
1- Generalidades .....	25
2- Rol de las Mucinas .....	26
3- Rol Metaloproteasas de matriz extracelular .....	30
3.1. Sustratos de la MMPs en la matriz extracelular .....	34
3.2. Moléculas Inhibidoras de las MMPs .....	37
3.3. Moléculas activadoras e Inductores de las MMPs .....	38
4- Rol de los factores de Crecimiento .....	40
4.1. Factor de Crecimiento Vascular A .....	41
4.2. Factor de Crecimiento Nervioso $\beta$ .....	43
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>I-MATERIAL BIOLÓGICO .....</b>	<b>48</b>
1-Animales .....	48
2-Obtención de muestras de hembras de alpacas .....	48
2.1. Diseño experimental .....	48
2.2. Plasma sanguíneo .....	49
2.3. Fluido y Tejido uterino .....	49
<b>II-MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
1- Zimografía en gelatina .....	50
1.1. Cuantificación de proteínas totales .....	50
1.2. Zimograma de fluido uterino .....	51

1.3. <i>Análisis de Imágenes</i> .....	53
2-Microscopía electrónica de Barrido .....	53
3-Técnicas Histológicas .....	53
3.1. <i>Inclusión de las muestras en Paraplast</i> .....	53
3.2. <i>Tinción con Hematoxilina-Eosina</i> .....	54
3.3. <i>Tinción PAS (ácido periódico-Schiff)</i> .....	55
3.4. <i>Tinción con Alcian Blue pH 2,5</i> .....	56
3.5. <i>Tinción con Picrosirius red</i> .....	56
3.6. <i>Inmunohistoquímica: localización de <math>\beta</math>-NGF y TrKA</i> .....	57
3.7. <i>Análisis de Imágenes</i> .....	58
4-Amplificación de genes .....	59
4.1. <i>Extracción de ARN total</i> .....	59
4.2. <i>Síntesis de ADNc</i> .....	60
4.3. <i>Diseño de Cebadores</i> .....	61
4.4. <i>PCR semicuantitativa</i> .....	62
4.5. <i>PCR en tiempo real</i> .....	62
4.6. <i>Análisis de Imágenes</i> .....	64
5- Análisis estadístico .....	64
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
I- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y QUÍMICA DEL ENDOMETRIO DE LOS CUERNOS UTERINOS DE ALPACAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS .....	66
Ia- Ultraestructura de la superficie luminal uterina .....	66
Ib- Citoarquitectura de la mucosa uterina .....	67
Ic- Estudio de mucinas en la mucosa uterina .....	69
Ic.I. <i>Detección de los mucopolisacáridos</i> .....	69
Ic.II. <i>Expresión relativa del ARNm de mucina 1 y mucina 16</i> .....	71
Id- Conclusiones parciales .....	73
II- ESTUDIO DE MOLÉCULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL ENDOMETRIO EN LOS CUERNOS UTERINOS DE ALPACAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS .....	75
IIa. Análisis del colágeno endometrial en cuernos uterinos .....	75
IIa.I. <i>Contenido de colágeno I y III en la mucosa endometrial</i> .....	75
IIa.II. <i>Expresión relativa de COL1A2 y COL3A1</i> .....	77
IIb. Análisis del sistema de las MMPs en cuernos uterinos .....	79

<i>Ib.I. Detección de MMPs con actividad gelatinolítica en el fluido uterino</i> .....	79
<i>Ib.II. Análisis de la expresión de MMP-2 y MMP-9</i> .....	81
<i>Ib.III. Estudio de la expresión de los genes reguladores de las MMPs (TIMPs, LGMN, MMP-14 y EMMPRIN)</i> .....	83
Ic. Conclusiones parciales .....	89
III- CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NGF Y VEGF EN EL ENDOMETRIO DE LOS CUERNOS UTERINOS DE ALPACAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS .....	91
IIIa. Estudio del factor de crecimiento vascular A en cuernos uterinos .....	91
IIIb. Estudio del factor de crecimiento nervioso en cuernos uterinos .....	92
<i>IIIb.I Expresión génica del factor de crecimiento nervioso <math>\beta</math> (<math>\beta</math>-NGF) y su receptor tirosina quinasa A (TrKA) en cuernos uterinos</i> .....	92
<i>IIIb.II. Localización del factor de crecimiento nervioso <math>\beta</math> (<math>\beta</math>-NGF) y su receptor tirosina quinasa A(TrKA) en cuernos uterinos de alpaca</i> .....	94
IIIc. Conclusiones parciales .....	98
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>100</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>111</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>114</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>124</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>132</b>

# Resumen



En Camélidos Sudamericanos (CSA), las preñeces se gestan en el 98 % de los casos en el cuerno uterino izquierdo (CUI) independientemente de que la ovulación se haya producido en el ovario derecho o izquierdo. Es decir que durante el periodo de receptividad uterina el endometrio del CUI debe reconocer al blastocito y permitir la implantación, posiblemente en respuesta a un dialogo materno-embionario preciso, a diferencia de lo que sucede en el cuerno uterino derecho (CUD). Este fenómeno de implantación diferencial de los CSA constituye un modelo biológico único para estudiar procesos críticos relacionados con la receptividad uterina comunes a todos los mamíferos.

Durante esta tesis se buscó identificar y caracterizar la expresión de genes relacionados con la remodelación de la mucosa uterina durante la implantación embrionaria de CSA. Se propone que existen cambios en la expresión de determinados genes que favorecen la implantación en el CUI o que impiden la misma en el CUD.

Inicialmente, se caracterizó la superficie de la mucosa endometrial de ambos cuernos uterinos (CUs) en alpacas no preñadas (NP) y con 15 días de preñez (P). CUI y CUD no presentaron diferencias entre sí a nivel ultraestructural, bioquímico y molecular (expresión de Mucina 1 y 16). En el endometrio de las alpacas P se observó presencia de protrusiones globulares en las células epiteliales y la desaparición de las células ciliadas. Además, hubo una disminución en la presencia de mucinas (MUC) ácidas con grupos sulfatados y carboxilados, y niveles expresión menores de MUC1 y MUC16. Coincidiendo con lo observado en otras especies, estos cambios permitirían establecer el primer contacto entre el blastocito y el útero, para dar lugar a su posterior implantación.

Se evaluó la expresión de aquellas moléculas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular (MEC) de la mucosa uterina que se producen durante la implantación embrionaria: colágeno (COLI, COLIII), metaloproteasas de matriz (MMP-2, MMP-9 y MMP-14), sus inhibidores tisulares (TIMP1 y TIMP2), sus activadores como leguminaína (LGMN) e inductores (EMMPRIN). Se observó que durante la preñez temprana tanto la expresión de COL1A2 y COL3A1, como el contenido de fibras de COLI y COLIII disminuyen significativamente en el CUD. Asimismo, el sistema de regulación MMP-2 (MMP-14, TIMP2, LGMN, EMMPRIN) y MMP-9 (TIMP1) disminuyen en el CUD de alpacas P.

Finalmente, se analizó la expresión endometrial de algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso  $\beta$  ( $\beta$ -NGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) relacionados con la preñez temprana. Respecto a la presencia de  $\beta$ -NGF su expresión aumenta en las alpacas P; mientras que su receptor tirosina quinasa A (TrKA) no mostró diferencias entre alpacas NP y P. Ambos co-localizan en el epitelio luminal (EL), epitelio glandular (EG); y el endotelio de la mucosa endometrial. En relación a VEGFA, en alpacas P la expresión entre CUs fue similar, aunque el CUD mostró niveles de expresión significativamente menores a los observados en alpacas NP.

Los resultados de esta tesis doctoral indican que los CUs, de manera intrínseca, presentan diferencias en la expresión de genes involucrados en la remodelación de la MEC del endometrio. Asimismo, el CUD y el CUI responden de un modo diferente al estímulo de la preñez. Las diferencias descriptas entre ambos CUs principalmente durante la etapa pre-implantacional favorecerían el éxito de la implantación en el CUI de los CSA.

In SAC, 98% of the pregnancies occur in the left uterine horn (LUH) regardless of whether ovulation has occurred in the right or left ovary. That is, during the period of uterine receptivity, the endometrium of the LUH must be recognized at diagnosis and allow implantation, possibly in response to a precise maternal-embryonic dialogue, a difference from what happens in the RUH. This phenomenon of differential placement of the CSA is a unique biological model for the study of the processes related to uterine receptivity common to all mammals.

The aim of this study was identify and characterize the expression of genes related to the remodeling of the uterine mucosa during the embryonic implantation of SAC. It is proposed that there are changes in the expression of certain genes that promotes implantation in the LUH or that prevent it in the RUH.

Initially, the surface of the endometrial mucosa of both UHs was characterized in non-pregnant alpacas (NP) and with 15 days of pregnancy (P). There are no differences between LUH and RUH at ultrastructural, biochemical and molecular level (expression of Mucin 1 and 16). In the endometrium of the alpacas, the presence of globular protrusions in the epithelial cells and the disappearance of ciliated cells. In addition, there was a decrease in the presence of mucins (MUC) with sulphated and carboxylated groups, and lower levels of expression of MUC1 and MUC16. Coinciding with what was observed in other species, these changes allow to establish the first contact between the blastocyst and the uterus, for lead to its subsequent implementation.

The expression of those molecules involved in the remodeling of the extracellular matrix (ECM) of the uterine mucosa produced during embryo implantation was evaluated: collagen (COLI, COLIII), metalloproteases (MMP-2, MMP-9 and MMP-14), its tissular inhibitors (TIMP1 and TIMP2), its activators legumain (LGMN) and inducers (EMMPRIN). It was observed that during the early pregnancy both, the expression of COL1A2 and COL3A1, as well as the content of COLI and COLIII fibers decrease significantly in the CUD. Likewise, the regulation system of MMP-2 (MMP-14, TIMP2, LGMN, EMMPRIN) and MMP-9 (TIMP1) decrease in the CUD of alpacas P.

Finally, the endometrial expression of some growth factors such as nerve growth factor  $\beta$  ( $\beta$ -NGF) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) related to early pregnancy was analyzed. Regarding the presence of  $\beta$ -NGF, its expression increases in alpacas P; while its TrKA receptor showed no differences between NP and P alpacas. They both colocalize in the luminal epithelium (EL), glandular epithelium (EG); and the endothelium of the endometrial mucosa. In relation to VEGFA, in alpacas P the expression between CUs was similar, although the RUH showed significantly lower expression levels than those observed in alpacas NP.

The results of this doctoral thesis indicate that the UHs, intrinsically, present differences in the expression of genes involved in the remodeling of the ECM of the endometrium. Likewise, the RUH and the LUH respond in a different way to the stimulus of pregnancy. The differences described between both CUs mainly during the pre-implantation stage would favor the success of the implantation in the LUH of the SACs.



# Introducción



Los Camélidos Sudamericanos (CSA) domésticos probablemente constituyen la principal fuente de ingresos económicos de las zonas altoandinas de Sudamérica, permitiendo incorporar a sectores social y ecológicamente marginados a la economía a través de la producción de carne y fibra. El interés por los productos derivados de los CSA ha incentivado emprendimientos productivos en las llanuras pampeanas, mesetas patagónicas y serranías centrales de Argentina, y en otros países como Australia, Nueva Zelanda e Italia. A pesar del creciente interés, la producción y conservación de los CSA todavía enfrenta varias limitaciones, una de las cuales es la baja eficiencia reproductiva, y aunque se han realizado avances en el conocimiento de su fisiología reproductiva, éstos resultan aún escasos comparados con los de otras especies de rumiantes domésticos (Huanca y col., 2007).

La implantación del embrión ocurre en el 98 % de los casos, en el CUI, independientemente que la ovulación se haya producido en el ovario derecho o izquierdo. Esto significa que los blastocistos producidos en el oviducto derecho deberían migrar hacia el CUI a fin de implantarse (Vaughan y Tibary, 2006). Es decir que, durante el periodo pre-implantacional el endometrio del CUI debe reconocer al concepto y, a diferencia del CUD, permitir una implantación más favorable; posiblemente en respuesta a un preciso diálogo materno-embionario. Pensamos que, por estas particularidades reproductivas, los CSA son un modelo biológico de interés para estudiar procesos críticos comunes a todos los mamíferos.

El escaso conocimiento sobre el proceso de implantación embrionaria en camélidos, y por ende su diagnóstico y control, es un obstáculo importante para lograr tasas de preñez elevadas. Por ello, para determinar los rasgos característicos de un endometrio receptivo, es de primordial importancia conocer los genes que se están expresando en ese periodo, o bien cuáles genes dejan de hacerlo.

Los mecanismos de la receptividad uterina aún no se conocen en detalle, pero se ha propuesto que estaría relacionada con la adquisición de ligandos o receptores que facilitan la aposición y luego la adhesión del embrión, o a la pérdida de componentes que las impiden e inhiben (Perrier D' Hauterive y col., 2002). En bovinos, porcinos, roedores y primates, se demostró la importancia de la expresión de genes relacionados con la remodelación de la MEC durante la implantación, tales como los de metaloproteasas de matriz (MMPs): MMP-2, MMP-9 y MMP-14 (Salamonsen, 1999). La regulación precisa,

específica y localizada de la actividad de las MMPs en el sitio de implantación es mantenida por sus inhibidores, los TIMPs. Más aún, se ha relacionado a la desregulación de MMPs o TIMPs con la infertilidad (Salamonsen, 1999; Riley y col., 2000; Curry y Osteen, 2001).

Entre los genes que también han sido vinculados en este proceso se encuentra EMMPRIN, que es una glicoproteína multifuncional, que actúa como inductor de las MMPs. En bovinos EMMPRIN se expresa en el endometrio y en el concepto durante el periodo de peri-implantación y su expresión se coordina con la de la MMP-2 y MMP-14 (Mishra y col., 2010; Mishra y col., 2012). EMMPRIN se expresa junto con otras moléculas relacionadas a la MEC, tales como MMP-2, MMP-9, MMP-14 y TIMPs (Kizaki y col., 2008).

LGMN es una enzima de la familia de las catepsinas, que ha sido involucrada en el proceso de remodelación del endometrio (Shim y col., 2013,) y durante la placentación temprana puede actuar a través de su papel como activador de otras enzimas o proteínas como las MMPs (Liu y col., 2003).

Las mucinas constituyen otro grupo de proteínas de interés para este estudio. MUC1 y MUC16 suprimen la interacción entre el embrión pre-implantacional y las moléculas de adhesión en el endometrio materno, creando una barrera para la implantación en humanos, así como otras especies de mamíferos (Aplin y col., 2001; Aplin, 2007; Redzovic y col., 2013). Por lo que su eliminación del EL es crucial para el proceso de implantación, dicha remoción puede estar mediada por MMPs (Thathiah y Carson, 2004; Govindarajan y col., 2012).

Los genes del sistema de MMPs antes mencionados constituyen el interés de estudio de este trabajo de tesis. Nuestra hipótesis es que existen cambios en la expresión de los genes del sistema de MMPs que favorecerían la implantación en el cuerno uterino izquierdo.

# Objetivos



### **OBJETIVOS:**

Caracterizar los cambios que ocurren en el endometrio durante la etapa preimplantacional a fin de reconocer las moléculas que puedan estar implicadas en la implantación diferencial en el CUI.

Para alcanzar este objetivo, esta tesis propone:

- Estudiar las características ultraestructurales e histoquímicas del endometrio de alpacas preñadas y no preñadas.
- Caracterizar la expresión de moléculas de la matriz extracelular del endometrio de alpacas preñadas y no preñadas. Específicamente las moléculas relacionadas al sistema de MMPs.
- Caracterizar de la expresión de factores de crecimiento de importancia en la preñez temprana. Específicamente  $\beta$ -NGF, su receptor específico TrkA, y VEGFA en el endometrio de alpacas preñadas y no preñadas.

# Antecedentes Bibliográficos



## I- PARTICULARIDADES REPRODUCTIVAS DE LA HEMBRA DE CSA

### 1- Anatomía de los órganos reproductores

El útero es el órgano de la preñez, proporciona el entorno para el transporte de espermatozoides, la embriogénesis temprana y el sitio para la unión del concepto (embrión en un estadio temprano de desarrollo) con la hembra (Senger, 2004). Como en la mayoría de los mamíferos, el útero de alpacas y llamas es bicornes; los CUs, derecho e izquierdo, se encuentran separados por un tabique y los extremos o puntas de los CUs son romas y redondeadas (Vaughan y Tibary, 2006).

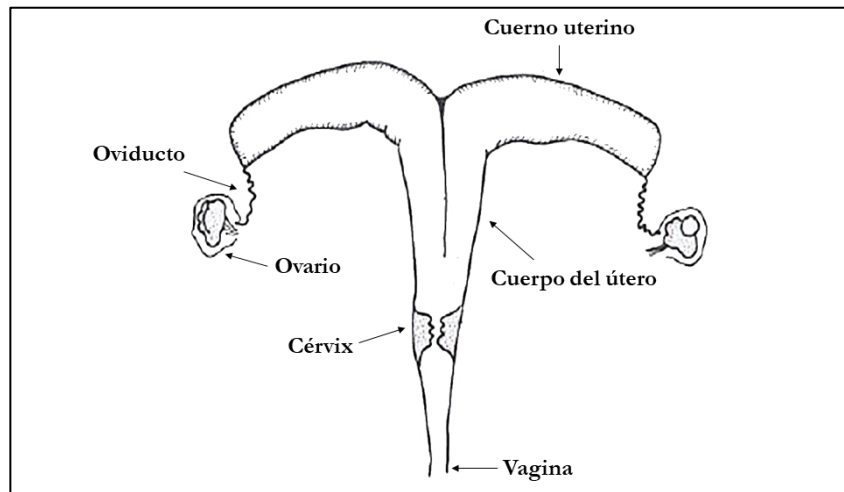
El útero forma parte del tracto reproductor femenino (TRF) y conecta a los oviductos con el cérvix. Además, el TRF incluye a los ovarios, el cuerpo del útero, la vagina y los genitales externos (Fig.1) (Senger, 2004). Los dos CUs tienen aproximadamente 8 cm de largo en alpacas, y de 8 a 15 cm en llamas, sin embargo, el CUI fetal y prepuberal es generalmente más grande que el CUD y esta diferencia se exagera en las hembras multíparas, debido a que el 98% de todas las gestaciones ocurren en el CUI (Vaughan y Tibary, 2006). El cuerpo del útero (aproximadamente 3 cm de largo en alpacas, de 3 a 5 cm en llamas) es corto en relación con la longitud de los CUs. Cada CU termina en un oviducto largo (10-20 cm) y tortuoso, que une al CU con la bolsa ovárica. En alpacas y llamas la bolsa ovárica es grande, de 2,5 cm × 2,5 cm × 5 cm, y envuelve por completo al ovario. Los ovarios de alpaca de aproximadamente 1 x 1 x 1,5 cm y 2 x 2 x 1 cm en llama, son redondos a ovales y de forma globular, con una textura firme e irregular y contienen numerosos folículos característicamente dispuestos a lo largo de la periferia o superficie del ovario, por lo que su tamaño varía según las estructuras presentes en él. El tamaño de los folículos ováricos en condiciones no patológicas varía en alpacas entre 5 y 12 mm y en llamas entre 2-16 mm de diámetro (Brown, 2000; Vaughan y col., 2006). El cuerpo uterino se adhiere a un cuello uterino de 2 cm de largo en alpacas y menos de 5 cm en llamas, cuya luz contiene 2-3 anillos/pliegues espirales de mucosa, denominados cérvix (Brown, 2000; Vaughan et al, 2006). El orificio externo del cuello uterino sobresale en la vagina y esta conduce a una abertura vulvar de 2-4 cm de largo ventral al ano. La longitud de la vagina es de aproximadamente 13-15 cm en alpacas y de 15-20 cm en llamas, longitud que puede variar con la madurez de la hembra. El perineo en estas especies posee un área muy pequeña (Brown, 2000; Vaughan y col., 2006).



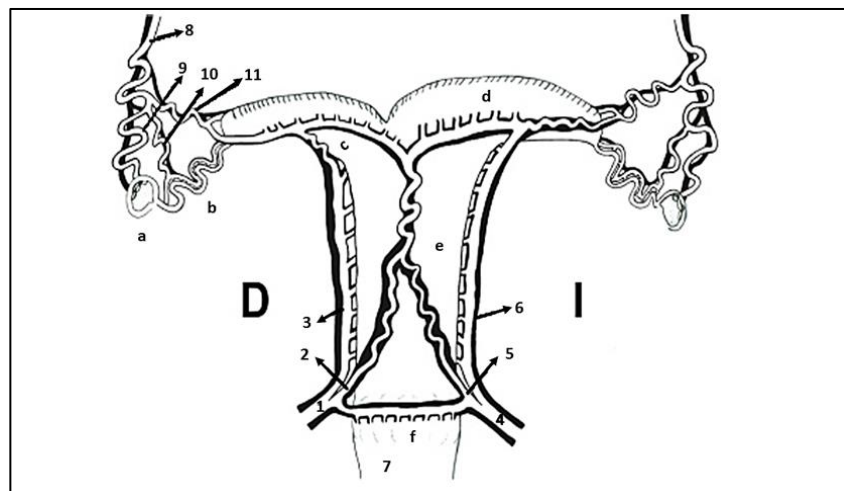
En CSA, a nivel del TRF, los vasos sanguíneos adoptan un patrón totalmente diferente al descrito en otras especies domésticas, ya que poseen arterias no antes descritas, como la arteria vaginal caudal, la arteria vesical media, la arteria vaginal craneal, la arteria uterina dorsal con sus ramas lateral y medial, y la arteria arco cervical. A cada arteria le corresponde una vena satélite (León y col., 2011). El CUI presenta una mejor irrigación dado que la arteria uterina derecha envía su rama medial derecha hacia el lado izquierdo del aparato reproductor. Además, la arteria arco cervical establece comunicación entre las arterias uterinas izquierda y derecha, pasando por la superficie ventral del cérvix. Esta arteria puede emerger tanto de la misma arteria uterina como de su rama medial (Fig. 2) (León y col., 2011).

El útero en CSA al igual que en otros mamíferos consiste en una capa serosa llamada perimetrio que forma parte del peritoneo, capa más externa. El perimetrio es bastante delgado y casi transparente. Debajo de la capa serosa hay una capa longitudinal de músculo liso que es fácil de reconocer debido a las arrugas, o pequeñas crestas que se extienden en una dirección cráneo-caudal. Debajo de la capa longitudinal de músculo liso hay una capa circular. Las células del músculo liso se envuelven alrededor del CU de manera circular. En conjunto, la capa longitudinal externa y la capa muscular circular interna se denominan miometrio. La porción interna del útero es el endometrio o mucosa, es la capa más importante desde el punto de vista reproductivo, porque es la estructura directamente responsable de la implantación y el desarrollo del concepto, y es el objeto de nuestro estudio. El endometrio, está constituido por dos capas, el epitelio luminal (EL) y la submucosa (estroma ó lámina propia), la primera está formada por células cuboidales altas asentadas en una lámina basal, el segundo posee dos estratos, el denso (o compacto) y el laxo (o esponjoso). Las glándulas uterinas se desarrollan a partir del EL del útero y penetran en el estroma, donde predomina el tejido conectivo, que da soporte y aloja a las mismas. El estrato denso o zona densa (ZD) está compuesto de células ovaladas estromáticas, de gran núcleo y escaso citoplasma; el estrato esponjoso o zona laxa (ZL), en cambio posee pocas células dispersas, lo que le atribuye este aspecto. En la ZL, se ubican gran número de glándulas endometriales, de epitelio secretor cuboidal, además, junto a las glándulas en este segmento es posible ubicar vasos sanguíneos y linfáticos (Fig. 3) (Brown, 2000; Senger, 2004; Olivera, 2007).

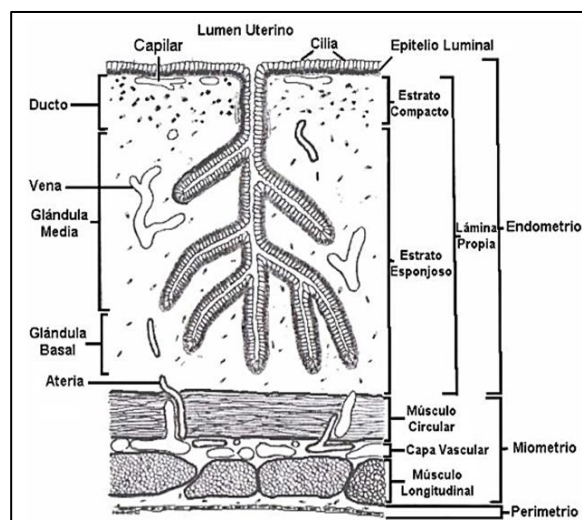




**Figura 1. Diagrama del tracto reproductor femenino de camélidos.** Mediante flechas se indican los miembros del tracto reproductor de hembras de camélidos (modificado de Tibary, 1997).



**Figura 2. Representación gráfica de la distribución de las arterias y venas del aparato reproductor femenino de la llama.** Vista ventral. 1. Arteria Uterina Derecha; 2. Arteria Uterina Medial Derecha; 3. Arteria Uterina Lateral Derecha; 4. Arteria Uterina Izquierda; 5. Arteria Uterina Medial Izquierda; 6. Arteria Uterina Lateral Izquierda; 7. Arteria Arco Cervical; 8. Arteria Ovárica; 9. Rama Ovárica; 10. Rama Tubárica; 11. Rama Uterina; a. Ovario Derecho; b. Oviducto Derecho; c. Cuerno Uterino Derecho; d. Cuerno Uterino Izquierdo; e. Cuerpo Uterino; f. Cérvix (León y col., 2011).



**Figura 3. Ilustración esquemática del tejido uterino** (Kenney, 1986).

## 2- Fisiología ovárica y ovulación

En ausencia de la cópula con el macho, la dinámica de los folículos ováricos en la hembra acontece en ondas superpuestas de crecimiento y regresión folicular. El intervalo entre ondas es de aproximadamente 20 días en llamas y varía de 12 a 22 días en alpacas (Vaughan y Tibary, 2006).

El crecimiento folicular se puede dividir en tres fases, la fase de **crecimiento** del folículo, de alrededor de 3-9 días; la fase de **maduración** cuando el folículo alcanza un tamaño preovulatorio de 7-12 mm, y la fase de **regresión** o atresia, de 3-5 días (Fig. 4) (Vaughan y Tibary, 2006). La actividad folicular ovárica en los camélidos no necesariamente alterna entre los ovarios de una onda folicular a la siguiente y no es algo que pueda predecirse (Brown, 2000; Vaughan y col., 2006; Whitehead, 2007).

Si no se produce el apareamiento, el folículo dominante ingresa en fase de regresión de 3-5 días y una nueva ola de folículos comienza su fase de crecimiento en un corto tiempo, debido a esto, un nuevo folículo puede volverse dominante en 2-3 días (Brown, 2000). La rápida tasa de reemplazo de los folículos dominantes asegura niveles casi ininterrumpidos de estrógeno. Aunque estos niveles no dan lugar a la oleada preovulatoria de LH; estarían implicados en la receptividad casi continua a los machos, lo que les da la capacidad de reproducirse todo el año (Bravo y col., 1990; Brown, 2000).

Existe una correlación positiva entre el tamaño del folículo y la concentración en plasma del estradiol-  $17\beta$  ( $E_2$ ) y el sulfato de estrona en alpacas y llamas (Vaughan y Tibary, 2006). Las concentraciones máximas de  $E_2$  plasmático coinciden con el tamaño máximo del folículo, mientras que los niveles de  $P_4$  en plasma permanecen por debajo de 1 ng/ml en la mayoría de las hembras no copuladas. La liberación del  $E_2$  plasmático se da en forma de pulsos, que duran de 4 a 5 días, y que alcanzan su punto máximo a concentraciones de 10-12 pg/ml. Estos pulsos son concomitantes con los patrones de crecimiento y regresión de los folículos y están separados por periodos de duración variable (como mínimo 1-2, como máximo 10 días), donde las concentraciones de la hormona se encuentran en los límites mínimos detectables (6 pg/ml) (Bravo y col., 1990). Por lo tanto, los períodos breves de anestro que ocurren en hembras NP pueden explicarse por la asincronía ocasional entre las sucesivas oleadas de crecimiento folicular, de modo que la iniciación de una nueva ola de crecimiento de folículos y su producción de  $E_2$  asociada, se retrasa el tiempo suficiente para que la desensibilización de los centros neuronales pueda ocurrir (Brown, 2000).

Las hembras de CSA son ovuladoras inducidas por la cópula. Los estímulos que influyen en el eje neuroendocrino de los camélidos para inducir el pico ovulatorio de LH, incluyen: la penetración del pene en el cuello uterino, el "orgling" (sonido emitido por el macho), el contacto físico, y, como fue demostrado recientemente, la presencia del  $\beta$ -NGF, factor inductor de la ovulación, en el plasma seminal del eyaculado (Vaughan y col., 2006; Ratto y col., 2012; El-Allali y col., 2017). El  $\beta$ -NGF, además de inducir la ovulación, ejerce un efecto luteotrófico al alterar el patrón de secreción de LH y potenciar la vascularización tisular durante el período pre-ovulatorio y las etapas iniciales del desarrollo del CL (Ulloa-Leal y col., 2014).

Cuando los folículos ováricos de 4-5 mm están presentes en el momento del apareamiento, la cantidad de LH liberada es insuficiente para inducir la ovulación y es cuantitativamente mucho menor que el producido por las hembras con folículos de 6-12 mm, que sí experimentan la ovulación. Por otro lado, cuando los folículos en regresión están presentes en el momento del apareamiento, la cantidad de LH liberada es similar a la de las hembras con folículos en crecimiento o maduros, pero se da lugar a la luteinización y no a la ovulación (Brown, 2000; Vaughan y col., 2006).

El patrón de liberación de LH en llamas y alpacas es similar al que ocurre en otros ovuladores inducidos y se inicia en respuesta al estímulo copulatorio. Las concentraciones plasmáticas de LH aumentan notablemente dentro de los 15 min del inicio de la cópula seguido de un pico preovulatorio de LH a las 2 hs como máximo. Los apareamientos dentro de las 24 hs posteriores al apareamiento inicial no parecen estimular una mayor liberación de LH.

El intervalo entre el apareamiento y la ovulación es de aproximadamente 48 hs en alpaca y llama (Brown, 2000; Vaughan y col., 2006). La ovulación ocurre con la misma frecuencia en el ovario izquierdo y el derecho, y el origen del ovocito no tiene ningún efecto sobre la probabilidad de preñez, aunque la mayoría de las gestaciones exitosas están localizadas en el CUI (Vaughan y Tibary, 2006). Las ovulaciones múltiples ocurren en 5-15% de los apareamientos naturales.

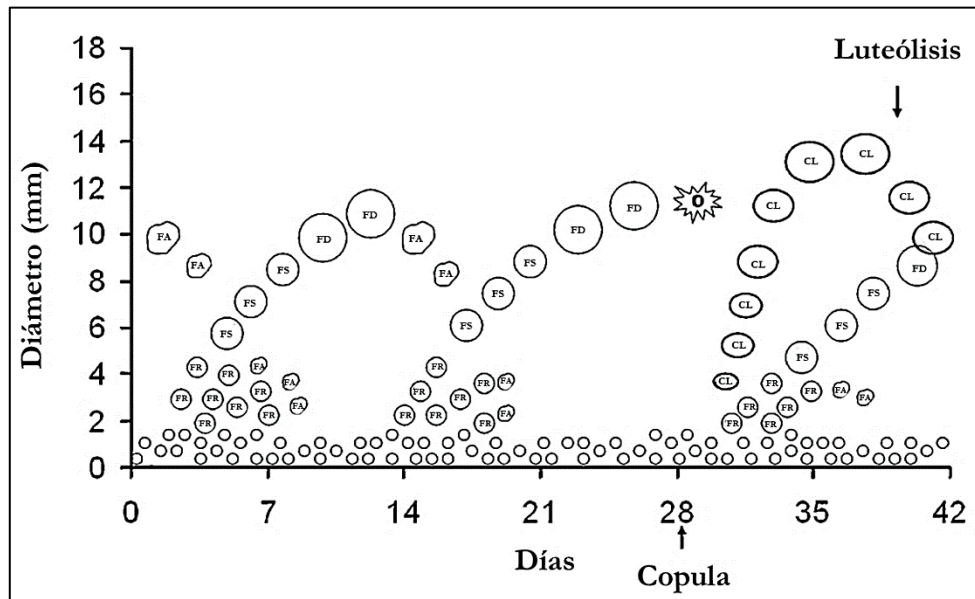
De tres a cinco días después del apareamiento (2-4 días después de la ovulación), se desarrolla un CL en el ovario de la ovulación concurrente. El CL funcional secreta de forma constante y creciente progesterona ( $P_4$ ) en plasma a partir del día 4 a 6 hasta el día 8 a 10 post-cópula. La máxima producción de  $P_4$  se da cuando el CL alcanza su máximo tamaño (10-15 mm en alpacas y llamas) a los 7 a 9 días post-cópula. Los niveles circulantes de  $P_4$

superiores a 2 ng/ml se consideran una indicación fuerte de la presencia de un CL maduro y funcional.

La regresión del CL en hembras NP comienza alrededor del día 10-12, en asociación con la liberación pulsátil de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). En este momento, las concentraciones de  $P_4$  disminuyen rápidamente para alcanzar niveles basales alrededor del día 14-15 después de la ovulación. Ante la disminución de las concentraciones de  $P_4$ , se reanuda el crecimiento folicular, lo que provoca un aumento en la secreción de  $E_2$  y la inducción del celo, que se ha observado que vuelve a ocurrir ya en el día 12 (cuando la concepción no ocurre), al igual que en otras especies como las ovejas. La vida útil del CL es por lo tanto de 8 a 9 días.

La  $PGF_{2\alpha}$  juega un papel fundamental en la regresión lútea, en llamas y alpacas. En alpacas  $PGF_{2\alpha}$  se secreta de forma pulsátil, desde el endometrio no preñado a la circulación sistémica a través de las venas uterinas (Aba y col., 2000). La actividad luteolítica del CUD es local y afecta solo el CL en el ovario derecho, mientras que el CUI tiene un efecto local y sistémico, que afecta al CL en cualquiera de los ovarios (Vaughan y Tibary, 2006).

Esta diferencia en la actividad luteolítica entre los CUs podría explicarse por una diferencia en la anatomía vascular del útero, los ovarios y los oviductos en los camélidos. Un estudio sobre el útero de hembras adultas y fetales, determinó que la arteria uterina derecha es más grande en la mayoría de los casos ( $> 90\%$ ) y sus ramificaciones se cruzan para suministrar al CUI. La vena uterina derecha también es más grande y drena gran parte al CUI, sin embargo, la vena uterina izquierda no drena al cuerno derecho. Se postuló que el CUI puede inducir luteólisis de un CL en el ovario derecho a través de una vía veno-arterial local (Del Campo y col., 1996).



**Figura 4. Representación esquemática de ondas foliculares en alpacas y llamas.** Las zonas bajas coincidentes con los folículos de menor tamaño, indican periodos de no-receptividad. El apareamiento induce la ovulación del folículo dominante y la formación de un CL. El hecho de no concebir conduce a la luteólisis del CL. **FR:** folículo reclutado, **FS:** folículo seleccionado, **FD:** folículo dominante, **FA:** folículo en atresia, **O:** ovulación, **CL:** cuerpo lúteo (modificado de Vaughan, 2011).

### 3- Preñez

La duración de la gestación en llamas y alpacas es muy variable, y va de 342 a 350 días, dando lugar al nacimiento de una sola cría y cuando ocurren gestaciones de gemelos, se abortan entre los 5 a 6 meses de preñez (Brown, 2000; Whitehead, 2007).

Entre las particularidades reproductivas que presentan las hembras de los CSA en comparación con otros animales domésticos, se destacan las características como la ovulación inducida, la vida media corta del CL, la actividad luteolítica diferencial y que el RMP comience antes del día 10 después de la cópula. Sin embargo, uno de los rasgos reproductivos más intrigantes en esta especie, es el hecho de que el 98% de las preñeces exitosas, se den en el CUI, independientemente de la lateralidad de la ovulación (Brown, 2000; Vaughan y Tibary, 2006). Así pues, la incapacidad del CUD para sostener una preñez a término junto con el estrés, defectos cromosómicos, problemas nutricionales e infecciones de bajo grado, constituyen las principales causas de la muerte embrionaria temprana en camélidos (Brown, 2000; Whitehead, 2007).

Las causas del patrón particular de implantación de embriones en esta especie aún no se han aclarado, sin embargo, una hipótesis que busca explicar esta particularidad sugiere que existe un flujo sanguíneo basal diferencial entre CUs que puede determinar una irrigación endometrial asimétrica entre el CUI y el CUD (Del Campo y col., 1996). Esta hipótesis se

basa en que CUI es ligeramente más grande que su contraparte derecha; una diferencia no causada por la gestación, ya que también se observa en hembras y fetos nulíparas, por esta razón se sugirió que esta clara asimetría anatómica sería el resultado de diferencias en la disposición arteriovenosa que irriga y drena ambos CUs. La presencia de una rama arterial cruzada prominente que se extiende desde la arteria uterina derecha hasta el CUI indica que este lado uterino está provisto de un potencial mayor flujo sanguíneo, y esto puede reflejar una provisión evolutiva para el mayor tamaño y función de la arteria uterina en el CUI de estas especies (Del Campo y col., 1996). Sin embargo, en especies con útero simétrico (vacas, cerdas, ovejas y yeguas) durante el ciclo estral, se han descrito variaciones regulares del flujo sanguíneo uterino, que son producidas principalmente por los cambios en la concentración de hormonas esteroideas sexuales en la sangre sistémica (Ford, 1982; Bollwein y col., 2002). El estrógeno tiene un reconocido y potente efecto vasodilatador (Matiolli y col., 2001), existiendo así, una correlación positiva entre el flujo sanguíneo de las arterias uterinas y ováricas con la concentración de estrógeno en plasma durante el estro. Por lo tanto, se produce un rápido aumento del flujo sanguíneo uterino en o justo antes del estro, seguido de una reducción gradual durante la fase lútea, una variación que se asocia a la proporción diaria de  $P_4$  en el plasma sanguíneo (Ford y col., 1979). Recientemente en llamas se determinó que las concentraciones circulantes de  $E_2$  producen un aumento en la vascularización uterina durante la fase folicular, sin embargo, no encontraron diferencias entre CUI y CUD en este estadio, por lo que la primera hipótesis no ha sido confirmada aún (Silva y col., 2018). Curiosamente, además del tamaño y la asimetría vascular, no se han descrito otras diferencias a nivel ecográfico, histológico y / o subcelular entre los CUs, que explique el patrón particular de implantación de embriones y, en consecuencia, la alta incidencia de gestaciones en el CUI observadas en esta especie (Feder y col., 1999; Powell y col., 2007; Del Campo y col., 1996; Bianchi y col., 2013).

Si bien, en llamas, se estudió la expresión endometrial de los receptores de estrógeno ( $RE\alpha$  y  $RE\beta$ ), el receptor de progesterona ( $RP_4$ ), el receptor de oxitocina ( $ROx$ ) y ciclooxygenasa-2 ( $COX-2$ ), solo se describió una mayor expresión de  $ROx$  en el CUD, mientras que los demás receptores no presentaron diferencias entre CUI y CUD que puedan favorecer la implantación preferencial en CUI (Bianchi y col., 2013).

Durante la gestación, las hembras muestran pocos cambios físicos indicativos de la misma, inclusive las que transitan una preñez avanzada y, en consecuencia, los primeros signos de un nacimiento próximo a menudo pueden pasar desapercibidos para los observadores inexpertos. El rechazo de las hembras previamente apareadas, hacia los

machos, es el primer buen indicador de la preñez, pero no es el más confiable. No todas las hembras que rechazan al macho están necesariamente preñadas; esta puede haber sufrido una pérdida embrionaria recientemente o que la regresión lútea no esté completa. Además, es posible que una hembra P acepte a un macho si es particularmente agresivo, o si ésta es muy sumisa (Brown, 2000).

Una preñez temprana se ha logrado diagnosticar mediante ecografía intra-rectal (Bourke y col., 1992; Parraguez y col., 1997) en las primeras 3 semanas de preñez y mediante palpación rectal a partir de los 35 días (Alarcón y col., 1990), aunque esta técnica es más confiable a partir de los 45-50 días. Para una preñez más avanzada, el examen transabdominal es un método confiable para su determinación y control, con una precisión del 92% a los 80 días para las alpacas y del 100% a los 75 días para las llamas, sin embargo, a medida que la preñez avanza, la precisión del diagnóstico por este método disminuye para ambas especies (Alarcón y col., 1990).

El CL es el encargado de producir y mantener altas concentraciones de  $P_4$  durante toda la gestación (Brown, 2000), por lo que el monitoreo de la concentración de  $P_4$  en plasma durante los primeros 30 días posteriores al apareamiento es un método útil para detectar la preñez (Adam y col., 1989). Las concentraciones de  $P_4$  a los 14 días de preñez (Fig. 5) varían al menos 1 a 2 ng/ml, pero estas concentraciones de  $P_4$  también pueden indicar la presencia de un CL persistente en hembras NP y en estos casos se puede realizar un diagnóstico falso positivo de preñez (Whitehead, 2007). Por esta razón, idealmente, la preñez debe confirmarse por al menos dos métodos y, debido a las altas pérdidas embrionarias, debe reconfirmarse después del primer trimestre.

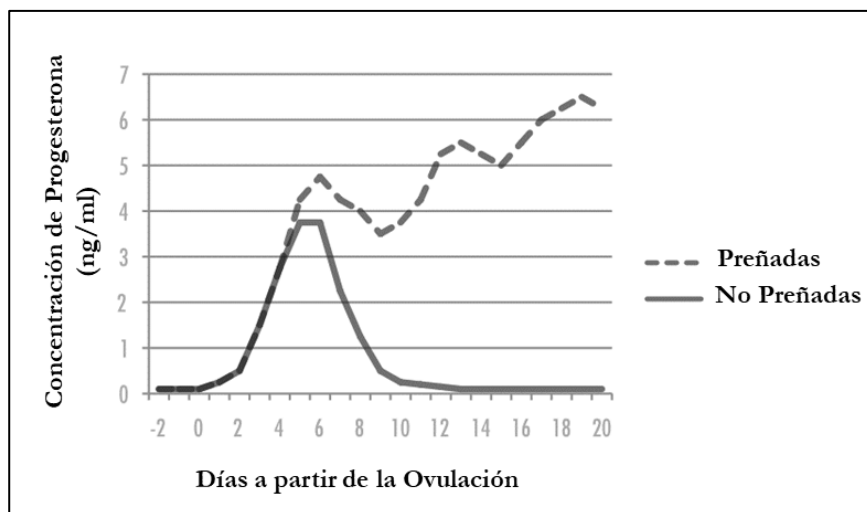
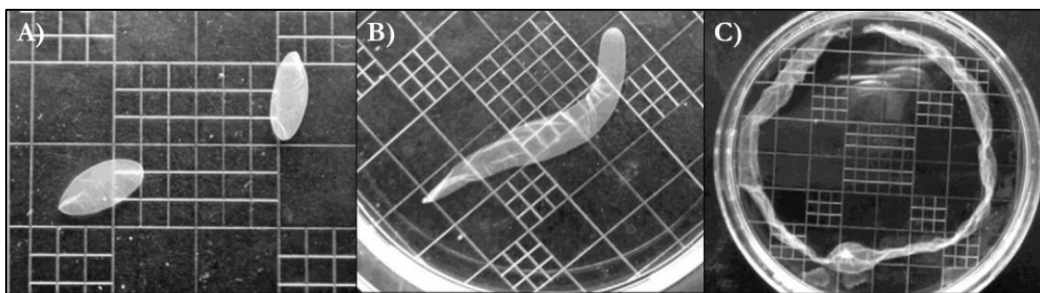


Figura 5. Gráfico de la concentración de progesterona durante los primeros 20 días de preñez en camélidos sudamericanos (modificado de Whitehead, 2007).

### 3.1. Fertilización y desarrollo embrionario

Durante la cópula, el macho deposita el semen en el interior de los CUs y dado que en esta especie el semen se deposita hasta 2 días antes de la ovulación, la unión útero-tubárica actúa como reservorio espermático hasta el momento de la ovulación (Apichela y col., 2009). Los eventos de maduración de los ovocitos, la capacitación de los espermatozoides y la reacción acrosómica que conducen a la fertilización no se han descrito detalladamente en los camélidos y se suponen similares a los procesos en otros animales domésticos (Vaughan y Tibary, 2006). Donde después de la fertilización, se da secuencialmente el desarrollo del dentro de los confines de la zona pelúcida, la eclosión del blastocisto desde la zona, la formación de las membranas extraembrionarias y el RMP antes de que el embrión se una al útero (Senger, 2004). En camélidos, después de la fertilización exitosa, el desarrollo embrionario es rápido. Cuatro días después del apareamiento, se puede encontrar una mórula de 4 a 8 células en el oviducto. Los embriones entran en la cavidad uterina aproximadamente 5-6 días después de la ovulación en la etapa de eclosión o blastocisto temprano. La elongación del embrión (Fig. 6) comienza hacia el día 9 (1,3–1,5 cm), y ocupa toda la cavidad uterina en el día 10 (5,5 cm). Se cree entonces que el embrión se mueve continuamente a través del lumen uterino al mismo tiempo que continúa con su desarrollo, llegando a medir 21 cm para el día 15 en alpacas (Picha y col., 2013).



**Figura 6. Desarrollo embrionario de alpacas.** En las imágenes se observa al blastocisto de alpaca elongado: **A)** Día 9 (1,3- 1,5 cm); **B)** Día 10 (5,5 cm) y **C)** Día 15 (21 cm) (modificado de Picha y col., 2013).

### 3.2. Reconocimiento materno de la preñez y migración embrionaria

El RMP se refiere al requisito de que el concepto produzca una señal que actúa sobre el útero y/o CL, para garantizar el mantenimiento de un CL funcional para la producción de P<sub>4</sub>; hormona necesaria para el mantenimiento de la gestación en la mayoría de los mamíferos. La señal de RMP, en humanos la gonadotropina coriónica (hCG), en bovinos



el interferón- $\tau$  (IFN- $\tau$ ) y en cerdos el estrógeno, actúa sobre los epitelios uterinos para mejorar la expresión de genes críticos para el crecimiento y desarrollo del concepto (Bazer, 2013). En CSA no se sabe cuál es la molécula señalizadora del RMP, pero hay evidencias que sugieren que sería el estrógeno (Powell y col., 2007; Bianchi y col., 2015). En llamas el RMP ocurre entre los días 8 y 12, mientras que en alpaca se ha propuesto que ocurre entre los días 9 y 15 post-cópula (Powell y col., 2007; Picha y col., 2013; Bianchi y col., 2015). En camellos durante el periodo de RMP, el blastocisto produce grandes cantidades de estrógeno, mayormente en forma de  $E_2$ , similar a lo observado en blastocistos de cerdos y caballos (Powell y col., 2007). En llamas se ha determinado que el blastocisto pre-impantacional, también produce grandes cantidades de  $E_2$  durante el periodo de RMP, señal que estimularía la producción de  $P_4$  lútea y así contrarrestaría el efecto luteolítico de la  $PGF_{2\alpha}$  (Powell y col., 2007). En esta especie, la liberación de  $PGF_{2\alpha}$  por parte del útero no se elimina, se ha determinado que el patrón de secreción de esta PG en alpacas gestantes puede ocurrir a una frecuencia similar a la observada en animales no gestantes, pero con una magnitud menor (Aba y col., 1997). En cuanto a los  $RE$  y  $RP_4$ , en llamas se determinó un mayor porcentaje de  $RE\alpha$  en estroma el día 8 y el día 12 en EL después de la inducción de la ovulación, mientras que la población de  $RP_4$  disminuyó en ese mismo día en EL y EG, y en el estroma; y la expresión de COX-2 en EL fue menor en las hembras P que en las NP (Bianchi y col., 2015). La presencia del embrión parece atenuar la secreción materna de  $PGF_{2\alpha}$  durante la preñez temprana al disminuir la expresión endometrial de la COX-2 en EL de las llamas gestantes. Por su parte, la disminución del  $RP_4$  endometrial en llamas gestantes podría ser un evento necesario para permitir la expresión de proteínas involucradas en la adhesión del concepto, un mecanismo ampliamente aceptado en otras especies. Y el aumento de  $RE\alpha$  en hembras P apoya la hipótesis de que los estrógenos están involucrados en el mecanismo de RMP de la preñez en CSA, sin embargo, estos resultados no son determinantes (Bianchi y col., 2015).

Con respecto a la migración embrionaria, como se mencionó anteriormente debido a la actividad luteolítica diferencial, los embriones formados en el CUD, deben migrar hacia el CUI a fin de prevenir la actividad luteolítica sistémica que genera este cuerno, durante la preñez temprana (Brown, 2000). Esto podría explicar el hecho de que a pesar de que del 100% de las preñeces que se den en el CUI, el 50% de estas gestaciones se mantienen por el CL en el ovario derecho (Vaughan y Tibary, 2006). Alternativamente, la ausencia de un embrión en el lado derecho puede contribuir a la regresión del CL derecho, aunque esto solo debe ocurrir cuando la migración se retrasa más allá del tiempo normal en el que se espera que se dé el RMP. Que el CL en el ovario derecho aparentemente sufra regresión a un ritmo

más rápido que el de la izquierdo puede sugerir una acción local más potente del agente luteolítico producido en el CUD, que no puede prevenirse por la presencia de un embrión en ese cuerno (Vaughan y Tibary, 2006). Sin embargo, en la actualidad, se ha establecido que ni la ubicación del folículo ovulado (ovario derecho o izquierdo), ni el grado de desarrollo del folículo dominante durante la cópula tienen una influencia directa sobre la tasa de ovulación y de supervivencia de los embriones en CSA (Ratto y col. 2011). Llamativamente, cuando el embrión es depositado directamente en el CUI y en presencia de un CL en el ovario izquierdo (ubicación que evitaría la migración del embrión), la tasa de preñez no mejora como podría haberse esperado, esto implicaría que muchos de los embriones que se originan en el lado izquierdo también se pierden (Trasorras y col. 2010).

Al parecer los dos cuernos uterinos en estas especies han evolucionado de manera diferente en términos de RMP, de manera que, para lograr una gestación exitosa, los embriones formados en el oviducto derecho deben migrar hacia el CUI a fin de prevenir la luteólisis del CL, ya sea en el ovario izquierdo o derecho (Brown, 2000; Powell y col., 2007).

### *3.3. Implantación y placentación*

Dentro de la fisiología de la reproducción en los mamíferos, la implantación y la placentación constituyen fenómenos indispensables para el desarrollo y la nutrición del embrión, además, de que hay una íntima relación entre la tasa de fertilidad y mortalidad embrionaria durante estos dos fenómenos (Galina, 2006).

El proceso de implantación, varía entre las diferentes especies y dependiendo del tipo de placentación, el proceso de implantación puede ser, altamente invasivo (roedores y primates) o no invasivo (rumiantes). Las placentas se describen morfológicamente de acuerdo a la distribución del vello coriónico sobre su superficie como: Difusa, Cotiledonaria, Zonaria y Discoide (Fig. 7) (Senger, 2004). Y según, el grado de intimidad entre el punto de contacto materno y el fetal, se pueden clasificar según el número de capas placentarias que separan la sangre fetal de la materna en: Epteliocorial, Endoteliocorial y Hemocorial (Fig. 8) (Senger, 2004).

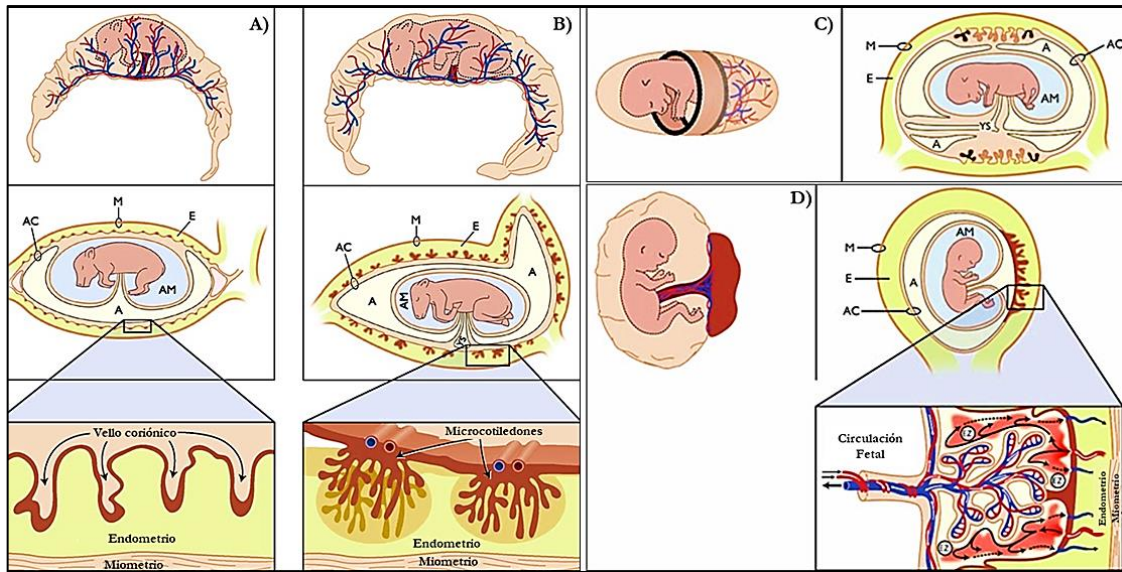
Los camélidos, de forma similar a los cerdos, desarrollan un tipo de placenta epteliocorial difusa (Majewska y col., 2009), este tipo de unión materno-fetal se caracteriza por dos eventos, la aposición, seguida de la adhesión (Senger, 2004). En alpacas, la implantación se inicia alrededor del día 20 (Brown, 2000; Olivera y col., 2003), el trofoblasto se coloca en la superficie epitelial del útero (aposición), con áreas de contacto y la adhesión

se da por medio de una interdigitación compleja alrededor de los días 22 y 26 de gestación, y a medida que el desarrollo continúa, las áreas de conexión se vuelven más extensas (Olivera y col., 2003; Vaughan y Tibary, 2006). Se cree que zonas especializadas de pre-contacto, conocidas como almohadillas ectoplásmicas (similares a los uterodomas), funcionan como puntos iniciales de unión y/o áreas para el intercambio metabólico temprano y de reconocimiento materno-fetal, las cuales hasta ahora se han descrito en dromedarios, pero no en alpacas (Abd-Elnaeim y col., 1999; Murphy, 2000).

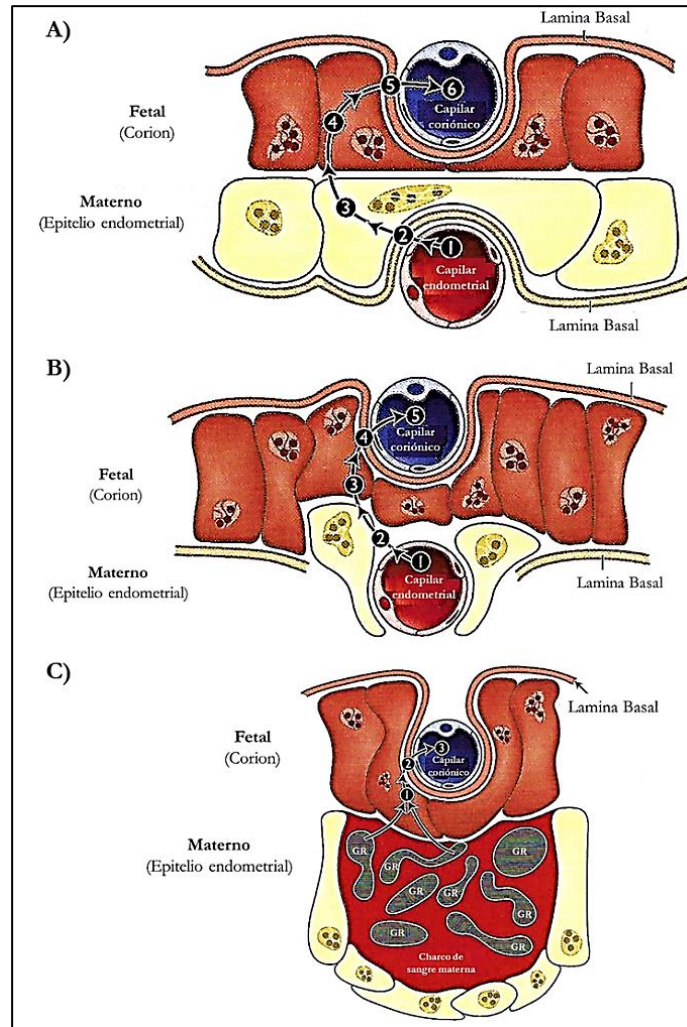
Como se mencionó anteriormente, los sitios de implantación ocurren predominantemente en el CUI, pero un trofoblasto expandido también ocupa grandes extensiones del CUD, donde la interacción materno-fetal muestra áreas peculiares de aposición (Olivera y col., 2003). Hacia el día 30 de gestación, la capa de trofoblasto ya está recubierta por un tejido conjuntivo extraembrionario que, para el día 45, está bien vascularizado, lo que indica el punto de partida de la formación de la placenta. Los capilares fetales y maternos irrigan al epitelio y al trofoblasto, estrechando las áreas especializadas de intercambio, que se producen a lo largo de toda la interfaz materno-fetal, caracterizando así la naturaleza difusa de esta placenta (Olivera y col., 2003).

En especies con implantación epiteliocorial, el patrón de glicosilación en la interfaz materno-fetal es típico de cada especie (glico-código), siendo un factor importante para la implantación y el mantenimiento exitoso de la preñez (Jones y col., 2008). El glico-código materno, formado por el glicocáliz del EL, es importante para la implantación y el establecimiento de una interfaz materno-fetal estable, y el glico-código fetal por su lado, además de contribuir a la unión estable, interactúa con el sistema inmunitario materno para permitir la tolerancia fetal (Jones y col., 2008; Skidmore, 2011). En CSA solo se registra un estudio del patrón de glicosilación en endometrio uterino en alpacas con y sin tratamiento de superovulación (López y col., 2014). López y col. (2014), determinaron que el glico-código uterino de las alpacas variaba con el tratamiento hormonal de superovulación, donde las lectinas PNA, SJA, SBA, ConA, LCA y PSA presentaron diferencias entre el CUD y el CUI, lo que sugiere que los glicoconjugados de unión a estas lectinas podrían participar en generar un ambiente propicio para la implantación en el CUI.

Queda claro que todavía existen muchos mecanismos fisiológicos desconocidos con respecto al RMP y al desarrollo e implantación embrionaria en CSA.



**Figura 7. Esquema comparativo entre placentas según su morfología.** A) La placenta difusa de la cerda consiste en muchos vellos coriónicos distribuidos en toda la superficie del corion. Penetran en el endometrio formando la interfaz materna fetal. Los vasos que forman cada vellosidad coriónica se fusionan eventualmente a partir de los vasos grandes que entran en el cordón umbilical. B) La placenta difusa de la yegua consta de muchos microcotiledones distribuidos en toda la superficie del corion. Estos microcotiledones son el sitio del intercambio materno-fetal. C) La placenta zonaria (PZ) consiste en; una zona de transferencia (ZT), una zona pigmentada (ZP) y una zona relativamente no vascular, el alantocorión. En la PZ, se forma una banda de tejido alrededor del concepto donde ocurre la transferencia de nutrientes. La PZ o placenta representa regiones locales de hemorragia materna y necrosis. D) La placenta discoide consiste en un parche alrededor de tejido coriónico que forma la interfaz materno- fetal. Los vasos de la zona de intercambio se fusionan para formar los vasos umbilicales que suministran sangre al feto. La vasculatura del corion (dentro del disco) está inmersa en charcos de sangre donde se produce el intercambio metabólico. A: Alantois, AC: Alantocorión, AM: Cavidad aminiónica, E: Endometrio, M: Miometrio, YS: Saco vitelino (modificado de Senger, 2004).



**Figura 8. Esquema comparativo entre las diferentes placentas según el grado de intimidad entre el punto de contacto materno y el fetal. A) Epiteliocorial (cerdos, caballos y rumiantes): (6) Capilares coriónicos, (5) Intersticio coriónico, (4) Epitelio coriónico, (3) Epitelio endometrial, (2) Intersticio endometrial y (1) Capilares endometriales. B) Endotelocorial (perros y gatos): (5) Capilares coriónicos, (4) Intersticio coriónico, (3) Epitelio coriónico, (2) Intersticio endometrial y (1) Capilares endometriales. C) Hemocorial (primates y roedores): (3) Capilares coriónicos, (2) Intersticio coriónico y (1) Epitelio coriónico. GR: glóbulo rojo (modificado de Senger, 2004).**

## II- MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA RECEPTIVIDAD UTERINA Y LA IMPLANTACION EN MAMIFEROS

### 1- Generalidades

La implantación de embriones representa el paso más crítico del proceso reproductivo en muchas especies, ya que los defectos que se originan durante la implantación del embrión inducen efectos dominantes con consecuencias adversas en los eventos de la gestación posteriores (Zhang y col., 2013). La implantación del concepto, consiste en un fenómeno biológico único que se produce en un período de tiempo limitado conocido como la ventana de implantación y que requiere, un endometrio receptivo, un embrión normal y funcional, y un diálogo sincronizado entre los tejidos maternos y embrionarios (Achache y col., 2006; Zhang y col., 2013). Si bien se ha identificado una gran cantidad de eventos celulares y vías moleculares involucradas en el diálogo entre el embrión y el útero durante la implantación a través de estudios de expresión génica y modelos de ratones diseñados genéticamente, en general, aún no se comprende la totalidad de la naturaleza del proceso de implantación de embriones (Zhang y col., 2013).

Un endometrio receptivo es el resultado de una serie de cambios estructurales y funcionales que ocurren durante la ventana de implantación (Redzovic y col., 2013; Hantak y col., 2014). La conformación de un endometrio receptivo está impulsada por las acciones coordinadas de hormonas esteroideas ( $E_2$  y  $P_4$ ) y la presencia del embrión. Los mecanismos moleculares de la receptividad uterina no se conocen en detalle, pero se piensa que podría estar relacionada con la adquisición de ligandos o receptores que facilitan la aposición y luego la adhesión del embrión, o a la pérdida de componentes que las impiden e inhiben (Perrier D' Hauterive y col., 2002). Entre los diversos sistemas implicados en la implantación embrionaria, la remodelación del endometrio es uno de los factores cruciales tanto para dar lugar a una receptividad efectiva como para lograr una gestación exitosa (Hashizume, 2007). Otros factores implicados incluyen aquellos que están involucrados en el desarrollo de la tolerancia inmuno-materna, la aposición, la decidualización, la angiogénesis y la invasión (Krüssel y col., 2003; Achache y col., 2006).

Las MMPs son enzimas involucradas en la remodelación endometrial, por lo que su rol durante la ventana de implantación es de vital importancia para comprender los eventos que dan lugar a una implantación exitosa. Las MMPs regulan cuidadosamente la composición y la rotación de los componentes de la MEC en varias especies (Hashizume,

2007). Su importancia, y particularmente la de MMP-2 y MMP-9, durante el proceso de implantación, ha sido reconocida tanto para especies con una implantación invasiva (humanos y roedores) así como para los de implantación no invasiva (rumiantes) (Hashizume, 2007). Es el equilibrio entre las MMPs y sus inhibidores los TIMPs, en cualquier punto focal lo que determina, por ejemplo, el sitio y el alcance de la invasión del trofoblasto (Salamonsen, 1999). Más aún, se ha relacionado a la desregulación de MMPs o TIMPs con la infertilidad (Tapia y col., 2008). Así pues, la regulación de las MMPs es de vital importancia para una remodelación endometrial adecuada, e involucra a diversas moléculas entre las cuales se encuentran además de sus inhibidores específicos los TIMPs, sus activadores MMP-14 y LGMN, así como al inductor de MMPs, EMMPRIN (Salamonsen, 1999; Curry y Osteen, 2003; Mishra y col., 2010; Shim y col., 2013).

Durante el período de pre-implantacional, las MMPs también están implicadas en la liberación de factores de crecimiento y/o citoquinas, así como los factores de crecimiento también pueden estimular la producción y/o liberación de las MMPs (Hashizume, 2007). Particularmente en este trabajo se abordará el análisis VEGFA y  $\beta$ -NGF. El estudio y la comprensión de las señales celulares y moleculares que regulan la receptividad e implantación en el útero puede ser útil para diagnosticar e identificar las causas de la pérdida recurrente de la preñez y para mejorar los índices de gestaciones exitosas en animales domésticos, en peligro de extinción y en humanos (Spencer y col., 2004).

## 2- Rol de las mucinas

Las mucinas son una familia de proteínas, voluminosas de alto peso molecular y fuertemente glicosiladas, que se ubican en la superficie celular formando parte del glicocáliz, y probablemente, durante la preñez sean las primeras moléculas con las que el embrión se encuentra antes de adherirse al endometrio (Redzovicy col., 2013). Así como el glicocáliz epitelial ofrece un sitio inicial de fijación para el embrión, también representa una barrera para la progresión de la implantación de modo que excluye una fracción de embriones. Esta interacción inicial donde el embrión se ubica dentro de un área específica de la superficie uterina, produce una señalización de corto alcance que lleva a la eliminación de las mucinas en el EL endometrial, es una prueba de viabilidad para el embrión, y los blastocistos de mala calidad, que pueden fallar en esta etapa. Al mismo tiempo, también coloca el estado de receptividad bajo prueba, para determinar si es capaz de responder a las señales derivadas del embrión (Aplin, 2007; Aplin, 2010).

Las mucinas se pueden dividir en dos subfamilias según su ubicación en relación con la superficie de la célula. Las mucinas formadoras de geles (secretadas) son completamente extracelulares y las mucinas de la superficie celular (transmembrana, unidas a la membrana), que son los principales componentes del glicocáliz (Gipson y col., 2014). De las mucinas transmembrana, las más estudiadas y mejor caracterizadas son la MUC1, MUC4 y MUC16 (Hattrup y Gendler, 2008; Gipson y col., 2014).

Particularmente MUC1 y MUC16, tienen funciones similares, como la de prevenir la adherencia o penetración de patógenos y la adhesión célula-célula. Estas mucinas presentan motivos de proteínas de esperma de erizo de mar, enterocinasa y agrina (SEA), estos motivos se encuentran en muchas proteínas asociadas a la membrana que se liberan desde la superficie de la célula (Gipson y col., 2014). En contraste con otras mucinas, que tienen un solo dominio SEA similar a MUC1, MUC16 tiene 16 módulos SEA, la variabilidad de la secuencia en los módulos SEA puede proporcionar funciones similares, pero con una especificidad de sustrato distinta entre las subfamilias. Curiosamente, sólo el segundo dominio SEA de MUC16 es similar al encontrado en MUC1 y otras mucinas; este segundo motivo SEA puede por lo tanto proporcionar un sitio de escisión proteolítica común con el de MUC1 y MUC3 (Hattrup y Gendler, 2008). Una comparación de la estructura molecular y el tamaño de MUC1 y MUC16 (Fig. 9) demuestra que, el ectodominio de MUC16 es aproximadamente 20 veces mayor que el de MUC1. MUC16 es una glicoproteína con una masa molecular de 2,5 MDa y una masa potencial glicosilada de aproximadamente 20 MDa (Hattrup y Gendler, 2008).

Las mucinas poseen sitios para la O-glicosilación, y la adición de cadenas de azúcar al núcleo peptídico dependen del tipo de célula y de las glicosiltransferasas expresadas; de forma similar, el grado de glicosilación (típicamente 50-100% de los sitios disponibles) depende del contexto (estado fisiológico y tipo de célula) en la que se expresan (Gipson y col., 2014).

La superficie epitelial apical del útero está protegida por el glicocáliz, que contiene MUC1 y otras mucinas de mayor masa molecular como MUC16 (Aplin, 2007; Hattrup y Gendler, 2008). Las mucinas pueden jugar un doble papel en relación con las interacciones celulares, ya que pueden tener capacidades tanto anti como pro-adhesivas (Fig.10). Debido a su estructura voluminosa y glicosilada, las mucinas bloquean por impedimento estérico la interacción con las moléculas de adhesión, de conformación más pequeña, ubicadas en la superficie celular uterina. Sin embargo, la adhesión inicial del embrión a las mucinas en el glicocáliz apical del EL, se da a través de una interacción mediada por carbohidratos



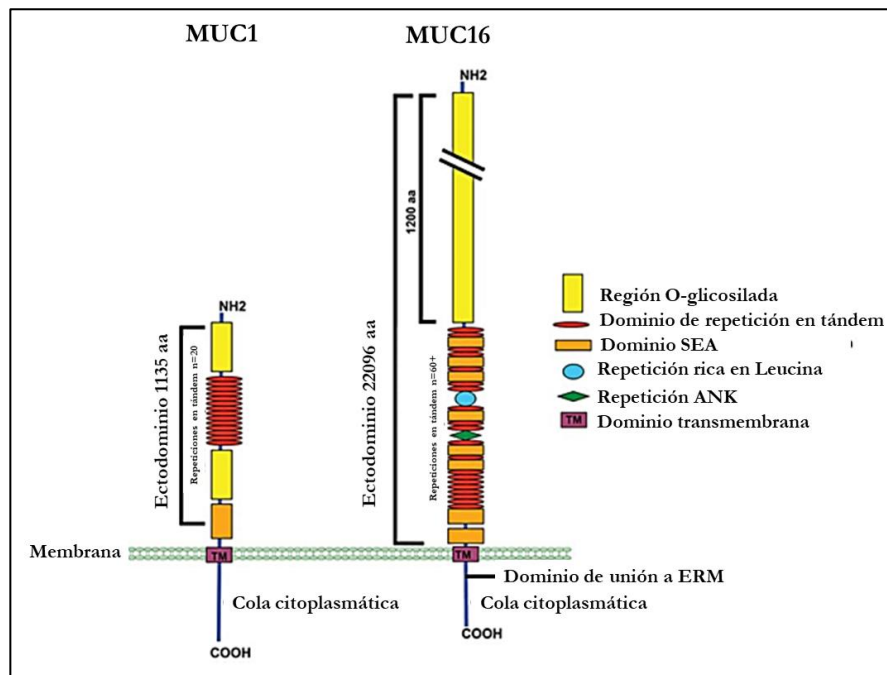
específicos, después del cuál el fenotipo epitelial de azúcares que lo compone, se modifica por una señal embrionaria de rango medio o corto. A continuación, se produce una cascada de interacciones que media la migración de embriones a través del epitelio hacia el sitio de implantación (Aplin, 2007). Por lo tanto, las mucinas pueden sufrir modificaciones a nivel del núcleo peptídico y a nivel de los carbohidratos que las componen, dichas modificaciones van a proporcionar epítopes para una variedad de moléculas de adhesión (Aplin, 2007; Hattrup y Gendler, 2008). Por ejemplo, el componente proteico del dominio de repetición variable de MUC1 interactúa con la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), mientras que los grupos carbohidratos sialil-Lewis<sup>a</sup> y sialil-Lewis<sup>x</sup> de MUC1 se unen a la familia de proteínas de selectina. Al igual que MUC1, se ha atribuido una función pro-adhesiva a MUC16 en virtud de su capacidad para unirse al marcador tumoral mesotelina (Aplin, 2007; Hattrup y Gendler, 2008).

En el útero, MUC1 suprime la interacción entre el embrión pre-implantacional y las moléculas de adhesión en el endometrio materno, creando así una barrera para la implantación en humanos, así como otras especies de mamíferos (Redzovic y col., 2013). Las hormonas sexuales controlan la transcripción génica de MUC1 ya sea por interacción directa con el promotor o indirectamente por estimulación o supresión de otros factores de transcripción en el útero, por lo tanto, la expresión de MUC1 se elimina bajo el control hormonal materno antes de la implantación del embrión. Sin embargo, en humanos, la P<sub>4</sub> aumenta la síntesis y secreción de MUC1 a un nivel sistémico durante el período pre-implantacional, al igual que ocurre en el endometrio de conejos, ratones, ratas y macacos (Aplin, 2007; Hattrup y Gendler, 2008; Redzovic y col., 2013). La eliminación de MUC1 en este caso, puede darse de modo local en el sitio de implantación, aparentemente como resultado de la señalización directa del embrión (Aplin, 2007; Redzovic y col., 2013). Esta remoción específica, sugiere la existencia de una vía diferente al control materno, por el cual MUC1 es eliminada de un sitio específico. Una posible vía de remoción del ectodominio de MUC1, se da mediante la acción de la metaloproteasa de matriz de membrana (MT1-MMP o MMP-14), la cual incrementa su expresión durante la fase receptiva y se co-localiza con MUC1 en el epitelio uterino humano durante la implantación (Redzovic y col., 2013).

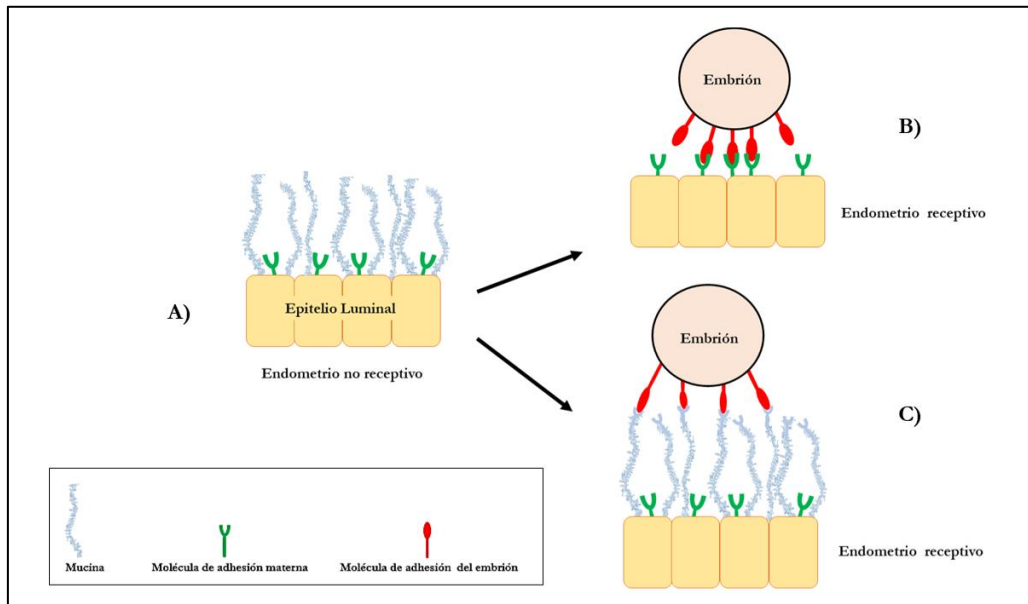
En bovinos, ovinos y porcinos la presencia de MUC1 se regula a través de la pérdida de los receptores de P<sub>4</sub> (RP<sub>4</sub>) en el epitelio uterino. El momento de la implantación, o en el caso de la fijación placentaria, se puede regular por el tiempo que el endometrio está expuesto a la estimulación de la P<sub>4</sub>. Las concentraciones de P<sub>4</sub> en suero se aumentan rápidamente después de la formación del CL. Después de 8 a 10 días de exposición a la P<sub>4</sub>,

se presenta una disminución de  $RP_4$  en el epitelio uterino, que conduce a la pérdida del efecto directo de la  $P_4$  en este tipo de célula. Como la síntesis epitelial de MUC1 es estimulada por la  $P_4$ , la pérdida del  $RP_4$  del epitelio uterino reduciría la producción de MUC1 y se abriría un estado receptivo para la adhesión del embrión (Bowen y col., 1997; Johnson y col., 2001; Hafez, 2002).

Con respecto a MUC16, si bien ha sido menos estudiada que MUC1, se ha sugerido que ambas poseen una regulación común de la adhesión celular del trofoblasto en las diferentes especies de mamíferos. En el endometrio bovino MUC16 disminuye durante la fase lútea y en el endometrio humano, se ha demostrado que la proteína MUC16 previene la adhesión celular inicial del trofoblasto y la expresión se pierde durante la fase receptiva (Bauersachs y col., 2008). Debido a su mayor tamaño MUC16 proporcionaría una función de barrera más importante que MUC1, y se cree que MUC1 cumple más bien una función de direccionamiento hacia el sitio de implantación (Aplin y col., 2001; Gipson y col., 2014).



**Figura 9. Esquema comparativo de mucina 1 (MUC1) y mucina 16 (MUC16).** Tanto MUC1 como MUC16 tienen una cola citoplásmica corta, un dominio transmembrana y un dominio extracelular muy glicosilado que contiene repeticiones en tándem de aminoácidos, ricas en serina y treonina, que permiten la O-glucosilación de estas moléculas. MUC1 tiene un módulo de proteínas de esperma de erizo de mar, enterocinasa y agrina (SEA), mientras que MUC16 tiene múltiples módulos SEA intercalados en repeticiones en tándem y, además, una región citoplásmica más corta y un dominio de unión a ERM. El ectodominio de MUC16 es aproximadamente 20 veces más largo que el de MUC1. Se ha estimado que MUC16 puede extenderse hasta 250-300 nm en el glicocáliz (modificado de Gipson y col., 2014).



**Figura 10. Modelo de las funciones y los cambios en la expresión de mucinas en la superficie apical de la mucosa del útero. A)** En un endometrio no receptivo, las mucinas no adhesivas se expresan abundantemente en estas superficies y protegen la mucosa del ataque enzimático, la adhesión microbiana y evitan la unión del embrión. **B)** En un endometrio receptivo, la pérdida de mucina puede ser desencadenada por hormonas esteroides o factores derivados del embrión en el útero para generar una superficie receptiva a la inserción del embrión. **C)** En el endometrio receptivo de algunas especies, es posible que las estructuras de oligosacáridos de mucina estén alteradas, de modo que la mucina ahora pueda funcionar para promover la unión del embrión (modificado de Carson y col., 1998).

### 3- Rol Metaloproteasas de matriz extracelular

La MEC es un componente regulador clave en la fisiología celular, ya que proporciona un entorno para la migración, división, diferenciación y anclaje celular, y, en algunos casos, un destino final entre la supervivencia o la muerte celular (Curry y Osteen, 2003).

El control altamente regulado del recambio y la homeostasis de los componentes de la MEC se da por acción de una clase específica de enzimas proteolíticas, las MMPs (Diao y col., 2011). La degradación de la MEC, por lo tanto, es un proceso exquisitamente controlado y, como tal, la síntesis y activación de las MMPs son puntos críticos de regulación de la homeostasis de MEC (Fig. 11) y a su vez la regulación de la síntesis de MMP puede ser específica tanto de tejido como del tipo de MMP (Curry y Osteen, 2003).

Actualmente, la familia de MMPs abarca al menos 25 enzimas proteolíticas relacionadas, que incluyen cuatro clases amplias: las colagenasas, gelatinasas, estromelisinases y enzimas tipo membrana (MT-MMP). Una lista de los miembros de la familia MMP y sus sustratos se detalla en la Tabla 1 (Curry y Osteen, 2003). Si bien, las MMPs se agrupan según

su capacidad de actuar sobre sustratos específicos de la MEC, en momentos y lugares selectivos, también tienen la capacidad de actuar sobre diferentes componentes de la misma, adquiriendo así la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos en el momento que se requiera (Curry y Osteen, 2003).

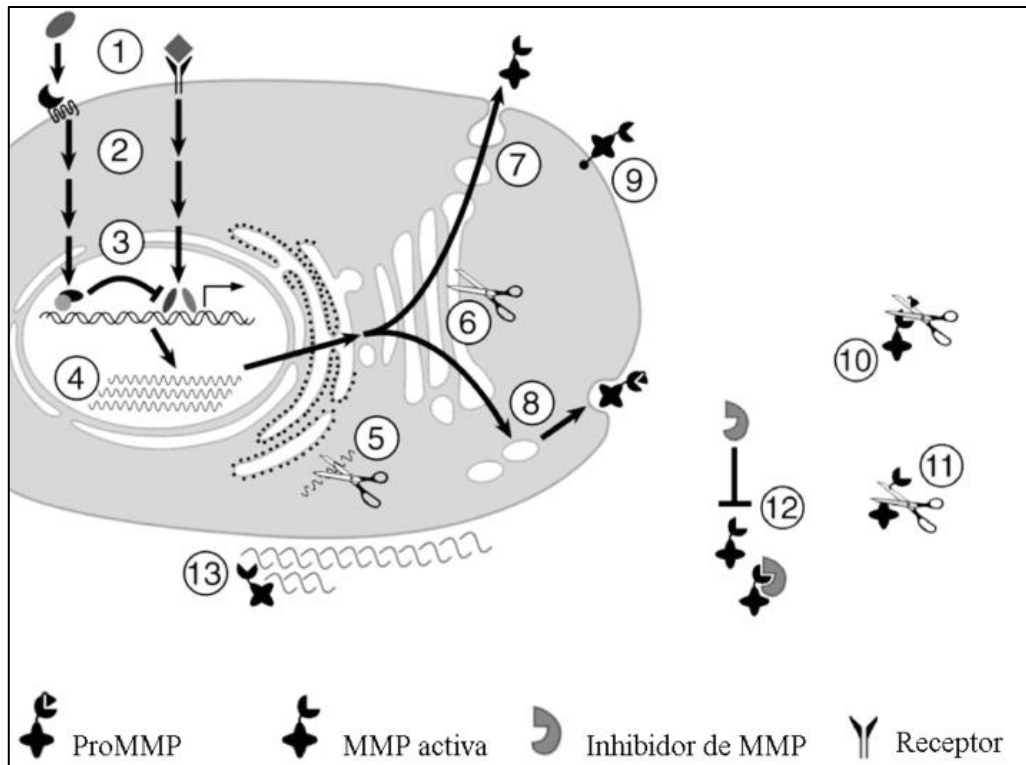
Las MMPs junto a sus inhibidores actúan en conjunto para controlar el sitio y el grado de recambio de la MEC en todo el cuerpo. Esta regulación por el sistema de las MMPs afecta numerosos procesos biológicos diversos; por ejemplo, a nivel reproductivo regula cambios estructurales en la arquitectura del tejido, que están orquestados por diversas hormonas, factores de crecimiento y citoquinas que son cruciales para la fisiología ovárica y uterina normal (Lenhart y col., 2001; Curry y Osteen, 2003). Durante la preñez temprana, el equilibrio temporal y espacial de la actividad de las MMPs y TIMPs en el útero es crítico para promover la invasión de trofoblasto mientras que también limita el alcance de la invasión. En consecuencia, las moléculas que alteran el equilibrio entre la expresión de MMPs y TIMPs son potencialmente importantes reguladores de la implantación (Chen y col., 2009).

De los más de 20 tipos de MMPs, MMP-2 (72 kDa) y MMP-9 (92 kDa) son los miembros de la familia más cruciales y representativos para la fisiología normal del sistema reproductivo. MMP-2 y MMP-9 desempeñan un papel integral en la implantación de embriones humanos y son las principales enzimas limitantes de la velocidad en la remodelación de la MEC durante la implantación. La hiperactividad de MMP-2 y MMP-9 se asocia con un entorno uterino desfavorable, similar al que se observa con la inflamación endometrial, la cual depende de un equilibrio preciso entre la activación y la inhibición de las MMPs (Yoshii y col., 2013).

Para hablar de la participación de las MMPs en especies con una implantación hemocorial, como primates, incluidos los humanos, se tiene que tener en cuenta que la mayoría de la información se obtiene de datos en ratas y ratones. En rasgos generales, se ha determinado que todas las clases de proteasas asociadas con la degradación de la MEC se expresan en un patrón temporal y específico en la célula, consistente con sus probables papeles en el proceso invasivo de la implantación en ratón. Además, estos patrones de expresión coinciden con los de los inhibidores específicos en el tejido que rodea el sitio de invasión (Salamonsen, 1999). La regulación de la expresión de MMP-2 y MMP-9 cumple un papel central en la implantación embrionaria y placentación. La MMP-9, es una enzima importante involucrada en la degradación de la membrana basal y es crucial para la capacidad invasiva de las células trofoblásticas. La regulación de la capacidad invasiva del trofoblasto también se da en esta instancia por los TIMPs, ya sean de origen decidual o de células del

trofoblasto, por ejemplo, TIMP-3 endometrial y MMP-9 del trofoblasto, regulan directa o indirectamente los sitios de invasión de la implantación (Huang, 2006). MMP-2 ha sido inmunolocalizada en muchos tipos de células diferentes, incluidos todos los tipos de células trofoblásticas, células deciduales, células de Hofbauer y fibroblastos vellosos en sitios de implantación humana durante el primer trimestre de gestación. La MMP-9 se inmunolocaliza dentro del EL y el EG durante el período post-ovulatorio y puede verse progresar hacia la superficie apical de las células, liberándose en el lumen uterino justo en el momento en que la superficie se vuelve receptiva, el papel de MMP-9 en este momento aún no se conoce, pero esta tiene el potencial de degradar componentes del glicocáliz (Merchant y Davidge, 2004). Durante el periodo pre-implantacional, la MMP-14 de origen endometrial se detecta junto con la MMP-2 de origen fetal, por lo que se postuló que esto da lugar a la activación de la MMP-2 de origen fetal, facilitando la penetración de la lámina basal del EL. MMP-2 además está implicada en la vasoconstricción a través de la producción de vasoconstrictores y la reducción de los niveles de vasodilatadores, así mismo, factores como VEGF son capaces de estimular la producción y/o liberación de estas MMPs (Merchant y Davidge, 2004). TIMP-1, -2 y -3 están presentes en el endometrio humano a lo largo del ciclo en todos los compartimentos celulares y se expresan fuertemente en células deciduales. Estos inhibidores proporcionarían una barrera sustancial a la invasión en estas especies (Salamonsen, 1999).

En especies con una placentación epiteliocorial, se esperan efectos menos marcados en la remodelación endometrial; sin embargo, a pesar de esta diferencia, y la menor información que existe sobre la implantación en estas especies en comparación con los datos en modelo murino, MMP-2 y MMP-9 parecen tener la misma importancia en este proceso (Salamonsen, 1999). Tanto en el fluido uterino (FU), como en el trofoblasto, se ha determinado la presencia de MMP-2 y MMP-9 en el momento de la implantación en ovejas preñadas. Los embriones de cerdo pre-implantacionarios también producen MMP-2 y MMP-9. En ovejas y cerdos, el trofotodermo y el endometrio producen una variedad de inhibidores de la proteasa como los TIMPs, lo cual podría estar implicado en la limitación de la actividad invasiva del concepto. El endometrio de estas especies también tiene el potencial de producir un amplio rango de MMPs, y su producción focal es sin duda importante para los extensos cambios vasculares asociados con la implantación (Salamonsen, 1999).



**Figura 11. Representación esquemática de la regulación de las MMPs.** Los mecanismos regulatorios incluyen señales de inducción y supresión de la transcripción (1) que actúan a nivel de receptores de la superficie celular y desencadenan una cascada de señales intracelulares (2) dando lugar a la activación o represión transcripcional de los genes de las MMPs (3). Los mecanismos post-transcripcionales también pueden influir en la expresión de las MMPs (4). Eventualmente, el ARNm puede ser degradado (5), o bien ser traducido en la forma latente de la proteína. Ciertas proMMPs son activadas intracelularmente por convertasas tipo furina (6) y son secretadas (7) o insertadas en la membrana celular en su forma activa (9). La mayoría de las MMPs sin embargo son secretadas en su forma latente (8) y activadas en el espacio extracelular por otras proteasas (10). Las MMPs activas pueden actuar degradando componentes de la MEC (13). Alternativamente las MMPs pueden ser inhibidas por su unión a inhibidores (12) o sufrir una proteólisis que las inactive (11) (Modificado de Sternlicht y Werb, 2001).

**Tabla 1. Resumen de la nomenclatura y blancos de acción de las MMPs** (modificada de Curry y Osteen, 2003).

MMP n°	Nombre común	Colágeno	Sustratos adicionales
1	Colagenasa-1, colagenasa intersticial, colagenasa fibroblástica	I, II, III, VII, VIII, X	Agrecanos/gelatina/ MMP-9
2	Gelatinasa de 72 KDa, gelatinasa A, colagenasa de 72KDa tipo IV	I, II, III, IV, V, VII, X, XI	Agrecanos/elastina/fibronectina/gelatina / laminina/ MMP-9 /MMP-13
3	Estremolisina-1, transina-1, procollagenasa, proteína PTR1	II, III, IV, IX, X, XI	Agrecanos/elastina/fibronectina/gelatina / laminina/ MMPs 7, 8, 13
7	Matrilisina, matina, PUMP-1, metaloproteasa uterina	IV, X	Agrecanos/elastina/fibronectina/gelatina / laminina/ MMPs 1, 2, 9
8	Colagenasa-2, colagenasa neutrofila, colagenasa PMNL	I, II, III, V, VII, VIII, X	Agrecanos/elastina/fibronectina/gelatina / laminina
9	Gelatinasa de 92 KDa, gelatinasa B, colagenasa de 92 KDa tipo IV	IV, V, VII, X, XIV	Agrecanos/elastina/fibronectina/gelatina
10	Estremolisina-2, transina- 2	III, IV, V	Agrecanos/elastina/fibronectina/gelatina / laminina/MMPs 1, 8
11	Estremolisina-3		Agrecanos/fibronectina/laminina
12	Macrófago metaloclastasa	IV	Elastina/fibronectina/gelatina/laminina
13	Colagenasa-3	I, II, III, IV	Agrecanos/gelatina
14	Metaloproteasa de tipo membrana-14, MT1	I, II, III, IV	Agrecanos/elastina/fibronectina/gelatina / laminina/ MMPs 2, 13
15	Metaloproteasa de tipo membrana-15, MT2		Fibronectina/gelatina/laminina/ MMP-2
16	Metaloproteasa de tipo membrana-16, MT3		MMP-2

### 3.1. Sustratos de la MMPs en la matriz extracelular

Entre los componentes de la MEC se incluyen los colágenos, proteoglicanos heparán sulfato y laminina (Fig. 12); los cuales durante la gestación temprana sufren una degradación proteolítica que se da tanto en primates con placentación invasiva (remodelación endometrial alta), así como en rumiantes con placentación no invasiva (remodelación endometrial moderada) (Hashizume y col., 2003). Las MMPs contribuyen a la degradación proteolítica de la MEC en condiciones fisiológicas y patológicas, por lo que también participan en la remodelación de tejidos uterinos durante el ciclo estral y la preñez en varias especies (Hashizume y col., 2003). Por esta razón, el contenido neto de colágeno (COL) representa un equilibrio entre su biosíntesis y su degradación por parte de MMP específicas, tales como colagenasas, gelatinasas y estromelisininas (Raffetto y col., 2008).

Los colágenos, son los principales componentes proteicos de la MEC y proporcionan a los tejidos su fuerza y forma (Diao y col., 2011). Existen al menos 28 subtipos de colágeno diferentes clasificados en ocho subfamilias: COL formador de fibrillas (COLI y COLIII); COL de membrana basal (COLIV); COL formador de filamentos moldeados (COLVI); COL de anclaje formador de fibrillas (COL VII); COL que se asocia a fibrillas con

interrupciones en triple hélice (COLIX); COL formador de redes hexagonales (COLX); COL transmembrana (COL XIII); y las multiplexinas (COL XVIII)(Fig. 13) (Diao y col., 2011). Además de sus funciones estructurales, los colágenos actúan como ligandos para receptores de membrana celular (por ejemplo, integrinas y anexina A5) a través de los cuales median funciones celulares, tales como crecimiento, supervivencia, diferenciación, adhesión y migración (Diao y col., 2011; Guzeloglu-Kayisli y col., 2011). Si bien, la MEC sirve de reservorio de factores de crecimiento y enzimas, así mismo hay factores de crecimiento que se unen específicamente al COL y un cambio en la proporción del mismo afectaría la bio-disponibilidad de estos factores (Fig. 14). Una deposición anormalmente aumentada de COL también puede afectar procesos como la angiogénesis, la permeabilidad vascular, funciones uterinas, y hasta inclusive, puede retrasar eventos de remodelación durante la implantación (Wary y col., 2003; Diao y col., 2011).

En la MEC, la alteración del contenido y expresión del COL tipo I-IV, laminina y fibronectina, disminuye espacio-temporalmente alrededor del inicio de la implantación en bovinos al igual que en roedores y humanos (Hashizume y col., 2003). Así, durante el proceso de implantación la expresión del gen del COL sufre profundas alteraciones debido a la diferenciación progresiva de células del estroma como los fibroblastos (productores de colágeno) en células deciduales, en estas especies (Diao y col., 2011). Los principales COL formadores de fibrillas (I, III y V) están reducidos en los sitios de implantación en comparación con los sitios sin implantación en el útero de rata (Diao y col., 2011). En bovinos, también se producen cambios en el contenido de COL durante el proceso de implantación que ruptura de la membrana basal (Hashizume y col., 2003).

Como se mencionó anteriormente, la degradación del COL en la MEC depende de la actividad de las MMPs, en particular de MMP-2 y MMP-9 (Rodríguez-Piñón y col., 2015). La síntesis y regulación de estas gelatinasas participan en el proceso de remodelación, tanto en el periodo periparto como durante el período de implantación. Por ejemplo, se ha determinado que MMP-2 puede desempeñar importantes funciones reguladoras para el contenido de COL durante la implantación, inclusive en rumiantes (Kizaki y col., 2008) y su actividad sobre el COLI, se ve incrementada por la presencia de MMP-14 (Ohuchi y col., 1997). Además, en procesos patológicos como la endometriosis, es normal el recambio del COLIII por el COLI y se ha determinado que los cambios en la proporción de COL y el tipo de COL también afectan la presencia de receptores de estrógeno y P<sub>4</sub> (Lunelli y col., 2013).



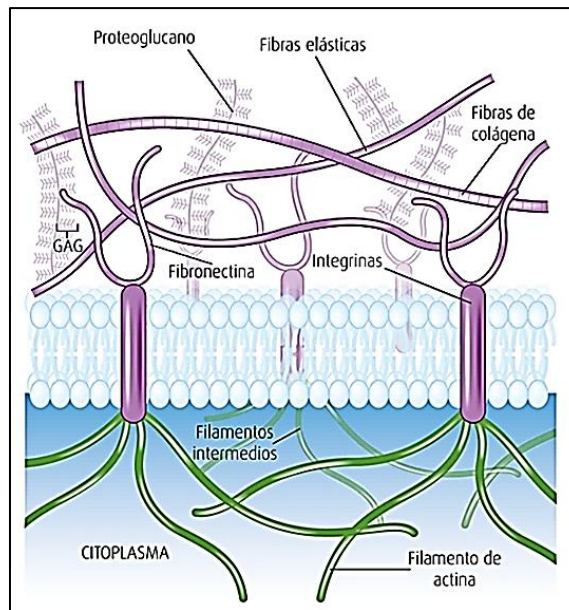


Figura 12. Esquema de la estructura de la matriz extracelular (Sepúlveda, 2013).

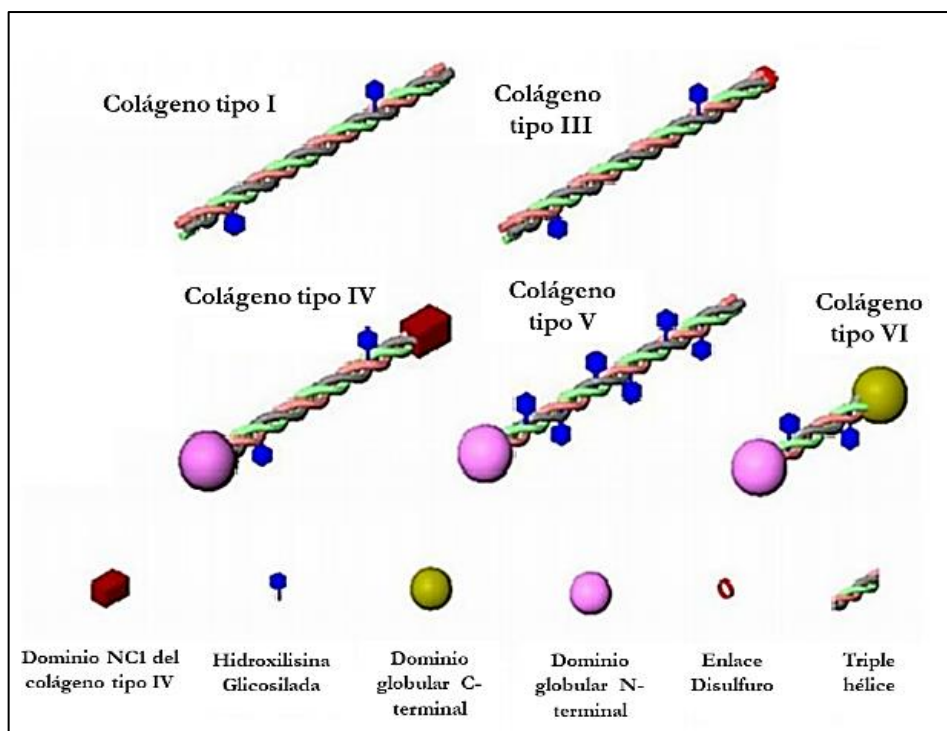
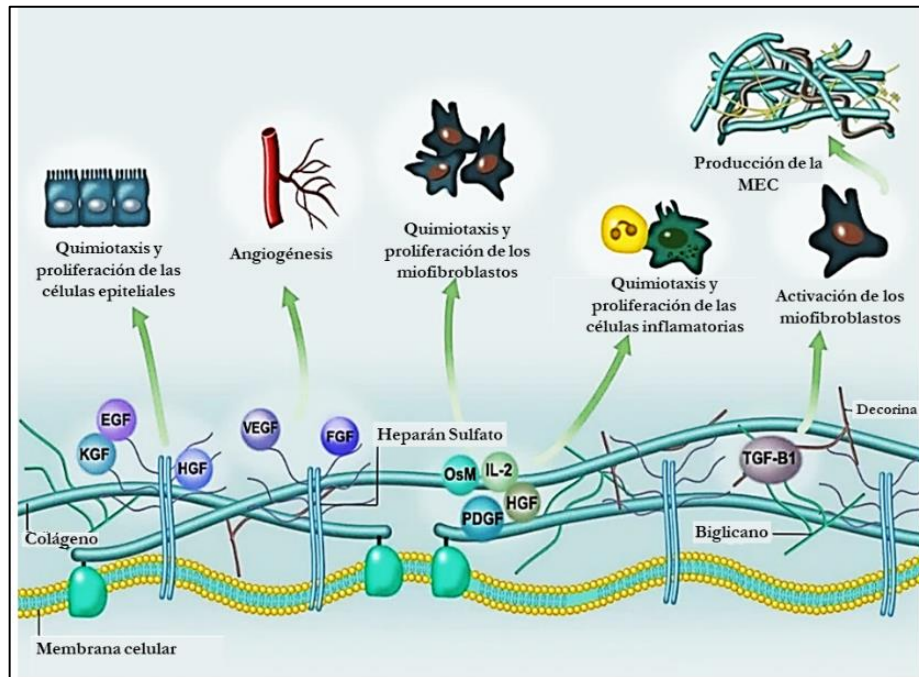


Figura 13. Esquema de las principales diferencias estructurales entre colágenos (modificado de Gorgieva y Kokol, 2011).



**Figura 14. Esquema de los factores de crecimiento ligados a la matriz extracelular.** Además de los componentes estructurales, la MEC es un reservorio de diversas moléculas entre las cuales se encuentran los factores de crecimiento que intervienen en diversos procesos fisiológicos. PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, EGF: factor de crecimiento epidérmico, TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante factor  $\beta$ , VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, FGF: factor de crecimiento de fibroblastos, KGF: factor de crecimiento de keratinocitos y HGF: factor de crecimiento de hepatocitos, entre otros (modificado de Monteiro y col., 2018).

### 3.2. Moléculas Inhibidoras de las MMPs

La acción de las MMPs, se regula específicamente por los “inhibidores tisulares de metaloproteinasas” los TIMPs, los cuales se producen localmente e inhiben específicamente a las MMPs. Los TIMPs están hormonalmente regulados, y se cree que coordinan numerosos procesos ováricos y uterinos, incluyendo la remodelación de la MEC, el crecimiento celular y la esteroidogénesis (Curry y Osteen, 2003).

Los TIMPs (1-4), son glicoproteínas secretadas (29 kDa) que se unen e inhiben a la forma activa de las MMPs en una relación estequiométrica 1: 1. La capacidad de los TIMPs para inhibir la acción de las MMPs se da a través de la interacción del dominio N-terminal del TIMP con el sitio activo en el dominio catalítico y el surco de unión al sustrato de la MMP. TIMP2 está regulado diferencialmente de TIMP1 y actúa selectivamente en diferentes MMPs, por ejemplo, TIMP2 tiene una alta afinidad por MMP-2, mientras que TIMP1 se une preferentemente a MMP-9. TIMP3 también exhibe preferencia por MMP-9 y es capaz de inhibir a MMP-14. Sin embargo, a diferencia de TIMP1 o TIMP2, TIMP3 se secreta y luego se une al MEC, es decir que no se encuentra libre en el fluido extracelular. TIMP4 está

presente en los tejidos reproductores y es un buen inhibidor para todas las clases de MMP sin una preferencia notable para una MMP en particular. Además de su función como inhibidores de las MMPs, los TIMPs también pueden actuar promoviendo el crecimiento y desarrollo de embriones, como agentes anti-angiogénicos, estimulando el crecimiento celular en una variedad de tejidos, influyendo en la apoptosis y reclutando células inactivas en el ciclo celular (Curry y Osteen, 2003).

A nivel hormonal  $E_2$  y  $P_4$ , tienen un efecto inhibidor sobre la actividad de las MMPs, efecto que se controla mediante una variación espacio-temporal del  $RP_4$  y el receptor de estrógenos en el útero y el cuello uterino, en ratas (Diao y col., 2011).

### *3.3. Moléculas activadoras e Inductores de las MMPs*

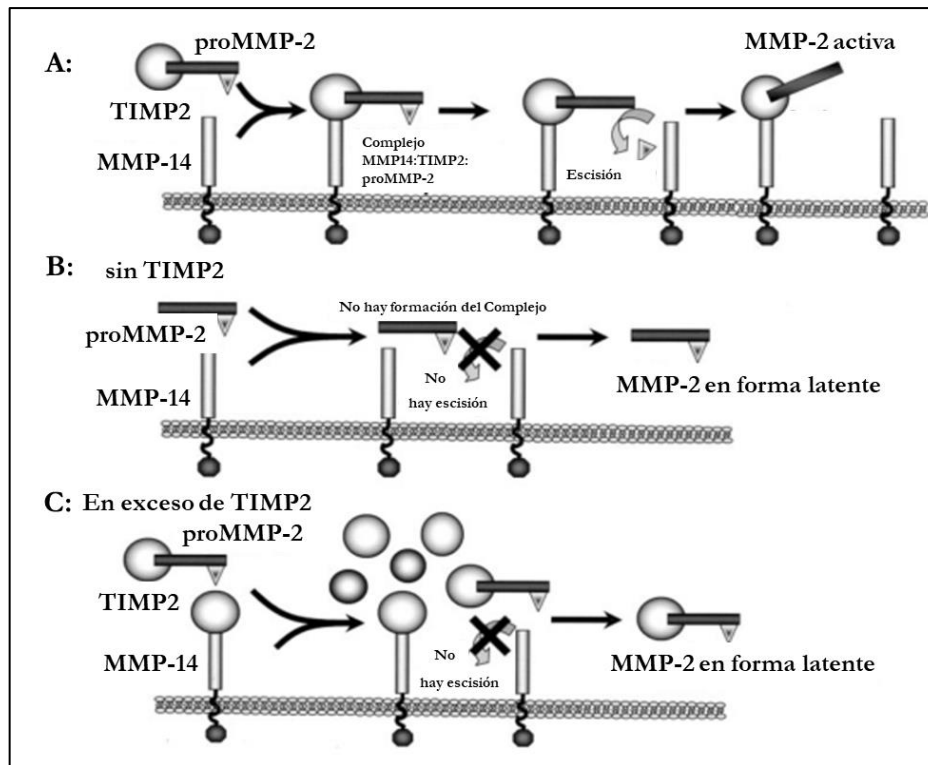
Después de la síntesis de MMPs, la activación de las pro-MMP en el espacio extracelular ocurre a través de proteinasas, que incluyen otras MMPs, serina proteinasas (activador de plasminógeno/sistema de plasmina), cisteína proteinasas, así como agentes no proteolíticos tales como especies reactivas de oxígeno, agentes reactivos sulfhidrilo y desnaturalizantes. El sistema plasminógeno activador-plasmina se ha propuesto para activar MMPs en la superficie celular a través del activador de plasminógeno uroquinasa (uPA), receptor de uPA/cascada de plasminógeno (Curry y Osteen, 2003). Sin embargo, las MMPs que son resistentes a la activación de la serina proteinasa, como la MMP-2, se activan a través de un mecanismo que involucra a MMP-14 y a TIMP2 (Curry y Osteen, 2003).

En este caso, la activación de MMP-2 se da por la capacidad del dominio C-terminal de TIMP2 para unirse a la pro-MMP-2 para formar un complejo no inhibidor, pro-MMP-2/TIMP2 (Fig. 15). Este complejo puede reconocerse y unirse por el dominio extracelular de la MMP-14. Alternativamente, TIMP2 se puede unir a MMP-14 de tal manera que se forma un receptor para la MMP-2 latente. Independientemente de la formación del complejo trimolecular de MMP-14/TIMP2/pro-MMP2 en la superficie de la célula, las MMP-14 adyacentes libres son capaces de escindir el pro-péptido de MMP-2 activando a la MMP (Fig. 15A). Por lo tanto, TIMP2, junto con las MMP-14, actúan para regular el sitio específico de activación de MMP-2. La activación de MMP-2 en este caso, se da mediante un delicado equilibrio entre estas moléculas, por ejemplo, la exposición de TIMP2 exógeno a las células que expresan MMP-14 mejora la activación de MMP-2, mientras que la ausencia de TIMP2 (Fig.15B) o altas concentraciones de TIMP2 exógeno (Fig.15C) disminuye la activación de MMP-2. Por lo que se ha propuesto que este proceso ocurre con niveles bajos

de TIMP2 que propician la formación del complejo trimolecular (es decir, MMP-14/TIMP2/pro-MMP-2) que resulta en la activación de MMP-2, mientras que altas concentraciones de TIMP2 se unen a todas las MMP-14 disponibles de modo que no haya MMP-14 libre disponible para activar MMP-2. Por lo tanto, la activación de la forma latente de MMP-2 puede ser regulada diferencialmente por la presencia o ausencia de MMP-14 en la superficie celular y la concentración de TIMP2 en el espacio extracelular. Este mecanismo de activación de MMP-2 también puede ocurrir para la activación de otras MMPs (Curry y Osteen, 2003).

Si bien uno de los mecanismos de activación de MMP-2 depende de la acción de MMP-14 en conjunto con TIMP2, se ha determinado recientemente otra vía de activación de MMP-2 durante la preñez temprana (Chen y col., 2001; Ledgard y col., 2009). LGMN, es una cisteín proteínasa, que hidroliza específicamente enlaces asparaginilo, de origen lisosomal, es activa en condiciones ácidas (pH 3 - 6), por lo que en plantas y mamíferos funciona como una enzima de procesamiento. LGMN escinde el enlace asparaginilo del zimógeno de MMP-2, para dar lugar a la enzima madura, y es capaz de hacerlo, aunque MMP-2 se encuentre unida a TIMP-2 (Chen y col., 2001).

Con respecto al inductor de MMPs, EMMPRIN, este ha sido identificado como un componente clave para la estimulación de la liberación de MMPs por parte de las células del estroma. EMMPRIN es una glicoproteína transmembrana multifuncional, que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa en la superficie celular de varios tejidos o células embrionarias y adultas. EMMPRIN tiene diferentes designaciones (basigina, CD147, etc.) según la función celular que lleve a cabo. EMMPRIN contiene un dominio extracelular (DEC), con dos dominios de inmunoglobulina (IgI e IgII), que comprende uno o dos sitios de N-glicosilación respectivamente, un único dominio transmembrana con un ácido glutámico conservado y una cola citoplásmica corta. EMMPRIN está glicosilado de forma variable entre 44 y 66 kDa, con una proteína central de aproximadamente 28 kDa. Dependiendo del tipo de célula, la sobreexpresión de EMMPRIN puede estimular la producción de diferentes MMPs, a través del contacto directo célula-célula o de forma paracrina, cuando su forma soluble se libera de la superficie celular. La glicosilación de los dominios DEC, IgI e IgII de EMMPRIN estimula significativamente la producción, secreción y actividad gelatinolítica de MMP-2 (Papadimitropoulou y Mamalaki, 2013), además, el patrón de expresión del gen de EMMPRIN se correlaciona con la expresión de MMP-2 y MMP-9, lo que sugiere que su expresión puede influir en las células del estroma uterino durante la gestación temprana en ratones (Chen y col., 2009).



**Figura 15. Activación y regulación de MMP-2 por metaloproteasa de membrana tipo 1 (MMP-14).** Un complejo de TIMP2 y pro-MMP-2 se une a MMP-14 (A). Una MMP-14 adyacente es capaz de escindir el dominio propéptido de MMP-2, dando como resultado la activación de MMP-2. Esta activación de MMP-2 depende de un equilibrio delicado entre pro-MMP-2, TIMP2 y MMP-14. Por ejemplo, en ausencia de TIMP2 (B), pro-MMP-2 no se une a por MMP-14. Como tal, pro-MMP2 no puede ser activado por MMP-14 adyacente y permanece en un estado latente. En exceso de TIMP2 (C) no se da el acoplamiento de pro-MMP-2 a MMP-14. Por lo tanto, pro-MMP-2 no puede ser activado por MMP-14 y permanece en un estado latente (modificado de Curry y Osteen, 2003).

#### 4- Rol de los Factores de Crecimiento

Numerosos y sofisticados mecanismos de adaptación promueven interacciones complejas entre el embrión en desarrollo, la decidualización del endometrio y el desarrollo de la tolerancia immuno-materna y/o alteraciones en las respuestas inmunitarias celulares y humorales. Todos estos eventos celulares y moleculares están controlados por hormonas, incluidos los esteroides sexuales y por factores locales paracrinós. Estas moléculas de señalización producidas localmente consisten en factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas.

El término factor de crecimiento corresponde a una familia de proteínas de señalización secretadas, capaces de inducir la proliferación y la diferenciación en las células. Los factores de crecimiento típicamente actúan como iniciadores de cascadas de señalización en células por interacciones paracrinós y endocrinas. Estos se pueden clasificar de acuerdo con asociaciones estructurales y evolutivas, ordenándolas en familias más grandes de

proteínas. En los últimos años se ha observado un gran aumento en la cantidad de factores de crecimiento identificados y su papel en la implantación se está comprendiendo cada vez más. La expresión de diversos factores de crecimiento y sus receptores en el útero es de tipo célula- específica y temporal durante el período de pre-implantación, lo que sugiere que algunos de estos factores de crecimiento y citoquinas son cruciales para la implantación del blastocisto y/o la receptividad endometrial (Tommetten y col., 2005), particularmente en este apartado nos centraremos en VEGFA y  $\beta$ -NGF.

### *4.1. Factor de Crecimiento Vascular A*

En el sitio de implantación del blastocisto, eventos secuenciales como el aumento de la permeabilidad vascular, la deciduización en el estroma endometrial y la posterior apoptosis en las células epiteliales conducen a la adhesión y penetración del trofoblasto. La familia de los VEGF son los principales reguladores de la vasculogénesis y la angiogénesis uterina durante el ciclo reproductivo y la gestación. La función y expresión de VEGF han demostrado ser fundamentales para la angiogénesis durante el proceso de implantación y el desarrollo temprano de la placenta. La alteración de este proceso podría conducir a la falla de la implantación y la pérdida temprana de la gestación. Durante la fase de pre-implantación, ciertos receptores de VEGF parecen expresarse y funcionar para optimizar la implantación del blastocisto al mediar la permeabilidad vascular (Trollice y col., 2008; Ghosh y col., 2000; Noriyuki y col., 2007; Saikia y col., 2017).

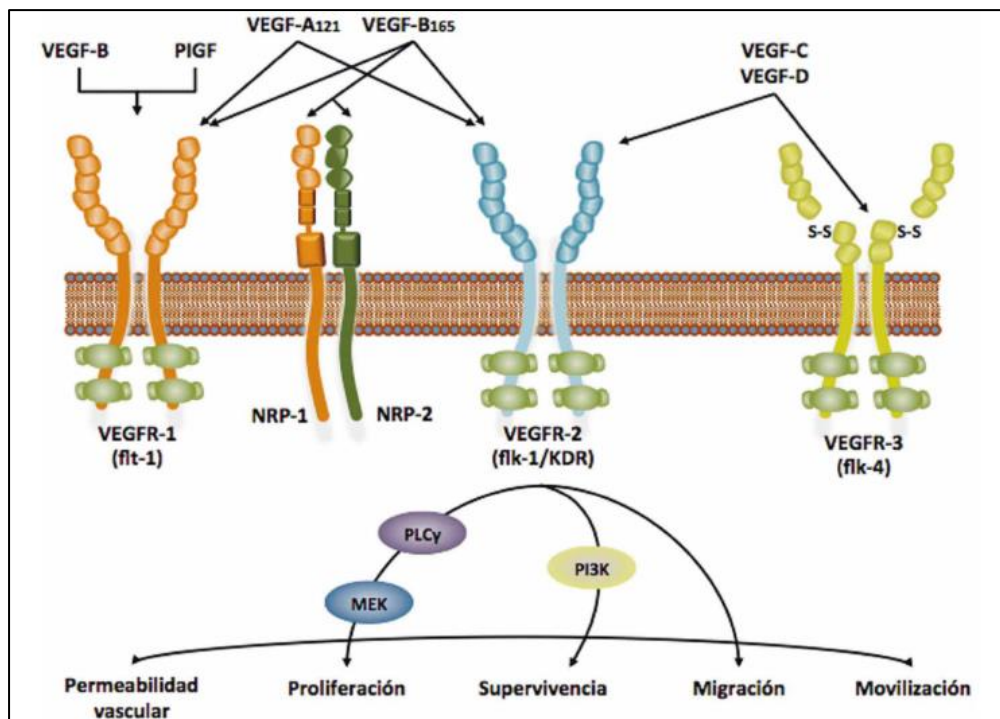
La familia VEGF está conformada por seis citoquinas: VEGF A, B, C, D, E, y el factor de crecimiento placentario (PGF o PLGF), así como de sus respectivos receptores (VEGFRs), que son los factores más críticos en la regulación de los procesos vasculogénesis, angiogénesis y linfangiogénesis (Tabla 2) (Roa, 2014). Los receptores de la familia VEGF pertenecen a una subfamilia de receptores tirosina-quinasa transmembrana de la clase III (TrKs) que se expresan en altos niveles en las células endoteliales. Existen tres tipos de receptores para VEGF (VEGFRs); VEGFR1 regula negativamente la angiogénesis mediante la modulación de la actividad de VEGFR2. VEGFR1 es requerido para el normal desarrollo y ensamblaje de angioblastos en los vasos sanguíneos. VEGFR2 se expresa principalmente en las células endoteliales activas y sus precursores embrionarios, además es necesario para diferenciación de los angioblastos durante la vasculogénesis, mientras que VEGFR3 es predominantemente expresada en endotelio linfático (Roa, 2014). Todas las isoformas del VEGF son capaces de unirse a alguno de estos tres receptores: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-

2 (KDR o Flk-1) o VEGFR-3 (Flt-4). Además, algunos VEGFs que se unen al VEGFR-1 o VEGFR-2 también pueden unirse a co-receptores como las neuropilinas (NRPs). Al igual que otros TrKs, los VEGFRs se dimerizan y experimentan trans-autofosforilación con la unión al ligando, desencadenando una cascada de señalización fosforilando distintas proteínas, como la proteína 3-quinasa (PI3K), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y el blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR) regulando mecanismos involucrados en la angiogénesis, activados por el VEGF (Figura 16) (Roa, 2014). VEGF-A es el principal miembro y más estudiado de esta familia, éste posee 3 isoformas, VEGFA<sub>165</sub>, VEGFA<sub>183</sub> y VEGFA<sub>145</sub>, siendo la primera, la isoforma más común y predominante. VEGFA interviene en las interacciones materno embrionarias al regular el aumento de la permeabilidad endometrial vascular y la proliferación de células endoteliales en los sitios de implantación en roedores, además es un regulador esencial para la vasculogénesis y angiogénesis, promueve la división celular y migración de las células endoteliales y provee a dichas células señales de supervivencia y anti-senescencia junto a neuroprotección ante desordenes isquémicos (Guzeloglu-Kayisli y col., 2009; Roa, 2014). Además, VEGFA tiene efectos sustanciales en el establecimiento de la receptividad endometrial (capacidad adhesiva) y la implantación en diversas especies de mamíferos, incluidos los humanos. Tanto es así, que bajos niveles de este factor se han determinado en mujeres con infertilidad inexplicada (Binder y col., 2014; Zhang y col., 2017).

Se ha descrito que, VEGF, MMP-2 y MMP-9 comprenden una red funcional que regula el fenotipo invasivo en una variedad de tipos de células incluyendo las células trofoblasto (Ghosh y col., 2011). La secreción de MMPs permite a las células endoteliales penetrar en su membrana basal subyacente y elimina la inhibición de contacto que normalmente bloquea la proliferación de células endoteliales (Hollborn y col., 2007). De este modo es que existe una relación de regulación estrecha entre las MMPs y el VEGF, MMP-9, por ejemplo, tiene una regulación de retroalimentación positiva al ser capaz de inducir un incremento en la expresión génica y la secreción de VEGF. La presencia de VEGF unido a la matriz extracelular es dependiente de P<sub>4</sub> en primates, y se vuelve biodisponible después de su liberación proteolítica de la MEC por acción de la MMP-9 (Hollborn y col., 2007; Guzeloglu-Kayisli y col., 2009; Minder y col., 2015) y MMP-2 en cambio tiene un efecto negativo al reducir la secreción de este factor, mientras que VEGF estimula la activación de MMP-2 en células endoteliales (Malik y col., 2006).

**Tabla 2. Subtipos de VEGFs, receptores y funciones** (modificado de Roa, 2014).

Subtipo de VEGF	Receptor	Mecanismo de acción
VEGFA	VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilina-1	Fundamental en vasculogénesis y angiogénesis.
VEGFB	VEGFR-1	Factor de supervivencia para células endoteliales, células musculares lisas vasculares y pericitos.
VEGFC	VEGFR-2, VEGFR-3	Esencial para linfangiogénesis y angiogénesis patológica
VEGFD	VEGFR-2, VEGFR-3	Promueve la metástasis linfática e induce angiogénesis.
VEGFE	VEGFR-2	Efecto mitogénico de células endoteliales e induce la angiogénesis.
PGF	VEGFR-1, neuropilina-1	Promueve la supervivencia de las células endoteliales y modula la actividad de señalización de VEGFA.



**Figura 16. Familia de VEGF, receptores y vías de señalización** (modificado de Roa, 2014).

#### 4.2. Factor de Crecimiento Nervioso $\beta$

El  $\beta$ -NGF, pertenece a una familia de proteínas conocidas como neurotrofinas que son esenciales para diversos procesos fisiológicos como la supervivencia, el desarrollo y la diferenciación de las neuronas en los sistemas centrales y periféricos (Li y col., 2012; Maranesi y col., 2016). Aunque el NGF ha estado históricamente implicado en varias funciones del sistema nervioso, recientemente se ha indicado que este factor es clave para el éxito del embarazo, ya que constituye un vínculo funcional entre los sistemas nervioso, inmunitario y endocrino y la traducción de señales ambientales o endocrinas (Fig.17)



(Vandita y col., 2015). Los efectos pleiotrópicos de la vía NGF además incluyen, el control de la foliculogénesis y la función ovárica, y la regulación de la fisiología y la angiogénesis a través de interacciones con VEGF (Frank y col., 2014).

El NGF es producido como un precursor de proNGF, que más tarde experimenta escisión proteolítica intracelularmente por plasmina y furina, y extracelularmente por MMPs para producir su forma madura (Mohamed y El-remessy, 2015). La degradación de NGF en productos biológicamente inactivos también se da por acción de las en MMPs, y está relacionada con un aumento de la actividad de las mismas. Por ejemplo, MMP-2 y MMP-9 activas, degradan fuertemente al NGF maduro, pero no al proNGF (Chattopadhyay y col., 2007; Kao y col., 2015; Kucharczyk y col., 2016).

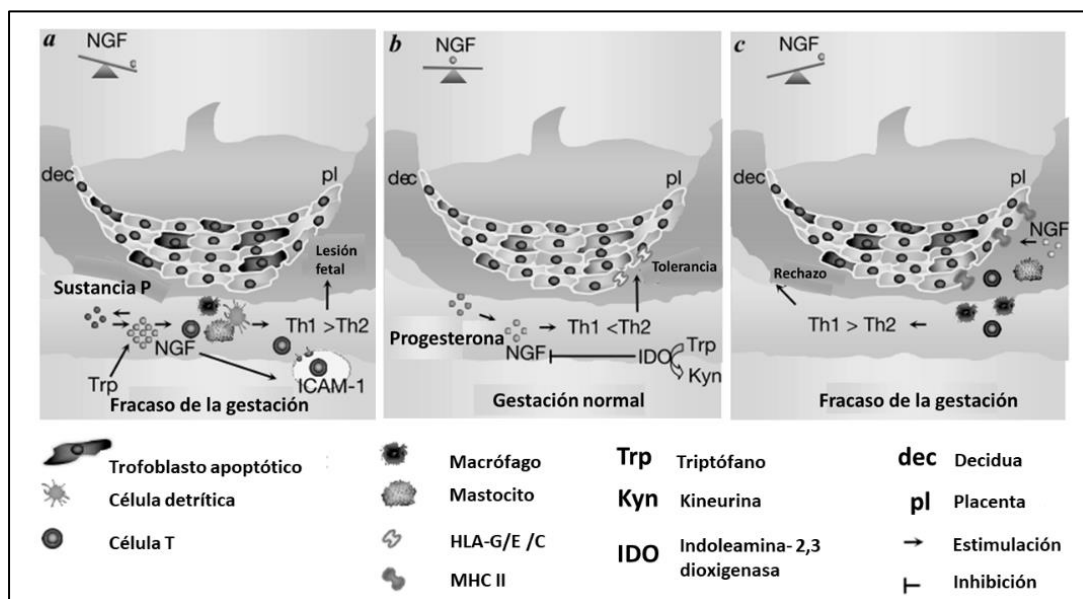
Los múltiples efectos de  $\beta$ -NGF están mediados a través de sus receptores, el receptor de membrana de alta afinidad, la tirosina quinasa A (TrkA) y el receptor de baja afinidad, receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR o p75<sup>NTR</sup>) (Fig. 18) (Li y col., 2012; Mohamed y El-remessy, 2015; Maranesi y col., 2016).  $\beta$ -NGF y sus receptores, se expresan en una gran variedad de tejidos, incluidos diferentes órganos del tracto genital masculino y femenino donde desempeñan funciones reproductivas clave.

Particularmente en el útero el sistema se detectó tanto en especies ovuladoras espontáneas, como los roedores, como la (rata, conejillo de indias, ratón y murciélago) y en animales de granja (cerdo y caballo), así como en algunas especies de ovuladoras inducidas como conejos y ardillas; sin embargo, en camélidos aún no se ha determinado su presencia en el útero (Li y col., 2012; El-Allali y col., 2017). En machos,  $\beta$ -NGF se ha identificado en el plasma seminal de varias especies y, al menos en llamas y alpacas, actúa como un factor inductor de la ovulación (OIF) (Li y col., 2012; Maranesi y col., 2016). La infusión de líquido seminal en el útero puede inducir cambios moleculares y celulares que facilitan la concepción y la preñez. De hecho, el plasma seminal provoca una respuesta inflamatoria instantánea en el útero, lo que sugiere que los factores paternos pueden influir en la unión del concepto y el reconocimiento materno de la preñez. El fluido seminal está enriquecido con moléculas biológicamente activas (por ejemplo, testosterona, estrógenos, PG, factores de crecimiento y citoquinas) que pueden unirse a receptores específicos y cambiar las características moleculares, celulares y bioquímicas del endometrio (Bidarimath y Tayade, 2017). Un cierto nivel de NGF en la interfaz materno-fetal sería esencial para la progresión de la gestación, en ratones preñados. NGF uterino acelera marcadamente la transformación de células gigantes trofoblásticas y su expresión equilibrada tiene un efecto protector de la preñez al disminuir la tasa de aborto, efecto que estaría relacionado con la expresión del complejo mayor de

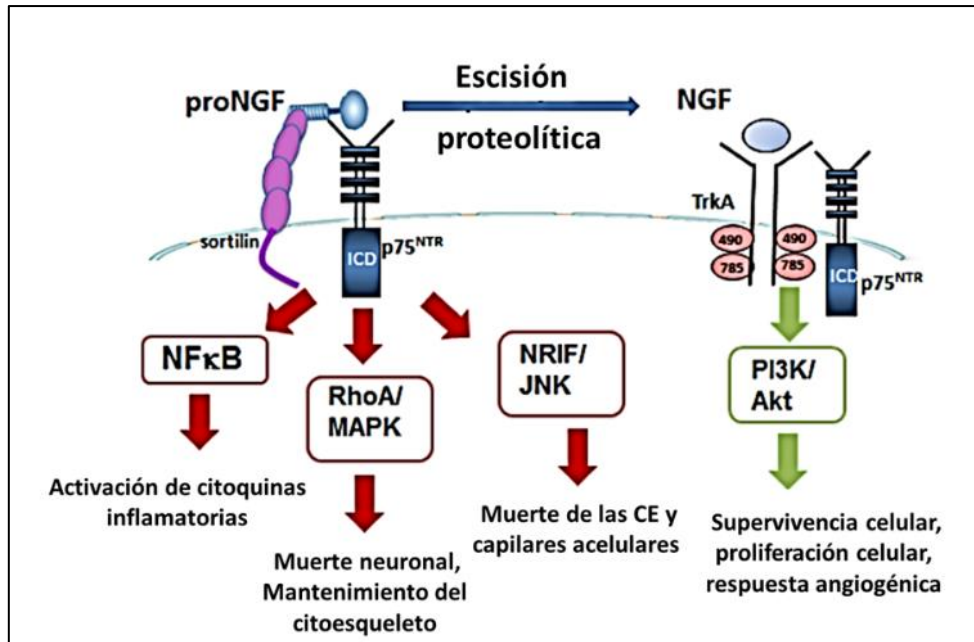
histocompatibilidad II (MHCII). Cuando se supera un determinado umbral de expresión de NGF, esto puede dar como resultado el rechazo fetal debido a la inflamación exacerbada (Tometten y col., 2005; Frank y col., 2014). La P<sub>4</sub> por su parte, regula el contenido local de NGF en el tejido uterino prenatal, lo cual extendería las funciones protectoras de la P<sub>4</sub> durante la gestación al proporcionar una concentración equilibrada de NGF en la interfaz materno-fetal (Tometten y col., 2005).

En útero de conejo se ha determinado que la unión de NGF con TrKA incrementa la producción de PGF<sub>2α</sub> y PGE<sub>2</sub> regulando positivamente las actividades de NOS y la PGE<sub>2</sub>-9-cetoreductasa (PGE<sub>2</sub>-9-K), mientras que la unión de NGF al receptor de baja afinidad incrementa solo la secreción de PGF<sub>2α</sub>, a través de un mecanismo intracelular que aún se desconoce (Maranesi y col., 2016). Por otro lado, otra posible función del NGF puede ser la función reguladora de la apoptosis (Maranesi y col., 2016).

Debido a la importancia de este factor mencionada anteriormente en la fisiología reproductiva de los camélidos, es que consideramos de vital interés su estudio durante el periodo clave de RMP.



**Figura 17. Posibles roles de NGF en la reproducción:** Vías dependientes de NGF: **a)** Altos niveles de NGF en la interfaz materno-fetal debido a, por ejemplo, el estrés o altas concentraciones de Triptófano / baja actividad IDO inducen una inflamación neurogénica, caracterizada por un aumento de la sustancia P, el reclutamiento de células inmunes y el sesgo hacia un perfil de citoquinas Th1, que resulta en lesión y rechazo fetal. **b)** Los niveles adecuados de NGF, posiblemente regulados por la P<sub>4</sub>, contribuyen al perfil de citocinas Th2 tolerogénico. **c)** La privación de NGF local da como resultado un incremento en la expresión de moléculas abortogénicas de MHC II en el trofoblasto, por lo tanto, las células inmunes maternas reconocen y rechazan al feto (modificado de Tometten y col., 2005).



**Figura 18. Representación esquemática de las múltiples vías de acción de proNGF / NGF.** El NGF maduro se une al receptor de tirosina quinasa (TrkA) en combinación con p75<sup>NTR</sup>, lo que provoca la autofosforilación del receptor de TrkA y la activación de la vía P13K / Akt que conduce a la proliferación celular, la supervivencia celular y la respuesta angiogénica. El pro-NGF se une preferentemente a p75<sup>NTR</sup>, en combinación con su co-receptor, para activar múltiples vías dependiendo de la interacción del dominio intracelular (ICD) y una proteína adaptadora dada. La interacción de p75<sup>NTR</sup> ICD con NF-κB da como resultado la activación de la producción de citoquinas proinflamatorias. La interacción del ICD con la vía RhoA / MAPK resulta en muerte neuronal. La interacción del ICD con NRIF activa a JNK, que da lugar a la apoptosis de las células endoteliales (CE) y la formación de capilares acelulares, marcador sustituto de la isquemia (modificado de Mohamed y El-remessy, 2015).

**Materiales**

**y**

**Métodos**



## I-MATERIAL BIOLÓGICO

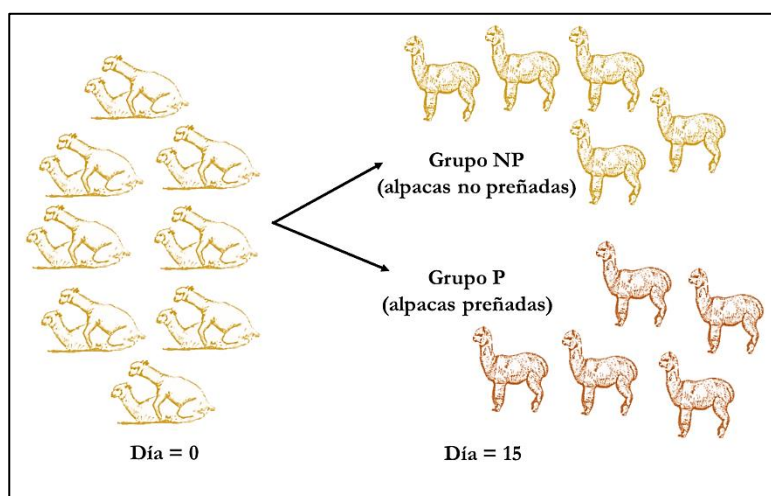
### 1- Animales

Se utilizaron 12 hembras vírgenes con madurez reproductiva de 2 años de edad, de la especie *Vicugna pacos* (raza alpaca Huacaya), pertenecientes al Centro de Investigación Veterinaria (IVITA) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Marangani (UNMSM), provincia de Canchis, en la región de Cuzco, Perú (14°S, 71°O, 3698 m.s.n.m). Las alpacas se mantuvieron en potreros al aire libre y se alimentaron con heno de hierba y agua a voluntad.

### 2- Obtención de muestras de hembras de alpacas

#### 2.1. Diseño experimental

El diseño experimental se realizó con el objetivo de obtener dos grupos, hembras de 15 días postcópula: con CL (preñez temprana) y sin CL (no preñadas). Para esto, se efectuó un sólo apareamiento (día:0) para cada una de las hembras, cada una con un macho adulto fértil diferente. El momento de apareamiento se eligió al azar, sin determinar tamaño del folículo ovárico (indicador de probable ovulación). Las hembras fueron faenadas para consumo 15 días después del apareamiento, el día de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de ética y el cuidado institucional de los animales de la UNMSM. En ese momento se recolectó el aparato reproductor y se agruparon las muestras según presencia de CL en el ovario, en dos grupos: NP y P (Fig. 19). Las hembras NP presentaron folículos ováricos menores a 7 mm de diámetro.



**Figura 19. Esquema general del diseño experimental.** En el día 0 cada una de las hembras fue apareada con un macho fértil. Para el día 15 después de la faena, se separaron los aparatos reproductores en grupos P y NP, correspondientes a alpacas preñadas y no preñadas respectivamente.

## 2.2. Plasma sanguíneo

Previo a la faena de las hembras se obtuvo sangre mediante punción de la vena yugular empleando jeringa de 10 ml, aguja N° 20 G, y tubos conteniendo EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se separó la fracción celular del plasma sanguíneo mediante centrifugación a 3.000 x g durante 5 minutos. El plasma sanguíneo de alpacas NP y alpacas P, fue recuperado y fraccionado en tubos de 2 ml, y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) usando un kit de diagnóstico Roche Elecsys Cobas (Roche Diagnostics, Indianápolis, EE. UU.), que se basa en el principio sándwich se realizó la determinación de la P<sub>4</sub> en plasma sanguíneo. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y las muestras se analizaron con un analizador de inmunoensayo Roche Elecsys 2010 (Roche Diagnostics). Los resultados se compararon con una curva de calibración, que se generó específicamente mediante una calibración de dos puntos y una curva maestra proporcionada a través del código de barras del reactivo. En hembras P, la preñez se confirmó por la presencia de embriones y por dosaje de P<sub>4</sub> (Tabla 3); los valores superiores a 4 ng/ml se consideraron normales para los animales con 14 días de gestación (Bravo, 2002).

**Tabla 3. Dosaje de progesterona en sangre.** Se realizó el dosaje de P<sub>4</sub> en sangre de alpacas P y NP.

Valores de Progesterona (ng/ml) en plasma sanguíneo		
	Mínimo	Máximo
<b>Alpacas P</b>	4,5	10,2
<b>Alpacas NP</b>	0,03	0,19

## 2.3. Fluido y Tejido Uterino

Los tractos reproductivos obtenidos luego de la faena se colocaron en solución fisiológica fría y se procesaron en forma inmediata.

Para obtener el fluido del cuerno uterino, el embrión se eliminó cuidadosamente y luego cada CU, por separado, se pinzó en ambos extremos. Se insertó una aguja roma unida a una jeringa y se perfundió con 4 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, y luego se aspiró. El volumen se centrifugó a 5000 x g (10 min, 4 ° C) para sedimentar cualquier residuo celular. Tras el lavado, se disecó el endometrio del CUI y del CUD en segmentos de 50 mm y se colocaron en solución de PBS formaldehído al 4% pH 7,4 para

ensayos histológicos, en solución de Karnovsky para microscopía electrónica de barrido (MEB), o en solución ARN-later (Ambion, Austin, TX, EE. UU.) para realizar extracción de ARN total. Las muestras embebidas en ARN-later y el FU se transportaron en hielo seco y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## II-MÉTODOS

### 1- Zimografía en gelatina

La presencia de MMPs en el fluido uterino izquierdo (FUI) y en el fluido uterino derecho (FUD) de alpacas NP ( $n=4$ ) y alpacas P ( $n=4$ ), se evaluó mediante zimografía empleando gelatina como sustrato. Esta técnica permite separar las enzimas en un gel de poliacrilamida y determinar su actividad proteolítica sobre un sustrato específico, en este caso gelatina, que se encuentra embebido en el gel de electroforesis.

Adicionalmente, se estudió, (como control positivo) la actividad gelatinolítica de MMPs en las muestras de plasma sanguíneo.

Para realizar la zimografía se desarrollaron los siguientes pasos:

#### *1.1. Cuantificación de proteínas totales*

Se determinaron proteínas totales en el FUI, el FUD y el plasma sanguíneo de alpacas NP y alpacas P, empleando un método colorimétrico (kit Micro BCA, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) mediante lectura a 562 nm en espectrofotómetro, y empleando cantidades conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) para la construcción de una curva patrón o estándar.

Brevemente, las muestras fueron diluidas 1:1.000 en agua estéril (volumen final 1 ml). Simultáneamente se prepararon soluciones conteniendo 0, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  de BSA/ml (volumen final 1 ml). Posteriormente, se agregó 1 ml del reactivo de trabajo (preparado según indicaciones del fabricante) a cada una de las soluciones anteriores. Se incubó 1 hora a  $60^{\circ}\text{C}$  y se realizaron las lecturas de absorbancia a 562 nm. A partir de los valores de absorbancia para BSA se construyó una curva estándar graficando absorbancia en función de la concentración de proteína. La cantidad de proteínas en las muestras se obtuvo extrapolando los valores de absorbancia en la curva estándar.

### 1.2. Zimograma de fluido uterino

Las proteínas del FU y plasma sanguíneo se separaron, mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras empleando como gel de resolución al 8% (resolving gel) geles de poliacrilamida al 8% conteniendo 1 mg/ml de gelatina (Britania, Buenos Aires, Argentina). Para ello, un volumen conteniendo 15 µg de proteínas totales se mezcló con un volumen equivalente de buffer de muestra (SDS 2%, Azul de bromo fenol 0,1%, glicerol 40%, en Tris-HCl 0,5 M pH 6,8) y se sembró directamente en el gel de concentración al 4% (stacking gel) sin realizar ningún paso de desnaturalización previo. Es importante resaltar que el buffer de muestra no contenía el agente reductor  $\beta$ - mercaptoetanol, ya que éste, al romper los enlaces disulfuro, alteraría la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, y por consiguiente su función. Se sembraron 5 µl del marcador de peso molecular Unstained Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) en una de las calles a fin de estimar el peso molecular de las bandas detectadas.

El gel de resolución y el gel de concentración se prepararon empleando las soluciones y las cantidades indicadas en la Tabla 4.

La corrida electroforética se realizó a 150 V durante 1 hora a temperatura ambiente, empleando una fuente de poder PowerPac HV (BioRad). Luego los geles fueron lavados 6 veces durante 15 minutos con el buffer de renaturalización de la enzima (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 5 µM, Tritón X-100 2,5%, NaN<sub>3</sub> 0,02%, pH 7,5), a fin de remover el SDS del gel de electroforesis permitiendo la renaturalización de las proteínas. A continuación, los geles se incubaron a 37 °C durante 42 horas con el buffer de desarrollo (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 5 µM, NaN<sub>3</sub> 0,02%, pH 7,5), que contiene los iones, osmolaridad y pH necesarios para favorecer la actividad de las MMPs. Finalmente, los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,125% en metanol 50% y ácido acético 20% con agitación suave; y el exceso de colorante se eliminó empleando una solución de metanol 30%, ácido acético 10%. El Coomassie Blue tiñe de azul la gelatina del gel, salvo en las regiones donde por la acción enzimática fue degradada, las que se visualizan como bandas claras (Zampini y col., 2014).

La técnica de zimograma permite observar tanto las formas activas como los precursores inactivos de las MMPs. Esto se debe a que el SDS contenido en el buffer de muestra rompe la interacción del pro-péptido con el sitio activo. El SDS se elimina durante la renaturalización de las enzimas. Esto permite que el pro-péptido pueda ser escindido mediante actividad autocatalítica de la propia MMP y así degradar la gelatina. Como



consecuencia se puede observar en el gel una banda de degradación correspondiente a la MMP y una banda de mayor peso molecular correspondiente a su zimógeno (pro-MMP).

Para distinguir si las bandas visualizadas en el gel corresponden a MMPs o pro-MMPs, el FU y el plasma sanguíneo, fueron tratados con APMA (acetato aminofenil mercúrico), previo a la corrida electroforética. La pre-incubación con APMA genera la escisión del pro-péptido y por lo tanto la activación de las pro-MMPs (Zampini y col., 2014).

Para ello se procedió de la siguiente manera: a partir de una solución de APMA 20 mM en NaOH 80 mM, se preparó una solución 5 mM en buffer de desarrollo (pH 7,5). Se mezcló un volumen de de la muestra con 4 volúmenes de la solución de APMA 5 mM para tener una concentración final de APMA 1 mM, y se incubó durante 4 horas a 37 °C (Ogata y col., 1995). Posteriormente las muestras tratadas con APMA y sin tratarse sembraron en un gel de poliacrilamida con gelatina como se indicó anteriormente. Así fue posible distinguir las formas activas de las inactivas en base a los pesos moleculares de las bandas al comparar los perfiles de los zimogramas del FU y del plasma sanguíneo tratados con APMA y sin tratar.

Para confirmar que las bandas detectadas eran MMPs, se adicionó EDTA 10 mM a las soluciones de renaturalización y desarrollo. El EDTA es un quelante de iones divalentes, y por lo tanto inhibe la actividad de las MMPs al secuestrar los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  que actúan como co-factores de estas enzimas. De este modo no se observaría bandas de actividad debido a MMPs en el gel (Roy y Ghosh, 2010).

A fin de descartar señales producidas por serino-proteasas se adicionó benzamidina 10 mM a las soluciones de renaturalización y desarrollo. La benzamidina es un inhibidor competitivo de serino-proteasas por lo que su uso elimina la señal debida a estas enzimas (Roy y Ghosh, 2010).

**Tabla 4: Fórmula para la preparación de los geles de resolución y concentración.**

	<b>Gel de Resolución 8%</b>	<b>Gel de Concentración 4%</b>
<b>Acrilamida- bisacrilamida 30:80</b>	2 ml	0,625 ml
<b>Tris-HCl 3 M pH 8,8</b>	0,950 ml	-----
<b>Tris-HCl 0,5M pH 6,8</b>	-----	1,25 ml
<b>SDS 10%</b>	0,075 ml	0,050 ml
<b>Gelatina 10%</b>	0,750 ml	-----
<b>Agua destilada</b>	3,537 ml	2,825 ml
<b>Persulfato 2% (0,02 g/ml)</b>	0,187 ml	0,250 ml
<b>TEMED</b>	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
<b>Volumen final</b>	7,5 ml	5 ml

### *1.3. Análisis de Imágenes*

Las imágenes de los geles fueron capturadas con una cámara digital Optio M90-PENTAX. Los pesos moleculares de las bandas detectadas fueron calculados usando el programa GelAnalyzer 2010a (Copyright por Istvan Lazar), tomando como referencia las bandas del marcador de peso molecular (Zampini y col., 2014). El análisis de la intensidad de las bandas fue llevado a cabo mediante el programa ImageJ de acuerdo con Jensen (2013) y los datos obtenidos se expresaron como intensidad de bandas en unidades arbitrarias, en función de los CUs de los diferentes grupos en estudio.

## **2- Microscopía electrónica de Barrido**

Para el estudio con MEB se utilizaron muestras de tejido de CUI y CUD de Alpacas NP (n = 3) y P (n = 3). Las muestras se procesaron en el Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME) y la metodología utilizada se describe brevemente a continuación. Las muestras de tejido uterino previamente fijados en solución de Karnovsky se lavaron en PBS 0,1 M (pH 7.4), se posfijaron en 1% de tetróxido de osmio en la misma solución tampón durante 2 horas. Posteriormente fueron deshidratados en un gradiente de graduación creciente de etanol (25 a 100%) y acetona. Luego, las muestras fueron desecadas mediante punto crítico, montadas en soportes de aluminio de 3 cm de diámetro (stubs), y finalmente metalizadas con oro para su observación. Las muestras fueron examinadas mediante un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss VR Supra 55VP scanning electron microscope (Oberkochen, Germany) y las imágenes más representativas de las observaciones se documentaron mediante microfotografías.

## **3- Técnicas Histológicas**

Para el estudio histológico se tomaron secciones del CUI y CUD, tanto de alpacas NP (n=3) como de alpacas P (n=3). Las piezas se fijaron en formaldehído-PBS al 4% pH 7,4 durante 24 h, luego se transfirieron a una solución de etanol al 80% y se conservaron a 4°C hasta su uso.

### *3.1. Inclusión de las muestras en Paraplast*

Se realizó deshidratación de las muestras mediante una serie de pasajes de 15 minutos por etanol 90°, 95° y 100° a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 baños de 10 minutos c/u en cloroformo. Posteriormente, se realizó una incubación del tejido durante

60 minutos a 58°C en una mezcla 1:1 de cloroformo-Paraplast (BioPack, Zarate, Argentina). Por último, se realizaron tres baños en Paraplast al 100% durante 60 minutos a 58°C, para eliminar el cloroformo. Para el armado del taco se adicionó Paraplast en un molde, se colocó el tejido en el centro orientado en dirección vertical y se dejó solidificar.

Se realizaron cortes de 5 µm de espesor en micrótomos, los cuales fueron montados en portaobjetos previamente tratados con Histogrip (Zimed Lab, Inc. USA) e incubados durante 24 horas a 40°C.

Para realizar las tinciones histológicas, las muestras se desparafinaron e hidrataron según se detalla a continuación:

- 3 baños con Xilol (Cicarelli) durante 10 minutos c/u.
- Alcohol 96° durante 2 minutos.
- Alcohol 80° durante 2 minutos.
- Alcohol 70° durante 5 minutos.
- Alcohol 50° durante 2 minutos.
- Agua destilada durante 5 minutos.

Luego de someterlos a los protocolos de las diferentes tinciones realizadas, las muestras se deshidrataron, aclararon y montaron, como se detalla a continuación:

- Alcohol 80° durante 5 minutos.
- Alcohol 96° durante 5 minutos.
- 2 baños con Xilol de 3 minutos c/u.
- Montaje con bálsamo de Canadá (Cicarelli).

### *3.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina*

Para analizar la microestructura de los cuernos uterinos se empleó la coloración morfológica de Hematoxilina-Eosina (HE). Este método de tinción es ampliamente usado en técnicas histológicas. La combinación de Hematoxilina con Eosina permite observar los núcleos celulares azul-violeta (basofilia) en contraste con los citoplasmas que adquieren una tonalidad rosada (acidofilia). Esta coloración muestra con nitidez la forma, estructura y ubicación de los núcleos, como también forma, extensión y disposición de los diferentes

tipos celulares en el tejido, de modo que resulta útil para el estudio de la morfología y de la arquitectura tisular. Para esta coloración se utilizaron Hematoxilina activada y Eosina (BIOPUR, Rosario, Argentina).

A continuación, se indican los pasos de la técnica de coloración (HE):

- Desparafinar e hidratar los cortes.
- Solución de Hematoxilina activada por 25 s.
- Lavar en agua destilada por 1minuto y luego con agua corriente por 5 min.
- Enjuagar con agua destilada y coloreadas con Eosina al 0,5 % por 1,15 min.
- Lavar con agua destilada, deshidratar, aclarar y montar.

### *3.3. Tinción PAS (ácido periódico-Schiff)*

Para la detección de glicoconjugados neutros o débilmente ácidos se realizó la técnica de coloración con el reactivo de Schiff (SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA). La tinción PAS se basa en la reacción del reactivo de Schiff con los grupos aldehído presentes en los carbohidratos tras su oxidación con ácido periódico. El reactivo de Schiff contiene fucsina básica, que en solución ácida y en presencia de SO<sub>2</sub> da lugar a una forma no coloreada (ácido N-sulfónico). Al reaccionar con los grupos aldehído libres este reactivo forma un compuesto insoluble de color púrpura que identifica a los mucopolisacáridos neutros. La coloración de contraste se realizó con Hematoxilina de Weigert, que colorea los núcleos de marrón.

A continuación, se indican los pasos de la técnica de coloración PAS:

- Desparafinar e hidratar los cortes.
- Solución de Acido Periódico 0,5% por 30 min.
- Lavar en Agua destilada (2 lavados de 1minuto c/u).
- Cubrir con el Reactivo de Schiff por 30 min.
- Lavado con agua a 60 °C (2 lavados de 1minuto c/u).
- Hematoxilina de Weigert por 5 min y lavar con agua corriente.
- Lavar con agua destilada, deshidratar, aclarar y montar.

### 3.4. Tinción con Alcian Blue pH 2,5

Este método expone la presencia de mucinas ácidas con ésteres de sulfato y grupos carboxilo en los glicoconjugados, las mismas se observan de color azul (Luna, 1968). En esta coloración se utilizó una solución al 1% de Alcian Blue (AB) 8Gx (Biopack), pH 2,5 y una contra tinción de núcleos con Fast Red (SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA), que colorea los núcleos en color magenta.

A continuación, se indican los pasos de la técnica de coloración con AB pH 2,5:

- Desparafrinar e hidratar los cortes
- Solución de Ácido Acético 3% por 3 min.
- Solución de Alcian Blue por 30 min.
- Lavar con agua corriente por 10 min y luego enjuagar con agua destilada.
- Fast Red por 4 min y lavar con agua corriente.
- Lavar con agua destilada, deshidratar, aclarar y montar.

### 3.5. Tinción con Picrosirius red

Mediante la utilización del colorante Picrosirius red (PSR), Junqueira y col. (1979) desarrollaron un método simple y sensible para identificar las redes de COL fibrilar en secciones de tejido. Picrosirius red (F3BA) es un colorante aniónico fuerte y lineal que posee seis grupos sulfonato que pueden asociarse a las fibras de COL catiónico y mejorar su birrefringencia natural bajo luz polarizada cruzada. Una birrefringencia amarillo-roja se corresponde con el COLI, mientras que el COLIII muestra una birrefringencia de color verde (Junqueira y col., 1979, Montes y Junqueira, 1991). Bajo microscopio de campo claro, la tinción con PSR permite observar las fibras de COL total (COLT) de color rojo, las fibras musculares y el citoplasma de color amarillo y los núcleos marrones. Para esta tinción se utilizó el colorante Sirius Red direct 80 (SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA) y se realizó la contra tinción de los núcleos con Hematoxilina de Weigert, la cual se obtiene de la mezcla en partes iguales de la solución A y la solución B, las cuales se prepararon de la siguiente manera:

#### Solución A:

Hematoxilina..... 1g.

Alcohol 96°..... 100 ml.

### Solución B:

FeCl<sub>3</sub> (29%) ..... 4 ml.

HCl conc. .... 1 ml.

H<sub>2</sub>O destilada..... 95 ml.

A continuación, se indican los pasos de la técnica de coloración con PS:

- Desparafrinar e hidratar los cortes
- Hematoxilina de Weigert por 10 min.
- Lavar con agua corriente por 10 min.
- Colorear con Sirius red por 60 min.
- Lavar dos veces con una solución de ácido acético 0,5%.
- Deshidratar, aclarar y montar.

### *3.6. Inmunohistoquímica: localización de $\beta$ -NGF y TrKA*

Mediante la técnica de inmunohistoquímica se evaluó la localización y distribución del factor de crecimiento nervioso beta ( $\beta$ -NGF) y su receptor tirosina quinasa A (TrKA) en los cuernos uterinos de alpacas P (n=3) y alpacas NP (n=3). Los cortes de 5  $\mu$ m de espesor se montaron sobre portaobjetos cubiertos con Poly-lisina. Previo a la inmunodetección los cortes fueron desparafrinados e hidratados según los pasos detallados en el apartado **3-Técnicas Histológicas**.

A continuación, se indican los pasos para la inmunodetección de  $\beta$ -NGF y TrKA:

- Incubación con una solución de proteinasa K (SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA) de 10  $\mu$ g / $\mu$ l en Buffer TE, pH 8, a 37°C en cámara húmeda (CH) durante 20 minutos para la exponer el antígeno.
- Lavar con Buffer TE (50 mM Tris Base, 1 mM EDTA, 0,5% Tritón X-100, pH 8) a temperatura ambiente (TA) durante 10 min.
- 2 baños con PBS de 1 minuto c/u.
- Bloqueo de sitios inespecíficos con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS a TA en CH, durante 30 minutos.

- Incubación con una dilución del anticuerpo 1°, para  $\beta$ -NGF (dilución 1: 1500, sc-548) y para TrkA (dilución 1: 100, sc-118) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU) en BSA al 1% en PBS- Tween 20 (0,02%), durante una hora a 37 °C en CH.
- 3 baños con PBS- Tween 20 (0,02%), de 2 min c/u.
- Incubación con el anticuerpo 2° IgG anti-conejo biotinilado (B8895, SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA), dilución 1: 200 en BSA al 1% en PBS- Tween 20 (0,02%), durante 20 min a TA en CH.
- Lavar 3 veces con PBS- Tween 20 (0,02%).
- Incubar con extravidina fosfatasa alcalina conjugada (SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA) dilución 1: 500 en BSA al 1% en PBS, durante 30 minutos a TA en CH.
- Lavar 3 veces con PBS- Tween 20 (0,02%) 2 min c/u.
- Revelado con una solución (23,15 mg/ml) de sustrato SigmaFast (BCIP / NBT, B5655, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) hasta el desarrollo de color azul-violáceo, durante 19 minutos para  $\beta$ -NGF y durante 8 minutos para TrkA.
- 2 baños con agua destilada para detener la reacción.
- Los cortes de tejido de control se procesaron reemplazando el anticuerpo 1° con una solución de BSA al 1% en PBS- Tween 20 (0,02%).
- Fast red (SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA) durante 2,5 minutos y después lavar con agua corriente.
- Deshidratar, aclarar y montar.

### *3.7. Análisis de Imágenes*

Los preparados de Hematoxilina-Eosina, PAS, AB, PSR (COLT) y la localización de  $\beta$ -NGF y TrkA se observaron en un microscopio Leica DM 500 y las imágenes se capturaron con una cámara Leica ICC50 HD utilizando el software LASZ Leica Inc. Para la determinación del COLI y del COLIII los preparados se observaron en un microscopio Olympus Bx80 con epifluorescencia y polarizadores y las imágenes se capturaron con una cámara Qcolor5 Olympus.

Para la cuantificación del colágeno se diferenció entre la ZD y la ZL del endometrio, utilizando dos fotografías (10X) de cada muestra con un área total analizada de 3.209.613,91 píxeles/ $\mu\text{m}^2$ . Se seleccionaron aleatoriamente tres regiones rectangulares de interés (ROI) con un área de 10.300,88 píxeles/ $\mu\text{m}^2$  para la ZD y un área de 769.793,6 píxeles/ $\mu\text{m}^2$  para la ZL. Para la cuantificación del COLT las imágenes se convirtieron a 8 bits y luego se seleccionó un umbral específico para la cuantificación. Mientras que para COLI y COLIII se realizó primeramente una separación en canales de color, seleccionando para COLI el canal rojo y para COLIII el canal verde, por último, se seleccionó un umbral específico para la cuantificación en ambos casos.

Para la cuantificación del marcaje en el área del EL para la tinción de Alcian Blue y PAS, utilizamos dos fotografías (100X) de cada muestra con un área total analizada de 16.518,1 píxeles/ $\mu\text{m}^2$ . Se seleccionaron aleatoriamente tres ROI con un área de 981,8 píxeles/ $\mu\text{m}^2$ . Primero, las imágenes se convirtieron a 8 bits, luego se realizó un umbral específico para cada tinción y cuantificación. Otros tejidos teñidos no se cuantificaron porque no están en contacto directo con los embriones

En el análisis del marcaje del área del EL y el EG en el estudio de la localización de  $\beta$ -NGF y TrKA, se utilizaron dos fotografías (100X) de cada muestra con un área total analizada de 16.518,1 píxeles/ $\mu\text{m}^2$ . Se seleccionaron aleatoriamente tres ROI con un área de 460,53 píxeles/ $\mu\text{m}^2$ , para las mediciones de EL y EG y se procedió de igual modo que para la cuantificación del marcaje AB y PAS.

La cuantificación de vasos y capilares (VC) se realizó a partir de dos fotografías (10X) de cada muestra con un área total analizada de 3.209.613,91 píxeles/ $\mu\text{m}^2$  en los preparados de HE mediante el software ImageJ 1.42q (NIH), con la herramienta cuantificación de partículas.

Los datos obtenidos en todas las determinaciones se expresaron en píxeles/ $\mu\text{m}^2$ , salvo para el recuento de VC que se expresó en %/ $\mu\text{m}^2$ , en función de los CUs de los diferentes grupos en estudio.

## 4- Amplificación de Genes

### 4.1. Extracción de ARN total

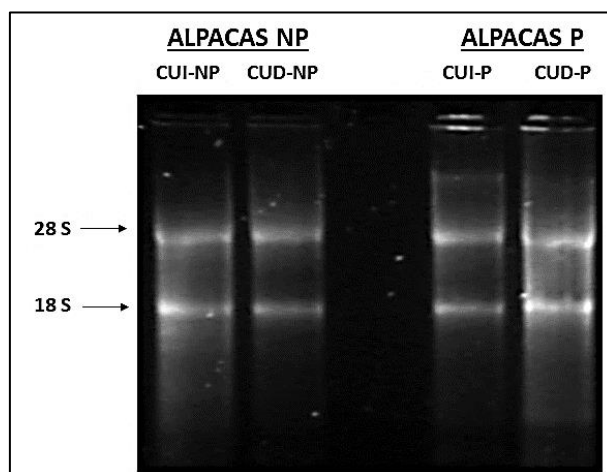
Para la obtención de ARN total de tejido uterino se utilizó el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, USA). Los segmentos de CUI y CUD de alpacas NP (n=5) y alpacas P (n=5) se procesaron por separado. Para ello, los segmentos de



tejido uterino previamente conservados en ARN-later, fueron transferidos a tubos conteniendo 350  $\mu$ l de buffer de lisis del kit, y se disgregaron utilizando un homogeneizador de tejido (Ultraturrax). El aislamiento y purificación del ARN total prosiguió de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. Finalmente, el ARN se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua libre de ARNasas y se conservó a -70 °C hasta su uso.

Para determinar la concentración de los ARN extraídos se efectuaron lecturas en espectrofotómetro. Para ello se realizó una dilución del ARN obtenido en agua destilada (dilución 1:400) y se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Un valor de absorbancia igual a 1 corresponde a 40  $\mu$ g de ARN/ml.

También se evaluó la integridad de los ARN, sembrando 2  $\mu$ l en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8,2) teñidos 1:20.000 con SYBR Safe (Invitrogen). La presencia de bandas nítidas correspondientes a los ARN ribosómicos eucariotas 18S y 28S sugiere que el ARN total se encuentra intacto y que no ha sufrido degradación durante la extracción (Fig. 20).



**Figura 20. Detección de ARN ribosómico.** Electroforesis en gel de agarosa del ARN total obtenido a partir de CUs de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y de alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Señaladas con flechas observan las dos bandas de ARN ribosómico 28S y 18 S.

### 4.2. Síntesis de ADNc

Se obtuvo ADN complementario (ADNc) de cada uno de los segmentos de CUI y CUD de alpacas NP (n=5) y alpacas P (n=5), y un pool de ADNc a partir de una mezcla de ARN total de los distintos segmentos de CUI y CUD de alpacas NP (0,20  $\mu$ g de ARN de cada muestra). Un pool de ADNc de CUs de alpacas NP fue utilizado para la puesta a punto de las reacciones de amplificación por PCR punto final y en tiempo real.

Los ADNc de cada uno de los segmentos de CUI y CUD de alpacas NP y alpacas P se emplearon para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes en estudio.

La síntesis de ADNc se realizó mediante transcripción reversa con la enzima MMLV (Promega, Madison, USA) y empleando oligo dT como cebador (15 dTTP, Invitrogen). Un microgramo de ARN total de cada segmento o de la mezcla de ARN se diluyó en un volumen final de 13,5 µl conteniendo agua estéril libre de ARNasas y 0,5 µg de oligo dT. Esta solución se incubó 10 minutos a 70 °C y se colocó en baño de hielo. Luego se agregaron 11,5 µl de una mezcla de reacción conteniendo 5 µl del Buffer 5X Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA) (Tris-HCl 83,33 mM; pH 8,3; KCl 125 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM y DTT 16,67 mM), 5 µl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Promega) (0,83 mM de cada uno: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl de la enzima transcriptasa reversa M- MLV (Promega, Madison, USA) (200 U/µl) y 0,5 µl de agua libre de ARNasas para completar un volumen final de reacción de 25 µl. Esta mezcla se incubó a 42 °C durante 90 minutos y finalmente se elevó la temperatura a 94 °C durante 5 minutos para inactivar a la enzima. Los ADNc se conservaron a -20 °C hasta su uso.

### *4.3. Diseño de Cebadores*

El diseño de los cebadores se realizó empleando el programa PRIMER BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y para la elección de los mismos se tuvo en cuenta que cada par de cebadores tuviera temperaturas de hibridación comprendidas entre 58 y 65 °C, y que los productos de amplificación no superaran los 200 pb de longitud. Además, se chequeó la presencia regiones de autocomplementariedad dentro de cada cebador y entre los cebadores del par (que pudieran dar lugar a la formación de estructuras secundarias) mediante el programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Así, se seleccionaron aquellos pares de cebadores que no presentaban estructuras secundarias o aquellos cuyas estructuras secundarias presentaban baja estabilidad.

Los cebadores para MMP-2, MMP-9, TIMP1 y TIMP2 fueron diseñados por Zampini y col., (2014); al igual que los cebadores para los genes de referencia empleados para cuantificar los niveles de expresión relativa de los demás genes en estudio (Tabla 5 y 6). Para cuantificar los niveles de expresión por PCR en tiempo real se utilizaron como genes de referencia la  $\beta$ -actina y la HPRT (hipoxantina fosforibosil transferasa), mientras que para la semi-cuantificación sólo se utilizó HPRT como gen de referencia.

**Tabla 5: Tabla de Cebadores con su correspondiente secuencia y tamaño producto a amplificar.**

GEN	REFERENCIA	CEBADOR FORWARD	CEBADOR REVERSO	PRODUCTO DE PCR (pb)
MUC1	XM_006214755.1	TGCTGCTATTCCAGTGCTT	TGAGGTGTCATTGGTGGTCG	119
MUC16	XM_006206471.1	TTGTTCAGAGAAGCAGCCT	GGATGTCCACCCCTGTCTTG	97
COL1A2	XM_006207628.1	GGATGAGGAGACTGGCAACC	ATCAAGGATAGGCAGGCGAG	193
COL3A1	XM_006209994.2	TGCTAAGGGTGAAGTTGGAC	TTTGCCACCAGGACTACCAC	142
MMP-14	XM_006217304.1	GAGGTTCACGGTCTGCGAG	GGGGGTGTAGTTCTGGATGC	193
EMMPRIN	XM_006206619.1	AGGTGCTTGCTGGTCACT	GCCTTCTTGCCCTTTGTCGT	137
LGMN	XM_006208217.1	GATGAACACCAACGATCTGC	ACCCCGAGATCAAGGAGACA	119
VEGFA	XM_015237401.1	CGGTATAAATCCTGGAGCGT	GCCTCGGCTTGTCACATCT	168
$\beta$ -NGF	XM_006213697.2	TGCTGGGAGAGGTGAACATT	CGAAGGTGTGGGTGTGGTA	147
TrkA	XM_015248158.1	GCTTCATCTTCACCGAGTTCCT	TAGCCAGCAGCGTGTAGTTG	114

**Tabla 6: Tabla de Cebadores con su correspondiente secuencia y tamaño producto a amplificar.**

GEN	REFERENCIA	CEBADOR FORWARD	CEBADOR REVERSO	PRODUCTO DE PCR (pb)
MMP2	GQ244429.1	CATGATGGAGAGGCTGACAT	GCTCATCGTCATCAAAGTGG	148
MMP9	GU207475.1	GTTTCGATGTGAAGACGCAGA	GTCCACCTGGTTACACCTCAT	175
TIMP1	KC425456	GTGGCTCCCTGGAACAGTC	TCGGTCCACAAGCAATGAGT	143
TIMP2	KC425455	GCACCAACCAAGAAGAGC	CCATCCAGAGGCACTCATCC	117
$\beta$ -ACTINA	XM_003357928.1	GCGGGACCAACCATGTACC	ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	183
HPRT	XM_006215984.1	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGC	94

#### 4.4. PCR semicuantitativa

Los genes específicos de MMP-9, TIMP1, MUC1, MUC16, COL1A2, COL3A1, EMMPRIN, VEGF-A,  $\beta$ -NGF y TrkA se amplificaron mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a partir del ADNc obtenido por transcripción reversa en el punto 4.2. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ l que contenía: 1  $\mu$ l de ADNc de CUI o CUD; 2  $\mu$ l de 5X Green GoTaq Reaction Buffer, pH 8,5 (Promega, Madison, USA); 0,2 mM de cada dNTP (Promega, Madison, USA); 2,5 unidades de ADN polimerasa GoTaq (Promega, Madison, USA) y 1  $\mu$ M de cada par de cebadores (Tabla 5 y 6). Se analizaron diferentes ajustes de amplificación para determinar las condiciones óptimas de PCR: 95 ° C durante 3 min, seguidos de 45 ciclos a 95 ° C durante 10 s, 60 ° C durante 5 s, 72 ° C durante 5 seg, y una extensión final a 72 ° C durante 5 min. Los productos de PCR se analizaron con electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron con SYBR Safe DNA Gel Stain (Life technologies, Carlsbab, EE. UU.).

#### 4.5. PCR en tiempo real

Se cuantificó la expresión génica de MMP-2, MMP-14, TIMP2 y LGMN en los CUs de alpacas P (n=5) y NP (n=5) mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Con el fin de cuantificar la expresión génica, se calculó la eficiencia de amplificación para cada gen. Se transcribieron y amplificaron diferentes cantidades de ARN 30, 60, 120, 250, 300, 500 ng, mediante diluciones seriadas (1:3) a partir de un pool de ADNc de las muestras.

Inmediatamente después de la amplificación los productos fueron sometidos a un gradiente de temperatura creciente para determinar las temperaturas de fusión (temperatura de melting,  $T_m$ ) de los mismos (temperatura a la cual el 50% del ADN está desnaturalizado).

A partir de los valores de  $C_t$  (threshold cycle) obtenidos de las diferentes diluciones es posible construir una curva estándar que permite determinar la eficiencia de amplificación con cada cebador. Para ello se grafica los valores de  $C_t$  en función del logaritmo de la dilución de ADNc. El valor de la eficiencia ( $E$ ) se calcula partir de la pendiente de la curva de calibración empleando la siguiente fórmula:  $\% E = [(10^{-1/\text{pendiente}}) - 1] \times 100$ . Un valor de eficiencia del 100% indica una perfecta duplicación de los productos luego de un ciclo de amplificación. Se recomienda que los valores de eficiencia estén comprendidos entre 90 y 110%. Si bien pueden emplearse distintas moléculas fluorescentes en las reacciones de PCR en tiempo real, en este trabajo se empleó el agente intercalante SYBR Green. La principal desventaja de este fluorocromo es que se une al ADN de manera inespecífica (independiente de la secuencia del producto amplificado), y por lo tanto es necesario chequear la especificidad de los productos de reacción. Para ello se construyeron curvas de  $T_m$  y también se sembraron los productos amplificados en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE. Las curvas de  $T_m$  se determinan experimentalmente y permiten estipular las  $T_m$  de los productos amplificados (se grafica la primera derivada del cambio de fluorescencia en función de la temperatura). Cada producto de amplificación tiene una  $T_m$  característica dependiendo de la longitud y secuencia del fragmento, que se visualiza como un pico en la curva de  $T_m$ . La aparición de picos extras con  $T_m$  bajas, probablemente indica la formación de dímeros de cebadores. Comparando las imágenes de los geles con las curvas de  $T_m$ , es posible identificar los picos correspondientes a los productos específicos y las bandas inespecíficas. Además, se realizaron controles de amplificación negativos sin templado (NTC o no template control) y empleando ARN que no fue retro-transcripto (NRT o no reverse transcriptase control), para cada gen. El NTC permite descartar cualquier tipo de contaminación de los reactivos para la PCR, y/o la formación de dímeros de cebadores. Por su parte el NRT permite descartar la amplificación de ADN genómico.

En base a todos estos ensayos y controles se ajustaron las condiciones de amplificación, el programa de PCR y la concentración de los cebadores empleados. En caso de ser necesario se diseñaron nuevos cebadores.

La cuantificación de los niveles de expresión génica se realizó en un termociclador CFX96 (BioRad). Las reacciones de PCR se cargaron en placas de 96 pocillos, y consistieron en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo 5  $\mu$ l del ADNc (ADNc de CUI o CUD diluido 1:5), 200-300 nM de los cebadores forward y reverse, y 10  $\mu$ l de la mezcla de reacción para

PCR, Fast EvaGreen qPCR Master Mix (Biotium). El programa de PCR contó con un paso inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95 °C, seguido por 50 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 5 segundos a 60 °C (hibridación y extensión). Una vez concluido el programa de amplificación los productos fueron sometidos a un gradiente de temperatura de 65 °C a 95 °C (incrementando 0,5 °C cada 5 segundos), para la construcción de las curvas de T<sub>m</sub>.

Cada reacción se realizó por triplicado. Los niveles de expresión relativos se determinaron mediante el método del  $\Delta\Delta C_t$ , empleando el software CFX Manager versión 3.0 (BioRad). La media geométrica de los C<sub>t</sub> de los genes de referencia  $\beta$ -actina y HPRT, se empleó para la normalización de los datos.

### 4.6. *Análisis de Imagen*

Para la medición semicuantitativa de la abundancia relativa, las imágenes del gel se capturaron con una cámara digital Optio M 90 Pentax (Tokio, Japón), y la densidad óptica de los productos de PCR se cuantificó utilizando el software ImageJ 1.42q (NIH). Para ello se efectuó un ROI de selección sobre cada banda lo que permitió obtener una curva de intensidad; a continuación, la medida del área bajo la curva permitió cuantificar la intensidad de las mismas y los marcadores de peso molecular se usaron como control de calibración entre geles. La abundancia relativa de transcriptos se normalizó contra el gen de referencia HPRT (Tabla 4), y se calculó la proporción de transcripción / HPRT para cada tejido analizado (Diao y col., 2011). Los datos obtenidos se expresaron como expresión relativa en unidades arbitrarias en función de los cuernos uterinos de los diferentes grupos en estudio.

## 5- Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa InfoStat (Di Rienzo y col., 2008). El análisis de varianza de una vía (ANOVA) se utilizó para analizar las siguientes determinaciones: marcaje PAS, AB,  $\beta$ -NGF y TrKA, fibras de colágeno, densitometría de bandas gelatinolíticas, cuantificación y abundancia relativa de genes. Cuando ANOVA mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), se usó la prueba de Tukey para determinar el nivel de significación. Los resultados se representaron como la media  $\pm$  error estándar (EE).

# Resultados



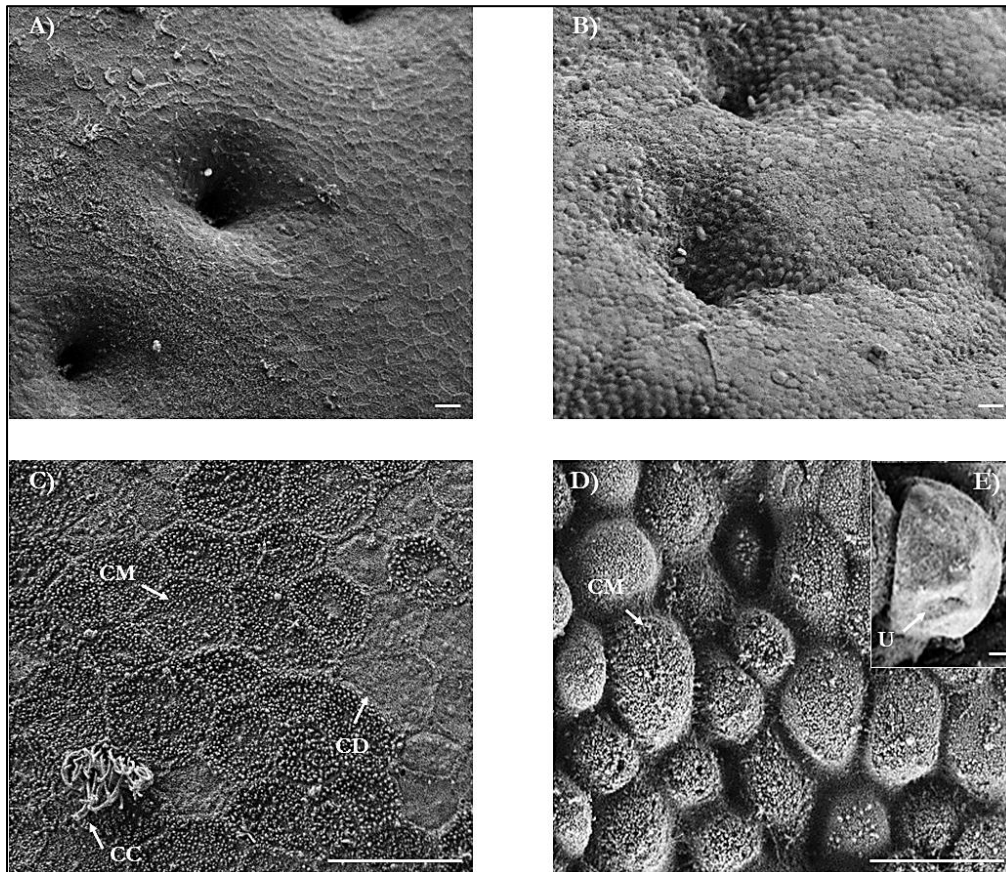
## I-CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y QUÍMICA DEL ENDOMETRIO DE LOS CUERNOS UTERINOS DE ALPACAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS

En esta sección se describen las características de la superficie luminal y del glicocáliz mucinoso de los cuernos uterinos en alpacas NP y alpacas P (15 días). Además, se determinó la abundancia relativa del ARNm de dos genes constituyentes del glicocáliz mucinoso, MUC1 y MUC16.

### **Ia- Ultraestructura de la superficie luminal uterina**

En hembras NP, tanto en CUI como en CUD, se observó una superficie endometrial de aspecto uniforme, en la que se apreció la desembocadura de las glándulas uterinas (Fig. 21A). Se distinguieron tres tipos de células epiteliales: células ciliadas, células no ciliadas y sin microvellosidades, y células secretoras, que son aquellas que poseen la superficie apical cubierta de microvellosidades (Fig. 21C). Las células ciliadas fueron menos numerosas y se encontraron aisladas e intercaladas entre las células no ciliadas. Las células secretoras se encontraron en mayor proporción que los otros dos tipos celulares observados.

La mucosa endometrial de las alpacas P (Fig.21B), a diferencia de las NP, exhibió una superficie irregular. La superficie apical de las células epiteliales secretoras presentó una apariencia prominente, con microvellosidades cortas y gruesas. Este fue el único tipo celular observado en ambos CUs. (Fig. 21D). También, se observó presencia aislada de útero domos sobre la superficie endometrial (Fig. 21E). En este estadio, los CUI y CUD se observaron ultraestructuralmente similares.



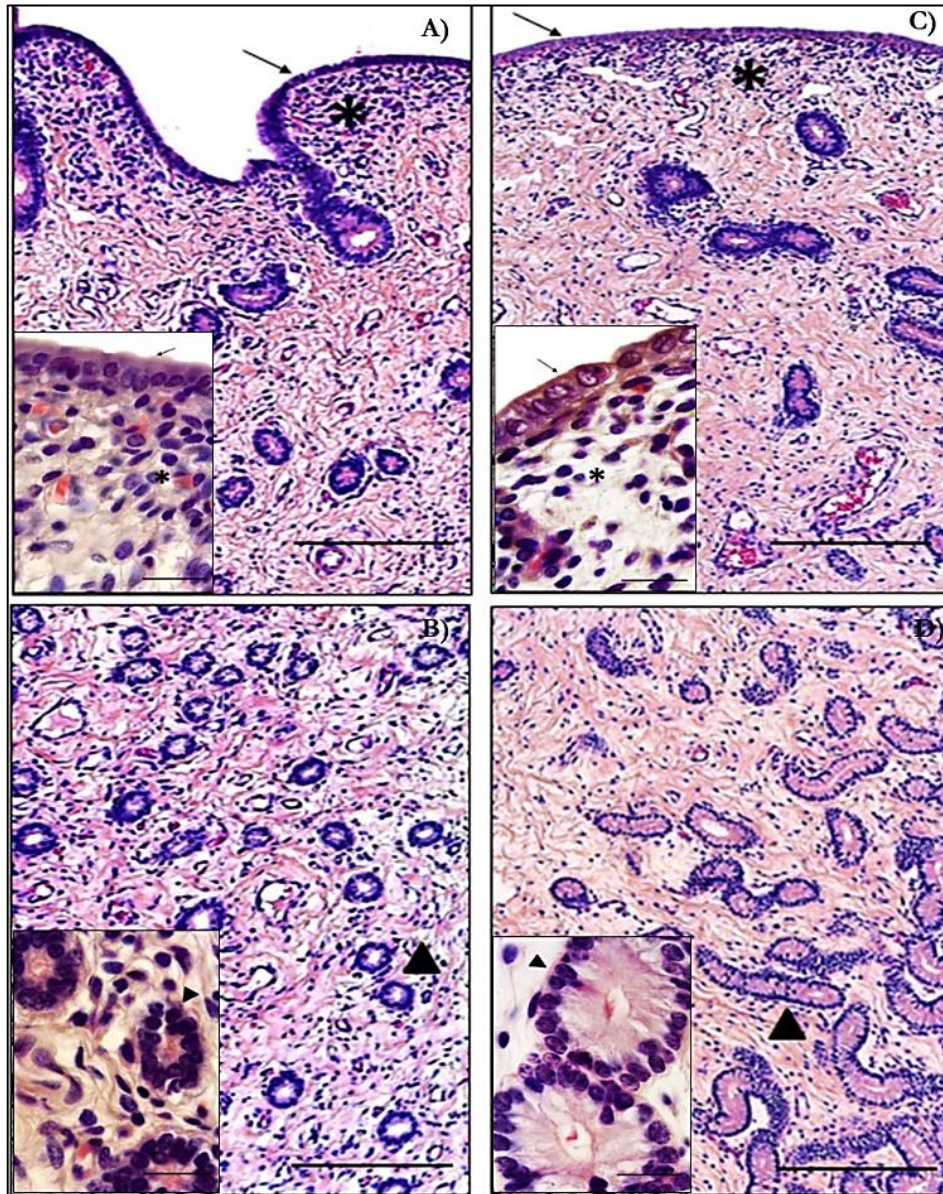
**Figura 21. Ultraestructura de la superficie luminal uterina.** Se determinó mediante microscopía electrónica de barrido. Las imágenes muestran la superficie endometrial de alpacas no preñadas (**A**, **C**) y alpacas preñadas (**B** y **D**) a diferentes aumentos (barra= 10  $\mu$ m). En el inserto (**E**) se observa en detalle un uterodomo (**U**), barra:1  $\mu$ m. Las flechas indican los diferentes tipos de células encontrados, **CC**: células ciliadas, **CD**: células desnudas, **CM**: célula con microvellosidades.

### Ib- Citoarquitectura de la mucosa uterina

A nivel histológico, se evidenciaron diferencias entre el endometrio de hembras P y NP, sin observarse diferencias entre CUI y CUD. El EL del endometrio de las hembras NP se presentó columnar pseudoestratificado (Fig. 22A), mientras que en las hembras P se observó un epitelio cuboide simple (Fig. 22C). En la ZD del endometrio de las hembras P los núcleos de los fibroblastos se observaron espaciados y dispersos entre sí (Fig. 22C); a diferencia de las hembras NP donde los fibroblastos se observaron hacinados (Fig. 22A).

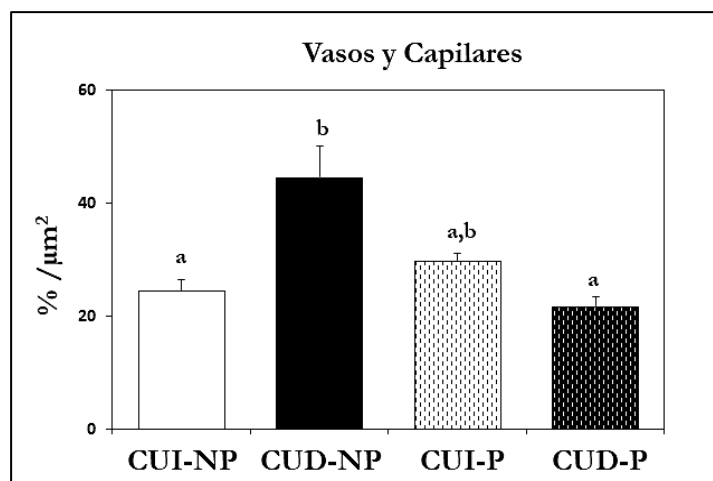
En la ZL del endometrio, las glándulas uterinas de alpacas P se observaron de mayor tamaño y más ramificadas, presentando un epitelio columnar (Fig. 22D), mientras que en las alpacas NP las glándulas uterinas presentaron una estructura simple y un epitelio de células cilíndricas bajas (Fig. 22B).





**Figura 22. Citoarquitectura de la mucosa uterina.** Se determinó mediante tinción con Hematoxilina-Eosina. Las imágenes muestran los CUs de alpacas No Preñadas (**A**, zona densa y **B**, zona laxa) y alpacas Preñadas (**C**, zona compacta y **D**, zona laxa) en un aumento de 10X (barra= 200  $\mu$ m). En los insertos se observa en detalle el epitelio luminal indicado con una flecha, el epitelio glandular indicado con un triángulo y la zona densa indicada con un asterisco, en un aumento de 100X (barra= 20  $\mu$ m).

El porcentaje de VC sanguíneos presentes en el endometrio uterino se determinó mediante el programa ImageJ a partir de las muestras teñidas con HE (Fig.22). La cuantificación de los VC (Fig. 23), mostró que en alpacas NP el porcentaje de VC varía entre CUI-NP y CUD-NP, siendo 1,81 veces mayor en el CUD-NP en comparación con CUI-NP. En cambio, durante la preñez temprana no se determinaron diferencias entre los CUs. Al comparar el endometrio de hembras P y NP, se evidenció que el porcentaje de VC en el CUD-P disminuyó significativamente 2,0 veces respecto al CUD-NP.



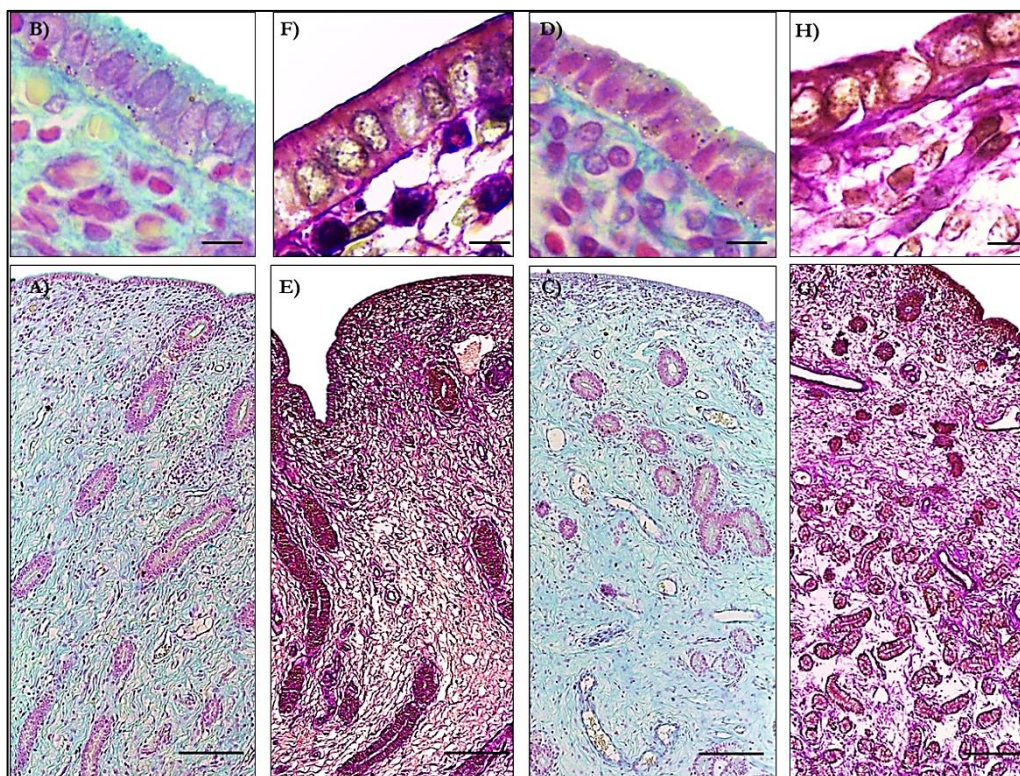
**Figura 23. Histograma del recuento de vasos sanguíneos y capilares.** La determinación se realizó en los cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los resultados se expresaron en  $\%/\mu\text{m}^2$ . Las diferencias significativas están indicadas con letras diferentes ( $p \leq 0,05$ ), los datos representan el promedio  $\pm$  EE,  $n = 3$ .

## Ic- Estudio de mucinas en la mucosa uterina

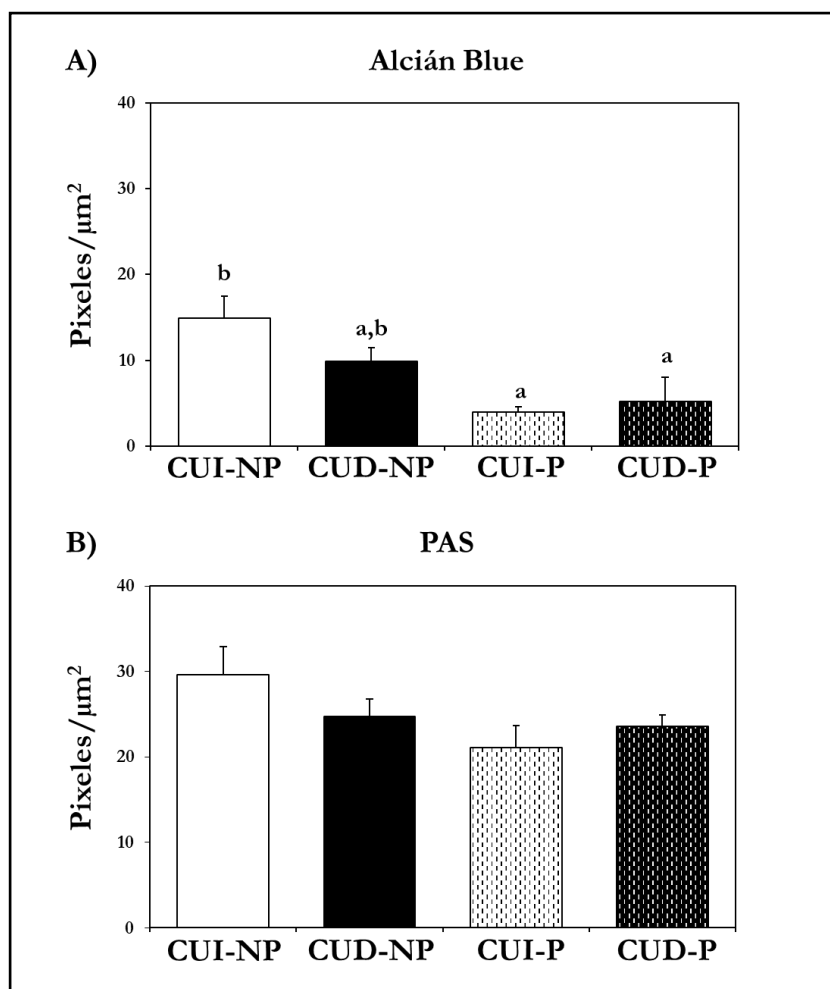
### Ic.I. Detección de los mucopolisacáridos

La distribución de las mucinas neutras y ácidas de la mucosa endometrial se determinó mediante las tinciones histoquímicas PAS y AB ( $\text{pH} = 2,5$ ). En general, el glicocáliz y la lámina basal del EL y el EG del endometrio, mostraron una marca positiva para ambos tipos de mucinas. El endotelio de los VC sanguíneos también mostró una tinción característica para mucopolisacáridos neutros y ácidos (Fig. 24). La marca para las mucinas ácidas en EL presentó una disminución en las alpacas P respecto de las hembras NP (Fig. 25). Esta disminución del área coloreada por el AB (píxeles/ $\mu\text{m}^2$ ) es significativa en CUI-P y CUD-P respecto de CUI-NP= 10,9 veces ( $p = 0,028$ ) y 9,7 veces ( $p = 0,047$ ) respectivamente. Por el contrario, las mucinas neutras no mostraron diferencias en su señal ni entre CUs ni entre hembras NP y P.





**Figura 24. Detección de Mucopolisacáridos.** Sección endometrial de alpacas no preñadas teñida con Alcian Blue (pH 2,5), **A)** 10X (barra = 100  $\mu$ m) y **B)** Detalle del epitelio luminal 100X (barra = 10  $\mu$ m). Sección endometrial de alpacas preñadas teñida con Alcian Blue (pH 2.5), **C)** 10X (barra = 100  $\mu$ m) y **D)** Detalle del epitelio luminal, 100X (barra = 10  $\mu$ m). Endometrio de alpacas no preñadas teñida con Ácido Peryódico-Schiff (PAS), **E)** 10X (barra = 100  $\mu$ m) y **F)** Detalle del epitelio luminal, 100X (barra = 10  $\mu$ m). Endometrio del útero de alpacas preñadas teñida con PAS **G)** 10X (barra = 100  $\mu$ m) y **H)** Detalle del epitelio luminal, 100X (barra = 10  $\mu$ m).



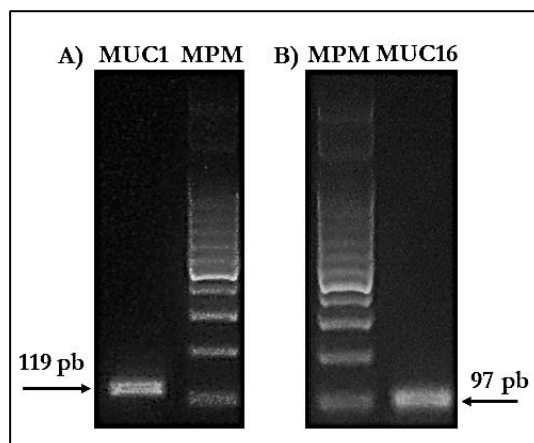
**Figura 25. Histogramas de la detección de mucopolisacáridos.** Con Alcian Blue **(A)**, y con PAS **(B)** en epitelio luminal de los cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). El área positiva para ambas tinciones se expresó en  $\text{píxeles}/\mu\text{m}^2$ . Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), los datos representan el promedio de los datos  $\pm$  EE,  $n = 3$ .

#### *Ic.II. Expresión relativa del ARNm de Mucina 1 y Mucina 16*

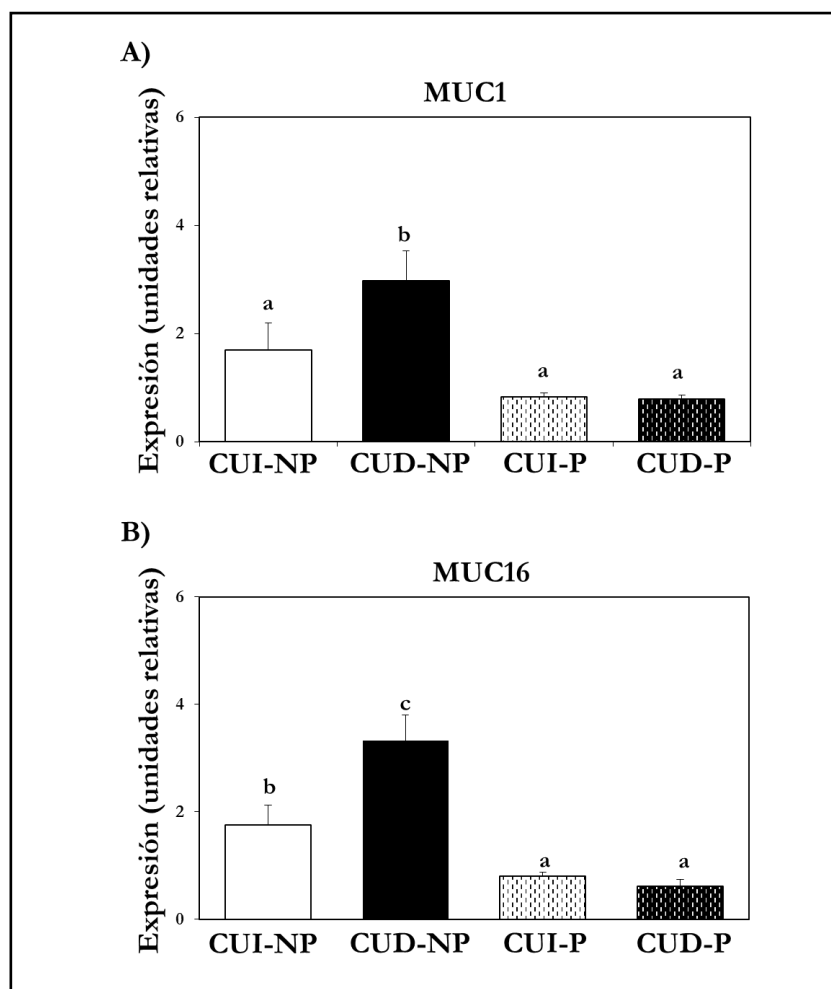
La expresión del ARNm de MUC1 y MUC16 se detectó en CUI y CUD de alpacas NP y P. La electroforesis de los productos de amplificación corrobora que los cebadores amplificaron productos únicos y del tamaño esperado (Fig. 26). Además, la identidad de los productos se confirmó mediante la secuenciación de los amplicones.

En hembras NP, la cuantificación relativa de la expresión de MUC1 en CUD-NP tiende ( $p=0,08$ ) a ser mayor que en CUI-NP. Al comparar los estadios fisiológicos se observa mayor abundancia relativa de MUC1 en CUs-NP. Específicamente, se determinó que la expresión en CUD-P disminuye significativamente (3,79 veces) en comparación con CUD-NP, mientras que CUI-P mostró una tendencia ( $p= 0,09$ ) a disminuir en comparación con

CUI-NP (Fig. 27A). La abundancia relativa de MUC16 en alpacas NP, fue 1,89 veces mayor en CUD-NP con respecto al CUI-NP. En hembras P, los niveles de expresión de MUC16 entre CUs fueron similares y menores que en alpacas NP. La expresión de MUC16 disminuyó 5,46 veces en CUD-P en comparación con CUD-NP (Fig. 27B).



**Figura 26. Detección de productos amplificados por PCR.** Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinaron los productos amplificados por PCR correspondientes a: **A)** MUC1 (119 pb) y **B)** MUC16 (97 pb) en cuernos uterinos de alpacas. **MPM:** marcador de peso molecular.



**Figura 27. Expresión relativa de mucina 1 y mucina 16.** Se determinaron los niveles de la abundancia relativa del ARNm de **A) MUC1** y **B) MUC16** en los cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). La expresión de ARNm de las mucinas se normalizó frente al gen de referencia HPRT. Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Los datos representan medias  $\pm$  EE,  $n = 5$ .

### Id- Conclusiones parciales

- 1) Los CUs de alpaca preñadas y no preñadas presentan diferencias histológicas, histoquímicas, ultraestructurales y de expresión génica.
- 2) Las modificaciones de la superficie uterina a nivel ultraestructural a los 15 días de preñez en la alpaca incluyen la aparición de uterodomas, la disminución o desaparición de las células ciliadas y el acortamiento de las microvellosidades, todos elementos considerados marcadores estructurales de la ventana de implantación.
- 3) Durante la preñez temprana se evidenciaron cambios en la morfología de las células del epitelio luminal y glandular, hipertrofia de las glándulas uterinas y una disminución del porcentaje de vasos y capilares en CUD respecto al CUD no preñado.

4) La expresión de mucopolisacáridos ácidos disminuye durante la preñez temprana (CUI-P vs. CUI-NP), la cuál es acompañada por la disminución en la expresión génica de las mucinas (MUC1 y MUC16).

5) La mucosa de los CUI y CUD estaría respondiendo de manera similar a los estímulos propios de la a preñez en lo que respecta a la ultraestructura, citoarquitectura y contenido de mucinas.

## II-ESTUDIO DE MOLÉCULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL ENDOMETRIO EN LOS CUERNOS UTERINOS DE ALPACAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS

La MEC uterina sufre modificaciones a lo largo de la preñez, siendo la homeostasis de sus componentes vital para los primeros estadios de la preñez, como durante la implantación. El colágeno es la proteína más abundante de la MEC, por esta razón es el objeto de estudio en esta sección. Además, se determinó la presencia de moléculas relacionadas con la remodelación de la MEC, como lo son las MMPs, sus activadores e inhibidores.

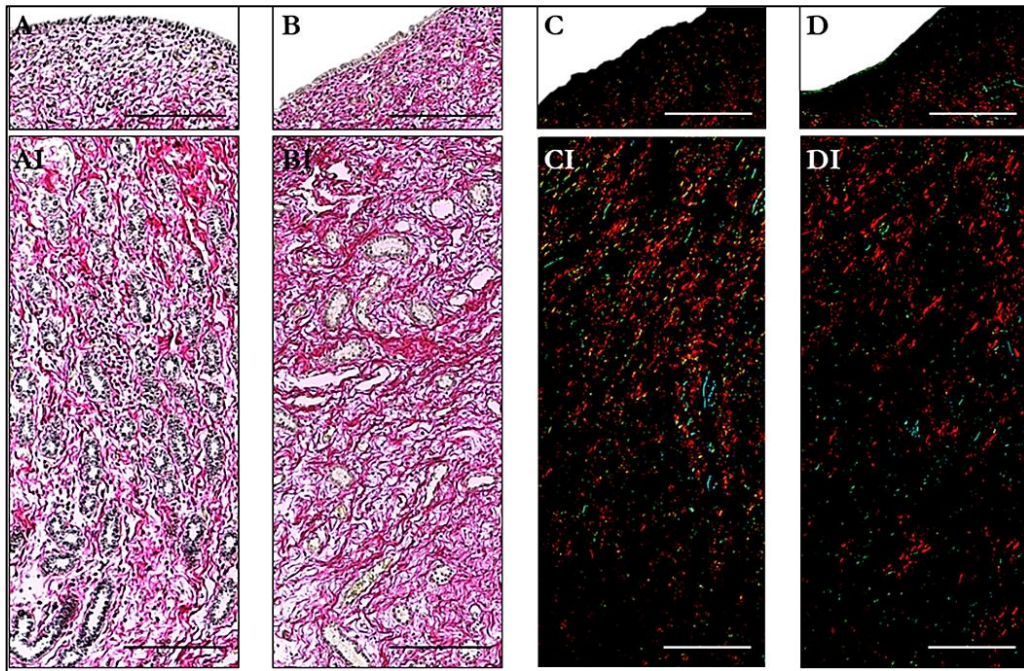
### **IIa- Análisis del colágeno endometrial en cuernos uterinos**

#### *IIa.I. Contenido de colágeno I y III en la mucosa endometrial*

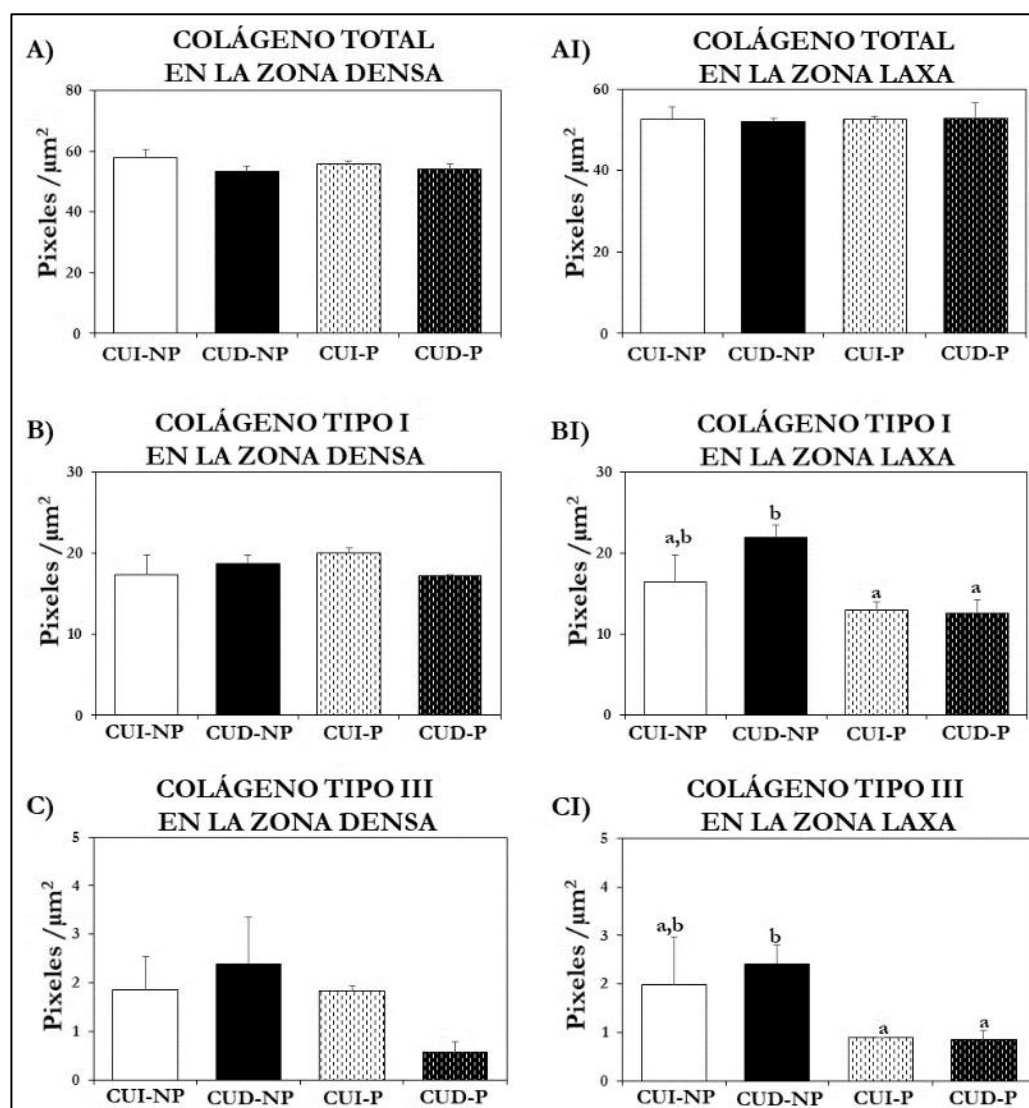
La presencia de COLT, COLI y COLIII se detectó en el endometrio uterino mediante la tinción específica con PSR. La presencia de COLT, se determinó tanto en la ZD como en la ZL de la mucosa uterina, sin observarse diferencias entre CUs ni entre estadios fisiológicos (Fig. 28 A, AI, B y BI). Bajo microscopio de luz polarizada, se observó que en general el COLI se encuentra en mayor proporción que el COLIII, (Fig. 28 C, CI, D y DI).

La cuantificación del contenido específico de COLI y COLIII (Fig. 29), en la ZD mostró una tendencia a disminuir en el CUD-P en comparación al CUD-NP ( $p \leq 0,1$ ). Por otra parte, en la ZL tanto el COLI como el COLIII disminuyeron durante la preñez, en ambos CUs respecto al CUD-NP ( $p \leq 0,05$ ).





**Figura 28. Detección de fibras de colágeno en la mucosa uterina.** Se determinó mediante tinción con Picrosirius Red se en secciones endometriales de alpacas no preñadas, en campo claro: **A)** Zona Densa (ZD) y **AI)** Zona Laxa (ZL), 10X (barra = 200  $\mu$ m) y en campo polarizado: **C)** ZD y **CI)** ZL, 10X (barra = 200  $\mu$ m). En secciones endometriales de alpacas preñadas, en campo claro: **B)** ZD y **BI)** ZL, 10X (barra = 200  $\mu$ m) y en campo polarizado: **D)** ZD y **DI)** ZL, 10X (barra = 200  $\mu$ m). Como las CUs no muestran diferencias entre sí se muestran imágenes del CUD.



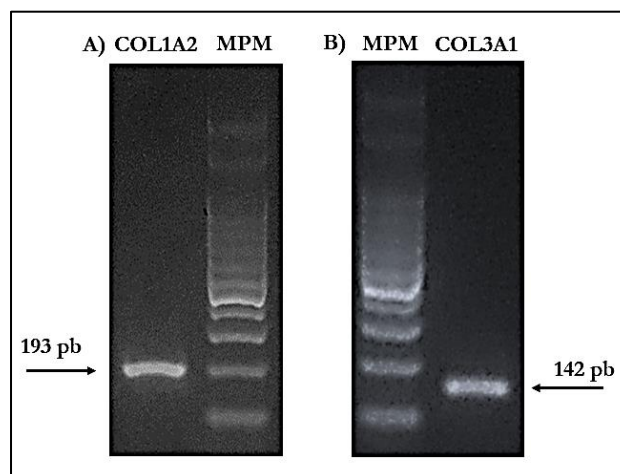
**Figura 29. Cuantificación del contenido de colágeno de la mucosa uterina.** Los histogramas del área coloreada con Picrosirius Red se expresaron en pixeles/ $\mu\text{m}^2$ . La zona densa del endometrio del cuerno uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P) corresponden a: A) Colágeno total (COLT), B) Colágeno tipo I (COLI) y C) Colágeno tipo III (COLIII) y en la zona laxa del endometrio: AI) CT, BI) COLI y CI) COLIII. Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas. ( $p \leq 0,05$ ), los datos representan los promedios  $\pm$  EE,  $n = 3$ .

## Ila.II. Expresión relativa de COL1A2 y COL3A1

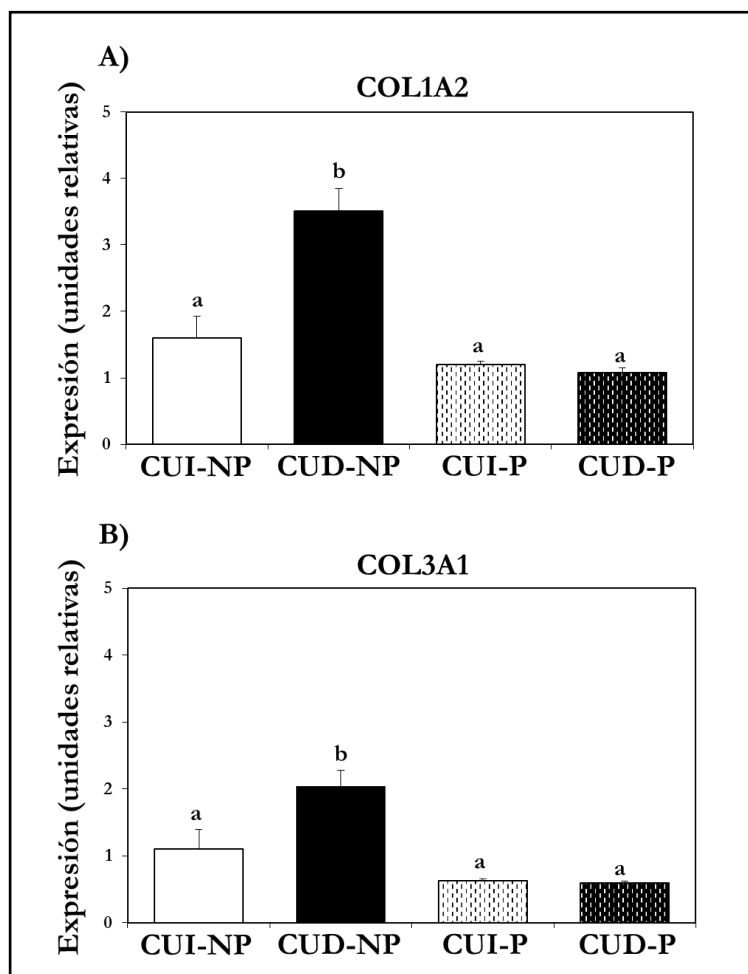
Para realizar reacciones de PCR en CUI y CUD de alpacas NP y alpacas P se diseñaron cebadores específicos en base a las secuencias nucleotídicas del colágeno tipo I alfa 2 (COL1A2) y el colágeno tipo III alfa 1 (COL3A1). Mediante electroforesis en gel de agarosa, se determinó la especificidad de los productos de PCR amplificados (Fig. 30), los cuales resultaron productos únicos y del tamaño esperado.

Después de determinar la especificidad de los productos de amplificación, se procedió a realizar la cuantificación relativa de los niveles de expresión de los mismos, en CUI y CUD de alpacas NP y alpacas P. En hembras NP, se observaron diferencias en la abundancia relativa del COL entre CUs. Los niveles de expresión de COL1A2 fueron 2,0 veces más altos en el CUD-NP al compararlo con CUI-NP (Fig. 31A); mientras, el COL3A1 se expresa 2,0 veces más CUD-NP en comparación con CUI-NP (Fig. 31B). En cuanto a hembras P, no se determinaron diferencias entre CUs en la expresión de COL1A2 y COL3A1.

Cuando comparamos la expresión entre estadios fisiológicos, determinamos que la expresión de COL1A2 disminuyó significativamente (3,0 veces) en el CUD-P en comparación con CUD-NP, mientras que la expresión de COL3A1 disminuyó significativamente (3,0 veces) en el CUD-P en comparación con CUD-NP; en CUI-P los niveles de expresión relativa tienden a disminuir con respecto a CUI-NP ( $p=0,1$ ).



**Figura 30. Detección de productos amplificados por PCR.** Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinaron los productos amplificados por PCR correspondientes a: **A)** COL1A2 (193 pb) y **B)** COL3A1 (142 pb) en cuernos uterinos de alpaca. **MPM:** marcador de peso molecular.



**Figura 31. Expresión relativa de colágeno tipo I (COL1A2) y colágeno tipo III (COL3A1).** Se determinaron los niveles de abundancia relativa del ARNm de **A) COL1A2** y **B) COL3A1** en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). La expresión de ARNm de COL1A2 y COL3A1 se normalizó frente al gen de referencia HPRT. Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) se indican con letras diferentes. Los datos representan medias  $\pm$  EE,  $n = 5$ .

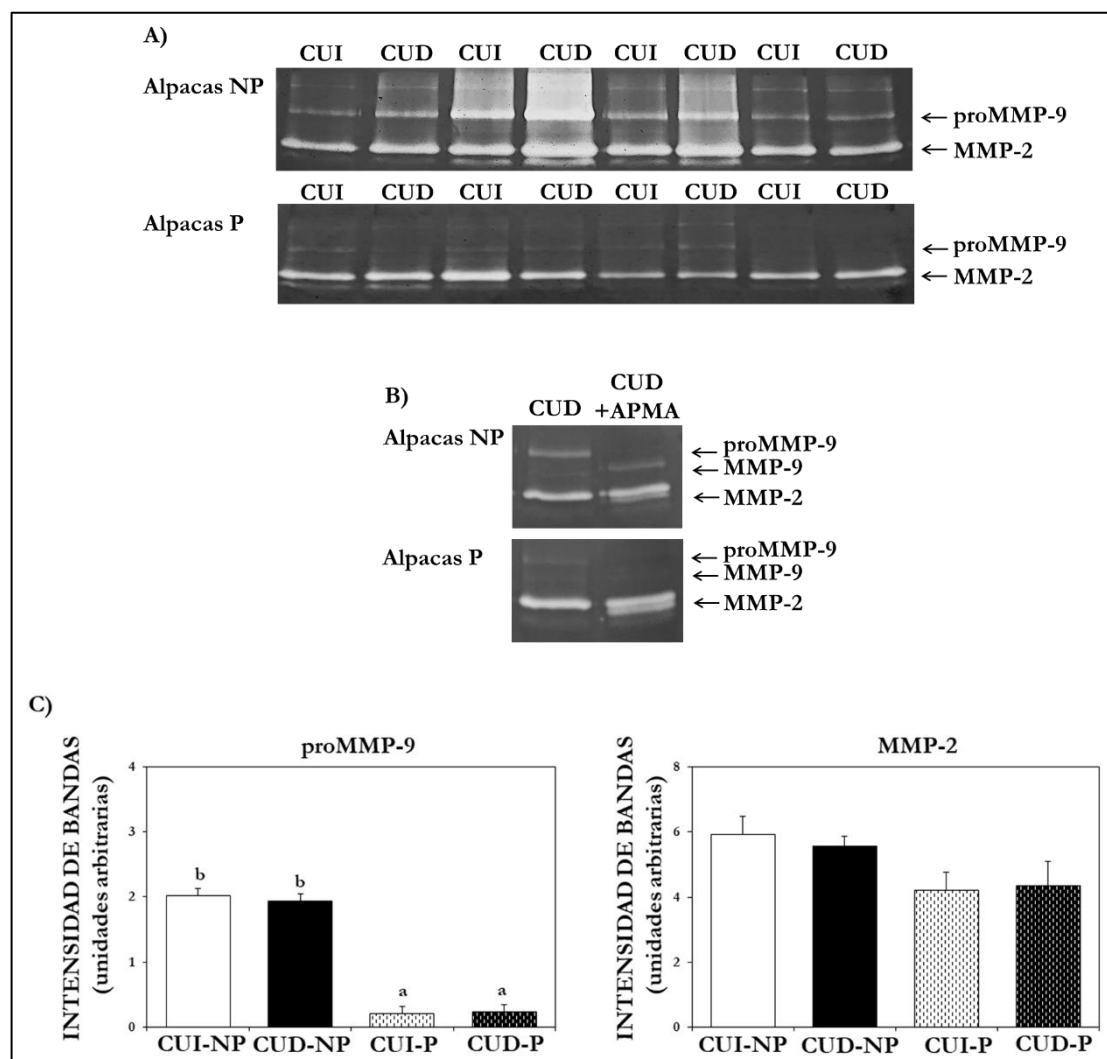
## **IIb- Análisis del sistema de las MMPs en cuernos uterinos**

### *IIb.I. Detección de MMPs con actividad gelatinolítica en el fluido uterino*

La presencia de enzimas con actividad de gelatinasas en el FU de alpacas NP y alpacas P (15 días) se determinó mediante zimografía en gelatina, según se describe en el apartado II-1 de Materiales y Métodos.

Se observaron cuatro bandas gelatinolíticas correspondientes a MMPs en las muestras de FU, tanto en hembras P como NP. En base a sus pesos moleculares, las bandas de 62 y 92 kDa correspondieron a MMP-2 y proMMP9, respectivamente (Fig. 32A). Estos datos fueron corroborados después del tratamiento del FU con APMA (un activador químico

de Pro-MMPs); la banda de proMMP-9 desapareció y apareció una banda de 82 kDa correspondiente a la MMP-9 activa (Fig. 32B). El análisis densitométrico mostró que la actividad de MMP-2 era similar entre los CUs analizados, mientras que la intensidad de la proMMP-9 en alpacas NP era significativamente mayor que en las alpacas P (Fig. 32C).



**Figura 32. Detección de MMPs con actividad gelatinolítica en el fluido uterino.** Mediante zimografía en gel se determinó la actividad gelatinolítica del fluido de los cuernos uterinos (FU): **A)** Zimografía en gel del FU de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). **B)** FU tratado con APMA, un activador de proMMP. **C)** Análisis densitométrico de proMMP-9 y de MMP-2. Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas. ( $p \leq 0,05$ ). Los datos representan los promedios  $\pm$  EE,  $n = 4$ .

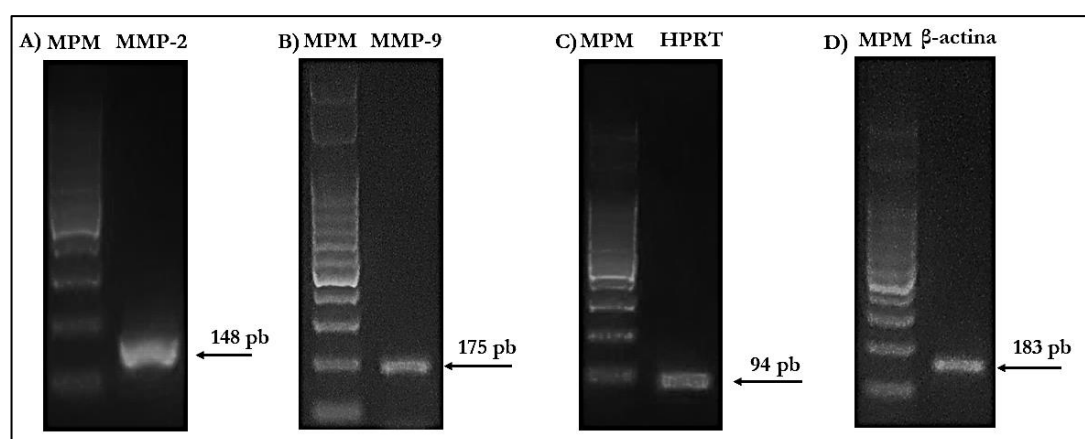
### *IIb.II. Análisis de la expresión de MMP-2 y MMP-9*

#### *Puesta a punto de las reacciones de amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real y PCR semicuantitativa.*

La especificidad de los productos de PCR se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa. En la figura 33 se muestran las electroforesis de los productos de amplificación confirmaron que los cebadores amplificaron productos únicos y del tamaño esperado.

Asimismo, para la cuantificación mediante qPCR de MMP-2, la especificidad de las reacciones de amplificación se determinó mediante el análisis de las curvas de melting para cada par de cebadores. En todos los casos se observó un solo pico a una temperatura definida, lo que indica la presencia de productos de amplificación únicos. Además, se realizaron controles de expresión negativos (NTC y NRT), los cuales no generaron productos de amplificación. También, se evaluó la eficiencia de amplificación para MMP-2 y los genes de referencia HPRT y  $\beta$ -actina. Las curvas correspondientes se construyeron graficando los valores de Ct obtenidos a partir de diluciones seriadas de ADNc de endometrio. La información de las eficiencias de amplificación, temperatura de melting, así como los distintos controles realizados para la puesta a punto de las reacciones de qPCR con cada uno de los cebadores se encuentra resumida en la Tabla 7.

Los niveles de expresión de MMP-9 se evaluaron mediante PCR en punto final y se empleó HPRT como gen de referencia.



**Figura 33. Detección de productos amplificados por PCR.** Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinaron los productos amplificados por PCR correspondientes a **A)** MMP-2 (148 pb), **B)** MMP-9 (175 pb), y los genes de referencia **C)** HPRT (94pb) y **D)**  $\beta$ -actina (183 pb) en cuernos uterinos de alpaca. **MPM:** marcador de peso molecular.

**Tabla 7: Parámetros y controles de RT-qPCR.** NTC: control de amplificación sin templado, NRT: control de amplificación con ARN no retro-transcripto, NA: no amplifica.

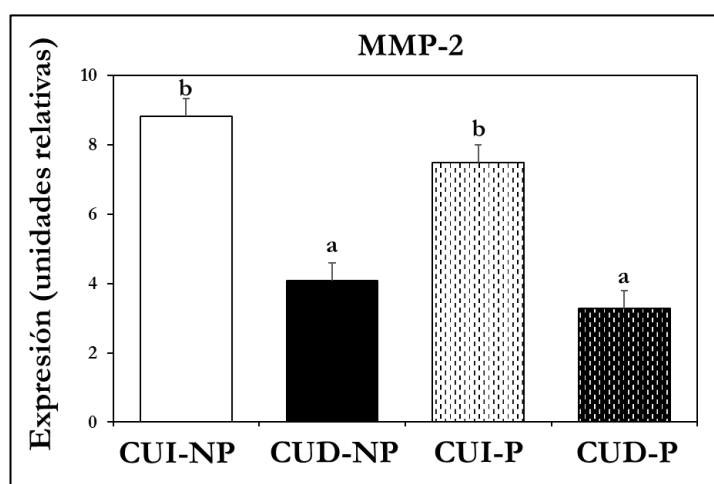
	$\beta$ -actina	HPRT	MMP-2
<b>Concentración del Cebador</b>	250 nM	250 nM	200 nM
<b>Eficiencia</b>	99,2	96,6	110
<b>Temperatura de melting</b>	85 °C	79,5 °C	84 °C
<b>Productos inespecíficos, dímeros de cebadores</b>	NA	NA	NA
<b>NTC</b>	NA	NA	NA
<b>NRT</b>	NA	NA	NA

### Expresión de MMP-2 y MMP-9

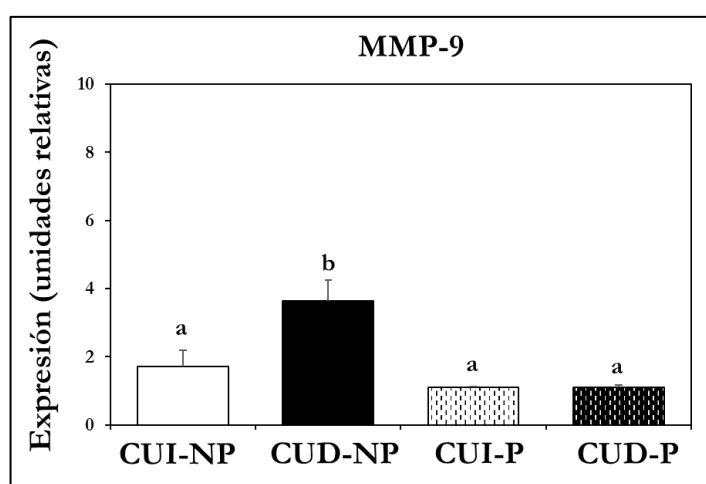
Se detectó la expresión de MMP-2 (Fig. 34) y MMP-9 (Fig. 35), en endometrio de hembras P y NP. En hembras NP, ambas MMPs se expresaron diferencialmente entre cuernos uterinos.

MMP-2 se expresa 2,15 veces más en el CUI-NP que en el CUD-NP, mientras que en hembras P su expresión, fue 2,27 veces más alta en el CUI-P que en el CUD-P. La expresión de MMP-2 entre estadios fisiológicos, se mantuvo invariable.

La expresión de MMP-9 en hembras NP, fue en CUD-NP 2,11 veces mayor que en el CUI-NP. En hembras P, MMP-9, no presentó diferencias de expresión génica entre CUI-P y CUD-P. Al comparar los estadios fisiológicos se determinó que la expresión de MMP-9 disminuyó 3,26 veces en el CUD-P comparado con el CUD-NP.



**Figura 34. Expresión relativa de metaloproteasa 2 (MMP-2).** Se determinaron los niveles de expresión relativa de MMP-2 en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica de los genes de referencia ( $\beta$ -actina y HPRT),  $\pm$  EE,  $n=5$ .



**Figura 35. Expresión relativa de Metaloproteasa 9 (MMP-9).** Se determinaron los niveles de expresión relativa de MMP-9 en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica del gen de referencia (HPRT),  $\pm$  EE,  $n=5$ .

*I Ib. III. Estudio de la expresión de los genes reguladores de las MMPs (TIMPs, LGMN, MMP-14 y EMMPRIN).*

*Puesta a punto de las reacciones de amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real y PCR semicuantitativa.*

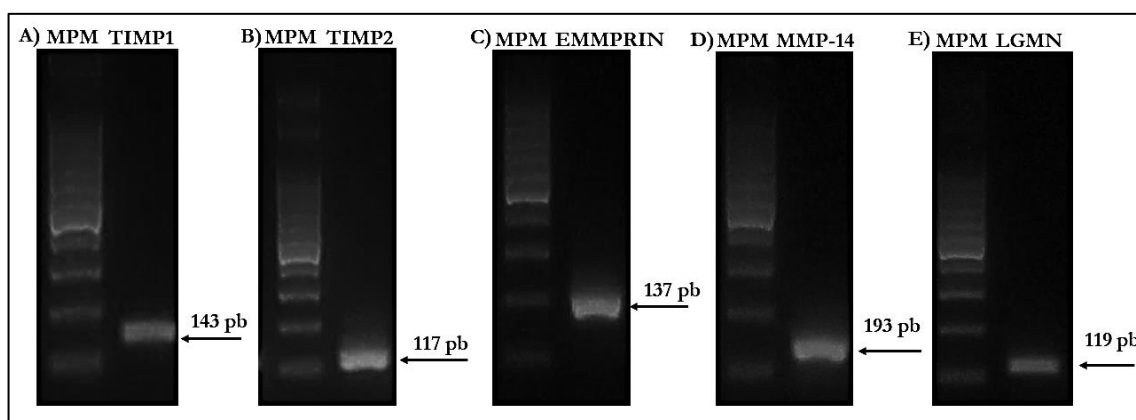
En base a las secuencias nucleotídicas de los inhibidores TIMP1 y TIMP2, el inductor EMMPRIN y los activadores LGMN y MMP-14, se diseñaron cebadores



específicos para realizar reacciones de RT-qPCR (TIMP2, MMP-14 y LGMN) y RT-PCR (TIMP1 y EMMPRIN), en CUI y CUD de alpacas NP y preñadas P.

En la figura 36 se muestran las electroforesis de los productos de amplificación confirmaron que los cebadores amplificaron productos únicos y del tamaño esperado.

En el caso de RT-qPCR, además se realizó el análisis de las curvas de melting para cada par de cebadores. En todos los casos se observó un solo pico a una temperatura definida, lo que indica la presencia de productos de amplificación únicos. Los controles de expresión negativos (NTC y NRT) por su parte, no generaron productos de amplificación. Las curvas de eficiencia de amplificación para cada uno de los genes se construyeron graficando los valores de Ct obtenidos luego de realizar las amplificaciones a partir de diluciones seriadas de ADNc de endometrio. La información de las eficiencias de amplificación, temperatura de melting, así como los distintos controles realizados para la puesta a punto de las reacciones de RT-qPCR con cada uno de los cebadores se encuentra resumida en la Tabla 8.



**Figura 36. Detección de productos amplificados por PCR.** Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinaron los productos amplificados por PCR correspondientes a **A)** TIMP1 (143 pb), **B)** TIMP2 (117pb), **C)** EMMPRIN (137 pb), **D)** LGMN (119 pb) y **E)** MMP-14 (193pb) en cuernos uterinos de alpaca. **MPM:** marcador de peso molecular.

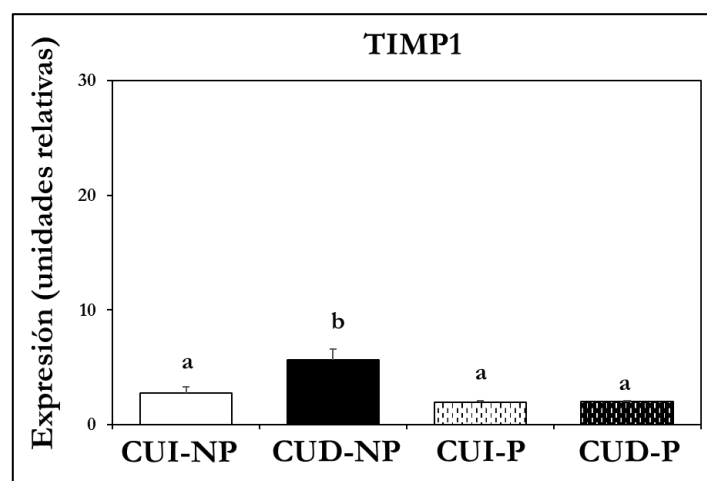
**Tabla 8: Parámetros y controles de RT-qPCR.** NTC: control de amplificación sin templado, NRT: control de amplificación con ARN no retro-transcripto, NA: no amplifica.

	MMP-14	TIMP2	LGMN
<b>Concentración del Cebador</b>	250 nM	250 nM	200 nM
<b>Eficiencia</b>	98,2	93,9	98,1
<b>Temperatura de melting</b>	85 °C	83,5 °C	82 °C
<b>Productos inespecíficos, dímeros de cebadores</b>	NA	NA	NA
<b>NTC</b>	NA	NA	NA
<b>NRT</b>	NA	NA	NA

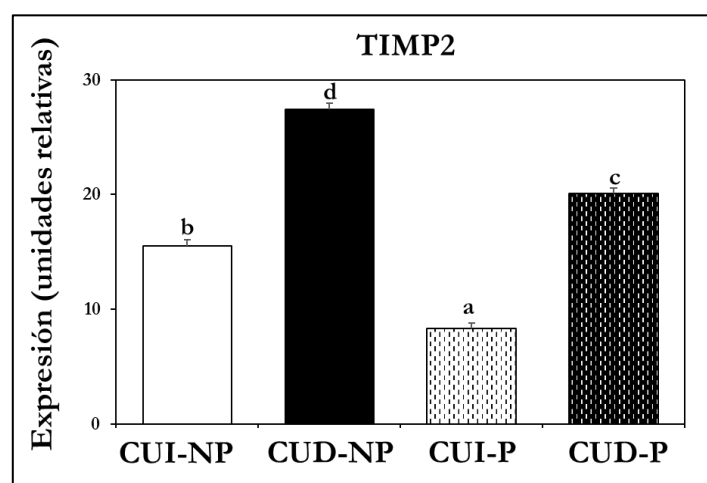
Al analizar los niveles de expresión de TIMP1 (Fig. 37) y TIMP2 (Fig. 38), inhibidores de MMPs, determinamos en el caso de TIMP2 que su expresión fue mayor en el

CUD en comparación con CUI para ambos estadios fisiológicos estudiados. En alpacas NP la expresión de TIMP2 fue en CUD-NP 1,76 veces mayor que en CUI-NP y en alpacas P, TIMP2 se expresó en CUD-P 2,42 veces más que en CUI-P. Al comparar la expresión entre estadios fisiológicos se determinó que TIMP2 disminuyó en ambos CUs durante la preñez, en CUI-P disminuye 1,87 veces y en CUD-P disminuye 1,36 veces, en comparación con hembras no preñadas.

Por su parte la expresión de TIMP1 en hembras NP fue 2,13 mayor en CUD-NP en comparación con CUI-NP y en alpacas P, la expresión de TIMP1 fue similar en ambos CUs. Al comparar entre estadios fisiológicos se determinó que TIMP1 disminuyó significativamente 2,62 veces en el CUD-P en comparación con CUD-NP.



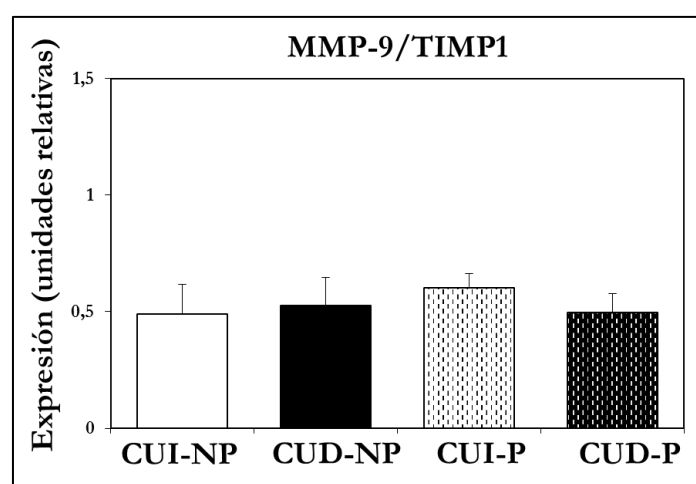
**Figura 37. Expresión relativa del inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP1).** Se determinaron los niveles de expresión relativa de TIMP1 en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica del gen de referencia (HPRT),  $\pm$  EE,  $n=5$ .



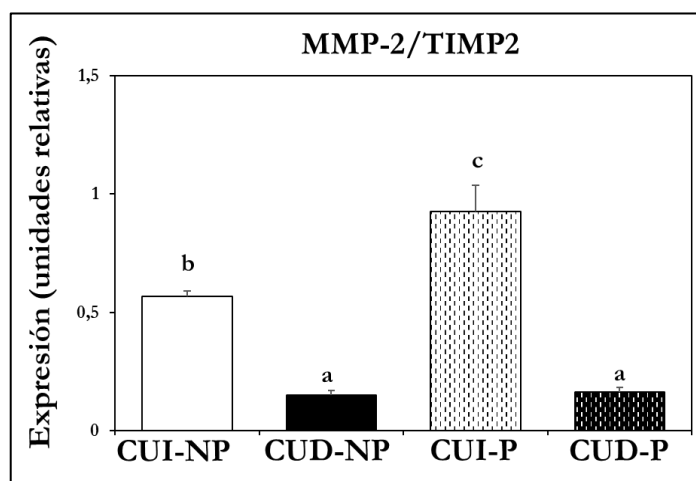
**Figura 38. Expresión relativa del inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP2).** Se determinaron los niveles de expresión relativa de TIMP2 en cuerno uterino izquierdo y derecho de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica de los genes de referencia ( $\beta$ -actina y HPRT),  $\pm$  error estándar,  $n=5$ .

Debido a que la relación entre MMP-9 y MMP-2 con sus inhibidores específicos TIMP1 y TIMP2 respectivamente, es equimolecular, se analizó la relación de expresión MMP-9/TIMP1 (Fig. 39) y MMP-2/TIMP2 (Fig. 40) para una mayor comprensión de su comportamiento durante la preñez temprana. La relación MMP-9/TIMP1 no presentó diferencias entre CUs, tanto para hembras NP como para hembras P, ni entre estadios fisiológicos. Mientras que la relación MMP-2/TIMP2 fue diferencial entre CUI y CUD tanto

en alpacas NP como en alpacas P. MMP-2/TIMP2 fue 3,81 veces mayor en CUI-NP en comparación con CUD-NP; mientras que en CUI-P esta relación fue 5,63 veces más alta que en CUD-P. Al comparar la relación MMP-2/TIMP2 entre estadios fisiológicos determinamos que CUI-P presentó un incremento de 1,62 veces en comparación con CUI-NP.



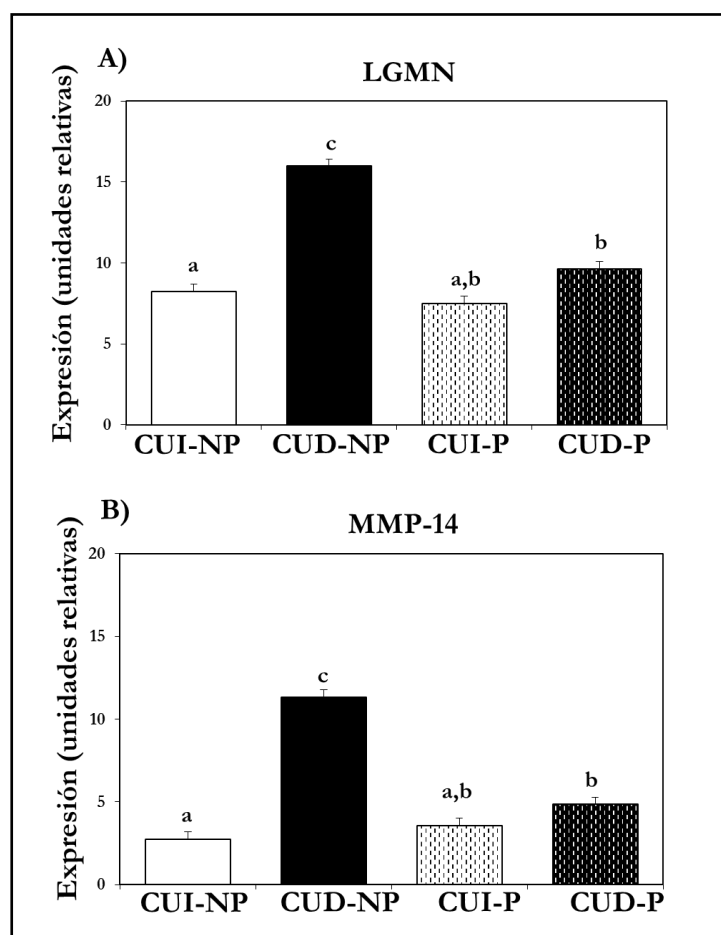
**Figura 39. Relación de los transcritos MMP-9/ TIMP1.** Los niveles de expresión relativa de la relación MMP-9/TIMP1 se determinaron en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica del gen de referencia (HPRT),  $\pm$  EE,  $n=5$ .



**Figura 40. Relación de los transcritos MMP2/ TIMP2.** Los niveles de expresión relativa de la relación MMP-2/TIMP2 se determinaron en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica de los genes de referencia ( $\beta$ -actina y HPRT),  $\pm$  EE,  $n=5$ .

El análisis de los niveles de expresión de LGMN (Fig. 41A) y MMP-14 (Fig. 41B), activadores de MMPs, mostró para LGMN que los niveles de expresión en hembras NP fueron 1,93 veces mayores en CUD-NP, en comparación con CUI-NP, mientras que en hembras P, no se determinaron diferencias entre CUs en la expresión de este activador. Al comparar los niveles de expresión de LGMN entre estadios fisiológicos se determinó que la expresión de LGMN decreció 1,65 veces en el CUD-P en comparación con CUD-NP.

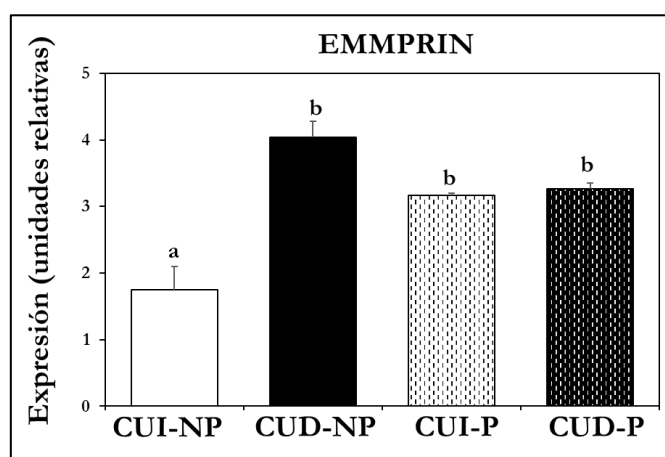
Con respecto a MMP-14, en hembras NP, su expresión fue 4,1 veces mayor en el CUD-NP en comparación con el CUI-NP, mientras que en hembras P, no se determinaron diferencias entre CUs en la expresión de MMP-14. Al comparar la expresión de este activador entre estadios fisiológicos, se determinó que durante la preñez temprana disminuye significativamente 2,33 veces en CUD-P en comparación con CUD-NP.



**Figura 41. Expresión relativa de legumanía (LGMN) y metaloproteasa 14 (MMP-14).** Se determinaron los niveles de expresión relativa de **A)** LGMN y **B)** MMP-14 en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica de los genes de referencia ( $\beta$ -actina y HPRT),  $\pm$  EE,  $n=5$ .

Por último, se determinó la expresión relativa de EMMPRIN (Fig. 42), un inductor de MMPs. Su expresión mostró diferencias en hembras NP, siendo su expresión 2,3 veces mayor en CUD-NP que en CUI-NP.

Al analizar la expresión de EMMPRIN entre estadios fisiológicos se determinó que su expresión se incrementó significativamente 1,81 veces en el CUI-P en comparación con CUI-NP, mientras que en CUD-P tiende ( $p=0,1$ ) a disminuir con respecto a CUD-NP.



**Figura 42. Expresión relativa del inductor de metaloproteasas (EMMPRIN).** Se determinaron los niveles de expresión relativa de EMMPRIN en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica del gen de referencia (HPRT),  $\pm$  EE,  $n=5$ .

## IIc- Conclusiones Parciales

1) La expresión y contenido de colágeno de la MEC del tejido uterino de alpacas disminuye significativamente en el CUD en los primeros 15 días de preñez, como se demostró por la menor expresión de COL1A2 y COL3A1 y el menor contenido de colágeno COLI y COLIII.

2) El FU presenta actividad gelatinolítica correspondiente a MMP-2 y a proMMP-9 (forma inactiva) tanto en alpacas preñadas y como no preñadas.

3) Los CUs de alpacas preñadas y no preñadas presentan expresión génica de todos los genes del sistema de MMPs estudiados.

4) La actividad y expresión del sistema de MMPs es diferente entre hembras preñadas y hembras no preñadas:

- a) La actividad gelatinolítica correspondiente a proMMP-9 es menor en los CUs de las hembras preñadas.
  - b) El CUI de las hembras no preñadas presenta menores niveles de expresión génica para EMMPRIN.
  - c) El CUD de las hembras no preñadas presenta mayores niveles de expresión génica para MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 y LGMN, pudiendo indicar que el sistema de MMPs se encuentra regulado durante la preñez, sobre todo a nivel del CUD.
- 5) La expresión génica y la actividad de MMP-2, son independientes de la preñez, ya que estas no varían entre los diferentes estadios.
- 6) Existe diferencia de expresión génica de elementos del sistema de MMPs entre los CUs de las hembras no preñadas. El CUI presenta mayor expresión de MMP-2, mientras que el resto de los genes estudiados presentan mayores niveles de expresión en el CUD.
- 7) Durante la preñez temprana de la alpaca existen diferencias entre cuernos en los niveles de expresión del sistema de MMPs. CUI presenta mayor expresión de MMP-2 y el CUD del inhibidor de MMP-2, TIMP2. Adicionalmente, la relación MMP-2/TIMP2 se incrementa significativamente durante la preñez temprana en el CUI. En conjunto, estos resultados podrían indicar que durante esta etapa es necesario mantener elevados los niveles de MMP-2 en forma diferencial en el cuerno uterino izquierdo.

### III- CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NGF Y VEGF EN EL ENDOMETRIO DE LOS CUERNOS UTERINOS DE ALPACAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS

La MEC es un reservorio de factores de crecimiento que una vez activos, regulan tanto el metabolismo celular como la homeostasis de la misma. Por su importancia en la preñez se determinó la expresión de VEGFA y la expresión y localización endometrial de  $\beta$ -NGF y su receptor de mayor afinidad TrKA) en el CUI y CUD de alpacas NP y alpacas P (15 días).

#### IIIa- Estudio del factor de crecimiento vascular A en cuernos uterinos

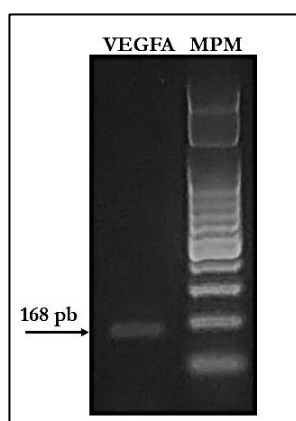
En base a las secuencias nucleotídicas del VEGFA, se diseñaron cebadores específicos para realizar reacciones de PCR en CUI y CUD de alpacas NP y alpacas P.

Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinó la especificidad de los productos de amplificación de VEGFA (Fig. 43) y se procedió a realizar la cuantificación relativa de los niveles de expresión del mismo. Se detectó la expresión de VEGFA en ambos estadios fisiológicos estudiados (Fig. 44).

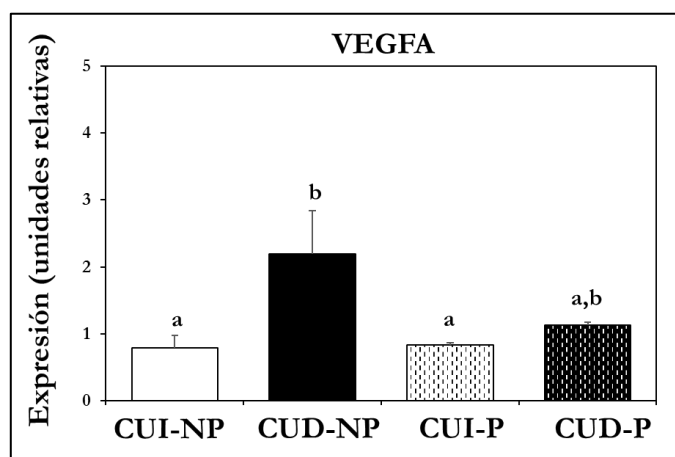
En hembras NP, los niveles de expresión de VEGFA se expresaron diferencialmente entre CUs; VEGFA se expresa 2,79 veces más en el CUD-NP que en el CUI-NP. Por el contrario, durante la preñez no se determinaron diferencias entre CUs.

Al comparar la expresión de VEGFA entre estadios fisiológicos, se observó que la expresión en CUI se mantuvo invariable entre ambos estadios en estudio, mientras que el CUD presentó una tendencia ( $p=0,09$ ) a disminuir durante la preñez temprana.





**Figura 43. Detección de productos amplificados por PCR.** Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinaron los productos amplificados por PCR correspondientes a VEGFA (168 pb) en cuernos uterinos de alpaca. **MPM:** marcador de peso molecular.



**Figura 44. Expresión relativa del factor de crecimiento endotelial A (VEGFA).** Se determinaron los niveles de expresión relativa de VEGFA en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica del gen de referencia (HPRT),  $\pm$  EE,  $n=5$ .

### IIIb- Estudio del factor de crecimiento nervioso en cuernos uterinos

#### *IIIb.I Expresión génica del factor de crecimiento nervioso $\beta$ ( $\beta$ -NGF) y su receptor tirosina quinasa A (TrKA) en cuernos uterinos*

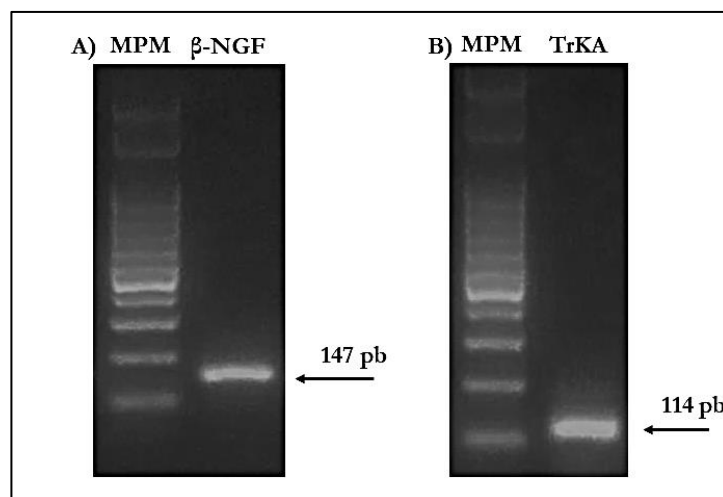
Se utilizaron cebadores específicos  $\beta$ -NGF y su receptor TrKA, para realizar las reacciones de PCR en CUI y CUD de alpacas NP y alpacas P. Para determinar la especificidad de los productos de PCR se realizó electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados (Fig. 45).

Posteriormente, se detectó expresión de  $\beta$ -NGF (Fig. 46A) y su receptor, TrKA (Fig. 46B), en ambos estadios fisiológicos estudiados.

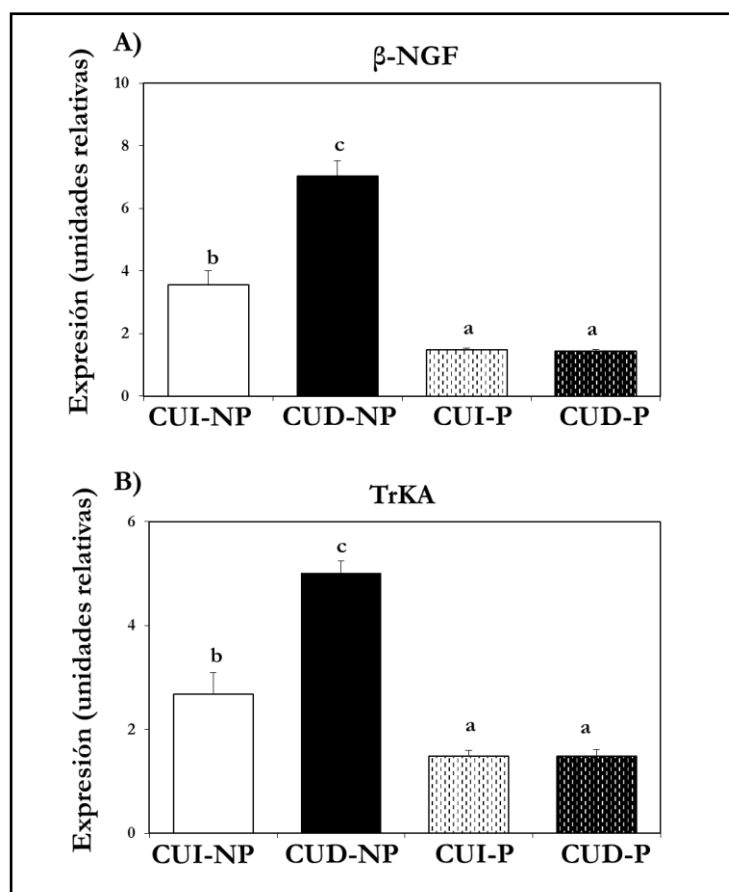
Al comparar la expresión en CUI y CUD de  $\beta$ -NGF y TrKA se determinó que se expresaron diferencialmente entre cuernos uterinos de hembras NP, siendo mayor su expresión en el CUD-NP. La expresión del  $\beta$ -NGF es 1,97 veces mayor en CUD-NP en comparación de CUI-NP, y TrKA se expresa 1,87 veces más en CUD-NP en comparación de CUI-NP.

Durante la preñez temprana no se determinaron diferencias en la expresión de  $\beta$ -NGF ni de su receptor TrKA entre CUs.

Cuando comparamos la expresión entre estadios fisiológicos, se determinó que  $\beta$ -NGF y TrKA disminuyeron su expresión significativamente en ambos CUs durante la preñez temprana.  $\beta$ -NGF disminuyó 2,4 veces en el CUI-P y 4,89 veces en CUD-P en comparación con los respectivos cuernos de las hembras NP. La expresión de TrKA disminuyó significativamente 1,79 veces en el CUI-P en comparación con CUI-NP, y 3,37 veces en CUD-P en comparación con CUD-NP respectivamente.



**Figura 45. Detección de productos amplificados por PCR.** Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinaron los productos amplificados por PCR correspondientes a **A)**  $\beta$ -NGF (147pb) y su receptor **B)** TrKA (114 pb) en cuernos uterinos de alpaca. **MPM:** marcador de peso molecular.



**Figura 46. Expresión relativa del factor de crecimiento nervioso  $\beta$  ( $\beta$ -NGF) y su receptor específico la tirosina quinasa A (TrKA).** Se determinaron los niveles de expresión relativa de **A)**  $\beta$ -NGF y **B)** TrKA en cuernos uterinos de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P). Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras representan los valores promedios de expresión normalizados con respecto a la media geométrica del gen de referencia (HPRT),  $\pm$  EE,  $n=5$ .

### IIIb.II. Localización del factor de crecimiento nervioso $\beta$ ( $\beta$ -NGF) y su receptor tirosina quinasa A (TrKA) en cuernos uterinos de alpaca

Los ensayos inmunohistoquímicos de  $\beta$ -NGF revelaron una señal muy débil en el EL y el EG en la mucosa de alpacas NP (Fig. 47: A y B). Mientras que, en el endometrio de alpacas P, la marca fue intensa, localizándose en el endotelio y en el EL y el EG (Fig. 47: C y D).

La cuantificación de la marca positiva (píxeles /  $\mu\text{m}^2$ ) (Fig. 49) permitió determinar que en el CUI-NP la señal es 7,65 veces mayor que en el CUD-NP a nivel del EL. En el EG no se determinaron diferencias entre CUs.

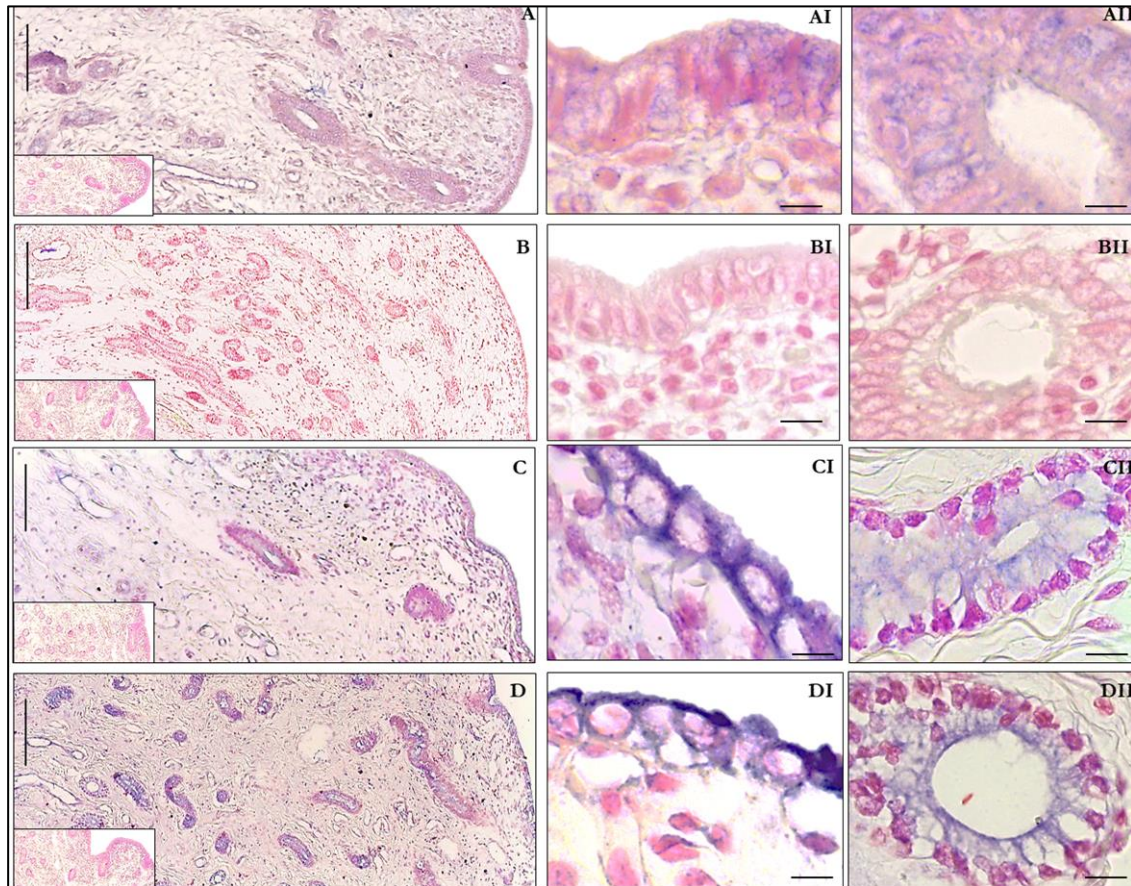
En alpacas P la señal de  $\beta$ -NGF en el EL, no mostró diferencias en contenido y localización al comparar ambos CUs. En cambio, la marca del EG presentó diferencias, siendo ésta 7,94 veces más elevada en el CUD-P versus CUI-P.

Al comparar los estadios fisiológicos, se determinó que  $\beta$ -NGF se incrementa en el EL del CUI y CUD durante la preñez, 5,35 y 48,0 veces, respectivamente. En el EG también se evidenció un incremento de  $\beta$ -NGF en ambos CUs, aumentó 41,0 veces en CUD-P, mientras que en el CUI-P se observó una tendencia a aumentar ( $p=0,06$ ).

Respecto a la localización del receptor de  $\beta$ -NGF, TrKA, ésta se determinó en el endotelio y en el EL y el EG co-localizado con su ligando, el  $\beta$ -NGF. No se observaron diferencias de distribución entre los CUs y/o estadios fisiológicos (Fig. 48).

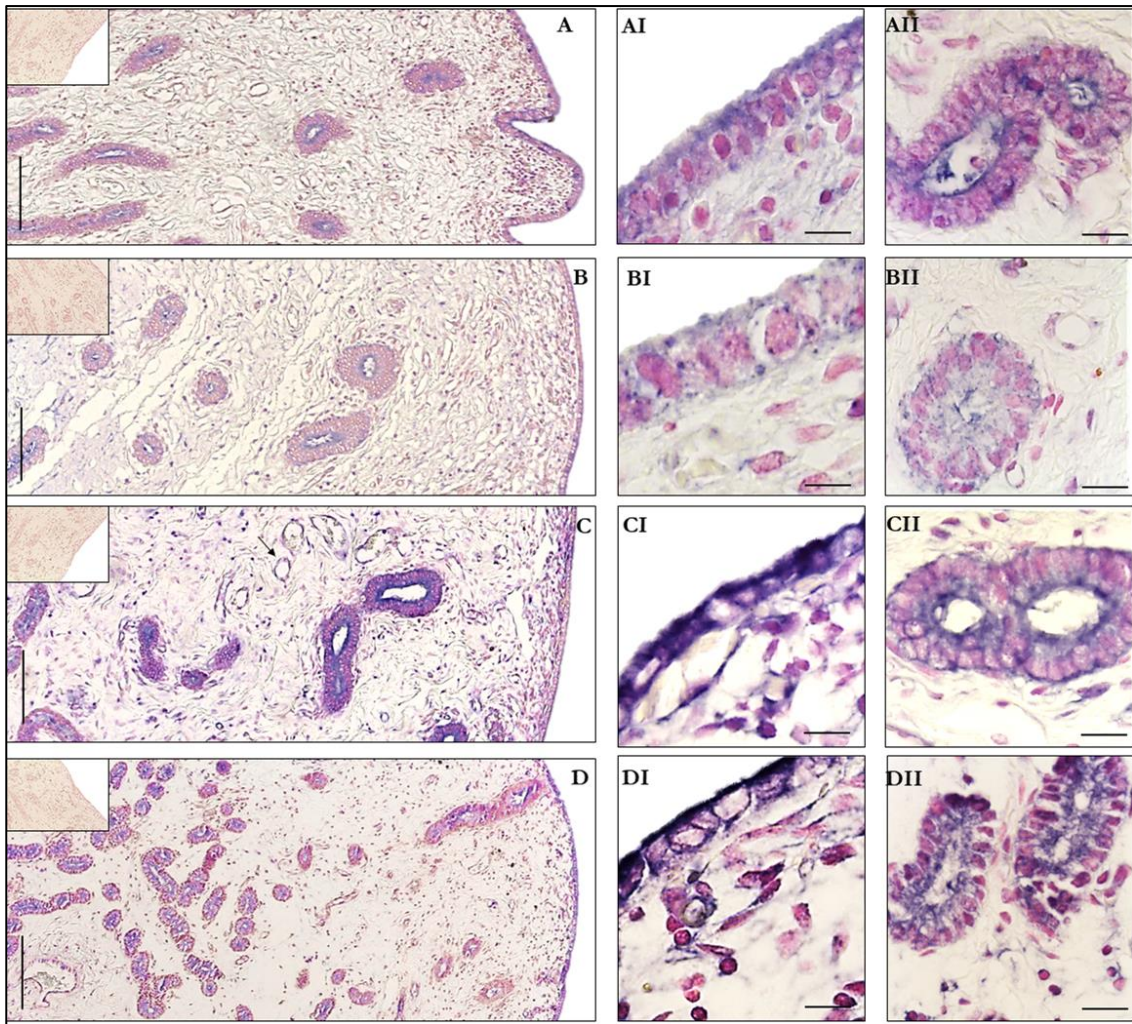
En cuanto al área ocupada por la señal de TrKA (Fig. 49), en alpacas NP, fue mayor en el CUI-NP, tanto a nivel del EL (1,87 veces); como del EG (1,23 veces). Durante la preñez, se determinaron diferencias a nivel del EL, siendo el marcaje 1,97 más alto en el CUI-P.

En los estadios fisiológicos, se determinaron diferencias solamente en el EL del CUI, incrementándose 1,31 veces en CUI-P en comparación con CUI-NP. En cambio, en el EG la presencia de TrKA se incrementó en ambos CUs, en CUI-P 1,14 veces y en CUD-P 1,46 veces en comparación con CUI-NP y CUD-NP, respectivamente.

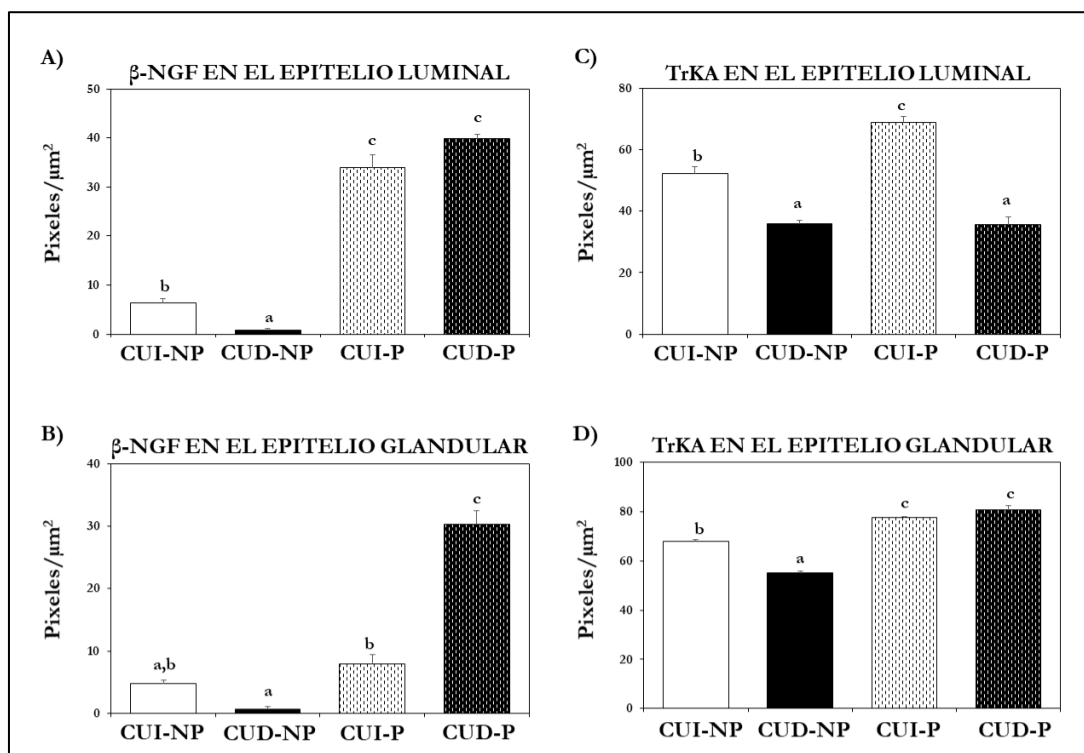


**Figura 47. Localización inmunohistoquímica del factor de crecimiento nervioso  $\beta$  ( $\beta$ -NGF) en la mucosa endometrial de alpacas.** El marcaje positivo da una coloración azul-violácea.  $\beta$ -NGF en sección endometrial de **alpacas no preñadas:** **A)** Cuerno uterino izquierdo (CUI) 10X (barra= 200  $\mu$ m), **AI)** Epitelio luminal, 100X (barra= 10  $\mu$ m), **AII)** Epitelio glandular, 100X (barra = 10  $\mu$ m) y **AIII)** Inserto del control de la reacción. **B)** Cuerno uterino derecho (CUD) 10X (barra= 200  $\mu$ m), **BI)** Epitelio luminal, 100X (barra= 10  $\mu$ m), **BII)** Epitelio glandular, 100X (barra = 10  $\mu$ m) y **BIII)** Inserto del control de la reacción.  $\beta$ -NGF en sección endometrial de **alpacas preñadas:** **C)** CUI 10X (barra= 200  $\mu$ m), **CI)** Epitelio luminal, 100X (barra= 10  $\mu$ m), **CII)** Epitelio glandular, 100X (barra = 10  $\mu$ m) y **CIII)** Inserto del control de la reacción. **D)** CUD 10X (barra= 200  $\mu$ m), **DI)** Epitelio luminal, 100X (barra= 10  $\mu$ m), **DII)** Epitelio glandular, 100X (barra = 10  $\mu$ m) y **DIII)** Inserto del control de la reacción.





**Figura 48. Localización inmunohistoquímica del receptor tirosina quinasa A (TrKA) en la mucosa endometrial de alpacas.** El marcaje positivo da una coloración azul-violácea. TrKA en sección endometrial de **alpacas no preñadas**: **A)** Cuerno uterino izquierdo (CUI) 10X (barra= 200 µm), **AI)** Epitelio luminal, 100X (barra= 10 µm), **AII)** Epitelio glandular, 100X (barra = 10 µm). **B)** Cuerno uterino derecho (CUD) 10X (barra= 200 µm), **BI)** E epitelio luminal, 100X (barra= 10 µm), **BII)** Epitelio glandular, 100X (barra = 10 µm). TrKA en sección endometrial de **alpacas preñadas**: **C)** CUI 10X (barra= 200 µm), **CI)** Epitelio luminal, 100X (barra= 10 µm), **CII)** Epitelio glandular, 100X (barra = 10 µm). **D)** CUD 10X (barra= 200 µm), **DI)** Epitelio luminal, 100X (barra= 10 µm), **DII)** Epitelio glandular, 100X (barra = 10 µm). Los insertos corresponden a los controles negativos sin el anticuerpo primario.



**Figura 49. Histogramas de la localización del factor de crecimiento nervioso  $\beta$  ( $\beta$ -NGF) y de su receptor la tirosina quinasa A (TrKA).** El área positiva de la marca se expresó en píxeles/ $\mu\text{m}^2$ , en el endometrio del cuerno uterino izquierdo y derecho de alpacas no preñadas (CUI-NP y CUD-NP) y alpacas preñadas (CUI-P y CUD-P): **A)**  $\beta$ -NGF en el epitelio luminal, **B)**  $\beta$ -NGF en el epitelio glandular, **C)** TrKA en el epitelio luminal y **D)** TrKA en el epitelio glandular. Los datos se analizaron con el software InfoStat y se utilizó el test de ANOVA de una vía y el post-test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), los datos representan el promedio de los datos  $\pm$  EE,  $n = 3$ .

### IIIc- Conclusiones parciales

1) Se detectó la presencia de los transcritos del factor de crecimiento vascular A (VEGFA) y el factor de crecimiento nervioso  $\beta$  ( $\beta$ -NGF) junto con su receptor la tirosina quinasa A (TrKA), en el endometrio de alpacas no preñadas y alpacas preñadas de 15 días.

2) La expresión de VEGFA, en alpacas no preñadas fue mayor en el CUD en comparación con CUI. En alpacas preñadas la expresión de VEGFA no mostró diferencias entre CUs; sin embargo, se observó que en la preñez la expresión disminuye en el CUD respecto al CUD-NP.

3) La expresión génica de  $\beta$ -NGF y su receptor TrKA fue mayor en el CUD en comparación con CUI en alpacas no preñadas. En la preñez no se determinaron diferencias entre CUs; sin embargo, se determinó una disminución significativa en ambos cuernos en comparación con las alpacas no preñadas.

4) A nivel de expresión proteica, tanto  $\beta$ -NGF como su receptor TrKA están presentes en la mucosa endometrial de alpacas, co-localizando en el epitelio luminal, el epitelio glandular y el endotelio. Se observaron diferencias entre los CUs.

- a) Existe expresión diferencial de  $\beta$ -NGF y TrKA entre cuernos de hembras NP, siendo mayor en el CUI a nivel del EL y el EG.
- b)  $\beta$ -NGF y TrKA se incrementan en la preñez temprana, exhibiendo además diferencia entre cuernos. Específicamente, la señal de TrKA es mayor en EL del CUI-P, pudiendo indicar que existe una regulación paracrina durante la preñez temprana, quizás asociada a la implantación diferencial en el CUI.



# Discusión



Una de las principales limitantes para el desarrollo de emprendimientos productivos en CSA, es la tasa de preñez baja, con una mortalidad embrionaria que puede ser mayor al 50% dentro de los primeros 35 días de gestación (Brown, 2000; Tibary y col., 2006). Entre los factores que pueden influenciar estos altos porcentajes de pérdidas embrionarias se encuentra el hecho que más del 98% de los embriones se implantan sólo en el CUI (Vaughan y Tibary, 2006). Esto significa que, a fin de poder implantarse, los blastocitos producidos en el oviducto derecho deberían migrar hacia el CUI. Asimismo, el endometrio receptivo del CUI debe reconocer al blastocisto y, a diferencia del CUD, favorecer la implantación; posiblemente en respuesta a un diálogo materno-embionario preciso (Vaughan y Tibary, 2006). Las moléculas y mecanismos que facultan la implantación en el CUI son desconocidas aún en esta especie.

En este trabajo de tesis se identificaron rasgos del endometrio de CSA en estado receptivo, determinando qué genes se están expresando y cuales dejan de hacerlo en el CUD y el CUI de alpacas. Los estudios se centraron en genes relacionados con la remodelación de la MEC de la mucosa uterina durante la implantación, comparando hembras NP y P. En este trabajo demostramos por primera vez que los genes MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP1, TIMP2, LGMN, EMMPRIN, MUC1, MUC16, COL1A2 y COL3A1 se expresan en el útero de alpaca y describimos además su grado de expresión bajo dos condiciones fisiológicas (P y NP).

Se determinaron cambios en la superficie uterina de alpacas durante el período pre-implantacional, tanto a nivel ultraestructural como histoquímico. Estas modificaciones incluyeron la presencia de estructuras consideradas marcadores estructurales de la ventana de implantación embrionaria en mamíferos (Giudice, 1999; Makker y Singh, 2006; Murphy, 2000), como la aparición de uterodomas, la desaparición de las células ciliadas y el aplanamiento de las microvellosidades (Nikas, 1999). A nivel histoquímico, también observamos cambios que pueden favorecer la implantación en el CUI, ya que se detectó una notable reducción en la presencia de mucinas ácidas en el glicocáliz de alpacas P, no así de mucinas neutras. Este cambio en el perfil de glicosilación durante la preñez temprana en alpacas es un evento considerado necesario para facilitar la unión inicial del trofotodermo al EL en mamíferos (Jones y Aplin, 2009; Clark, 2015). Si la modificación normal del glicocáliz materno en preparación para la implantación no se produce, la complementariedad entre el glico-código materno y el fetal no acontece, resultando en fallas en la implantación (Fouladi-Nashta y col., 2005).

En humanos se ha descrito la relación entre algunos cambios moleculares y modificaciones ultraestructurales que ocurren durante la ventana de implantación, así pues, la presencia de células ciliadas se asociaría con la presencia MUC1 en la superficie endometrial (Horne y col., 2002) y la aparición de uterodomas ha sido asociada con desaparición de la MUC16 (Gipson y col., 2008). En coincidencia, observamos que en la alpaca la disminución de células ciliadas y presencia de uterodomas, coinciden con la disminución de la expresión del ARNm de MUC1 y MUC16 durante la preñez temprana. Además, la disminución de MUC1 y MUC16, estaría en concordancia con la disminución de la presencia de mucinas ácidas observada histoquímicamente.

En todas las especies de mamíferos estudiadas hasta la fecha, se describe que la unión del concepto requiere primero la pérdida de moléculas anti-adhesivas en el glicocáliz del EL (Bazer y Johnson, 2014). La expresión de MUC1 está controlada por la P<sub>4</sub> y el estrógeno. Por ejemplo, en oveja, MUC1 del EL disminuye durante la elongación del concepto, entre los días 9 y 17 de preñez. El aumento de los niveles de P<sub>4</sub> y la pérdida del RP<sub>4</sub> en el endometrio, durante esta etapa llevaría a la regulación negativa de ciertos genes como MUC1 (Spencer y col., 2004). En cerdas, de placentación epiteliocorial como la alpaca, la P<sub>4</sub> también disminuye la expresión de MUC1 (Bowen y col., 1997). A su vez, Ren y col. (2010) describieron que la expresión de MUC1 en EL varía durante la implantación, siendo menor en los sitios de acoplamiento del embrión porcino. De manera similar, la expresión de MUC1 en el endometrio de alpacas podría estar regulada por los niveles de P<sub>4</sub>, los que se observaron aumentados a los 15 días de preñez en comparación con las hembras NP. El comportamiento del RP<sub>4</sub> en esta etapa sería también similar a lo descrito en otras especies; Bianchi y col. (2015), observaron que la población de RP<sub>4</sub> del EL disminuye hacia el día 12 de la preñez en las llamas, aunque los autores no especifican si existen diferencias entre CUs. Estudios realizados en dromedarios con 78 a 83 días de preñez señalan una menor expresión del RP<sub>4</sub> en el CUI respecto al CUD, y que su expresión esta correlacionada espacialmente con la expresión de MUC1 en el estroma endometrial (Al-Ramadan y col., 2013.)

Con respecto a la MUC16, su expresión disminuye durante la fase lútea en el endometrio bovino (Bauersachs y col., 2008) y durante la fase receptiva en el endometrio humano donde es eliminada de la superficie del EL durante la formación de uterodomas (Gipson y col., 2008). La regulación de MUC16 también dependería entonces de la P<sub>4</sub> (Morgado y col., 2012). Podría pensarse entonces que en la alpaca también existe una regulación común de MUC16 y MUC1 que provoca su disminución, dependiente de P<sub>4</sub>, en la preñez temprana.

Además de estar reguladas a nivel de expresión génica, también se ha descrito una regulación proteolítica de las mucinas presentes en el glicocáliz del EL. Serino-proteasas y MMPs intervienen en este proceso en humanos, ratones y conejos, donde MUC1 se reduce localmente en el sitio de invasión del trofoblasto, probablemente, debido a los factores liberados por el mismo que actúan directamente o de forma paracrina para desencadenar la pérdida de MUC1 por regulación negativa de su expresión y/o remoción proteolítica (Aplin, 2006; Olson y col., 1998). Entre las MMPs, MMP-14 es capaz de escindir el ectodominio de MUC1 de la superficie celular en humanos, y la sobreexpresión o deficiencia de esta proteasa causa un aumento o inhibición de la remoción de las mucinas, respectivamente (Thathiah y Carson, 2004; Hattrup y Gendler, 2008). En el endometrio de alpacas, observamos que en las hembras NP hay diferencias entre CUs, en los niveles de expresión de MMP-14; mientras que durante la preñez estas diferencias desaparecen, indicando que la expresión de MMP-14 estaría regulada en esta etapa. Quizás, la regulación de la expresión de MMP-14 relacionada con la remoción de las MUCs sea específica a nivel del EL. Además de la remoción de las MUCs a nivel del EL, MMP-14 está implicada en la activación de la proMMP-2, concentra su actividad proteolítica en la superficie celular, y además contribuye a mantener altos niveles de MMP-9, permitiendo una degradación precisa de la MEC (Cauwe y col., 2007).

Uno de los principales cambios que sufre el endometrio para dar lugar a una gestación exitosa, es la remodelación de la MEC, la cual involucra una extensa y controlada regeneración y degradación de sus componentes, esta última mediada principalmente, por las MMPs, como MMP-2 y MMP-9. Asimismo, la actividad de estas dos MMPs está regulada por el balance de sus inhibidores (TIMP1 y TIMP2), sus activadores (LGMN y MMP-14) e inductores (EMMPRIN) (Kizaki y col., 2008). Debido a las diferencias que existen entre la placentación de primates y roedores (hemocorial) respecto a la de los ruminantes (epiteliocorial), por mucho tiempo se especuló que el mecanismo de remodelación del tejido endometrial durante la preñez temprana en rumiantes era diferente a la de los humanos y a la mayoría de los primates. Sin embargo, se determinó que, tanto en las especies de implantación invasiva como en los rumiantes, existe una remodelación activa de la MEC en la que intervienen las MMPs (Salamonsen y col., 1999; Kizaki y col., 2008; Bazer, 2013). De hecho, se ha demostrado que las células endometriales bovinas, ovinas y porcinas secretan MMP-2 y MMP-9 (Menino y col., 1997; Roy y Ghosh, 2010). Si bien la evidencia indica que ambas, MMP-2 y MMP-9, son críticas para la implantación, se han descrito variaciones temporales y locales en la expresión de una o de otra durante este proceso, sugiriendo que cumplirán distintas funciones (Curry y Osteen, 2003).

MMP-2 y MMP-9 se expresan en los CUs de alpaca. Interesantemente, la MMP-2 presentó diferencias de expresión entre CUs, siendo mayor en el CUI, patrón que se mantiene durante la preñez. En bovinos, MMP-2 sería clave para mediar la degradación de la MEC del endometrio uterino, desempeñando un papel importante en la reorganización del contacto célula-célula y de esa forma en la remodelación del epitelio y el estroma endometrial durante la preñez temprana (Hashizume, 2007; Kizaki y col., 2008). También, se ha postulado que MMP-2 podría facilitar y regular la liberación de factores de crecimiento, almacenados en la MEC durante la ventana de implantación, implicados en apoyar el desarrollo del concepto (Ulbrich y col., 2011). Por otro lado, los niveles de expresión de MMP-9 fueron mayores en CUD de alpacas NP en comparación con CUI, y mientras que durante la preñez la expresión de MMP-9 disminuyó en el CUD. La regulación de la expresión de MMP-9 durante el periodo pre-implantacional en alpacas, podría deberse a su rol en una gestación más avanzada, como ocurre en roedores, donde la sobre-expresión del ARNm de MMP-9 se produce en el periodo post-implantacional (Kizaki y col., 2008). Asimismo, la neutralización de MMP-9 con anticuerpos monoclonales disminuye la degradación de la MEC debido a las secreciones del blastocisto murino ya implantado (Kizaki y col., 2008).

Considerando que, en los CSA el CUI es el sitio donde la implantación tiene mayores probabilidades de éxito, la mayor expresión de MMP-2 en el CUI además de indicar diferencias intrínsecas entre ambos CUs, sería un indicio de que dicha metaloproteasa interviene de alguna manera en el proceso de implantación diferencial en el CUI. Esta hipótesis debe ser explorada, a fin de poder asignarle a la MMP-2 un rol definitivo en este proceso.

Además, de la expresión génica de MMP-2 y MMP-9 en el endometrio, este trabajo describe por primera vez la actividad de MMPs en el FU de alpacas. Se observó que la MMP-2 se encuentra en su forma activa y en mayor proporción MMP-9, la cual está presente como zimógeno (proMMP-9). Estos resultados coinciden con lo descrito en ovinos y bovinos, donde MMP-2 y MMP-9 están presentes en la secreción endometrial durante el periodo pre-implantacional, también presentando las diferencias observadas en alpacas (Salamonsen y col., 1999; Roy y Ghosh, 2010). Por otra parte, en alpacas proMMP-9 disminuye marcadamente durante la preñez temprana, en coincidencia con lo observado respecto a su expresión génica en CUD. La composición del FU refleja aspectos adicionales de la función endometrial, así como el diálogo que se produce antes de la implantación embrionaria (Van der Gaast y col., 2008). El hecho de que MMP-2 se encuentre en su forma

activa y en mayor proporción que la proMMP-9, podría evidenciar un rol diferencial entre estas dos MMPs durante el período de RMP en alpacas.

La actividad de las MMPs se regula mediante un equilibrio adecuado con sus inhibidores, los TIMPs (Roy y Ghosh, 2010). En bovinos, ovinos y porcinos los niveles de expresión de TIMP1 y TIMP2, están elevados en el endometrio durante el periodo pre-implantacional, en comparación con hembras no gestantes, ya que éstos limitan la invasión del concepto en estas especies de implantación no invasiva, por inhibición de la acción de las MMPs sintetizadas por el concepto (Ledgard y col., 2009; Ka y col., 2012). En bovinos se describe una marcada disminución de la proteína TIMP2 durante la preñez temprana, tanto en el endometrio como en el FU, mientras que TIMP1 se observa incrementado (Ledgard y col., 2009; Roy y Ghosh, 2010). En el caso de la alpaca, los niveles de expresión génica de TIMP2 disminuyeron durante la preñez temprana, en coincidencia con lo observado en bovinos a nivel de expresión proteica (Ledgard y col., 2009).

Resulta interesante destacar, que al igual que lo observado para MMP-2, existen marcadas diferencias en los niveles de expresión de TIMP2 entre CUs, siendo menor en el CUI. Por lo tanto, CUI posee diferencialmente mayores niveles de expresión de MMP-2 y menores niveles de su inhibidor TIMP2. Además, al comparar la relación MMP-2/TIMP2, ésta se incrementó en el CUI-P respecto al CUI-NP, indicando una posible regulación positiva de la MMP-2 durante la preñez temprana por disminución de la expresión de su inhibidor específico. En coincidencia con lo observado en el CUI de alpaca, en bovinos durante el periodo pre-implantacional, el patrón de expresión temporal de TIMP2 aparece inversamente relacionado con la expresión de MMP-2 (Ulbrich y col., 2011). Estos resultados podrían indicar que durante el periodo pre-implantacional en alpacas, es necesario mantener elevados los niveles de MMP-2 en el CUI-P, a fin que la remodelación de la MEC pueda asegurar una implantación exitosa.

En bovinos y en porcinos LGMN, un activador de MMPs, es considerado como un gen importante durante el período pre-implantacional y más aún se ha propuesto que puede desempeñar un papel en la regulación de la remodelación de MEC como activador de MMP-2 (Bauersachs y col., 2008; Ledgard y col., 2009; Song y col., 2010; Shim y col., 2013). En la alpaca se observa que LGMN se expresa tanto en cuernos NP, como en cuernos P. Llamativamente, se observa que la expresión de LGMN en el CUD-NP es elevada; mientras, la misma disminuye en la preñez, de manera similar a lo se observó para el activador de MMP-2, la MMP-14. Este tipo de regulación llevaría a reducir la diferencia entre CUs,

respecto a los activadores de MMPs, lo que sugeriría que la función de las MMPs en el CUI no estaría regulada principalmente por los activadores de MMPs descritos, sino, como se planteó anteriormente, por la acción de los inhibidores, TIMPs.

En el caso de EMMPRIN, inductor de la expresión de MMPs, es importante destacar que, a pesar que no hay diferencias entre CUs en la preñez, se observó un marcado incremento en el CUI-P respecto al CUI-NP. Como sucede en el caso de MMP-9, TIMP1, LGMN y MMP-14, los niveles de expresión de EMMPRIN tienden a igualarse en ambos CUs durante la preñez temprana, probablemente debido a la acción de la P<sub>4</sub>. Sin embargo, a diferencia de éstos, la regulación de EMMPRIN sería para incrementar la expresión MMPs. En bovinos la expresión de EMMPRIN es estimulada directamente por la P<sub>4</sub> (Chen y col., 2009), y sus niveles de expresión se incrementan en la preñez estimulando la expresión de MMP-2 y MMP-14 en el estroma del endometrio, provocando la remodelación endometrial y el establecimiento de la preñez en esta especie (Mishra y col., 2010; Mishra y col., 2012). En roedores, la expresión de EMMPRIN está elevada regionalmente en el sitio de aposición embrionaria, y los ratones knockout que carecen del gen EMMPRIN muestran tasas de implantación gravemente comprometidas (Singh y Aplin, 2009). Si bien, el mecanismo de inducción de las MMPs a través de EMMPRIN es altamente complejo y no se ha sido dilucidado claramente. Estudios recientes sobre metástasis tumoral han sugerido que EMMPRIN puede regular a las MMPs a través de la interacción célula-célula, interacción que depende del equilibrio de la producción de MMP y la regulación por parte de MMP-14, TIMP2 y EMMPRIN o de forma paracrina (Kizaki y col., 2008; Mishra y col., 2012).

La variación dinámica temporal de tipo específica del colágeno uterino durante la implantación del embrión es otro factor importante relacionado a las modificaciones de la MEC y a las MMPs (Diao y col., 2011). En porcinos y en bovinos, de placentación epiteliocorial, la expresión de los componentes de la MEC, como el COLI y COLIII, disminuyen alrededor del inicio de la implantación tanto espacial como temporalmente (Kizaki y col., 2008; Sanchis y col., 2011). En ratas, de placentación invasiva (hemocorial), también se observa una reducción espacio temporal de COLI y COLIII en los sitios de implantación en comparación con los sitios de no implantación en el útero, principalmente porque desaparecen progresivamente de las zonas deciduales primarias y secundarias (Diao y col., 2011). En ratones *Lpar3*<sup>-/-</sup> (*Lpar3* está sobre expresada en el útero pre-implantacional, y la eliminación de *Lpar3* conduce a la receptividad uterina retrasada) se ha asociado al retraso de la eliminación del COL I y COL III, con la sobre expresión de COL1A2 y COL3A1. Esta alteración de los niveles de colágeno fue acompañada con la disminución de MMPs en el

útero de ratones (*Lpar3*<sup>-/-</sup>) (Diao y col., 2011). Por lo que, en condiciones de receptividad uterina normales, se esperaría que la disminución de la expresión de COL1A2 y COL3A1 acompañe a la eliminación de COL I y COL III en la MEC de la mucosa uterina. En alpacas observamos que el contenido de colágeno durante la preñez temprana no muestra diferencias entre CUs, tanto a nivel de expresión génica (COL1A2 y COL3A1) como proteica (COL I y COL III). Sin embargo, al igual que en el caso de los genes antes mencionados, se determinó una disminución marcada del colágeno endometrial en el CUD-P en comparación con CUD-NP. Se ha descrito que niveles anormalmente elevados de colágeno podrían afectar la función uterina, posiblemente interfiriendo con la vascularización o retrasando los eventos de remodelación en el momento de la implantación (Diao y col., 2011). Los resultados sugieren que existiría una regulación tendiente a igualar los niveles de colágeno en ambos CUs durante la preñez temprana en alpacas.

Las MMPs también participan en la liberación y activación de una gran variedad de factores de crecimiento, permitiéndoles así unirse a sus receptores específicos y desencadenar su acción (Monteiro y col., 2018). Por ello, resultó de interés estudiar algunos de estos factores de crecimiento relacionados al sistema de MMPs. Así pues, se realizó por primera vez la determinación en CUs de alpacas de VEGFA y  $\beta$ -NGF.

El VEGFA, es un factor fundamental para la angiogénesis y la permeabilidad vascular durante el proceso de implantación y el desarrollo placentario temprano (Welter y col., 2003; Trolice y Amyradakis, 2008). En alpaca observamos que la expresión génica de VEGFA presenta diferencias entre CUs en hembras no preñadas. Mientras que la expresión de VEGFA presentó una disminución en el CUD-P en comparación con CUD-NP. Esta reducción equilibraría las diferencias que presentaba la expresión de VEGFA en hembras NP, de modo que ambos CUs presentarían iguales condiciones en procesos fisiológicos como la hiper-permeabilidad vascular que ocurre durante la angiogénesis. La angiogénesis es un proceso descrito tanto en el endometrio humano como en el de cerdos durante el período de implantación y el mismo es regulado por  $P_4$  (Sugino y col., 2002; Welter y col., 2003). Tanto en alpacas P como NP, también se determinó la microrquitectura vascular del endometrio mediante el % de VC en ambos CUs. La remodelación que sufre la vasculatura uterina, se correlacionó con el patrón de expresión de VEGFA, evidenciando una regulación durante la preñez temprana que da lugar a la igualación del %VC en CUI-P y CUD-P durante la preñez temprana.



Si bien VEGFA es regulado positivamente por  $P_4$  (Spencer y col., 2004), en alpacas, los niveles de expresión de VEGFA no se ven incrementados, sino que se igualan durante la preñez temprana en ambos CUs. Este efecto quizás se deba a la presencia de  $RP_4$ , que en llamas y ovejas está disminuido durante la preñez temprana (Spencer y col., 2004; Bianchi y col., 2015). Por otro lado, VEGFA estimula la expresión génica y la secreción de MMP-9, mediante una retroalimentación positiva entre MMP-9 y VEGFA (Hollborn col., 2007). En alpacas la expresión en los CUs de MMP-9 como la de VEGFA son concomitantes, tanto para en hembras P y como NP. Ambos resultados podrían indicar que en la etapa pre-implantacional de la preñez las señales de vascularización y remodelación mediadas por estos genes no serían sustanciales.

Las MMPs también influyen sobre la disponibilidad del factor de crecimiento  $\beta$ -NGF (Chattopadhyay y col., 2007; Saygili y col., 2011; Kao y col., 2015; Kucharczyk y col., 2016), factor importante en la fisiología reproductiva de CSA y en la preñez en mamíferos (Tommetten y col., 2005; Silva y col., 2014; Sari y col., 2018). En alpacas se determinó por primera vez tanto la expresión génica como la localización del producto proteico de  $\beta$ -NGF y TrKA en los CUs de alpacas NP y alpacas P.  $\beta$ -NGF y TrKA co-localizan en EL, EG y en el endotelio de los CUs de alpacas P y NP, en coincidencia con lo observado en roedores (ardilla y hámster) y cabras (Li y col., 2012; Ren y col., 2005). La marca de  $\beta$ -NGF y TrKA se incrementó marcadamente en ambos CUs durante la preñez temprana, tanto en EL como en EG, quizás en respuesta al estímulo paracrino de la  $P_4$ , la cual regula la expresión de estos genes (Li y col., 2011). Teniendo en cuenta que la degradación del  $\beta$ -NGF en péptidos biológicamente inactivos estaría mediada por MMP-9 (Li y col., 2015) y que MMP-2 además es capaz de mediar la activación de pro $\beta$ -NGF a  $\beta$ -NGF (Saygili y col., 2011). En alpacas NP, los niveles elevados de ARNm de MMP-9 en CUD-NP coinciden con los bajos niveles de  $\beta$ -NGF en EL de ese cuerno. Mientras, que durante la preñez temprana los niveles bajos ARNm de MMP-9 coinciden con la mayor marca  $\beta$ -NGF. Por otro lado, resulta interesante destacar que en EL, la señal de TrKA se incrementó sólo en CUI-P. Esta respuesta diferencial en el CUI-P de alpacas, sugeriría a una mayor capacidad de respuesta a la señalización de  $\beta$ -NGF en este cuerno. Asimismo, la expresión génica del activador de  $\beta$ -NGF, la MMP-2, también esta elevada en este cuerno. Podría sugerirse entonces un posible rol de MMP-2 en la biodisponibilidad de  $\beta$ -NGF en el CUI-P de alpaca.

Trabajos que analizan los perfiles de expresión de  $\beta$ -NGF y sus receptores en la interfaz materno-fetal, señalan un papel fundamental de esta vía en el establecimiento de un sistema inmune endocrino equilibrado durante la gestación (Frank y col., 2014). Por lo que,

la acción de  $\beta$ -NGF en los CUs de alpacas P, de algún modo sería clave durante el periodo de RMP; aunque para determinar los procesos en los que está implicada esta vía de señalización aún deben realizarse más estudios.

La preñez es un proceso complejo de eventos progresivos e interrelacionados entre sí. Los mecanismos moleculares de dichas etapas están conservados entre las especies, inclusive en aquellos con diferentes tipos de placentación; sin embargo, hay algunos mecanismos que son especie-específicos.

Las particularidades reproductivas de los camélidos, y especialmente las relacionadas a la preñez temprana, son únicas en el reino animal. Más aún, el fenómeno de implantación en el CUI de los CSA constituye un modelo biológico exquisito para estudiar procesos críticos relacionados con la receptividad uterina e implantación embrionaria. En este trabajo de tesis doctoral, se describe por primera vez procesos moleculares que ocurren durante el periodo de reconocimiento materno de la preñez en alpacas, evidenciándose mecanismos propios y otros conservados.

*En general, nuestros resultados permiten afirmar que los CUs de alpacas presentan modificaciones ultraestructurales, histoquímicas y de expresión génica. En particular, los patrones de expresión de los genes estudiados parecerían indicar, que parte de la regulación durante la etapa pre-implantacional estaría basada más en una regulación negativa de la expresión de ciertos genes, mayormente a nivel del CUD, a fin de unificar las diferencias de expresión entre CUs observables en hembras no preñadas. Esto puede comprobarse para el caso de MUC1, MMP-9, MMP-14, LGMN, TIMP-1, COL1A2, COL3A1 y VEGFA. En el caso del CUI, como se mencionó anteriormente, los cambios observados en la preñez se orientarían a favorecer mayores niveles de actividad de MMP-2, demostrado por los elevados niveles de expresión de la propia MMP-2 y los menores niveles de expresión de su inhibidor específico TIMP2. Estos resultados señalan la importancia del sistema MMP-2/TIMP2 en la etapa pre-implantacional, donde podría actuar facultando la implantación exitosa del embrión en el CUI.*

*La contribución al conocimiento del ambiente uterino en CSA y las moléculas sintetizadas por él durante la preñez temprana permitirá avanzar en la comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso reproductor, contribuir al diagnóstico de la preñez y al desarrollo de protocolos y técnicas de reproducción*

*asistida que contemplen las particularidades fisiológicas de estas especies. Asimismo, este conocimiento podría ser extrapolado a otras especies de mamífero.*

# Conclusiones



## Conclusiones

Los resultados de esta tesis indicarían que:

### **1. El endometrio de alpacas se modifica en respuesta a la preñez temprana, en la etapa pre-implanacional de la misma. Esto se demuestra por lo siguiente:**

- Se evidencian rasgos característicos de un estadio de receptividad uterina en ambos CUs, con la presencia de úterodornos, la disminución o desaparición de las células ciliadas, el acortamiento de las microvellosidades y la disminución de la expresión de mucopolisacáridos ácidos acompañada con la disminución de la expresión génica de las mucinas (MUC1 y MUC16).

- La expresión y contenido de colágeno de la MEC del tejido uterino de alpacas disminuye significativamente en el CUD, como se demostró por la menor expresión de COL1A2 y COL3A1 y el menor contenido de colágeno COLI y COLIII.

- La microarquitectura vascular, así como la expresión del factor angiogénico VEGFA se encuentra regulada durante la preñez temprana, igualándose en ambos CUs mediante la disminución en el CUD-P respecto al CUD-NP.

- La presencia de  $\beta$ -NGF y su receptor TrKA se incrementa marcadamente en los CUs durante la preñez temprana, donde diferencialmente CUI-P presenta un mayor contenido de TrKA en comparación con CUD-P en EL, sugiriendo así un posible direccionamiento de la acción de  $\beta$ -NGF en ese cuerno.

- El endometrio de alpacas secreta MMP-2 (activa) y pro-MMP-9 (inactiva) Durante la preñez temprana la secreción de pro-MMP-9 disminuye marcadamente, mientras que los niveles de MMP-2 permanecen elevados en ambos estadios fisiológicos.

- Existen diferencias entre CUs en cuanto a los niveles de expresión de MMP-2, siendo mayor en el CUI. Adicionalmente la relación MMP-2/TIMP2 se incrementa significativamente durante la preñez temprana en el CUI. Estos resultados podrían indicar que durante esta etapa es necesario mantener elevados los niveles de actividad de MMP-2 en forma diferencial en el CUI.

- El sistema de las MMPs se encuentra regulado durante la preñez temprana. Esta regulación se da por equiparación de los niveles de expresión génica en los CUs para MMP-9, MMP-14, TIMP-1, LGMN y EMMPRIN.

### **2. En la hembra no preñada, existen diferencias entre CUs en la expresión de genes del sistema de MMPs:**

- Mientras que MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, LGMN y EMMPRIN se expresan en mayor proporción en el CUD-NP, MMP-2 es el único gen del sistema que se expresa en mayor proporción en el CUI-NP.

*Se postula que la relación del ARNm de MMP-2/TIMP2 podría ser utilizada como un marcador pre-implantacional de la preñez en Camélidos Sudamericanos.*

# Anexos



## I-EL ÚTERO DE MAMÍFEROS

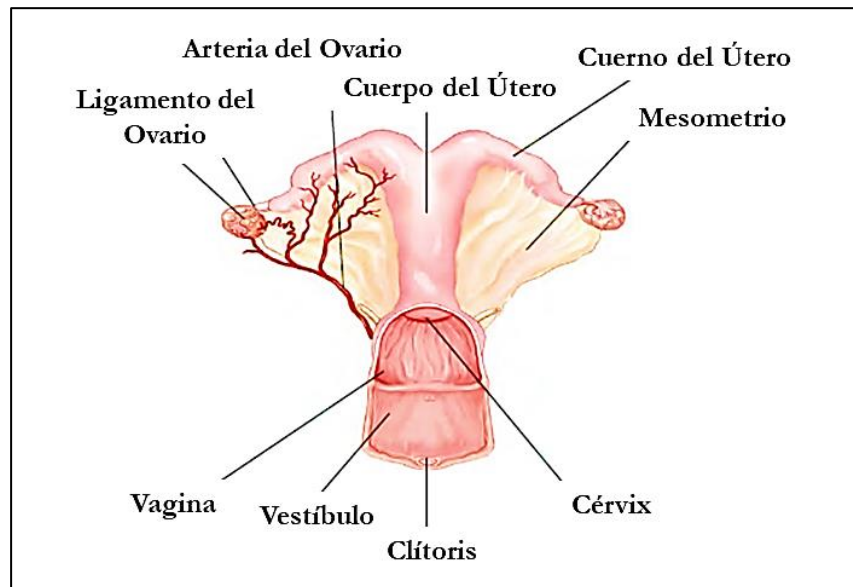
### 1- Anatomía e histología

El útero es un órgano que forma parte del TRF, este conecta los oviductos con el cérvix, además el TRF incluye los ovarios, la vagina y los genitales externos (Fig.50). Los ovarios producen los gametos femeninos y una variedad de hormonas que actúan sobre otras regiones del TRF. Los oviductos proporcionan el entorno óptimo para la fertilización y el desarrollo embrionario pre-implantacional. El útero es el órgano de la preñez, proporciona el entorno para el transporte de espermatozoides, la embriogénesis temprana y el sitio para la unión del concepto con la hembra. El cuello uterino es una barrera que secreta moco durante el estro y produce un tapón cervical durante la preñez. La vagina es el órgano copulatorio y produce una mucosidad lubricante durante el estro (Senger, 2004).

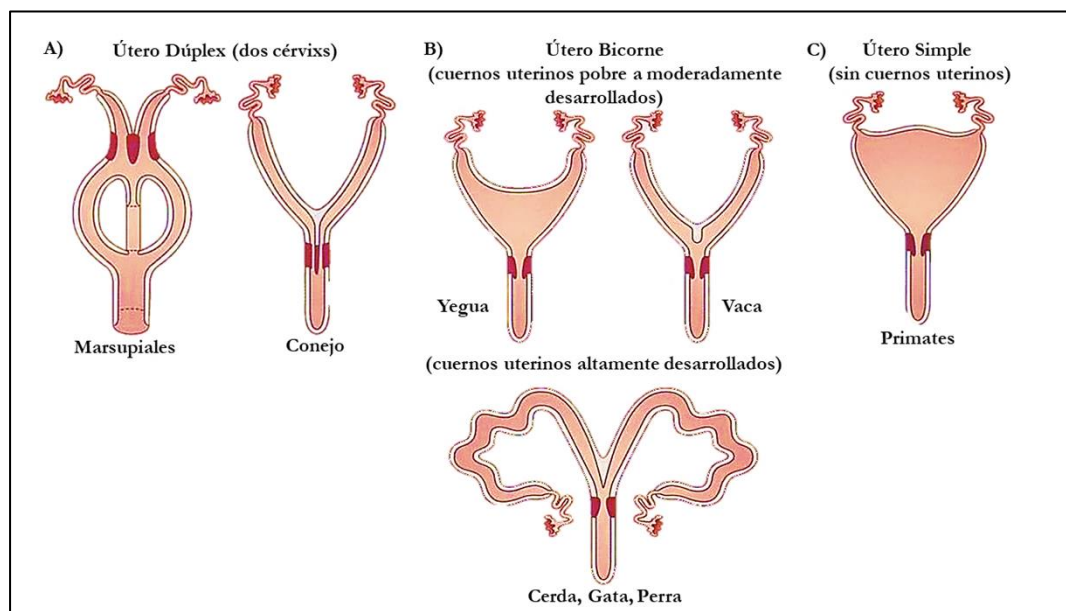
En la mayoría de los mamíferos, el útero consta de dos CUs. El grado en que se desarrollan los cuernos uterinos constituye la base para la clasificación de los úteros de mamíferos en tres tipos anatómicamente distintos (Fig. 51). El primero es un útero dúplex, que se caracteriza por tener dos canales cervicales que separan cada cuerno uterino en distintos compartimentos (Fig. 51A). Hay dos tipos de úteros dúplex. Uno se caracteriza por tener un conducto vaginal único que se abre hacia el exterior. En el interior se bifurca en dos vaginas y dos cuellos uterinos. Los marsupiales tienen este tipo de útero. En el otro tipo de útero dúplex, hay dos cuernos uterinos y dos canales cervicales distintos conectados a un canal vaginal único, este tipo de útero dúplex se encuentra en el conejo. El segundo tipo de útero es el bicorne, que se caracteriza por tener dos cuernos uterinos y un cuerpo uterino pequeño (Fig. 51B). La longitud de los cuernos uterinos depende del grado de fusión entre los conductos paramesonéfricos en el feto femenino en desarrollo. En las especies donde hay un alto grado de fusión (yegua) los cuernos uterinos son cortos y el cuerpo uterino es relativamente largo. Cuando ocurre un grado moderado de fusión, los cuernos uterinos resultan de una longitud intermedia (vaca, cabra y oveja). Y cuando el grado de fusión entre los conductos paramesonéfricos es pequeño, los cuernos uterinos resultantes tienen mayor longitud, es decir, que se encuentran altamente desarrollados (cerda, perra y gata). En todos los tipos de útero bicorne, el útero se abre a la vagina a través de un único canal cervical. En el útero bicorne se puede distinguir una bifurcación uterina interna y externa de los cuernos uterinos. Por último, el tercer tipo de útero es el simple y se caracteriza por tener un único cuerpo uterino (Fig. 51C). Solo se evidencian pequeños rudimentos de una estructura



parecida a un cuerno uterino. La fusión de los conductos paramesonéfricos está casi completa, lo que da como resultado un útero de cámara única, sin cuernos. El útero simple se encuentra en primates, incluidos los humanos (Senger, 2004).



**Figura 50.** Componentes del aparato reproductor femenino de yegua (modificado de Brisco, 2011).



**Figura 51.** Tipos de úteros encontrados en mamíferos. Las áreas rellenas de rojo, representan al cérvix (modificado de Senger, 2004).

## 2- Funciones del útero

Entre las funciones primarias del útero podemos mencionar el **control de la ciclicidad y la luteólisis**.

Después que el animal alcanza la pubertad, el sistema reproductivo se rige precisamente por una intrincada interacción de las hormonas producidas por la pituitaria anterior y las gónadas, esta interacción de las hormonas resulta en la ciclicidad en la hembra. El ciclo estral consiste en la fase folicular y la fase lútea, la primera es el periodo que va desde la regresión del cuerpo lúteo (CL) hasta la ovulación. Un pico de la hormona luteinizante (LH), da lugar a la ovulación, favoreciendo la formación del CL. Luego de la ovulación si el animal no está preñado, las células del endometrio uterino producen prostaglandina (PG), hormona encargada de la luteólisis o regresión del CL (Senger, 2004). Una diferencia distintiva entre los mamíferos inferiores y los primates, en particular los humanos, es que el endometrio del útero en el humano se desprende al exterior. Mientras en animales domésticos los mecanismos por los cuales las glándulas uterinas pueden perderse (o reponerse) siguen sin definirse (Senger, 2004).

Por lo tanto, la ciclicidad de la hembra está determinada entre otros factores por la funcionalidad y duración del CL, el cual produce Progesterona ( $P_4$ ) para el mantenimiento de la gestación. La regulación del CL está mediada por las prostaglandinas de la serie 2 principalmente la  $PGF_{2\alpha}$  y la  $PGE_2$ . El principal factor luteolítico es la  $PGF_{2\alpha}$ , mientras que la  $PGE_2$  estimula y favorece efectos luteotrópicos. Las  $PGF_{2\alpha}$  y  $PGE_2$ , son hormonas claves en la regulación de las funciones reproductivas de la hembra, estas no solo juegan un papel importante en la regulación de la viabilidad del CL, sino también en procesos fisiológicos como la ovulación, RMP, implantación y el parto entre otros (Sanín y col., 2010).

El RMP se refiere al requisito de que el concepto produzca una señal que actúe sobre el útero y/o CL para asegurar el mantenimiento de un CL funcional que produzca  $P_4$  (Bazer, 2013). La señal de RMP en los primates es la gonadotropina coriónica que actúa directamente sobre el CL, a través de los receptores de la hormona luteinizante para asegurar el mantenimiento del CL funcional durante la preñez. En los rumiantes, el IFN- $\tau$  es la señal de reconocimiento de preñez. El IFN- $\tau$  se secreta durante el período pre-implantacional y actúa sobre el epitelio uterino para silenciar la expresión del receptor de estrógeno  $\alpha$  y del receptor de oxitocina que anula la liberación dependiente de oxitocina de los pulsos luteolíticos de la  $PGF_{2\alpha}$  por el epitelio uterino; por lo tanto, el CL del cuerno preñado

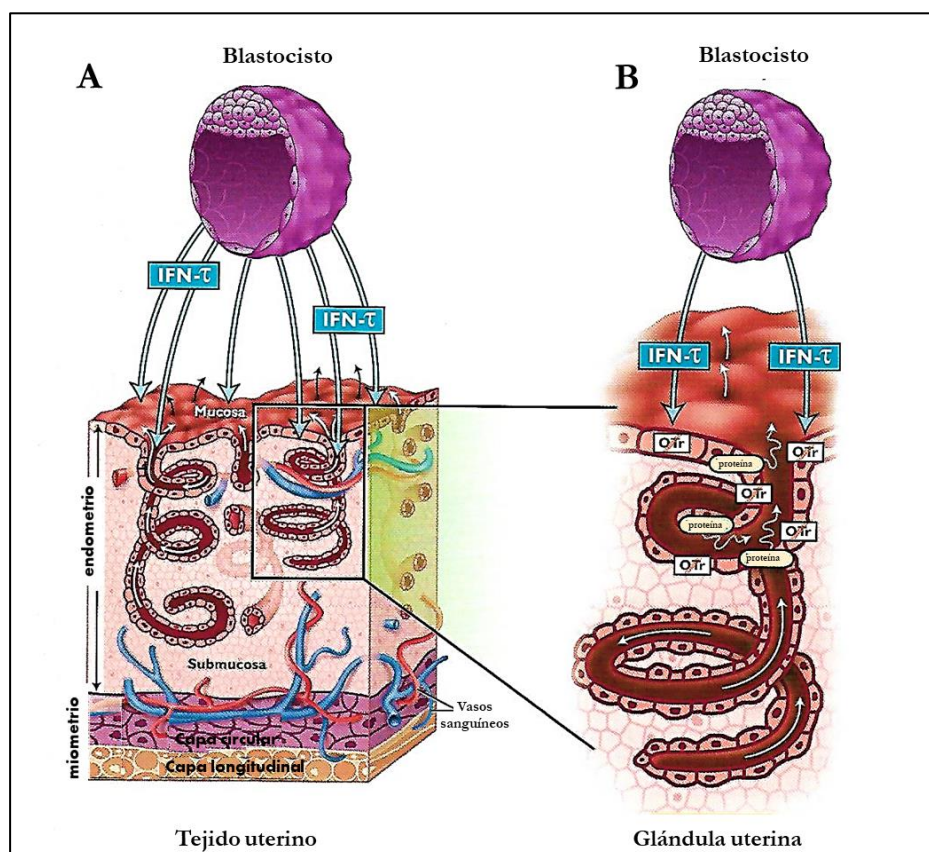
continúa produciendo  $P_4$  requerida para la preñez (Fig. 52). En cerdos, los conceptos secretan interferón delta e interferón  $\gamma$  durante el período pre-implantacional, pero no hay evidencia de que estén involucrados en la señalización del RMP (Bazer, 2013). Por el contrario, los conceptos de cerdo para el RMP secretan cantidades abundantes de estrógenos entre los días 11 a 15 (Fig. 53). El estrógeno, probablemente en compañía de la prolactina, previene la secreción de  $PGF_{2\alpha}$  en el drenaje venoso uterino (secreción endocrina), pero mantiene la secreción de  $PGF_{2\alpha}$  en la luz uterina (secreción exocrina) donde se metaboliza a una forma que no es luteolítica. Como la  $PGF_{2\alpha}$  está secuestrada dentro de la luz uterina y no está disponible para inducir la luteólisis, el CL se mantiene funcional para la producción de progesterona. Además, de la función de la GCH, el IFN- $\tau$  y los estrógenos en el RMP, estas hormonas actúan sobre el epitelio uterino para mejorar la expresión de genes críticos para el crecimiento y el desarrollo del concepto (Bazer, 2013).

Otra de las funciones del útero es el **transporte de espermatozoides**. Siendo el epitelio de la mucosa el responsable de la secreción de diversas sustancias al lumen uterino, es por ende el responsable directo de liberar moléculas que permiten y mejoran la viabilidad de los espermatozoides luego de la inseminación. Por ejemplo, en la perra, las glándulas uterinas pueden servir como un sitio de almacenamiento temporal para los espermatozoides después de la inseminación, si bien se han observado espermatozoides dentro de las glándulas uterinas, no se sabe si estos espermatozoides se almacenan y luego se liberan para lograr la fertilización. Entre las diversas responsabilidades fisiológicas que tiene el miometrio, está la de proporcionar motilidad (una forma de contracción) para el útero. En otras especies, además de la yegua, el miometrio tiene un alto grado de tono (un estado parcial de contracción) cuando el estrógeno es la hormona esteroidea predominante. Un alto grado de tono puede palparse (sentirse) como turgencia o dureza y distinguirse fácilmente de un útero blando o flácido, que se encuentra cuando el estrógeno es bajo y la progesterona es alta. El tono uterino está probablemente relacionado con los mecanismos de transporte del espermatozoides y el material mucoso producido por el útero. Bajo la influencia de la progesterona, el miometrio tiene un bajo grado de tono lo cual es apropiado, ya que es durante este tiempo en hembras preñadas, que se da la entrada del embrión en el útero (Senger, 2004).

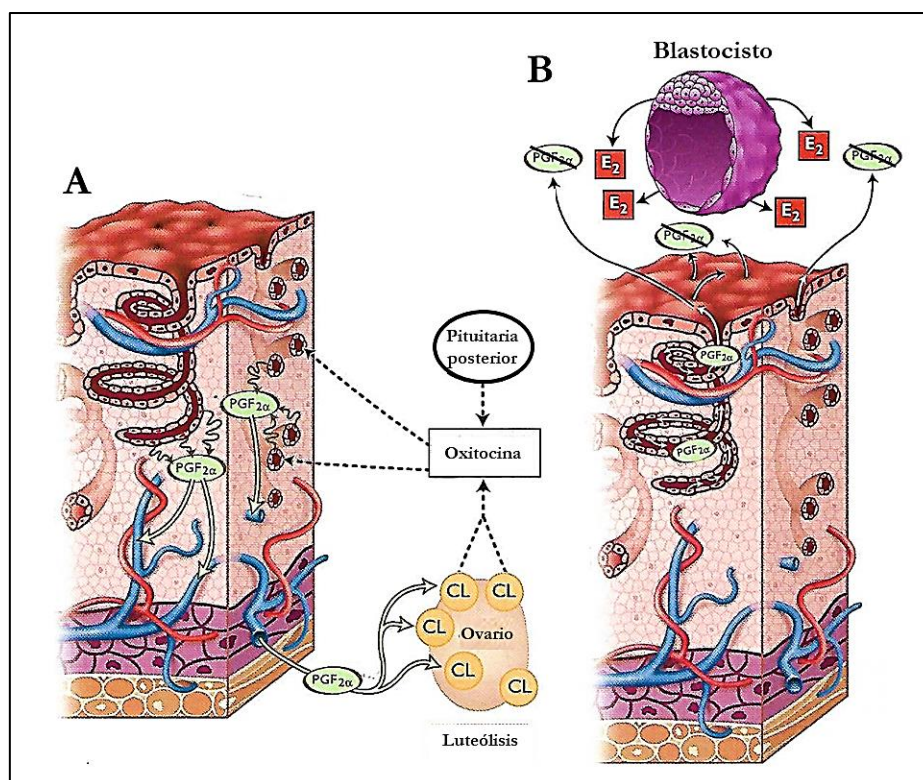
Además, el útero también tiene la función de realizar el **aporte materno a la placenta**. En rumiantes, la superficie del endometrio se caracteriza por tener pequeñas áreas no glandulares que sobresalen de la superficie del endometrio. Estas pequeñas protuberancias se denominan carúnculas. Estas regiones carunculares están muy vascularizadas y darán lugar

a la porción materna de la placenta si se produce la unión del embrión. En contraste con la vaca y la oveja, el endometrio de la cerda y la yegua, así como el de camélidos sudamericanos, no tienen carúnculas. Su endometrio se caracteriza por tener muchos pliegues endometriales. Por último, durante el parto, el miometrio tiene la función de proveer la fuerza impulsora para la **expulsión del feto y la placenta** (Senger, 2004).

Resumiendo, entonces, podemos decir que las funciones esenciales del útero incluyen: (1) la producción de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , que es la luteolisina requerida para la ciclicidad ovárica en animales domésticos; (2) transporte, almacenamiento y maduración de los espermatozoides; (3) la provisión de un ambiente embriotrófico para el crecimiento y desarrollo de embriones/feto y el aporte materno a la placenta; y (4) la expulsión del concepto durante el parto (Spencer, 2005).



**Figura 52. Esquema reconocimiento materno de la preñez en bovinos. A) Tejido Uterino y B) Glándula Uterina.** El  $IFN-\tau$  es producido por las células trofoblásticas del blastocisto (vaca y oveja).  $IFN-\tau$  actúa sobre las células endometriales del útero para inhibir la producción de receptores de oxitocina de modo que la oxitocina no puede estimular la síntesis de  $PGF_{2\alpha}$ . Además,  $IFN-\tau$  causa la producción de proteínas de las glándulas uterinas. Las flechas de las glándulas uterinas indican el movimiento de los productos que se secretan en la luz uterina para nutrir el concepto (modificado de Spencer, 2005).



**Figura 53. Esquema reconocimiento materno de la preñez en cerdos.** En la cerda no preñada **A**), la oxitocina del endometrio, el lóbulo pituitario posterior y el CL promueven la síntesis de  $PGF_{2\alpha}$  por el endometrio uterino. La  $PGF_{2\alpha}$  se difunde por gradiente de concentración hacia los capilares endometriales donde drena a la vena uterina, se transporta al ovario y causa luteólisis. En la cerda gestante **B**), el blastocisto produce estradiol que hace que la  $PGF_{2\alpha}$  sea reencaminada hacia la luz uterina, donde se destruye, evitando así la luteólisis. Al igual que en la vaca, la oxitocina también es producida por el CL y el lóbulo pituitario posterior en la cerda gestante (modificado de Spencer, 2005).

## Fluido uterino

En el endometrio tanto EL cómo EG secretan diversas moléculas al lumen uterino, estas secreciones forman lo que se denomina el fluido uterino (FU) (Forde y col., 2013). Básicamente el FU se compone de: (i) proteínas que se originan de la transudación de suero; (ii) productos de filtración de células epiteliales apoptóticas; y (iii) proteínas secretadas del epitelio (Van der Gaast y col., 2008).

El FU contiene citoquinas como el factor inhibidor de la leucemia (LIF) e interleucinas, así como hormonas esteroides (estrógeno, progesterona y sus precursores) (Van der Gaast y col., 2008). Las propiedades bioquímicas, fisicoquímicas y biológicas de las proteínas de la secreción uterina son de gran interés. Tanto el volumen del FU, como su concentración y composición varía continuamente desde la fase proliferativa a la secretora, así como también desde la ovulación hasta la implantación.

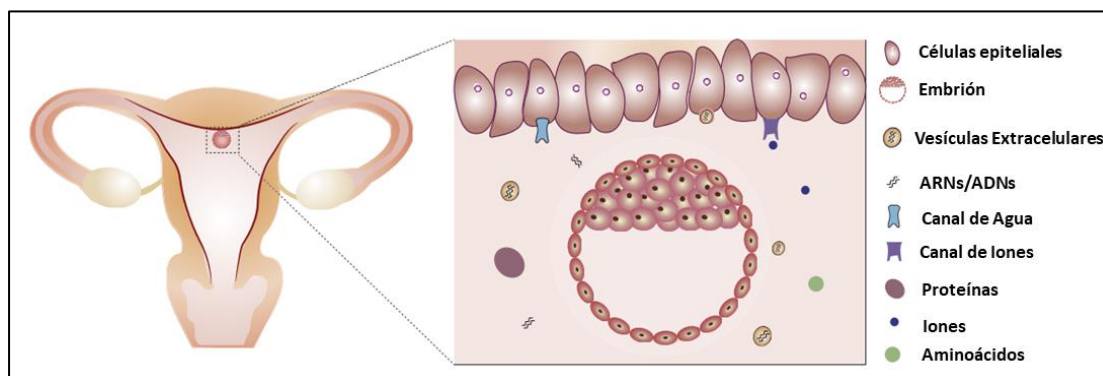
La mayoría las proteínas que componen el FU se clasifican como glicoproteínas, las cuales son macromoléculas relativamente pequeñas (25-50.000 KDa), aunque también se secreta una gran cantidad de enzimas e inhibidores de enzimas, especialmente proteasas e inhibidores de proteasas (Beier y col., 1971; Van der Gaast y col., 2008). Si bien, existe poca información sobre el efecto de la estimulación ovárica en la expresión de proteínas en la interfaz materno-embionaria, el FU refleja aspectos adicionales de la función endometrial, así como el diálogo que se produce antes de la implantación, por lo que es de importancia su evaluación para inferir sobre la maduración y diferenciación endometrial (Van der Gaast y col., 2008).

Durante el periodo pre-implantacional en ovejas, los genes localizados en EL y el EG uterino se han asociado con 3 clases principales de moléculas secretadas: (i) proteínas que son detectables en el fluido luminal uterino: la Molécula de Adhesión Celular Glicosilada 1 (GlyCAM-1), la Catepsina L (CTSL), la Estaniocalcina 1 (STC1), la Cistatina C (CST3), el Péptido liberador de gastrina (GRP) y la Proteína de Unión al Factor de Crecimiento tipo insulina 1 (IGFBP1) (ii) enzimas que producen componentes del FU: la Prostaglandina-Endoperoxido Sintasa 2 (PTGS2) y la 11 Beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa Tipo 1 (HSD11B1), involucradas en la producción de la prostaglandina y el cortisol, respectivamente) y (iii) transportadores activos de moléculas al FU: transportadores de Glucosa (SLC2A1 y SLC5A1), transportadores catiónicos de aminoácidos (SLC1A5 y SLC7A2) y transportadores de iones. En bovinos, además se han identificado entre las proteínas secretadas en el FU, la proteína de unión al retinol, legumina (LGMN) y el inhibidor de metaloproteasas 2 (TIMP2) (Forde y col., 2013).

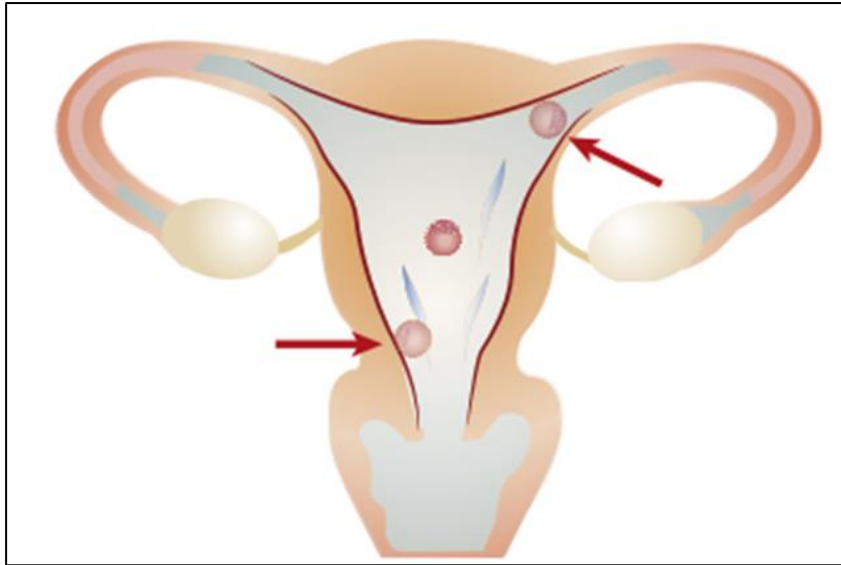
Antes de la fecundación del ovocito, el FU presenta un pH y osmolaridad apropiadas para este proceso; mientras, que después de la fecundación, el FU se regula dinámicamente a fin de facilitar el transporte, desarrollo e implantación del embrión intrauterino (Nilsson y col., 1972; Zhang y col., 2017). Uno de los requisitos previos para establecer un entorno uterino capaz de mantener al concepto pre-implantacional es un adecuado aumento post-ovulatorio en las concentraciones de progesterona circulante (P4). Tanto en el ganado bovino como en el ovino, la P4 elevada en el período post-ovulatorio da como resultado un alargamiento avanzado del concepto. Durante la elongación del concepto, en bovinos, el concepto incrementa su producción del IFN- $\tau$  en la luz uterina, lo que se asocia con mayores tasas de preñez. Los efectos de P4 no afectan directamente al embrión en desarrollo, sino que actúan indirectamente alterando el transcripto del endometrio y, posteriormente, la composición del FU (Forde y col., 2013).



Antes y durante la implantación del embrión, el FU es el medio líquido que conecta al embrión flotante con el útero, y tiene el potencial de transferir información vital entre el embrión y la madre (Zhang y col., 2017). Sumado a esto, recientemente se determinaron nuevas formas de comunicación materno embrionarias en el FU que se dan mediante el suministro y/o intercambio de vesículas extracelulares (VE) y ARN móviles, portadores de información (Fig. 54) (Zhang y col., 2017). Además de su composición, el volumen del FU también es regulado hormonalmente durante el período pre-implantacional y de implantación, por ejemplo, luego del transporte del embrión a la posición intrauterina correcta, hay una disminución rápida en el volumen del FU lo que facilita el proceso de cierre luminal que "fija" físicamente al embrión y facilita la inserción embrionaria en el útero (Fig.55) (Zhang y col., 2017). El momento adecuado en el que se da la disminución del volumen del FU es esencial para el inicio normal de la preñez; la falla en este proceso debido a factores hormonales o no hormonales, retrasará la implantación embrionaria y alterará la ubicación intrauterina normal de la implantación, aumentando el riesgo de pérdida de la preñez durante la mitad de la gestación (Zhang y col., 2017).



**Figura 54. Fluido uterino pre-implantacional para el desarrollo e implantación de embriones.** Un entorno de fluido uterino normal facilita la transferencia del embrión flotante a la ubicación intrauterina correcta. Los contenidos moleculares del fluido uterino y los factores reguladores de las células epiteliales (que se muestran a la derecha) funcionan en conjunto para apoyar el desarrollo embrionario intrauterino y promover la implantación del embrión (modificado de Zhang y col., 2017).



**Figura 55. Alteración del volumen del Fluido Uterino.** Los niveles anormales de hormonas incrementan el volumen del fluido uterino y la homeostasis de su contenido, lo que entorpece la implantación del embrión. Las flechas rojas muestran las ubicaciones incorrectas de implantación en humanos (modificado de Zhang y col., 2017).



# Abreviaturas



**A:** Alantois

**AB:** alcián blue

**AC:** Alantocorión

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario

**FA:** folículo en atresia

**AKT:** Serina / Treonina Quinasa

**AM:** Cavidad aminiónica

**ANOVA:** análisis de varianza de una vía

**APMA:** acetato aminofenil mercúrico

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BNC:** células binucleadas

**BSA:** albúmina de suero bovino

**CE:** células endoteliales

**CIME:** centro integral de microscopia electrónica

**CL:** cuerpo lúteo

**cm:** centímetros

**COL:** colágeno

**Conc:** concentrado

**COX-2:** ciclooxigenasa-2

**CSA:** Camélidos Sudamericanos

**CST3:** Cistatina C

**Ct:** threshold cycle

**CTSL:** Catepsina L

**CUD:** Cuerno uterino derecho

**CUI:** Cuerno uterino izquierdo

**CUs:** Cuernos uterinos

**FD:** folículo dominante

**ICD:** dominio intracelular

**dNTPs:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**E:** eficiencia

**E<sub>2</sub>:** estradiol-17 $\beta$

**DEC:** dominio extracelular

**ECLIA:** electroquimioluminiscencia

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EE:** error estándar

**EG:** epitelio glandular

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico

**EL:** epitelio luminal

**eNOS:** óxido nítrico sintasa endotelial

**FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos

**Fig:** figura

**Flt:** receptor tirosina quinasa tipo fms

**FU:** fluido uterino

**FUD:** fluido uterino derecho

**FUI:** fluido uterino izquierdo

**g:** gramos

**GlyCAM-1:** Molécula de Adhesión Celular Glicosilada 1

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropina

**GPI:** glicofosfatidilinositol

**GPR54:** receptor 54 acoplado a la Proteína G

**GRP:** Péptido liberador de gastrina

**CG:** gonadotropina coriónica

**HE:** Hematoxilina-Eosina

**HGF:** factor de crecimiento de hepatocitos

**HPRT:** hipoxantina fosforibosil transferasa

**hs:** horas

**HSD11B1:** 11  $\beta$ -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa Tipo 1

**ICAM-1:** molécula de adhesión intracelular-1

**IDO:** Indoleamina 2, 3 dioxigenasa

**IFN:** interferón

**Ig:** inmunoglobulina

**IGFBP1:** Proteína de Unión al Factor de Crecimiento tipo insulina 1

**IVITA:** Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura

**JNK:** quinasa Jun-J

**kDa:** kilo Dalton

**kg:** kilogramo

**KGF:** factor de crecimiento de keratinocitos

**Kp:** kisspeptina

**Kyn:** kineurina

**LGMN:** legumaina

**LH:** hormona luteinizante

**LIF:** factor inhibidor de la leucemia

**m.s.n.m:** metros sobre el nivel del mar

**M:** mol/litro

**MAM:** mucinas ancladas a la membrana

**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos

**MDa:** mega Dalton

**MEB:** microscopía electrónica de barrido

**MEC:** matriz extracelular

**MET:** muerte embrionaria temprana

**mg:** miligramos

**MHCII:** Complejo mayor de histocompatibilidad II

**ml:** mililitro

**mm:** milímetros

**mM:** milimol/litro

**M-MLV:** virus de la leucemia murina mieloide

**MMPs:** metaloproteasas de matriz

**MPM:** marcador de peso molecular

**MT:** dominio transmembrana

**MT-MMP:** metaloproteasas de matriz de tipo membrana

**mTOR:** el blanco de rapamicina en mamíferos

**MUC:** mucina

**NA:** no amplifica

**NCBI:** Nacional Center for Biotechnology Information

**NCT:** control sin templado

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**ng:** nanogramos

**NGF:** factor de crecimiento nervioso

**nm:** nanómetros

**NOA:** Noroeste Argentino

**NOS:** óxido nítrico sintasas

**NP:** no preñadas

**NRIF:** factor de interacción de neurotrofina

**NRPs:** neuropilinas

**NRT:** control que no fue retro-transcripto

**O:** ovulación

**OIF:** factor inductor de la ovulación

**OPN:** osteopontina

**P:** preñadas

**P<sub>4</sub>:** progesterona

**PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida

**PAS:** ácido periódico-Schiff

**pb:** pares de bases

**PBS:** solución salina tamponada con fosfato

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PG:** prostaglandina

**PGE<sub>2</sub>-9-K:** PGE<sub>2</sub>-9-cetoreductasa

**PI3K:** proteína 3-quinasa

**PM:** peso molecular

**proMMPs:** pro-metaloproteasas de matriz

**PSR:** Picrosirius red

**PTGS2:** Prostaglandina-Endoperóxido Sintasa 2

- PZ:** placenta zonaria
- qPCR:** PCR cuantitativa
- GR:** glóbulo rojo
- RE:** receptor de estrógeno
- FR:** folículo reclutado
- RhoA:** miembro homólogo de la familia ras A
- RMP:** reconocimiento materno de la preñez
- ROI:** región rectangular de interés
- ROx:** receptor de oxitocina
- RP<sub>4</sub>:** receptor de progesterona
- RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa
- SDS:** dodecilsulfato sódico
- SEA:** espermatozoos de erizo de mar, enterocinasa y agrina
- FS:** folículo seleccionado
- SLC1A5:** familia de portadores de soluto 1, transportador de aminoácidos catiónico, sistema y<sup>+</sup>, miembro 5
- SLC2A1:** portador de soluto familia 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 1
- SLC5A1:** portador de soluto familia 5 (transportador de glucosa facilitado), miembro 1
- SLC7A2:** familia de portadores de soluto 7, transportador de aminoácidos catiónico, sistema y<sup>+</sup>, miembro 2
- STC1:** Estaniocalcina 1
- TAE:** tampón tris-ácido acético-EDTA
- Taq:** *Thermus aquaticus*
- TEMED:** tetrametiletilendiamina
- TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante factor  $\beta$ ,

**TIMP:** inhibidor tisular de metaloproteasa

**TIMPs:** inhibidores tisulares de metaloproteasas

**Tm:** temperatura de melting

**TRF:** tracto reproductor femenino

**Tris:** trihidroximetilaminometano

**TrKA:** tirosina quinasa A

**Trp:** triptófano

**UNMSM:** Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Marangani

**uPA:** activador plasminógeno uroquinasa

**V:** voltio

**VC:** vasos y capilares

**VE:** vesícula extracelular

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular

**VEGFA:** factor de crecimiento endotelial vascular A

**VEGFR:** receptor del factor de crecimiento vascular

**YS:** Saco vitelino

**ZD:** zona densa

**ZL:** zona laxa

**ZP:** zona pigmentada

**ZT:** zona de transferencia

**$\beta$ -NGF:** factor de crecimiento nervioso  $\beta$

**$\mu$ g:** microgramo

**$\mu$ l:** microlitro

**$\mu$ m:** micrómetro

**$\mu$ M:** micro mol/litro



# Referencias Bibliográficas



## Referencias Bibliograficas

Aba, M. A., Bravo, P. W., Forsberg, M., & Kindahl, H. (1997). Endocrine changes during early pregnancy in the alpaca. *Animal Reproduction Science*, 47, 273–279.

Aba, M. A., Kindahl, H., Forsberg, M., Quiroga, M., & Auza, N. (2000). Levels of progesterone and changes in prostaglandin F2 $\alpha$  release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Animal reproduction science*, 59(1-2), 87-97.

Abd-Elnaeim M.M.; Pfarrer C.; Saber A.S; Abou-Elmagd A.; Jones C.J.P. and Leiser. (1999). Fetomaternal Attachment and Anchorage in the Early Diffuse Epitheliochorial Placenta of the Camel (*Camelus dromedarius*). *Cells Tissues Organs*, 141–154.

Achache, H., & Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 12(6), 731–746.

Alarcon, V., Sumar, J., Riera, G.S., Foote, W.C. (1990). Comparison of three methods of pregnancy diagnosis in aplicas and llamas. *Theriogenology*; 34, 1119–1127.

Al-Ramadan, S. Y., Ali, A. M., & Althnian, T. A. (2013). Analysis of the expression of progesterone and oestrogen receptors and their effect on Mucin-1 at both uterine horns of pregnant camel. *Journal of Camel Practice and Research*, 20(1), 59-63.

Apichela, S., Jiménez-Díaz, M. A., Roldan-Olarte, M., Valz-Gianinet, J. N., & Miceli, D. C. (2009). In vivo and in vitro sperm interaction with oviductal epithelial cells of llama. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(6), 943–951.

Aplin, J. (2010). Redefining Endometrial Receptivity. *Indian J Physiol Pharmacol*, 54(5), 1–6.

Aplin, J. D. (2006). Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reproductive biomedicine online*, 13(6), 833-839.

Aplin, J. D. (2007). Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reproductive Biomedicine Online*, 14 Spec No(6), 49–55.

- Aplin, J.D., Meseguer, M., Simon, C., Ortiz, M.E., Croxatto, H., Jones, C.J. (2001). MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 153–156
- Bauersachs, S., Mitko, K., Ulbrich, S. E., Blum, H., & Wolf, E. (2008). Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 116(07), 371-384.
- Bazer, F. W. (2013). Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 23.
- Bazer, F. W., & Johnson, G. A. (2014). Pig blastocyst–uterine interactions. *Differentiation*, 87(1-2), 52-65.
- Beier, H. M., Kühnel, W., & Petry, G. (1971). Uterine secretion proteins as extrinsic factors in preimplantation development. In *Schering Symposium on Intrinsic and Extrinsic Factors in Early Mammalian Development, Venice, April 20 to 23, 1970* (pp. 165-189).
- Bianchi, C. P., Meikle, A., Benavente, M. A., Álvarez, M. A., Trasorras, V. L., Miragaya, M. H., ... & Aba, M. A. (2015). Oestrogen and Progesterone Receptors and COX-2 Expression in Endometrial Biopsy Samples During Maternal Recognition of Pregnancy in Llamas (*Lama glama*). *Reproduction in domestic animals*, 50(6), 980-988.
- Bidarimath, M., & Tayade, C. (2017). Pregnancy and spontaneous fetal loss: A pig perspective. *Molecular reproduction and development*, 84(9), 856-869.
- Binder, N. K., Evans, J., Gardner, D. K., Salamonsen, L. A., & Hannan, N. J. (2014). Endometrial signals improve embryo outcome: Functional role of vascular endothelial growth factor isoforms on embryo development and implantation in mice. *Human Reproduction*, 29(10), 2278–2286.
- Bollwein, H., Weber, F., Kolberg, B., & Stolla, R. (2002). Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, 57(8), 2129-2138.
- Bourke, D. A., Adam, C. L., & Kyle, C. E. (1992). Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *The Veterinary record*, 130(19), 424-428.

Bowen, J. A., Bazer, F. W., & Burghardt, R. C. (1997). Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vitro. *Biology of reproduction*, 56(2), 409-415.

Bravo, P.W. (2002). Female Reproduction. In The reproductive process of south American camelids. *Salt Lake City: Seagull Printing*, 1-29.

Bravo, P.W., Fowler, M.E., Stabenfeldt, G.H., Lasley, B.L. (1990). Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol. Reprod.* 43, 579–585.

Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., LOVE, C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011). Reproductive physiology of the nonpregnant mare. *Manual of equine reproduction*, 3, 10-18.

Brown, B. W. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 58, 169–195.

Carson, D. D., DeSouza, M. M., Kardon, R., Zhou, X., Lagow, E., & Julian, J. (1998). Mucin expression and function in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 4(5), 459-464.

Cauwe, B., Van den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2007). The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 42(3), 113-185.

Chattopadhyay, S., Myers, R. R., Janes, J., & Shubayev, V. (2007). Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: Implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(5), 561–568.

Chen, J. M., Fortunato, M., Stevens, R. A., & Barrett, A. J. (2001). Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase. *Biological chemistry*, 382(5), 777-784.

Chen, L., Belton, R. J., & Nowak, R. A. (2009). Basigin-mediated gene expression changes in mouse uterine stromal cells during implantation. *Endocrinology*, 150(2), 966–976.

Cheng J.G, Chen Jr, Hernandez L, Alvord W.G, Stewart C.L. (2001). Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 98:8680–8685.

- Clark, G. F. (2015). Functional glycosylation in the human and mammalian uterus. *Fertility research and practice*, 1(1), 17.
- Curry Jr, T. E., & Osteen, K. G. (2001). Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biology of Reproduction*, 64(5), 1285-1296.
- Curry, T. E., & Osteen, K. G. (2003). The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine Reviews*, 24(4), 428–65.
- Del Campo MR, Del Campo CH, Ginther OJ. (1996). Vascular provisions for a local utero-ovarian cross-over pathway in new world camelids. *Theriogenology* 15, 983– 991.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. I. (2008). versión 2008. *Córdoba (Argentina): Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba*.
- Diao, H., Aplin, J. D., Xiao, S., Chun, J., Li, Z., Chen, S., Ye, X. (2011). Altered spatiotemporal expression of collagen types I, III, IV, and VI in Lpar3-deficient peri-implantation mouse uterus. *Biology of Reproduction*. 84(2), 255–265.
- El Allali K, El Bousmaki N, Ainani H and Simonneaux V. (2017). Effect of the Camelid's Seminal Plasma Ovulation-Inducing Factor/ $\beta$ -NGF: A Kisspeptin Target Hypothesis. *Front. Vet. Sci.* 4:99.
- Feder, F. H., González, H., & Arias, U. P. (1999). Vergleichende histologische Studie des weiblichen Geschlechtsapparates beim Lama (*Lama guanicoe glama*). II. Eileiter, Uterus, Cervix, Vagina. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 28(2), 139-142.
- Fernandez-Baca, S., Hansell, W., Novoa, C. (1970). Embryonic mortality in the alpaca. *Biol. Reprod.* 3, 243–251.
- Fernandez-Baca, S., Hansell, W., Saatman, R., Sumar, J., Novoa, C. (1979). Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. *Biol. Reprod.* 20, 586–595.
- Forde, N., Mehta, J. P., McGettigan, P. a, Mamo, S., Bazer, F. W., Spencer, T. E., & Lonergan, P. (2013). Alterations in expression of endometrial genes coding for proteins secreted into the uterine lumen during conceptus elongation in cattle. *BMC Genomics*, 14(1), 321.

Fouladi-Nashta, A. A., Jones, C. J. P., Nijjar, N., Mohamet, L., Smith, A., Chambers, I., & Kimber, S. J. (2005). Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Developmental biology*, 281(1), 1-21.

Frank, P., Barrientos, G., Tirado-González, I., Cohen, M., Moschansky, P., Peters, E. M., ... & Blois, S. M. (2014). Balanced levels of nerve growth factor are required for normal pregnancy progression. *Reproduction*, REP-14.

Galina Carlos y Valencia Javier. (2006). Reproducción de animales domésticos. *México, Segunda Edición, Limusa*, p. 128, 130, 135, 136.

Ghosh, D., Najwa, a. R., Khan, M. a., & Sengupta, J. (2011). IGF2, IGF binding protein 1, and matrix metalloproteinases 2 and 9 in implantation-stage endometrium following immunoneutralization of vascular endothelial growth factor in the rhesus monkey. *Reproduction*, 141, 501–509.

Ghosh, D., Sharkey, A. M., Charnock-Jones, D. S., Dhawan, L., Dhara, S., Smith, S. K., & Sengupta, J. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 6(10), 935-941.

Gipson, I. K., Blalock, T., Tisdale, A., Spurr-Michaud, S., Allcorn, S., Stavreus-Evers, A., & Gemzell, K. (2008). MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biology of reproduction*, 78(1), 134-142.

Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., & Menon, B. B. (2014). Comparison of the transmembrane mucins MUC1 and MUC16 in epithelial barrier function. *PloS one*, 9(6), e100393.

Giudice, L. C. (1999). Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Human reproduction*, 14(suppl\_2), 3-16.

Gorgieva, S., & Kokol, V. (2011). Collagen-vs. gelatine-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives. In *Biomaterials applications for nanomedicine*. InTech.

- Govindarajan, B., Menon, B. B., Spurr-Michaud, S., Rastogi, K., Gilmore, M. S., Argüeso, P., & Gipson, I. K. (2012). A metalloproteinase secreted by *Streptococcus pneumoniae* removes membrane mucin MUC16 from the epithelial glycocalyx barrier. *PloS one*, 7(3), e32418.
- Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U. A., & Taylor, H. S. (2009). The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 27, No. 1, p. 62). NIH Public Access.
- Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U. A., & Taylor, H. S. (2011). NIH Public Access. In *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(1), 62–79.
- Hafez, E.S.E. y Hafez. B. (2002). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Ed. McGraw- Hill Interamericana, Séptima edición, p: 5-137.
- Hantak, A. M., Bagchi, I. C., & Bagchi, M. K. (2014). Role of uterine stromal-epithelial crosstalk in embryo implantation. *The International journal of developmental biology*, 58, 139.
- Hashizume, K. (2007). Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. *Journal of Reproduction and Development*, 53(1), 1-11.
- Hashizume, K., Takahashi, T., Shimizu, M., Todoroki, J., Shimada, A., Hirata, M., ... Ito, A. (2003). Matrix-metalloproteinases-2 and -9 production in bovine endometrial cell culture. *The Journal of Reproduction and Development*, 49(1), 45–53.
- Hattrup, C. L., & Gendler, S. J. (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual Review of Physiology*, 70, 431–457.
- Hollborn, M., Stathopoulos, C., Steffen, A., Wiedemann, P., Kohen, L., & Bringmann, A. (2007). Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(9), 4360–4367.
- Horne, A. W., White, J. O., Lalani, E.-N., Mobberley, M. a, Margara, R. a, Trew, G. H., & Ryder, T. a. (2002). Analysis of epitopes on endometrial epithelium by scanning immunoelectron microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292, 102–108.
- Huang, H. (2006). The cytokine network during embryo implantation. *Chang Gung medical journal*, 29(1), 25.

- Jensen EC. (2013). Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anatomical record*.296 (3):378–81.
- Johnson, G. A., Bazer, F. W., Jaeger, L. A., Ka, H., Garlow, J. E., Pfarrer, C., ... & Burghardt, R. C. (2001). Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biology of reproduction*, 65(3), 820-828.
- Jones, C. J., & Aplin, J. D. (2009). Glycosylation at the fetomaternal interface: does the glycode play a critical role in implantation?. *Glycoconjugate journal*, 26(3), 359-366.
- Jones, C. J., Skidmore, J. A., & Aplin, J. D. (2008). Placental glycosylation in a cama (camel-llama cross) and its relevance to successful hybridisation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 49(3), 1030.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 11:447-455.
- Ka, H., Seo, H., Choi, Y., Shim, J., & Kim, M. (2012). Signaling molecules at the conceptus-uterine interface during early pregnancy in pigs. *Journal of Embryo Transfer Vol*, 27(4), 211-221.
- Kao, T. H., Peng, Y. J., Salter, D. M., & Lee, H. S. (2015). Nerve growth factor increases MMP9 activity in annulus fibrosus cells by upregulating lipocalin 2 expression. *European Spine Journal*, 24(9), 1959-1968.
- Kenney, R., P. (1986). Equine endometrial biopsy. In: Current Therapy in Theriogenology. Morrow, D. 2nd edition. Lea and Febiger. Philadelphia. pp: 723-729.
- Kizaki, K., Ushizawa, K., Takahashi, T., Yamada, O., Todoroki, J., Sato, T., ... & Hashizume, K. (2008). Gelatinase (MMP-2 and-9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6(1), 66.
- Krüssel, J. S., Bielfeld, P., Polan, M. L., & Simón, C. (2003). Regulation of embryonic implantation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 110, S2-S9.
- Kucharczyk, M., Kurek, A., Detka, J., Slusarczyk, J., Papp, M., Tota, K., ... Budziszewska, B. (2016). Chronic mild stress influences nerve growth factor through a matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *Psychoneuroendocrinology*, 66, 11–21.



- Ledgard, A. M., Lee, R. F., & Peterson, A. J. (2009). Bovine endometrial legumain and TIMP-2 regulation in response to presence of a conceptus. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 76(1), 65-74.
- Lenhart, J. a., Ryan, P. L., Ohleth, K. M., Palmer, S. S., & Bagnell, C. a. (2001). Relaxin increases secretion of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig. *Endocrinology*, 142(9), 3941–3949.
- León Eric M., Alberto Sato S., Miluska Navarrete Z., Cisneros Jannet S. (2011). Anatomía macroscópica , irrigación y drenaje venoso del aparato reproductor femenino de la llama ( Lama glama ). *Rev Inv Vet Perú -ANATOMÍA*, 22(1), 1–8.
- Li, B., Sheng, X., Song, M., Zhang, H., Weng, J., Zhang, M., ... & Watanabe, G. (2012). Expression of nerve growth factor and its receptors TrkA and p75 in the uterus of wild female ground squirrel (Citellus dauricus Brandt). *General and comparative endocrinology*, 176(1), 62-69.
- Li, B., Sheng, X., Song, M., Zhang, H., Weng, J., Zhang, M., ... Taya, K. (2012). Expression of nerve growth factor and its receptors TrkA and p75 in the uterus of wild female ground squirrel (Citellus dauricus Brandt). *General and Comparative Endocrinology*, 176(1), 62–69.
- Li, Q., Winston, J. H., & Sarna, S. K. (2015). Noninflammatory upregulation of nerve growth factor underlies gastric hypersensitivity induced by neonatal colon inflammation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(3), R235-R242.
- López C, V., Vásquez C, M., Huanca L, W., Santiani A, A., Barbeito, C., Canuzzi A, C., ... Rodríguez G, J. (2014). Estudio Lectinhistoquímico del Útero de Alpacas (Vicugna pacos) bajo tratamiento superovulatorio. *Rev. Int. Vet. Perú*, 25(1), 1–15.
- Luna, L.G., (1968). Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.
- Lunelli, D., Cirio, S. M., Leite, S. C., Camargo, C. E., & Kozicki, L. E. (2013). Collagen types in relation to expression of estradiol and progesterone receptors in equine endometrial fibrosis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(04), 599.

- Majewska, M., Panasiewicz, G., Klisch, K., Olivera, L. V. M., Mamani, J. M., Abd-Elnaeim, M. M., & Szafranska, B. (2009). Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family: transcripts and gene amplicons in camelids. *Reproductive Biology*, 9(2), 127–150.
- Makker, A., & Singh, M. M. (2006). Endometrial receptivity: clinical assessment in relation to fertility, infertility, and antifertility. *Medicinal research reviews*, 26(6), 699-746.
- Malik, S., Day, K., Perrault, I., Charnock-Jones, D. S., & Smith, S. K. (2006). Reduced levels of VEGF-A and MMP-2 and MMP-9 activity and increased TNF- $\alpha$  in menstrual endometrium and effluent in women with menorrhagia. *Human Reproduction*, 21(8), 2158–2166.
- Maranesi, M., Parillo, F., Leonardi, L., Rebollar, P. G., Alonso, B., Petrucci, L., ... & Zerani, M. (2016). Expression of nerve growth factor and its receptors in the uterus of rabbits: functional involvement in prostaglandin synthesis. *Domestic animal endocrinology*, 56, 20-28.
- Matiolli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G. (2001). Follicular activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol Reprod*; 65:1014e9.
- Menino Jr, A. R., Hogan, A., Schultz, G. A., Novak, S., Dixon, W., & Foxcroft, G. H. (1997). Expression of proteinases and proteinase inhibitors during embryo-uterine contact in the pig. *Developmental genetics*, 21(1), 68-74.
- Merchant, S. J., & Davidge, S. T. (2004). The role of matrix metalloproteinases in vascular function: Implications for normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 111(September), 931–939.
- Minder, P., Zajac, E., Quigley, J. P., & Deryugina, E. I. (2015). EGFR Regulates the Development and Microarchitecture of Intratumoral Angiogenic Vasculature Capable of Sustaining Cancer Cell Intravasation. *Neoplasia*, 17(8), 634–649.
- Mishra, B., Kizaki, K., Koshi, K., Ushizawa, K., Takahashi, T., Hosoe, M., ... & Hashizume, K. (2010). Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 60.

Mishra, B., Kizaki, K., Sato, T., Ito, a., & Hashizume, K. (2012). The Role of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) in the Regulation of Bovine Endometrial Cell Functions. *Biology of Reproduction*, 87(October), 1–8.

Mohamed, R., & El-Remessy, A. B. (2015). Imbalance of the nerve growth factor and its precursor: implication in diabetic retinopathy. *Journal of clinical & experimental ophthalmology*, 6(5).

Monteiro A., I., Kollmetz, T., & Malmström, J. (2018). Engineered systems to study the synergistic signaling between integrin-mediated mechanotransduction and growth factors (Review). *Biointerphases*, 13(6), 06D302.

Montes GS, Junqueira LC (1991). The use of the Picrosirius- polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 Suppl 3:1-11.

Morgado, M., Dharmaraj, N., Carson, D. (2012). SUN-12: MUC16 stimulation by proin- flammatory cytokines in the Immortalized Human Endometrial Epithelial Cell Line, IHEEC, Houston, TX. The Endocrine Society's 94th Annual Meeting and Expo, June 23–26, 2012.

Murphy, C. R. (2000). Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: pinopods—or uterodomes?. *Human Reproduction*, 15(12), 2451-2454.

Nikas, G. (1999). Cell-surface morphological events relevant to human implantation. *Hum. Reprod.* 14, 37–44.

Nilsson, O. (1972). Ultrastructure of the process of secretion in the rat uterine epithelium at preimplantation. *Journal of ultrastructure research*, 40(5-6), 572-580.

Noriyuki, M., Sumi, T., Zhi, X., Misugi, F., Nobeyama, H., Yoshida, H., ... Ishiko, O. (2007). Vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and cyclooxygenase-2 influence prognosis of uterine cervical cancer in young women. *International Journal of Oncology*, 31, 531–536.

Ogata, Y., Itoh, Y., & Nagase, H. (1995). Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 270(31), 18506-18511.

- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., & Okada, Y. (1997). Membrane-Type metalloproteinase digests extracellular matrix macromolecules including interstitial collagens. *Matrix Biology*, 16(2), 76–77.
- Olivera, L. (2007). Caracterización histológica de las membranas útero-placentarias. XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú.
- Olivera, L. V. M., Zago, D. a., Jones, C. J. P., & Bevilacqua, E. (2003). Developmental changes at the materno-embryonic interface in early pregnancy of the alpaca, Lamos pacos. *Anatomy and Embryology*, 207, 317–331.
- Olson, G.E., Winfrey, V.P., Matrisian, P.E., NagDas, S.K., Hoffman, L.H. (1998). Blastocyst-dependent upregulation of metalloproteinase/ disintegrin MDC9 expression in the rabbit endometrium. *Cell. Tissue Res.* 293, 489–498.
- Papadimitropoulou, A., & Mamalaki, A. (2013). The glycosylated IgII Extracellular domain of EMMPRIN is implicated in the induction of MMP-2. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 379(1–2), 107–113.
- Parraguez, V.H., Cortez, S., Gazitua, F.J., Ferrando, G., MacNiven, V., Raggi, L.A. (1997). Early pregnancy diagnosis in alpaca Lama pacos and llama Lama glama by ultrasound. *Anim. Reprod. Sci.* 47,113–121.
- Perrier D' Hauterive, S., Charlet, J. D. C., Goffin, F., Foidart, J. M., & Geenen, V. (2002). La fenêtre implantatoire. *Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 31(5), 440-55.
- Picha, Y., Tibary, a., Memon, M., Kasimanickam, R., & Sumar, J. (2013). Chronology of early embryonic development and embryo uterine migration in alpacas. *Theriogenology*, 79(4), 702–708.
- Powell, S. A., Smith, B. B., Timm, K. I., & Menino Jr, A. R. (2007). Expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the corpus luteum and uterus from non-pregnant and pregnant llamas. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 74(8), 1043-1052.
- Powell, S. a., Smith, B. B., Timm, K. I., & Menino, A. R. (2007). Estradiol production by preimplantation blastocysts and increased serum progesterone following estradiol treatment in llamas. *Animal Reproduction Science*, 102, 66–75.

Raffetto, J. D., & Khalil, R. A. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 75(2), 346–359.

Ratto, M. H., Leduc, Y. a., Valderrama, X. P., van Straaten, K. E., Delbaere, L. T. J., Pierson, R. a., & Adams, G. P. (2012). The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 15042–15047.

Ratto, M., Cervantes, M., Norambuena, C., Silva, M., Miragaya, M., & Huanca, W. (2011). Effect of location and stage of development of dominant follicle on ovulation and embryo survival rate in alpacas. *Animal reproduction science*, 127(1-2), 100-105.

Redzovic, A., Laskarin, G., Dominovic, M., Haller, H., & Rukavina, D. (2013). Mucins help to avoid alloreactivity at the maternal fetal interface. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.

Ren, L., Medan, M. S., Weng, Q., Jin, W., Li, C., Watanabe, G., & Taya, K. (2005). Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats. *The Journal of Reproduction and Development*, 51(3), 399–404.

Ren, Q., Guan, S., Fu, J., & Wang, A. (2010). Temporal and spatial expression of Muc1 during implantation in sows. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2322–2335.

Riley, S. C., Webb, C. J., Leask, R., McCaig, F. M., & Howe, D. C. (2000). Involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9, tissue inhibitor of metalloproteinases and apoptosis in tissue remodelling in the sheep placenta. *Journal of reproduction and fertility*, 118(1), 19-27.

Roa, I. (2014). Conceptos Básicos Angiogénesis Tumoral. *International Journal of Medical and Surgical Sciences*, 1(2), 129–138. Retrieved from [www.ijmss.org](http://www.ijmss.org)

Rodríguez-Piñón, M., Tasende, C., Casuriaga, D., Bielli, a, Genovese, P., & Garófalo, E. G. (2015). Collagen and matrix metalloproteinase-2 and -9 in the ewe cervix during the estrous cycle. *Theriogenology*, 84(5), 818–26.

Roy SC & Ghosh J. (2010). Dynamic in vivo changes in the activities of gelatinases, matrix metalloproteinases (MMPs), and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in buffalo (*Bubalus bubalis*) uterine luminal fluid during estrous cycle and early pregnancy. *Mol Reprod Dev* 77, 944–953.

Saikia, P. J., Das, D., Mize, D., Das, M., & Sarma, H. N. (2017). Spatiotemporal expression of Vascular Endothelial Growth Factor-C in mice fetal-maternal tissues during periimplantation (D4–D7). *Middle East Fertility Society Journal*, 22(2), 115–124.

Salamonsen, L. a. (1999). Role of proteases in implantation. *Reviews of Reproduction*, 4(1), 11–22.

Sanchis, E. G., Cristofolini, a. L., Taglialegra, a, & Merkis, C. I. (2011). Porcine Uterine and Placental Extracellular Matrix Molecules Throughout Pregnancy. *International Journal of Morphology*, 29(4), 1438–1443.

Sanin, Y. Y., Olivera Ángel, M., & Tarazona Morales, A. M. (2010). Señales moleculares que afectan la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y  $\text{PGE}_2$  en el endometrio bovino.

Sari, L. M., Zampini, R., Argañaraz, M. E., Carretero, M. I., Fumuso, F. G., Barraza, D. E., ... & Apichela, S. A. (2018). Expression of  $\beta$ -ngf and high affinity ngf receptor (trka) in llama (Lama Glama) male reproductive tract and spermatozoa. *Molecular reproduction and development*.

Saygili, E., Schauerte, P., Pekassa, M., Saygili, E., Rackauskas, G., Schwinger, R. H., ... & Rana, O. R. (2011). Sympathetic neurons express and secrete MMP-2 and MT1-MMP to control nerve sprouting via pro-NGF conversion. *Cellular and molecular neurobiology*, 31(1), 17-25.

Senger, P. L. (2004). Pathways to pregnancy and parturition (No. Ed. 2). *Current conceptions, INC*.

Sepúlveda Saavedra, J. (2013). *Texto atlas de histología: biología celular y tisular*. McGraw Hill Mexico

Shim, J., Seo, H., Choi, Y., Yoo, I., Lee, C. K., Hyun, S. H., ... & Ka, H. (2013). Analysis of legumain and cystatin 6 expression at the maternal–fetal interface in pigs. *Molecular reproduction and development*, 80(7), 570-580.

Silva, M., Ulloa-Leal, C., Norambuena, C., Fernández, A., Adams, G. P., & Ratto, M. H. (2014). Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) from seminal plasma origin enhances Corpus Luteum function in llamas regardless the preovulatory follicle diameter. *Animal reproduction science*, 148(3-4), 221-227.

Silva, M., Urrea, F., & Ratto, M. (2018). Uterine endometrial vascularization during ovarian follicular growth in llamas: The effect of estradiol plasma concentration. *Theriogenology*, 106, 164-169.

Singh, H., & Aplin, J. D. (2009). Adhesion molecules in endometrial epithelium: Tissue integrity and embryo implantation. *Journal of Anatomy*, 215(1), 3–13.

Skidmore J.A. (2011). Reproductive physiology in female Old World camelids. *Anim Reprod Sci*; 124:148–54.

Skidmore, J. A., Wooding, F. B. P., & Allen, W. R. (1996). Implantation and early placentation in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Placenta*, 17(4), 253–262.

Song, G., Bailey, D. W., Dunlap, K. A., Burghardt, R. C., Spencer, T. E., Bazer, F. W., & Johnson, G. A. (2010). Cathepsin B, cathepsin L, and cystatin C in the porcine uterus and placenta: potential roles in endometrial/placental remodeling and in fluid-phase transport of proteins secreted by uterine epithelia across placental areolae. *Biology of reproduction*, 82(5), 854-864.

Spencer, T. E., Hayashi, K., Hu, J., & Carpenter, K. D. (2005). Comparative Developmental Biology of the Mammalian Uterus. *Current Topics in Developmental Biology*, 68(5), 85–122.

Spencer, T. E., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., & Bazer, F. W. (2004). Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction*, 71(1), 2-10.

Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, 17(1), 463-516.

Sugino, N., Kashida, S., Karube-Harada, A., Takiguchi, S., & Kato, H. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction*, 123(3), 379-387.

Tapia, A., Gangi, L. M., Zegers-Hochschild, F., Balmaceda, J., Pommer, R., Trejo, L., ... & Vargas, M. (2007). Differences in the endometrial transcript profile during the receptive

period between women who were refractory to implantation and those who achieved pregnancy. *Human reproduction*, 23(2), 340-351.

Tibary, A., Fite, C., Anouassi, A., & Sghiri, A. (2006). Infectious causes of reproductive loss in camelids. *Theriogenology*, 66(3), 633-647.

Tometten, M., Blois, S., Arck, P.C. (2005). Nerve growth factor in reproductive biology: link between the immune, endocrine and nervous system. *Chem. Immunol. Allergy*: 89, 135–148.

Trasorras, V., Chaves, M.G., Neild, D., Gambarotta, M., Aba, M., Agüero, A. (2010). Embryo transfer technique: factors affecting the viability of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 279–285

Trolice, M. P., & Amyradakis, G. (2008). Biomarkers Related to Endometrial Receptivity and Implantation. *Receptivity and Implantation*.

Ulbrich, S. E., Meyer, S. U., Zitta, K., Hiendleder, S., Sinowatz, F., Bauersachs, S., ... & Wolf, E. (2011). Bovine endometrial metallopeptidases MMP14 and MMP2 and the metallopeptidase inhibitor TIMP2 participate in maternal preparation of pregnancy. *Molecular and cellular endocrinology*, 332(1-2), 48-57.

Ulloa-leal, C., Bogle, O. A., Adams, G. P., & Ratto, M. H. (2014). Theriogenology Luteotrophic effect of ovulation-inducing factor / nerve growth factor present in the seminal plasma of llamas. *Theriogenology*, 81(8), 1101–1107.e1.

Van der Gaast, M. H., Classen-Linke, I., Krusche, C. A., Beier-Hellwig, K., Fauser, B. C. J. M., Beier, H. M., & Macklon, N. S. (2008). Impact of ovarian stimulation on mid-luteal endometrial tissue and secretion markers of receptivity. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(4), 553–563.

Vandita, D., Kilari, A., Pisal, H., Patil, V., Mehendale, S., Wagh, G., ... Joshi, S. (2015). Maternal nerve growth factor levels during pregnancy in women with preeclampsia: A longitudinal study. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 47, 340–346.

Vaughan, J. L., & Tibary, A. (2006). Reproduction in female South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research*, 61, 259–281.



Wary, K. K., Thakker, G. D., Humtsoe, J. O., & Yang, J. (2003). Analysis of VEGF-responsive Genes Involved in the activation of endothelial cells. *Mol Cancer*, 2(1), 25.

Welter, H., Wollenhaupt, K., Tiemann, U., & Einspanier, R. (2003). Regulation of the VEGF-system in the endometrium during steroid-replacement and early pregnancy of pigs. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 111(01), 33-40.

Whitehead, C. (2007). Reproductive anatomy, physiology and behaviour in camelids. *British Veterinary Camelid Society*, 25–32.

Yoshii, N., Hamatani, T., Inagaki, N., Hosaka, T., Inoue, O., Yamada, M., ... & Odawara, Y. (2013). Successful implantation after reducing matrix metalloproteinase activity in the uterine cavity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 37.

Zampini, R., Argañaraz, M. E., Miceli, D. C., & Apichela, S. A. (2014). Detection of the Matrix Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 in Llama (*Lama glama*) Oviduct. *Reproduction in domestic animals*, 49(3), 492-498.

Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H., & Armant, D. R. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular aspects of medicine*, 34(5), 939-980.

Zhang, Y., Wang, Q., Wang, H., & Duan, E. (2017). Uterine Fluid in Pregnancy: A Biological and Clinical Outlook. *Trends in Molecular Medicine*, 23(7), 604–614.