



UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA OBSTETRICIA Y
PUERICULTURA



“Distribución de Moléculas de la Matriz Extracelular Endometrial en un Modelo Animal de Aborto Espontáneo”

Tesis para optar al Grado de Licenciado/a
en Obstetricia y Puericultura

Autores: Lorena Andrea Tan Collao.

Marcela Denisse Viveros Sepúlveda.

Profesor Guía: Sebastián San Martín Henríquez.

Co-Guía: Macarena González Quijada.

2009

Agradecimientos

Agradecemos a nuestro Profesor guía el Doctor Sebastián San Martín por su gran apoyo docente, al entregarnos sus conocimientos y experiencias de trabajo, por su indispensable apoyo emocional, al entender el gran desafío que significaba esta investigación para nosotras como tesistas y por su comprensión en los momentos de dificultad. Gracias profesor por entregarnos las herramientas necesarias para enfrentar con éxito esta nueva experiencia y por ser parte de nuestra formación como profesionales en el área de la investigación científica.

Damos nuestro agradecimiento a Macarena González y Ximena Le Roy por la entrega de conocimientos teóricos y prácticos, que hicieron posible que el desempeño en el laboratorio fuera llevado con éxito.

Agradecemos al Laboratorio de Ciencias Morfológicas del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso, quien nos entregó el espacio físico y los materiales necesarios para lograr el óptimo desarrollo de esta investigación.

Gracias en primer lugar a mi madre, Mónica Collao González por entregarme su amor y apoyo incondicional, ayudándome a enfrentar todos los obstáculos que se presentaron en mis últimos años de carrera como estudiante.

Gracias a mi madrina Alma Collao González por sus consejos y apoyo.

Gracias a Pilar Ríos Muñoz por darme su apoyo y comprensión.

Gracias a mis ex compañeras de universidad y amigas quienes me apoyaron y siempre confiaron en mí y en mis capacidades.

Agradezco de todo corazón a mis padres Humberto Viveros y Raquel Sepúlveda, por apoyarme constantemente en este arduo camino, por concederme su cariño y apoyo incondicional y que a pesar de la lejanía física sufrida durante este año, siempre supieron estar presentes en mí.

Agradezco a mis hermanos que siempre me incentivaron a continuar y ser perseverante en mi trabajo y a superarme cada día más.

Gracias queridos amigos que siempre tuvieron una palabra de apoyo en los momentos de dificultad.

Gracias a Dios, por darme la fuerza espiritual en la que muchas veces me refugie y que me permitió sobreponerme ante la adversidad.

Índice

Resumen	6
Summary	7
Introducción	8
Capítulo 1	
1.- Reproducción en roedores	9
1.1.- Ciclo Estral	11
1.2.- Cópula	11
1.4.- Gestación y Parto	12
1.5.- Periodo Preimplantacional	13
1.6.- Implantación	15
1.7.- Decidualización	20
1.8.- Matriz Extracelular	23
2.- Moléculas de Matriz Extracelular	26
2.1.- Colágeno	26
2.1.- Tipos de Colágeno	28
2.1.2.- Distribución y expresión de Colágeno I, III y V	29
2.1.3.- Colágeno I, III, V y gestación	31
2.2.- Fibronectina	33
2.2.1.- Fibronectina y decidualización	35
2.3.- Tenascina	36
2.3.1- Tenascina y gestación en roedores	38
2.3.2.- Expresión Tenascina en	
Periodo Preimplantacional	39

2.4.- Laminina	43
2.4.1.- Laminina y decidualización	44
3.- Aborto Espontáneo	46
3.1.- Modelo de aborto espontáneo	47
Capitulo 2	
Delimitación del Problema	49
Hipótesis	49
Objetivo General	49
Objetivos Específicos	50
Capitulo 3	
Material y métodos	51
Animales	51
Procesamiento de los tejidos	51
Métodos Histoquímicos	52
Métodos Inmunohistoquímicos	52
Capitulo 4	
Resultados	55
Discusión	69
Conclusiones y sugerencias	77
Bibliografía	78

Resumen

El éxito reproductivo en mamíferos depende de una serie de factores, como son la participación activa de hormonas (estrógeno y progesterona) y la coordinación entre los tejidos del embrión y la madre.

El endometrio, está conformado por fibroblastos y moléculas de la matriz extracelular, estructuras que son modificadas producto de la implantación del embrión. Las características químicas y funcionales de estas moléculas son poco conocidas y probablemente desempeñen un rol importante en las etapas iniciales de la gestación.

La implantación en el ratón involucra procesos que conllevan, en términos normales, la nidación e invasión del blastocisto en el endometrio. Alteraciones en este proceso generarían la pérdida del embrión en estadios tempranos.

La susceptibilidad del embrión a agentes externos e internos, puede tener como consecuencia la pérdida embrionaria, desencadenando un aborto espontáneo. Modificaciones en el perfil molecular endometrial pueden generar un ambiente materno desfavorable al normal desarrollo del embrión.

El objetivo de esta tesis es *caracterizar la distribución de moléculas de la matriz extracelular del endometrio de ratón durante las etapas iniciales de la gestación en un modelo de aborto espontáneo*. Para ello se realizó un estudio de cohorte longitudinal prospectivo en el útero de ratón de la cepa CBA/J x CBA/2J, en las etapas iniciales de la gestación. Los resultados se compararon con un grupo control. La distribución de moléculas de la matriz extracelular fue analizada a través de técnicas histoquímicas e Inmunohistoquímicas.

Este estudio demostró diferencias en la distribución de colágeno, fibronectina, tenascina y laminina, moléculas existentes en la matriz extracelular del tejido endometrial y miometrial del modelo de aborto espontáneo y control, cuyos resultados sugieren que una inadecuada remodelación de la matriz extracelular, podría estar relacionada con el fenómeno de aborto espontáneo.

Palabras claves: Matriz Extracelular, Endometrio, Colágeno, Fibronectina, Tenascina, Laminina, Aborto Espontáneo, Ratón.

Summary

The reproductive successful in mammals are depend of different factors, as well as hormones (estrogen and progesterone) and the coordination between the embryo and maternal tissues.

The endometrium, is compose by fibroblasts and extracellular matrix molecules, components that are modify during the embryo implantation. The functional and chemical characteristic of these molecules are not well know and probably are related with the important role in the early pregnancy.

The implantation in mice, involve in normal conditions, the nidation and invasion of blastocyst in the endometrium. Some alteration in this process will promote the lost of the embryo during the early pregnancy.

The susceptibility to the embryo at external and internal agents, may be related with the embryony lost, promoting miscarriage. Changes in the molecular profile could be promoting the different maternal microenvironment to the normal embryo development.

The objective of this thesis *was characterized the distribution of extracellular matrix proteins in the mice uterus during the early pregnancy in a model of spontaneous abortion*. We have a prospective longitudinal cohort study in the uterus of CBA/J x CBA/2J mice in the early pregnancy. The results were compare with control groups. The distribution of extracellular matrix proteins were analyzed by histochemical and immunohistochemical techniques.

These study show differences in the distribution of collagen, fibronectin, tenascin and laminin, in the endometrial and myometrial stroma in the abortion model when compare with the control tissues.

These changes in the extracellular matrix of the uterus, could be related with the spontaneous abortion process.

Key words: Extracellular matrix, endometrium, collagen, fibronectin, tenascin, laminin, spontaneous abortion, mice.

Introducción

El aborto espontáneo recurrente es definido clínicamente como 3 o más abortos ocurridos durante el 1º trimestre. Aproximadamente, un 40% de los abortos espontáneos son de etiología desconocida y los procesos moleculares involucrados no han sido entendidos en el presente.

Una proporción de los abortos de etiología desconocida pueden ser causados por factores endometriales, que causarían alteraciones en uno o más de los componentes esenciales para la implantación y la continuidad de la gestación (Lee et al, 2007).

A nivel molecular, muchos son los factores involucrados en la preparación del endometrio para la gestación, desencadenando una serie de reacciones de síntesis y secreción de nuevas moléculas, que influenciarán las interacciones entre poblaciones celulares completamente diferentes, como es el caso de los tejidos maternos y embrionarios.

Por razones éticas, el fenómeno de aborto espontáneo no se ha estudiado en vivo en humanos y por eso se creó un modelo animal de ratón, que asemeja las condiciones humanas, dando así, la oportunidad a científicos de estudiar a nivel molecular este proceso.

Si bien, en base a este modelo, se han realizado diversos estudios, la distribución molecular de glicoproteínas implicadas en el proceso de aborto espontáneo, no ha sido documentada.

Considerando lo anterior, se espera que las moléculas a continuación estudiadas, desempeñen un rol importante durante el proceso de aborto espontáneo y sean un factor determinante al momento de encontrar las posibles causas de este fenómeno.

CAPITULO 1:

1.- Reproducción en Roedores

1.1.- Morfología del útero

El aparato reproductor femenino en ratones está conformado por ovarios, oviductos (homologo a las trompas de Falopio en humanos), útero, vagina y glándulas anexas. Ambos ovarios se localizan en el polo posterolateral del riñón y se conectan a la pared dorsal de la cavidad abdominal por una proyección del peritoneo denominada mesoovario que forma una bolsa alrededor del ovario. El mesoovario posee tejido conectivo laxo muy vascularizado y algunas fibras de músculo liso. La cápsula y el ovario se conectan por el hilio, región por donde ingresan los vasos sanguíneos y nervios al parénquima ovárico (Conti, 2001).

Histológicamente la superficie externa del ovario se compone por un epitelio cúbico, internamente se aprecia la región medular, formada por tejido fibroso que está conectada con el hilio y la región de la corteza. Esta región se encuentra bien vascularizada y contiene los folículos en distintos grados de desarrollo (Conti, 2001).

El oviducto es un tubo contorneado que conecta el espacio periovárico con los cuernos uterinos. Las regiones que conforman el oviducto son: infundíbulo, la ampolla, el istmo y la porción uterina.

El útero en roedores está conformado por dos cuernos uterinos largos que se unen justo anterior a su unión con la vagina, y cada uno de estos se adjunta a la pared dorsal del cuerpo uterino por un mesenterio, el mesometrio, que corresponde a un ligamento conectivo que contiene vasos sanguíneos y nervios (Allan et al , 1968; Conti, 2001).

La mucosa uterina (endometrio), está constituida por un epitelio cilíndrico simple, que contiene células secretoras no ciliadas y células ciliadas, sostenidas por una membrana basal. La lámina propia del endometrio tiene un tipo celular conocido como fibroblastos endometriales. Las glándulas endometriales son invaginaciones del epitelio de revestimiento, pero carecen de células ciliadas (Conti, 2001).

El miometrio está compuesto por dos capas musculares, una longitudinal externa y una circular interna, ambas capas musculares están separadas por una capa de tejido conectivo muy vascularizado. Los cuernos se revisten por una serosa (mesotelio) que se continúa directamente con el mesometrio. En un corte transversal del útero se aprecia que las principales modificaciones ocurren en el lumen uterino que cambian de una forma irregular a un lumen con criptas que se poseionan en orientación antimesometrial, aproximadamente 72 horas después del coito (Abrahamsohn and Zorn, 1993).

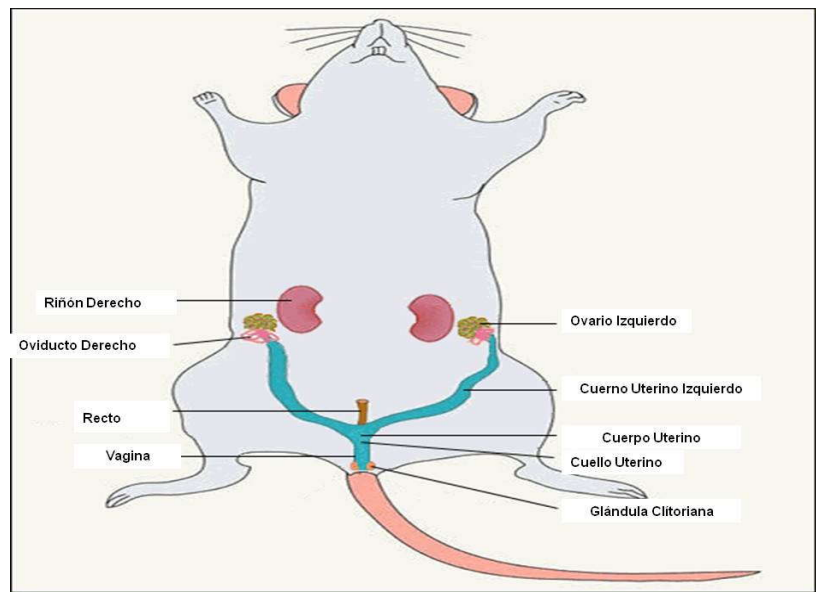


Figura 1: Esquema modificado de aparato reproductor en roedores.

Esquema original (Conti et al, 2004).

1.2.- Ciclo Estral

El útero al igual que la vagina se somete a una serie de cambios catabólicos y anabólicos durante el ciclo sexual, denominado en esta especie como ciclo Estral.

Los ratones son poliestríticos continuos, esta especie posee un ciclo Estral que dura entre 4 a 5 días. La periodicidad del ciclo Estral es observada en las hembras maduras y es el resultado directo de cambios cíclicos que ocurren en el ovario, y que reflejan la actividad y cambios hipotalámicos alternados en la secreción de las gonadotropinas (Jackson, 1968).

El ciclo Estral del ratón es dividido en cuatro fases: Proestro, Estro, Metaestro y Diestro. Las dos primeras fases (Proestro y Estro) se definen como fases activas en la cual se ponen en marcha el crecimiento de distintas partes del tracto genital, que culminará en la ovulación ó en caso de apareamiento, en la fertilización. En la tercera etapa la que se subdivide en dos (Metaestro-1 y Metaestro-2), son fases que se caracterizan por cambios degenerativos del tracto genital siendo finalmente la cuarta etapa el Diestro donde ocurre un período de inactividad o de lento crecimiento (Jackson, 1968).

1.3.- Cópula

La cópula se produce en el Estro y su estímulo produce contracciones uterinas fuertes las que son reguladas por estrógenos que circulan en la hembra (Woerpel et al, 2007), lo que provoca la inactivación de los espermatozoides que llegaron primero a la ampolla. A medida que pasa el tiempo las contracciones disminuyen en intensidad y es el momento en que los espermios con capacidad reproductiva llegan al oviducto, desencadenando la fecundación. Tras la cópula la hembra desarrolla un tapón vaginal, (que corresponde al día 1 de gestación) producto de los rápidos movimientos pélvicos y el posterior depósito de semen por el macho en la vagina de la hembra. Cada tapón vaginal está formado por una mezcla de secreciones de las vesículas y glándulas del macho, que suelen cubrir la vagina desde la vulva al cuello uterino. El tiempo que persiste esta estructura en la vagina es de 16 a 24 horas (Jackson, 1968).

1.4.- Gestación y Parto

La gestación en el ratón dura entre 19 a 21 días. Se ha demostrado que los ovarios son indispensables para mantener la gestación ya que si procede una ovariectomía en cualquier etapa del ciclo, se producirá un aborto o la reabsorción de los embriones debido a que la placenta (discoidea y hemocorial) no produce la suficiente progesterona. Es por ello que en la gestación la influencia hormonal tiene un rol importante. La progesterona entre otras funciones es necesaria para el éxito del apareamiento y juega una función primordial en la ovulación, mientras que los estrógenos que actúan sinérgicamente con los progestágenos pueden asegurar el éxito de la gestación (Allen et al, 1968). La existencia de un cuerpo lúteo funcional se encuentra en ratones siempre y cuando haya ocurrido el apareamiento (o estimulación cervical). Este apareamiento produce una activación generalizada del sistema nervioso, incluyendo al hipotálamo quien promueve la liberación de LTH (hormona luteotrópica) por la pituitaria anterior que permite el desarrollo del cuerpo lúteo funcional en el ratón. Otras de las hormonas secretadas durante la gestación es la hormona placentaria que aparentemente es una de las más importantes para el mantenimiento de la gestación (Allen et al, 1968; Woerpel et al, 2007).

El crecimiento de los cuernos uterinos recién se hace visible a los 13 días de gestación, los embriones se disponen de manera uniforme en ambos cuernos y se separan a una distancia razonable y eso permite el desarrollo individual de cada uno de ellos. El potencial reproductivo es alto, siendo el número de crías entre 10 a 12 aproximadamente, disminuyendo el número de ellos a medida que la madre envejece (Woerpel et al, 2007).

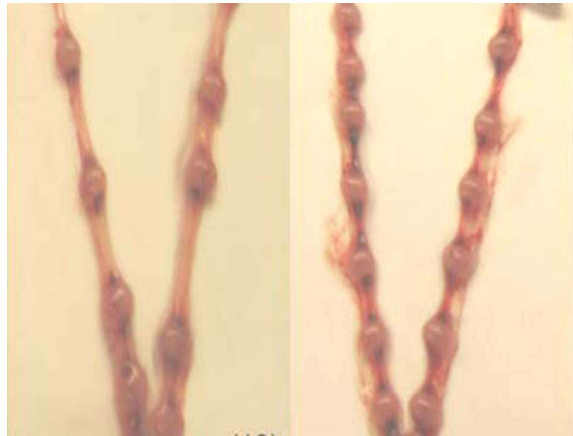


Figura 2: Sitios de implantación.

Foto original: (D'Souza et al, 2007).

1.5.-Periodo Pre-implantacional

La gestación es un proceso fisiológico que demanda grandes modificaciones, tanto a nivel funcional como estructural por parte del organismo femenino. Estos cambios se originan en respuesta a la fecundación y son cruciales para una exitosa implantación y posterior gestación.

En roedores luego de la fecundación, se desencadenan una serie de remodelaciones preparatorias para la implantación. Al primer día de gestación, la luz uterina se muestra amplia y ramificada, característica que varía hacia el día 2 de gestación, en donde exhibe una luz más regular y alargada sin presencia de ramificaciones. A este mismo tiempo, se aprecian diferencias entre las capas estromales. El estroma subepitelial, exhibe espacios extracelulares disminuidos, en comparación a la capa más profunda, esto debido principalmente a las características de los fibroblastos presentes en esta región. Entre el 3° y 4° día post coito se pueden observar diferencias entre estas poblaciones celulares (San Martín, 2003). En la capa subepitelial, en relación con las criptas de implantación, los fibroblastos se muestran más arredondados, perdiendo su forma alargada característica y exhibiendo espacios

extracelulares disminuidos, al contrario de lo que presenta el estroma profundo. En las zonas de ínter implantación se conservan las características morfológicas de los fibroblastos endometriales.

Desde el 1º día de gestación, se presenta un infiltrado leucocitario, compuesto principalmente por macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, productores de enzimas hidrolíticas, que degradan los componentes de la matriz extracelular (San Martín et al, 2003) ubicados principalmente en la región sub-epitelial del endometrio.

Además, en los primeros 3 días de gestación, se pueden observar cambios en el epitelio uterino, el cual comienza a adquirir una forma más alargada (San Martín et al, 2003), y orientando su eje mayor en dirección antimesometrial.

El útero es receptivo al embrión, solo en el día 4.5 después de la fecundación, luego, a partir del día 5.5 de gestación se hace refractario y no responde a la presencia del blastocisto. Esta receptividad se encuentra regulada por factores hormonales, estrógeno y progesterona, que otorgan un ambiente óptimo para la implantación. (Imakawa et al, 2004). Es necesario que exista una coordinación adecuada, entre la presencia de estas hormonas, para que la implantación proceda con normalidad. Si bien, el mecanismo de regulación aún no está caracterizado totalmente, la influencia del estrógeno y la progesterona, han sido estudiados por la supresión génica de los receptores de estas hormonas, donde las hembras homocigotas, que presentan esta supresión, se muestran estériles con diversos fracasos en el ámbito reproductivo (Imakawa et al, 2004).

Las modificaciones también ocurren en los vasos sanguíneos endometriales, donde al 3º o 4º día post coito, se pueden observar la división de las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Lunam and Rogers, 1981).

El aumento de la permeabilidad vascular, es un indicio más de las remodelaciones originadas en preparación a la llegada del blastocisto. Estos cambios son detectados en el 4º día de gestación, horas antes que ocurra la implantación, siendo las prostaglandinas, participantes fundamentales de este proceso, debido a que los niveles de esta molécula, se encuentran incrementados en los sitios de implantación (Kennedy, 2007). Los primeros indicios que vinculan a las prostaglandinas con el proceso preparatorio a la implantación,

fueron presentados por Horan en 1971, quien mostró los efectos inhibitorios de los antiinflamatorios no esteroideos sobre la síntesis de prostaglandinas antes de la implantación y su consecuente repercusión en la permeabilidad vascular endometrial. Estos resultados han sido apoyados por estudios posteriores, detallando que drogas, como la indometacina, retrasan o impiden el aumento de la vasculatura local del endometrio y por consiguiente la implantación del embrión (Kennedy, 1990, 1994).

1.6.- Implantación

El proceso de implantación en ratones comprende una serie de eventos complejos, dados a través de la aposición entre la capa del trofoblasto del blastocisto y el epitelio luminal uterino, permitiendo la adhesión e invasión del embrión en los tejidos maternos (Tan et al, 2005).

En ratones, el blastocisto se moviliza a través del oviducto, donde posteriormente, suele pasar un periodo de 24 a 48 horas suspendido en la cavidad del útero, previo a la implantación. Luego de permanecer en la cavidad uterina, orienta su pared trofoblástica hacia la superficie epitelial del endometrio. Durante este tiempo los blastocistos son distribuidos en los cuernos uterinos, en respuesta a los movimientos propios del miometrio. (Boving, 1971).

El embrión debe alcanzar un estado apropiado de desarrollo y de invasividad hacia el epitelio luminal del útero, a su vez, el útero debe estar receptivo hacia el blastocisto, que posteriormente se implantará. En roedores, este evento ocurre en la noche del día 4° de gestación y esta adhesión siempre ocurre en el polo antimesometrial del útero. La reacción de adhesión es precedida por el cierre del epitelio luminal, llevando al blastocisto en aposición con el epitelio luminal uterino. La adhesión del blastocisto coincide con el incremento de la permeabilidad vascular endometrial, seguido por la decidualización del estroma. Esta modificación en el endometrio ha sido definida como el momento en que se inicia la implantación. Se sostiene que el fracaso del

crecimiento uterino y diferenciación después de la adhesión del blastocisto, resulta en aborto espontáneo. (Hyun Jung Jade Lim and S.K. Dey, 2008)

Como se ha descrito anteriormente, la implantación requiere de cambios tisulares, celulares y moleculares necesarios para su normal desarrollo. (Paria et al, 2002; Dey et al, 2004). La implantación es un proceso que requiere de una secuencia coordinada de hormonas ováricas, siendo la acción coordinada de estrógeno (E2) y progesterona (P4) uno de los fenómenos necesarios para la preparación del endometrio en ratones, así como en humanos. En roedores el estrógeno aumenta en el día 1 de gestación equivalente a la formación del tapón vaginal (Dey et al, 2004), estimulando que las células epiteliales del útero proliferen.

La disminución del estrógeno genera la activación de la apoptosis de un gran número de células epiteliales uterinas. Al mismo tiempo el aumento de la progesterona genera la proliferación de las células del estroma uterino en los días sucesivos. Es por ello que los aumentos de estrógeno y progesterona determinan la receptividad del endometrio para la posterior implantación del blastocisto (Hyun Jung et al, 2008) y facilita las tres fases consecutivas, como son la aposición, adhesión e invasión del embrión.

La existencia de moléculas y receptores presentes tanto en las células del epitelio luminal, como en el embrión, indican la interacción mutua entre ambos componentes tisulares. Numerosos estudios muestran que la implantación exige la participación de numerosos factores de crecimiento y citoquinas involucradas en diferentes vías de señalización celular que, presumiblemente, están regulados de una manera espacio-temporal tanto en el embrión como en el útero (Tan et al, 2005).

Estas modificaciones morfológicas y funcionales del endometrio son necesarias para la implantación del embrión, las cuales son reconocidas en su conjunto como "*ventana de implantación*" período que dura aproximadamente unas pocas horas en el día 4 de gestación (Tan et al, 2005). La ventana de implantación se considera como el período en que el endometrio ofrece la máxima receptividad al embrión, a través de un diálogo paracrino complejo, entre la madre y el embrión. Entre estos cambios destacan las modificaciones en el glicocalix de las células epiteliales de la superficie luminal, secreción de factores de crecimiento y la expresión de moléculas relacionadas con la adhesión del blastocisto y la invasión del estroma (Glasser and Clark, 1975).

El embrión se adhiere mediante moléculas de heparan sulfato a los receptores expresados en la membrana apical del epitelio uterino durante la fase receptiva. El inicio de la implantación requiere que el trofoblasto se adhiera el lado apical de su membrana plasmática hacia la superficie apical de la membrana plasmática del epitelio uterino. (Carson et al.1990). Las células epiteliales comienzan a modificar su apariencia volviéndose mas aplanadas y siendo sus microvellosidades reemplazadas por proyecciones bulbosas llamadas pinopodos (Lopata et al. 2002; Murphy, 2000).

Durante esta etapa se expresan moléculas que juegan un rol importante y complementario a todo el proceso hormonal presente, es así como el Factor inhibitorio de Leucemia (LIF), una citoquina pleiotrópica, que regula diversas funciones celulares dependiendo de sus microambientes (Hilton, 1992; Metcalf, 1992, 2003; Shellard et al, 1996; Dani et al, 1998), modula la proliferación y diferenciación de los fibroblastos endometriales. Este factor experimenta un cambio bifásico durante la gestación, el primer día se expresa en el epitelio glandular del endometrio, luego comienza a declinar, pero en la mañana del 4° día de gestación antes del inicio de la implantación se expresa fuertemente en las células epiteliales glandulares (Imakawa et al, 2004), y luego en las células del estroma que rodean al blastocisto determinando el inicio de la implantación en la noche del día 4° de gestación (Vogiagis et al 2006; Haengseok Song and Hyunjung Lim 2006).

Finalmente LIF es secretado en el interior del lumen uterino siendo fundamental para el proceso de implantación en roedores y aparentemente también en humanos (Song et al, 2000).

El receptor de LIF (LIFR) es altamente expresado en el epitelio luminal y en menor cantidad en las glándulas durante la adhesión del trofoblasto, mientras que gp130 es expresada en el epitelio luminal, y en menor cantidad en el estroma y en las glándulas durante este periodo. LIFR y gp130 son co-localizadas en el epitelio luminal promoviendo un sitio de unión para LIF. En el día 6° y 8° de gestación LIFR fue predominantemente localizado en la zona decidual primaria (PDZ), en contraste el RNAm de gp130 fue detectado en el epitelio glandular en el día 1° de gestación, siendo su señal muy baja e indetectable en el día 2° y 3°. En el 4° día, gp130 fue limitada primariamente a las glándulas y luego moderadamente en el estroma (Song and Lim, 2006).

Se sugiere que LIF induce quizás la heterodimerización de LIFR y gp130 promoviendo la señalización necesaria para la unión del blastocisto con el epitelio luminal. (Song and Lim, 2006).

El complejo receptor LIF-gp130 da paso a la activación de las vías de transducción de señales, como ocurre con el activador de la transcripción (STAT) (Boulanger et al, 2003; Shoichi et al, 2008), específicamente Stat 3 en el ratón. Stat 3 se considera un factor de transcripción que se activa específicamente en el embrión de ratón *in vivo*. Stat 3 es inducida por la activación de LIF por sí sola, por lo que su localización está restringida en el día 4° de gestación en el epitelio luminal en ratones, y coincide con el inicio de la receptividad uterina, lo que indica que la interacción de estos dos componentes son importante para la implantación del ratón (Cheng, et al 2001).

El estrógeno es un requisito necesario para la inducción LIF en el útero de ratón. (Song et al, 2000). LIF se expresa en el útero del ratón de manera bifásica durante la implantación (Song et al, 2000), por lo que puede ejercer su función de dos maneras: En primer lugar, puede actuar de una manera sinérgica con otras citocinas en la adhesión e implantación del embrión. En segundo lugar, pueden actuar sobre el epitelio endometrial de una manera paracrina al aumentar la expresión de determinados factores de crecimiento pertenecientes a la familia de IL-1 y el sistema factor de crecimiento vascular entotelial (VEGF), moléculas que actúan en el trofoblasto promoviendo la vinculación de células y el desarrollo del embrión. La IL-1 se ha considerado relevante en la regulación de la comunicación entre el blastocisto y el endometrio (Arici et al, 2006).

En ratones y otras especies la expresión de la mucina – 1 (MUC -1) se encuentra disminuida en la superficie epitelial del endometrio uterino al momento de la implantación, por lo que cuando se expresa intensamente se compromete la implantación del embrión (Perrier et al, 2002). Así los co- factores de crecimiento y la expresión de genes son esenciales para el normal desarrollo de la implantación embrionaria. El gen Hoxa -10 es expresado en el endometrio uterino y regulado por E2 y P4, sus altos niveles son encontrados en el endometrio durante el periodo de la “*ventana de implantación*”. Este regula a su vez la expresión de la sub unidad beta -3 de integrina, molécula que puede participar en la adhesión del trofoblasto al epitelio luminal uterino.

Otros genes expresados en el trofoblasto del blastocisto, son AP-2, Mash2, Hand1 y Ets-2 que están relacionados con el desarrollo del trofoblasto en el periodo pre y post implantacional. El factor Eomes es solo expresado en el trofoectodermo durante la implantación, indicando que Eomes puede ser requerido para la diferenciación de las células del trofoblasto, participando en el proceso de implantación embrionaria (Imakawa et al, 2004).

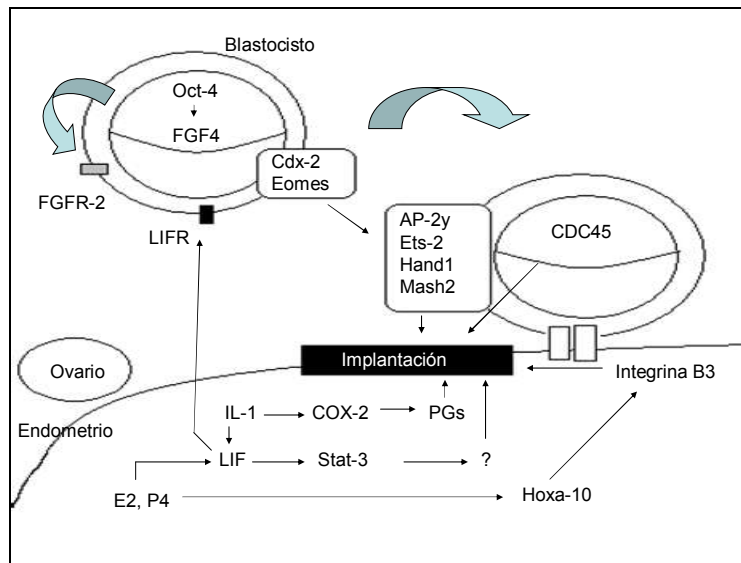


Figura 3: Esquema modificado de los genes y transcritos expresados durante la implantación en ratones.

Esquema original: (Imakana et al, 2004)

1.7.- Decidualización

Durante la implantación embrionaria, el estroma endometrial sufre modificaciones en la forma, organización y metabolismo de la población de células residentes del tejido conectivo estromal del endometrio, lo cual dará paso a una nueva estructura denominada decidua. (Abrahamsohn and Zorn, 1993). Este proceso es de gran relevancia, puesto que es mediante esta nueva organización celular por la cual, progresará la implantación del blastocisto y se establecerá la comunicación materno-fetal.

La decidualización, en roedores posee 5 características importantes a considerar: 1) la población fibroblástica debe ser preparada apropiadamente por esteroides ováricos; 2) en condiciones fisiológicas, la decidualización transcurre exclusivamente alrededor del sitio de implantación embrionaria, dejando zonas endometriales entre embriones en las cuales no ocurre reacción; 3) es posible ser inducida artificialmente en ausencia de embrión, formando un tejido similar a la decidua original; 4) Existe un periodo determinado en el cual es posible inducir la gestación o la pseudogestación; 5) Da como resultado la morfogénesis de un nuevo tejido, en un mamífero adulto normal (Abrahamsohn and Zorn, 1993).

En roedores, la transformación decidual se inicia en la región antimesometrial y subepitelial, rodeando las criptas de implantación (Mossman et al, 1987), luego comienza a extenderse, antimesometrialmente hacia el tejido miometrial, pudiendo ser visible también en la región mesometrial. La primera área decidual es la capa estrecha que se encuentra rodeando al embrión, denominada decidua primaria, o zona decidual primaria (Parr and Parr, 1989).

Una de las características fisiológicas más relevantes de la zona decidual primaria, es su aparente avascularidad. Si bien, esta zona presenta capilares y venulas, estos se encuentran colapsados y no contienen sangre (Roger et al, 1982; Christoferson and Nilsson, 1988). Se ha establecido también, el rol que desempeñan las células deciduales, las que pueden actuar como barrera ante el paso de macromoléculas, otorgando así, protección al embrión ante la exposición a microorganismo, IgG maternas y/o células inmunocompetentes (Parr and Parr, 1989).

Conforme avanza la decidualización, se puede observar que al 6° día de gestación, el trofoblasto entra en contacto con la decidua. En este periodo, las células deciduales se encuentran aumentadas tanto en volumen, como en tamaño, lo que se traduce en una amplia área de ocupación decidual (figura 4).

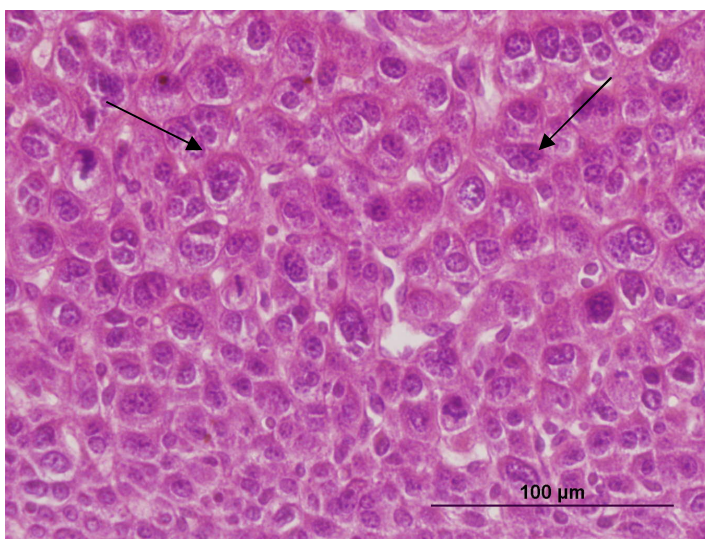


Figura 4: Corte histológico del área antimesometrial de útero de ratón día 7.5 de gestación. Se observan células de gran tamaño denominadas células deciduales maduras (flechas). Hematoxilina –Eosina, 60x.

De este modo, las células transformadas completamente, denominadas células maduras son voluminosas y con grandes núcleos, provocando así, una disminución de los espacios intercelulares, los cuales son características de la zona que rodea al embrión, en el polo antimesometrial de útero (San Martín et. al, 2003)

Durante la decidualización las células presentan un evidente aumento de retículo endoplásmico granular y Complejos de Golgi, aumento de mitocondrias, lisosomas, microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Las células deciduales establecen uniones de tipo Gap y adherens. Las primeras células deciduales, son observadas en el día 5° de gestación, alcanzando su máximo desarrollo en el 7° día, en los sitios de

implantación en el cual se observa diferentes poblaciones celulares que conforman 3 regiones diferentes:

a) Células deciduales maduras (CDM): región de decidua madura: región más próxima al embrión con células polipoides y/o binucleadas con drástica reducción de los espacios intracelulares.

b) Células pre-deciduales (CDP): región de la decidua madura, posee características morfológicas de sus células intermedias, entre las células de la decidua madura y fibroblastos del estroma no decidualizado.

c) Células no decidualizadas (CND): región más externa que limita con el miometrio. Constituida por fibroblastos típicos, espacios amplios y ocupados por gran cantidad de matrix extracelular (figura 5).

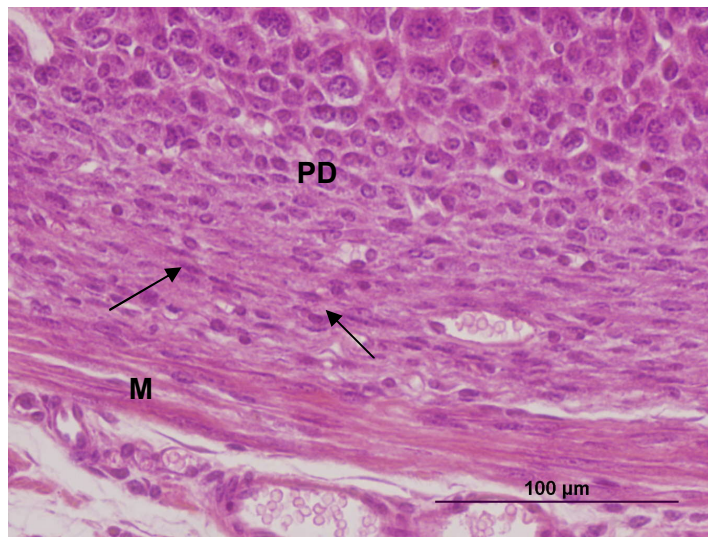


Figura 5: Corte histológico del área antimesometrial uterina de ratón, día 7.5 de gestación. Se observa capa muscular interna (M), células no decidualizadas (flechas) y la población celular pre decidual (PD). Hematoxilina –Eosina, 60x.

La decidualización está estrechamente relacionada a modificaciones del ambiente extracelular endometrial, siendo de gran utilidad analizar su comportamiento molecular

frente a variadas condiciones a la que se expone el medio , durante una gestación normal o patológica.

1.8.- Matriz extracelular

Para el normal funcionamiento en el compartimiento intracelular, es necesario contar a su vez con una alta organización extracelular, tanto para proveer un soporte a las células, como también facilitar la comunicación entre las diferentes poblaciones celulares.

Este espacio definido como matriz extracelular (MEC), consta de una estructura organizada de material proteico y polisacáridos que se encuentra rodeando las células y se genera a partir de la secreción celular local (Finn Geneser, 2000). Puede encontrarse en ocasiones como una composición escasamente definida o bien, presentar una forma estructural muy bien constituida, cuya delimitación puede ser observada en el microscopio de luz (Karp G, 1998). En algunos tejidos la MEC es muy abundante, sin embargo, en otros sectores las células se encuentran estrechamente unidas, a tal punto que la matriz se torna casi inexistente. Tiene a su vez, la capacidad de adoptar diversas características que varían dependiendo de la función tisular que se ejerza. De este modo la MEC, puede calcificarse y formar estructuras rígidas como huesos y dientes o tornarse transparente para formar parte de tejidos translucidos como la cornea.

La MEC se encuentra compuesta principalmente por colágenos, glicoproteínas y proteoglicanos, distribuidos y ensamblados en una compleja red, involucrada muy cercanamente con la superficie celular. Según las características de sus componentes, la MEC se puede dividir en dos secciones; una parte, está constituida por la sustancia fundamental formadas por moléculas de glicosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos, cuyas características aniónicas les permiten formar geles hidratados que otorgan a la matriz, fluidez, resistencia a las fuerzas de compresión y la capacidad de difundir diversos metabolitos. La segunda parte corresponde a elementos sólidos, compuestos por fibras, principalmente colágenas y componentes adhesivos que le conceden resistencia a la tracción (Alberts et al, 2000).

Dentro de su rol principal, la MEC está encargada de regular el desarrollo y la función de la mayoría de las células de nuestro organismo. Provee orden en el espacio extracelular y esta involucrada en varios ámbitos, relacionados con el establecimiento, separación y mantenimiento de tejidos y órganos. Destacan también la presencia de ligandos, encargados de activar cascadas de señalización hacia las células, regulando procesos como proliferación, supervivencia y diferenciación celular. (Kneis & Vale, 1999).

En el endometrio, la MEC esta relacionada principalmente con dos funciones; la primera es de tipo estructural, proporcionando soporte al tejido. La segunda función, recae en la interacción con la población de células residentes en el útero y del embrión, vía integrinas u otros receptores; mediando adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular (Aplin, 2002). Durante la gestación, las demandas estructurales son diferentes, produciéndose así, un cambio provisorio durante esta fase, retornando a su estado, luego de concluido el periodo de gestación.

Debido a los diferentes procesos biológicos, los componentes de la MEC deben sufrir recambios necesarios para el correcto funcionamiento de sus componentes, como es el caso del remodelamiento que ocurre en el útero durante la gestación. Esta función esta a cargo de una familia de enzimas, denominadas metaloproteinasas (MMPs, del inglés matrix metalloproteinases) las que se dividen según su modo de acción en dos grupos: unas son las serinas proteasas, que median su actividad a través de un residuo de serina que posee su centro activo; y las metaloproteasas, cuya acción depende de la unión a Calcio o Zinc. Las MMP son sintetizadas como zinoporas (inactivas) y su activación varía según el tipo de enzima interviniendo otras proteasas o las propias MMP (Chen et al, 2007).

Ambas enzimas son secretadas por las células del endometrio y del trofoblasto, siendo reguladas genéticamente por diversos factores, como citoquinas, factores de crecimiento y hormonas esteroideas, cuya función principal es la degradación de la MEC, y por ende, provocar un remodelamiento de esta (Zang and Salamonsen, 1997). Un factor involucrado en la estimulación de MMPs es el EMMPRIN. Esta molécula glicosilada transmembranal, es una inductora de MMPs que actúa estimulando a los fibroblastos para producción de MMPs, induciendo la producción de MMP -1, MMP-3 y MMP-2. Zucker et al, en el 2001, involucró a EMMPRIN en los procesos tumorales, donde se produjeron altos

niveles de MMPs que degradaban la MEC, facilitando la invasión tumoral (Chen et al, 2007).

Estudios realizados sobre MMP en periodo de gestación realizados por Waterhouse *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 1996; Leco *et al.*, 1996; Das *et al.*, 1997, muestran la expresión de 2 tipos principales de metaloproteinasas, MMP -2 y MMP-9 en el endometrio durante la implantación (Bany et al, 2000).

La MMP-9 se encuentra expresada durante la implantación en las células gigante del trofoblasto que rodean al embrión hacia el día 5.5 de gestación, prosiguiendo en los días 7.5 y 8.5 en la decidua, incrementándose paralelamente a la diferenciación de las células gigantes del trofoblasto. Por su parte, las MMP -2 fueron detectadas en las zonas deciduales no diferenciadas. (Alexander et al, 1996).

Las MMTs están reguladas a su vez por inhibidores de proteasas, los inhibidores de las metaloproteasas (TIMPs) y los inhibidores de las serinas proteasas, llamados serpinas. Ambos median su acción uniéndose a la enzima provocando un bloqueo de su actividad (Alberts et al, 2000). Existen diversos tipos de TIMPs, de los cuales TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3, son expresados en el útero. Si bien la MMP-9 y la TIMP-3 se expresan en altos niveles en el área de peri-implantación, también es posible observar MMP-2, TIMP-1 y TIMP-2 en una extensa e indiferenciada áreas decidual (Alexander et al, 1996).

Estudios realizados en estroma endometrial de ratón (Bijovsky et al, 1992) detallan que en la gestación de estos animales, las primeras señales de remodelación de la MEC fueron observadas en el segundo día de gestación en los fibroblastos endometriales cuyas vacuolas contenían fibras de colágeno. Los autores analizaron la actividad de fosfatasa ácida de estos fibroblastos y corroboraron que muchas de estas vacuolas correspondían a lisosomas, sugiriendo así que la fagocitosis y digestión de colágeno intracelular, son eventos probablemente relacionados con la remodelación del estroma endometrial como preparación para la decidualización e implantación embrionaria.

Sumados a la remodelación de las fibras colágenas, glicoproteínas como fibronectina, laminina y tenascina, también experimentan modificaciones las cuales de una u otra manera son eventos necesarios para la remodelación del endometrio, la decidualización y la implantación del embrión.

2. Moléculas de Matriz Extracelular

2.1.- Colágeno

El colágeno pertenece a la familia de proteínas fibrilares que se encuentran en todos los organismos pluricelulares, siendo la principal proteína fibrosa insoluble de la MEC y del tejido conectivo. Es considerado como el componente más abundante de la piel y huesos, correspondiendo al 25% de la masa total de las proteínas. Su secreción es llevada a cabo por las células del tejido conjuntivo así como por otros tipos celulares. Interactúan con la MEC tanto mecánica como químicamente, lo que produce notables efectos sobre la arquitectura tisular. Son proteínas que experimentan innumerables alteraciones post-traduccionales siendo procesadas al interior de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso (RER) y también en el medio extracelular. Es por ello que su síntesis es más compleja que la mayoría de las proteínas, lo que explicaría el elevado número de enfermedades resultantes de la síntesis defectuosa del colágeno (Alberts et al, 2000).

Se han identificado unas 25 cadenas alfa diferentes, cada una codificada por un gen distinto, expresando diversas combinaciones de estos genes en los diversos tejidos. Aunque se pueden formar 10.000 cadenas α hélice se han identificado solo 20. Aquellos identificados en el tejido conjuntivo son los tipos (I, II, III, V, XI), siendo el tipo I el principal de la piel y huesos. Estas cadenas encontradas en el tejido conjuntivo también son llamadas colágenas fibrilares o colágenos formadores de fibrillas. Estas fibras cuando son secretadas al espacio extracelular se organizan en polímeros llamados fibrillas de colágeno (Alberts et al, 2000).

Las moléculas de colágeno se constituyen por la unión de tres polipéptidos o cadenas alfas, con una longitud total de 300 nm. La cadena contiene alrededor de 1000 residuos de aminoácidos y se estructura como una hélice levógira de tres aminoácidos por vuelta, de los cuales el tercero siempre es una glicina. La glicina es considerada como el único aminoácido que por su tamaño reducido puede ocupar la región central de la triple hélice y cuya característica le otorga la función de mantener el denso empaquetamiento de las tres cadenas alfa necesarias para la formación de la super hélice

de colágeno, por lo tanto cada cadena está constituida por la siguiente secuencia: Gli-X-Y, donde X e Y pueden ser cualquiera residuo aminoacídico, pero habitualmente son ocupados por X = prolina e Y= hidroxiprolina; es por ello que las cadenas de colágeno son ricas en prolina e hidroxiprolina. La prolina es un aminoácido que tiene por función dentro de cada cadena estabilizar la conformación helicoidal. La hidroxiprolina raramente se encuentra en otras proteínas y parece ser que en la colágena los grupos hidroxilos de estos aminoácidos forman puentes de hidrógenos intercatenarios de manera que estabilizan la hélice trimérica.

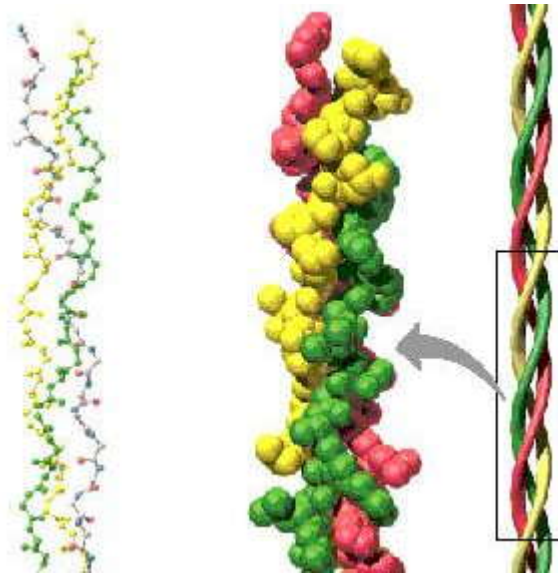


Figura 6: Molécula de colágeno en su conformación de triple hélice.

Esquema original: (www.ferato.com/wiki/index.php/Col%C3%A1geno.)

La síntesis del colágeno es iniciada en el citoplasma y en cada una de las cadenas polipeptídicas, es sintetizada por los ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico, siendo después traslocadas al lumen del mismo en forma de grandes

precursores (procadenas α), presentando aminoácidos adicionales (propéptidos) en los extremos amino y carboxilo terminales. En el retículo endoplásmico los residuos de prolina y lisina son hidroxilados mediante enzimas que requieren Hierro y vitamina C como cofactor, de ahí algunos suelen ser glucosilados en el aparato de Golgi. Tras su secreción, los propéptidos de las moléculas de procolágeno son degradados mediante proteasas convirtiéndolas en moléculas de tropocolágeno asociándose en el espacio extracelular formando las fibrillas de colágeno. La formación de fibrillas está dirigida, en parte, por la tendencia de las moléculas de procolágeno a autoensamblarse mediante enlaces covalentes entre los residuos de lisina, formando un empaquetamiento escalonado y periódico de las moléculas de colágeno individuales en la fibrilla. Quienes participan también en la formación de la molécula de colágeno son los residuos de lisina y de hidroxilisina cuando estos son glicosilados por la enzima lisil oxidasa, formando puentes cruzados entre los cortos segmentos no helicoidales de los extremos de la molécula de colágeno. Si es bloqueada la formación de estos enlaces cruzados, la tensión de las fibrillas disminuyen drásticamente provocando la fragilidad de los tejidos que están constituidos por colágenas y por lo tanto la pérdida de la continuidad de estas estructuras (Alberts et al, 2000).

2.1.1- Tipos de colágenos

Colágeno I

Sintetizado como un procolágeno heterodimérico que comprende dos cadenas alfa 1 y una alfa 2. Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras colágenas mayores. Está formada fundamentalmente por fibroblastos, pero también por condroblastos y osteoblastos. Predomina en el hueso, en los cartílagos, en la dermis y en los tejidos intersticiales. Su función principal es la de resistencia a la tracción. Son las fibras más gruesas, abundantes, y las más ampliamente distribuidas, siendo la estructura más representativa del tejido conectivo. (Spiess K and Zorn T, 2006).

Colágeno tipo III

Es un colágeno que aparece con mucha frecuencia vinculado al músculo liso y es fundamentalmente el colágeno de las vísceras, aunque también está presente en mayores cantidades en la dermis, sobre todo alrededor de fibras nerviosas y los vasos sanguíneos. Parece un constituyente importante de las fibras de 50 nm que se han llamado tradicionalmente *fibras reticulares*. Desde el punto de vista de la composición de los polipéptidos tiene tres cadenas denominadas alfa 1 (III), con una disposición de aminoácidos propia, donde predomina la hidroxiprolina y donde además aparece un aminoácido que no es muy común en otros colágenos, que es la cistina. Se sintetiza como un pro.-colágeno homotrimérico que comprende tres cadenas pro-alfa 1 idénticas. Su función es la de sostén de los órganos expandibles.

Colágeno tipo V

El colágeno tipo V es un miembro de la subclase de fibras de colágeno la cual tiene en común con las otras fibras un dominio triple helicoidal compuesto de ininterrumpidas secuencia de tripletes con su conformación Gli-X-Y. Este es cuantitativamente menor que el colágeno tipo I en los tejidos no cartilagosos. (Wenstrup et al, 2004). Su síntesis se da en ambas isoformas (heterotrimerico y homotrimerico). En su forma homotrimerica es encontrado en el endometrio de ratones presentándose significativamente en el endometrio al séptimo día de gestación. Se ha aislado de la placenta humana, estrato del pelo y se expresa en menor cantidad en su forma heterotípica.

2.1.2-Distribución y Expresión de Colágenos I, III y V.

Los diferentes tipos de colágeno están ampliamente distribuidos en los tejidos conectivos de animales, comenzando usualmente allí su expresión coordinada y formación de fibras heterotípicas. Las gruesas fibras de colágenos de la decidua madura están formadas por fibras heterotípicas compuestas por colágenos tipo I III y V. Rápidamente la variación en la expresión de estos colágenos, particularmente del colágeno tipo I en el estroma endometrial en gestación, refleja la intensa remodelación de

los tejidos uterinos durante el embarazo en el tiempo en que se forma la decidua (Fleishmyer et al, 1990; Spiess and Zorn, 2006).

Los colágenos tipo I, III y V se expresan mayormente en el séptimo día de gestación, periodo en que la decidua antimesometrial alcanza su mayor desarrollo. La gran expresión de estos colágenos se observaron en la región predecidual, donde la presencia de sus células que la conforman posee una gran actividad metabólica específicamente entre célula y célula durante la gestación (Oliveira et al, 1991). Estos tres tipos de colágenos se observaron claramente disminuidos al octavo día, en áreas donde hubo degeneración decidual, mientras que se mantuvieron en la periferia del estroma no decidualizado, particularmente alrededor de los vasos sanguíneos y glándulas.

Durante la implantación del embrión en el ratón, un inusualmente rápido engrosamiento de fibrillas de colágeno, ocurre en la decidua (Alberto-Rincón et al, 1989; Zorn et al, 1986), mientras que en la zona no decidualizada cerca del miometrio, las fibrillas permanecen finas a lo largo de la gestación. Debido a esta característica particular, la decidua se puede considerar un excelente modelo para el estudio de la fibrillogénesis de colágeno. Varias líneas de estudio han sugerido que los pequeños proteoglicanos ricos en leucina Decorin, Luminican, Fibromodulina y Biglican, son importantes reguladores del crecimiento del colágeno en las fibrillas (Ameye and Young, 2002; Lozzo, 1997, 1999).

Tanto Biglican como Decorin pueden desempeñar un rol fundamental en la determinación del espesor de las fibrillas de colágeno en las zonas decidualizadas del endometrio en el ratón (San Martin and Zorn, 2003), Biglican está asociado con fibrillas gruesas de colágeno en la deciduas de ratón (San Martin and Zorn, 2003). Decorin es un proteoglicano de intersticio que participa tanto en la fibrillogénesis de colágeno como en la proliferación celular, ambos aspectos fueron observados durante la reacción decidual, y es en el ratón donde existe un notable aumento del diámetro de las fibrillas de colágeno en la región de las células deciduales, región en la que no se observó Decorin. En esta especie, este proteoglicano estaba asociado con las fibrillas finas de colágeno presentes en abundancia en las regiones no decidualizadas del útero (San Martin and Zorn, 2003). Está también presente la asociación de otros factores, como son los distintos tipos de colágenos que se muestran insertos en la fibra de colágeno, y que además participarían

del engrosamiento de las mismas, siendo demostrada por varios autores (Canty and Kadler, 2005).

2.1.3-Colágenos I, III, V y Gestación

El colágeno tipo I a partir del quinto día de gestación se expresa de manera intensa y continua. Su reactividad no se observa en la membrana de Reichert's y en la decidua madura alrededor de las criptas de implantación (Clark et al, 1993). Sin embargo su abundancia fue delimitada a la predecidua y región no decidualizada. A medida que avanza la gestación el colágeno va desapareciendo en la predecidua, y en el estroma no decidualizado se mantiene en niveles bajos. En el séptimo día en las regiones decidualizadas aparece abruptamente y en gran cantidad. Al día siguiente se genera una involución paulatina en la decidua madura y en los filamentos entre las células deciduales, determinándose una mayor disminución en la región predecidual.

El colágeno tipo III se ha observado alrededor de las células endometriales y en toda la región endometrial y antimesometrial se observa una red extensa de este colágeno (madura, predecidua y estroma no decidualizado). Su expresión posee una variación bien marcada tanto en la decidua madura como en la predecidua (Clark et al, 1993). Este colágeno es el único que se presenta en la interface materno-fetal en el periodo en que ocurre la implantación del blastocisto sugiriendo un rol específico en la adhesión e invasión del trofoblasto. El colágeno tipo III se expresa intensamente y mantiene su condición a medida que avanzan la gestación. Es alrededor de los vasos sanguíneos y glándulas uterinas que se determina su reactividad (Spiess and Zorn, 2006). Hacia el quinto día de gestación hay una intensa marcación en las membranas extraembrionarias, detectándose un fino acoplamiento de fibras distribuidas entre las células en la decidua madura y en la predecidua, este disminuye hacia la región no decidualizada y a medida que transcurren los días la reactividad baja y se posesiona en las membranas extra-embriónicas. La presencia de este colágeno en el estroma decidualizado va en aumento, siendo altísimo durante el séptimo día. El engrosamiento de sus fibras se hace presente en la decidua madura y en las células predeciduales mientras que en la región no decidualizada se caracteriza por expresar delgadas fibras que rodean a los husos formados por fibroblastos endometriales. Llegado al octavo día de gestación

se produce una involución de las células deciduales generando una desorganización en las células y en la MEC que rodea al estroma endometrial entorno al embrión, esto conlleva a una disminución del colágeno en la predecidua y permanencia de delgadas fibras en la región no decidualizada (Spiess and Zorn, 2006).

Otro colágeno importante durante la gestación en roedores es el tipo V, cuya característica principal es de mantenerse asociado a diferentes membranas basales (Madri et al, 1982). Durante el quinto y sexto día, este colágeno está ausente en la decidua madura y en la predecidua. Se hace presente por primera vez hacia el séptimo día, como un conglomerado de fibras gruesas alrededor de las células deciduales y rodea como una delgada red fibrosa a las células y vasos sanguíneos y es a partir del octavo día que vuelve a disminuir en el estroma decidualizado, pero permanece como fibras delgadas en la MEC del estroma no decidualizado, y en los vasos sanguíneos. Estudios del colágeno tipo V en la decidua de humano en embarazo normal y abortos espontáneos sugiere que este tipo de colágeno jugaría un rol en el mantenimiento del embarazo. Una disminución en la expresión de este tipo de colágeno se ha asociado a abortos espontáneos (Iwahashi and Nakano, 1998).

2.2- Fibronectina

La fibronectina, es una glicoproteína adhesiva, que constituye uno de las principales componentes de la MEC (Kneis and Vale, 1999). Su principal función en la matriz, es la fijación de las células a todas las matrices que contienen colágeno fibrilar (I, II, III y V). Este carácter adhesivo le permite además, regular la morfología celular, migración, diferenciación y organización del citoesqueleto (Lodish et al, 2002).

En el organismo, se encuentra en forma soluble en el plasma como dímero e insoluble como multímeros de alto peso molecular, organizados en un componente fibrilar ubicado en la MEC (Lucena et al, 2006).

La fibronectina, está formada por 2 subunidades de 220 KDa aproximadamente, unidas por puentes disulfuro. Cada subunidad está compuesta en su mayoría, por la repetición de tres tipos de secuencia (I, II, III) que a su vez forman dominios de tipo estructural y funcional especializados en la unión a la superficie celular o a receptores de I tipo integrinas. Además, cada cadena polipeptídica que la conforma contiene; sitios de enlace para diversos componentes de la MEC de los que destacan, colágeno y glucosaminoglicanos y sitios de enlace en la superficie celular, que mantienen estable la unión entre la MEC y la célula (Karp G, 1998).

En la región central se encuentra un dominio de unión a la célula, el cual contiene la secuencia: Arginina (R), glicina (G) y ácido aspártico (D). Este dominio RGD, sitio reconocido por integrinas, tiene importancia en la capacidad adhesiva de esta molécula. Esto ha sido demostrado mediante compuestos formados por péptidos sintéticos, con la secuencia RGD, los que ejercen un efecto inhibitorio adhesivo a la fibronectina, mostrando clara competencia por el sitio de unión de diferentes tipos celulares como: fibroblastos, células epiteliales y plaquetas. Este dominio participa a su vez en la migración celular y durante procesos del desarrollo (Lucena et al, 2006).

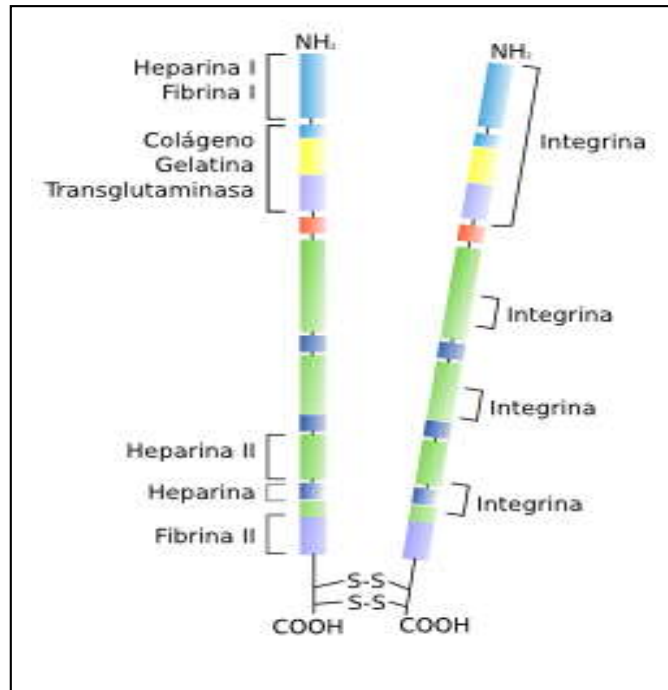


Figura 7: Esquema de una molécula de fibronectina. Está formada por dos cadenas de aminoácidos unidas por la zona próxima al extremo carboxilo por puentes de sulfuro. Se indican los dominios de la proteína que interaccionan con otras moléculas produciendo adhesión. (Modificado de Pankov 2002).

Esquema original: (www.uvigo.es/mmegias/5-celulas/2-componentes_glucoproteinas.php).

2.2.1-Fibronectina y decidualización

Durante el período de peri-implantación en los días 4.5 – 5.5, esta molécula se presenta de forma abundante en la MEC del endometrio de ratón. Mientras el desarrollo procede, la fibronectina se acumula en la matriz bajo la membrana basal y subyacente a la zona de conversión estromal (Rider et al, 1992; Slater and Murphy, 1999; Armant, 2005). Estudios realizados en decidua de ratón al día 7 de gestación, (Babiarz et al, 1996) revelaron consistentes niveles de síntesis y depósito de fibronectina, los que indicarían su participación durante la implantación del blastocisto, debido a que esta molécula tiene la capacidad de modular tanto, la actividad proteasa, como la adhesión mediante integrinas presentes en las células trofoblásticas.

En un estudio *in vitro*, (Babiarz et al, 1996) se caracterizó la expresión de fibronectina durante la decidualización en ratones mediante inmunofluorescencia en cultivos decidualizados, mantenidos en un medio libre de fibronectina. Las primeras expresiones de esta molécula se detectaron a las 24 horas en los cultivos, los que fueron incrementando su depósito en un periodo de 96 horas. Alrededor de las 72 horas, se observó que la acumulación de fibronectina producía estructuras gruesas de fibrillas extracelulares. En los cultivos más superficiales, la densidad de las fibras no se incrementó, pero se observó que a las 48 horas de cultivo muchas de las células estromales exhibían una red escasa de delgadas fibras de fibronectina alineadas con el eje celular.

En los cultivos obtenidos del día 7.5, predominó una población de células estromales largas, aplanadas, con morfología representativa de la región mesometrial *in vivo* (Pippard, 1987; Stewart and Muhktar, 1988; Babiarz et al, 1996). En estas condiciones, la región mesometrial, tanto de ratas como ratones, expresan bajos niveles de fibronectina hasta el día 10 de desarrollo, en el que se observa como un fino patrón fibrilar. (Glasser et al, 1987; Farrar and Carlson, 1992; Rider et al, 1992)

Es por estas razones, que se sugiere la participación importante de fibronectina, jugando un rol en conjunto con el citoesqueleto, ya sea estableciendo o manteniendo los cambios celulares originados durante las fases de diferenciación estromal.

2.3- Tenascina

Las interacciones célula-célula y célula-matriz son importantes en la regulación del normal desarrollo de los organismos multicelulares. Las células y tejidos perciben su ambiente por receptores en la superficie celular quienes ligan células vecinas con moléculas de la MEC. Estas interacciones controlan el comportamiento celular y su morfología, además de influir sobre el crecimiento y diferenciación de estas mismas. (Chiquet and Chiquet, 2003, Jones and Jones, 2000). La tenascina (TN) es parte de una gran familia altamente conservada de glicoproteínas oligoméricas encontrada en la MEC de los vertebrados (Sage et al, 1991; Michie and Head 1994, Hsia and Schwarzbauer, 2005). Está asociada con el desarrollo y crecimiento en los procesos fisiológicos y patológicos, debido a su interacción con otras moléculas de la MEC y con otras células (Thesleff et al, 1992).

Se constituye por seis subunidades unidas por puentes disulfuro (Vaquival, 1990) conformada por 6 brazos que emanan de una partícula globular central de aprox. 6 nm de diámetro. Estos brazos son largos, flexibles como los de la fibronectina circulante, pero presentan características diferentes. Cada brazo mide 87 nm de longitud, lo cual permite extenderse a una distancia de 150 nm, su peso promedio es de 190 a 320 Kda dependiendo del tejido y de la especie analizada (Lukina, 1991). Se han descrito diferentes subtipos entre los que se encuentran: la TN-C, TN-R, TN-W, TN-X y TN-Y, localizados en diferentes tejidos (Jons et al, 2000). El primer subtipo aislado en tejido humano fue la tenascina C (TN-C) (Chiquet-Ehrisman et al, 1988). La estructura primaria de la familia de las TNs tiene en común una secuencia que se repite consecutivamente, estos son: repeticiones en la región amino terminal, repeticiones del factor de crecimiento epidermal (EGF), repeticiones de fibronectina tipo III y un dominio globular en la región carboxilo terminal (Henry and Schwarzbauer, 2005).

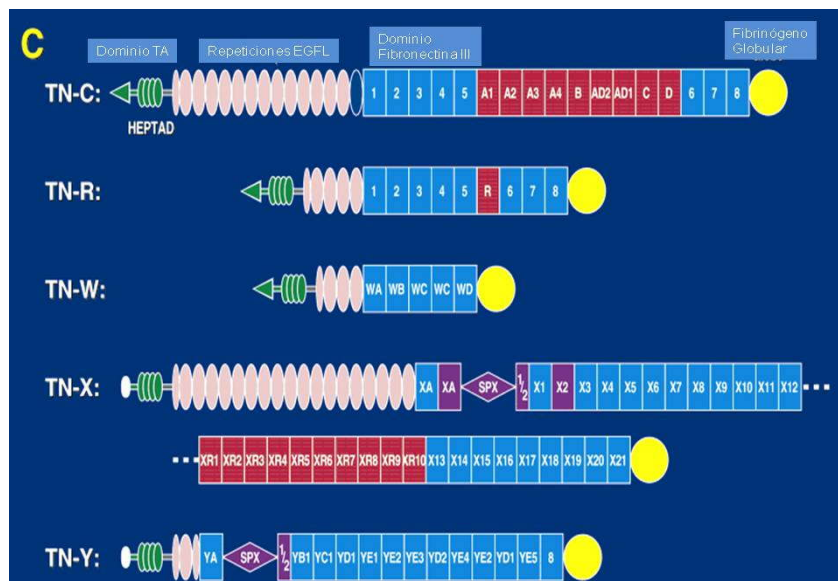


Figura 8: Diagrama esquemático de las cinco formas existentes de Tenascina, TN-C; TN-R; TN-W; TN-X; TN-Y.

Esquema original: (Revisión de Frederick Scheetz Jones y Peter Loyd Jones, 2000).

Posee sitios de unión para otras proteínas de la matriz extracelular y para receptores de adhesión de la membrana celular (Jarvinen, 2000) tipo glicocálix y a los mismos receptores de integrinas como la fibronectina. Esta glicoproteína estimula y dirige la capacidad de migración de los diferentes tipos de células, regula la diferenciación celular y la estructura de los tejidos y está funcionalmente asociada con el estrés mecánico que soportan estos (Lukina, 1991). Los diferentes tipos de tenascina son sintetizados primariamente por las células que constituyen los tejidos conectivos y cada tenascina tiene un patrón diferente de expresión. La expresión de tenascina está regulada por una variedad de factores de crecimiento, citoquinas, péptidos vasoactivos, proteínas de la matriz extracelular y factores biomecánicos (Jones and Jones, 2000). Su expresión en la embriogénesis se muestra durante los procesos de osteogénesis, condrogénesis, angiogénesis, odontogénesis y desarrollo neural (Vaqu coastal, 1990), pero posee patrones altamente restringidos durante el desarrollo neural, esquelotogénesis y vasculogénesis. Se manifiesta también en algunos tejidos adultos como lo son la cicatrización de heridas, la regeneración nerviosa, estados patológicos que incluyen enfermedades vasculares, la formación y desarrollo de tumores, metástasis y la

remodelación tisular (Jones and Jones, 2000).

Sus funciones dependen de la forma de presentación, sea soluble o insoluble (unida a un substrato), de los tipos celulares y del estado de diferenciación de las células blanco (Jones y Jones, 2000)

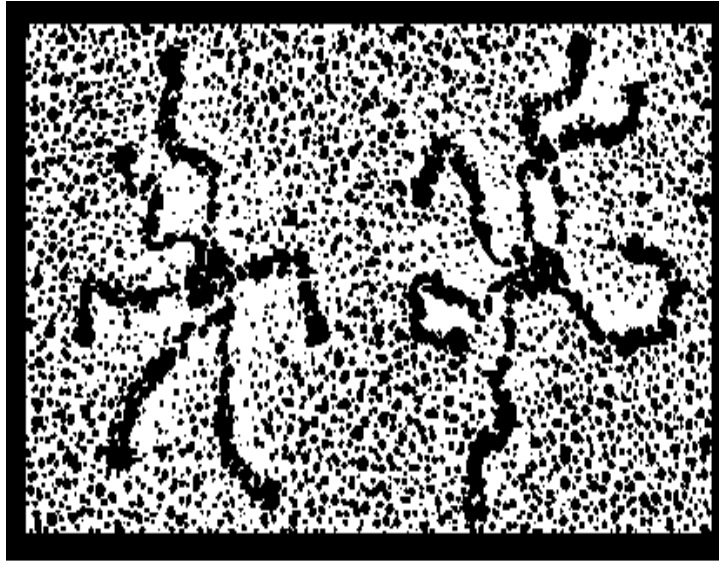
Esta glicoproteína estimula y dirige la capacidad de migración de diferentes tipos celulares, regula la diferenciación celular, la estructura de los tejidos y está funcionalmente asociada con el estrés mecánico que soportan éstos (Lukina, 1991).

La TN es importante durante la reparación de heridas. Está altamente expresada durante la formación de tejidos de granulación y en los frentes de migración de las células epiteliales, ambos procesos importantes para la reparación de los tejidos (Hakkinen, 2000).

2.3.1-Tenascina y Gestación en roedores

Bajos niveles de TN fueron expresados en el estroma de la MEC durante el ciclo estral y entre el primer y cuarto día de la gestación. Durante la adhesión del blastocisto (día 4° - 5°) se aprecia un intenso aumento en los depósitos de TN localizadas en la MEC del estroma inmediatamente adyacente al epitelio uterino que rodea al embrión. Esta localización intensa tiene una restricción de espacio y tiempo, y ya al quinto día se observa una disminución de esta glicoproteína a nivel del estroma diferenciado en la región decidual formando fibrillas fragmentadas (JoAnne et al, 1994).

La expresión de tenascina ha sido inducida a través de estímulos artificiales en el estroma uterino de ratones que han sido hormonalmente preparados para la implantación. La habilidad del estímulo artificial al inducir la expresión de TN, sugiere que la señal que induce TN deriva de las células epiteliales uterinas, presumiblemente del epitelio luminal mas que de las células del embrión. (J. Julian et al, 1994).



*Figura 9: Imagen rotatoria de la hexabrazación de tenascina de dos ratones.
Esquema original: (Revisión de Frederick Scheetz Jones y Peter Loyd Jones , 2000).*

2.3.2-Expresión de Tenascina en el periodo Pre-implantacional

Una fuerte señal fue detectada en el miometrio en todos los estadios previo a la implantación, mientras que en el estroma endometrial la marcación de TN fue relativamente baja en todos los estadios. Su marcación no fue detectable en las glándulas, epitelio luminal o mesenquima rodeando las bandas de musculo liso endometrial. Este patrón cambia localmente en los sitios de implantación en el periodo de adhesión entre el cuarto y quinto día de gestación. En los sitios adyacentes al estroma que contienen adherido al blastocisto continúa los niveles bajos de fragmentos fibrilares de TN, mientras que en el estroma antimesometrial se expresa un gran incremento formando fibrillas. La más intensa marcación de TN se encuentra hacia el quinto día de gestación, cuando ya se ha iniciado la reacción de adhesión y antes de que ocurra la invasión del embrión. Hacia el sexto día su marcación comienza a disminuir, permaneciendo localizada en la región antimesometrial del sitio de implantación. A medida que avanza la gestación la expresión de TN en el estroma subepitelial se reduce, aunque en los tejidos del embrión siempre esta presente. Ninguna de las células

deciduales presentes en la zona decidual secundaria y en el estroma mesometrial expresaron altos niveles de TN durante este periodo, sin embargo la TN fibrilar fue observada al fondo del estroma antimesometrial en el día 7,5 de gestación. Una de las funciones de la TN en el sitio de implantación podría ser que interfiere con la adhesión del epitelio uterino. Según estudios se demostró que la TN interfiere con la adhesión del epitelio uterino a la lámina basal con sustrato de Matrigel de manera dosis dependiente, siendo solo uno de los fragmentos recombinantes de TN que generan este efecto, nombrada como la región A-D (Aukhil et al, 1991).

Con pocas excepciones, la inducción de TN en el desarrollo de los sistemas ocurre en el mesenquima, respondiendo a señales moleculares secretadas desde el epitelio adyacente. En el estroma uterino en ratones durante la fase temprana de implantación se comunican con dos epitelios, el epitelio uterino y el trofoectodermo embrionario. La inducción restringida en el estroma uterino inmediatamente adyacente al epitelio luminal durante la implantación puede reflejar una respuesta a una señal originada en el trofoectodermo y traducida por el epitelio uterino o una señal molecular producida por el epitelio uterino en respuesta a un estímulo desde el blastocisto. En una gestación normal el blastocisto produce un estímulo localizado, molecular y mecánico al epitelio uterino y en cualquier caso el epitelio uterino responde al estímulo y realiza una señal. La estrecha distribución de TN en modelos de pseudogestación demostró que el epitelio luminal uterino completo y el estroma adyacente son capaces de responder a estos estímulos (Julian et al, 1994).

Se sugiere que la TN, en particular la TN-C, juega un rol importante en la implantación pudiendo modular la adhesión de las células endometriales uterinas y por ende promoviendo la penetración del embrión. (Julian J., Chiquet-Ehrismann R., Erickson H.P., Carson D.D., 1994). La TN-C acumulada en el estroma endometrial inmediatamente bajo el epitelio luminal en la gestación temprana, comienza a producirse por las células del estroma uterino mostradas por hibridación *in situ*. Se demostró a través del análisis inmunohistoquímico que la expresión de TN-C no era detectada en el endometrio de ratones no gestantes, mientras que en animales en gestación la expresión en el estroma uterino a lo largo de la membrana basal bajo el epitelio luminal en el día 0 de gestación fue evidente. Se mantuvo así hacia el día dos de gestación y desapareció hacia el día

tres reapareciendo otra vez al cuarto día de gestación. La expresión de TN-C después de 4° día aparece bajo control hormonal, mientras que en el día 0 de gestación podría ser debido a estimulación mecánica (Naomi, et al 2000).

Se determino que la IL-1 alfa, PGE2 y PGF 2-alfa significativamente regulan la expresión de TN-C en las células estromales en cultivo, mientras que la progesterona o el beta estradiol no lo hacen. Sin embargo cuando las células estromales fueron cocultivadas con células epiteliales la expresión de TN-C fue estimulada por progesterona. En el endometrio de ratones la IL-1 alfa expresada en las células epiteliales esta incrementada durante el estadio de blastocisto durante la preimplantación (Sanford et al, 1993; Takacs et al, 1996) cuando la progesterona y el estradiol están transitoriamente altos (Gidley-Baird, 1977; Critser et al, 1982).

La IL-1 alfa regula la síntesis de PGE2 y PGF 2-alfa por las células del estroma uterino. (Jacobs and Carson 1993). En ambas los resultados son consistentes con la hipótesis de que los altos niveles de hormonas esteroidales durante la preimplantación regulan la expresión de IL-1 alfa en las células epiteliales que podrían también estimular el aumento en la síntesis de PGE2 y PGF 2-alfa en las células del estroma uterino. Un incremento en el nivel de IL-1 alfa directamente o mediado por PGE2 y PGF 2-alfa podrían inducir la expresión de TN-C por las células del estroma uterino. Cuando la IL-1 alfa fue neutralizada por su anticuerpo en un sistema cocultivado simulado por progesterona, la expresión del ARNm de TN-C por las células del estroma disminuyeron en un 40%. La inhibición de la síntesis de prostaglandinas por indo metacina en contraste no alteraron el nivel de expresión. Estos resultados indican que la IL-1 alfa está involucrada en la interacción entre las células epiteliales y las células estromales y que la directa estimulación por IL-1alfa secretada por células del epitelio podrían ser los reguladores de la expresión de TN-C por las células del estroma uterino.(Naomi et al, 2000).

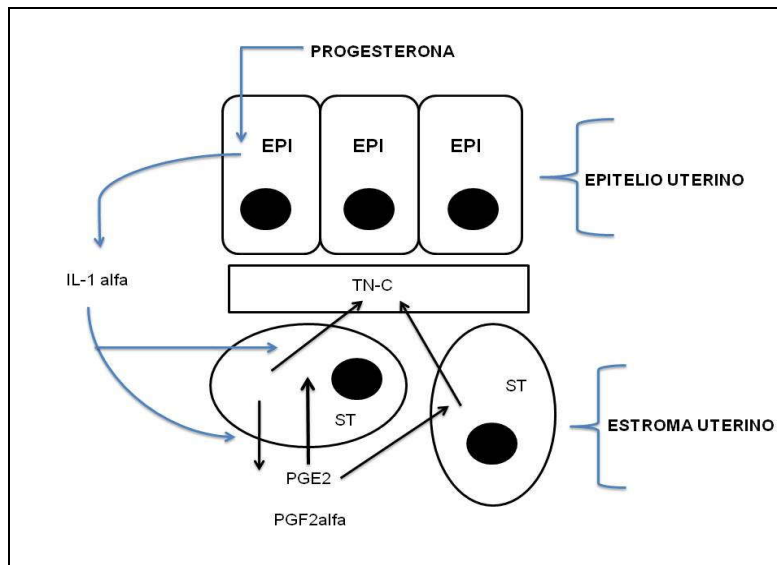


Figura 10: Modelo modificado para la expresión de Tenascina-C en células estromales uterinas reguladas por su interacción con las células epiteliales vía red consistida en Progesterona, IL-1 alfa, PGE2 y PGF 2-alfa.

Esquema original: (Noda, et al 2000).

Hacia el quinto día de gestación inmediatamente después que se forma la decidua, la TN-C estuvo presente en los tejidos estromales rodeando a los deciduomas. En un ciclo de estro normal la expresión de TN-C se detectó en las fases Estro y Diestro, correspondiendo al pick de progesterona. (Butcher et al, 1974; Michael, 1976; Michie and Head, 1994). Es así como la expresión de la TN-C en el estroma uterino durante la gestación en ratones parece ser regulada por la interacción del epitelio y las células estromales, además de una influencia hormonal notable (Naomi et al, 2000).

2.4-Laminina

Perteneciente a la familia de las glicoproteínas, la laminina se encuentra presente en la MEC y es considerada como el mayor componente de las láminas basales.

Estructuralmente representa un gran complejo, siendo su masa molecular cercana al millón de Daltons, flexible de heterodímeros, de cadenas alfa, beta, gamma, unidas mediante puentes de disulfuro en una triple hélice presentando una forma de cruz, como se muestra en la figura (11) (Aplin, 2002). Cada brazo corto de esta molécula, surge a partir de la región N terminal. Variaciones en la longitud de estos brazos y la composición de las cadenas dan origen a diversas isoformas, siendo identificado al menos 20 tipos de lamininas en mamíferos (Colognato and Yurchenco, 2000).

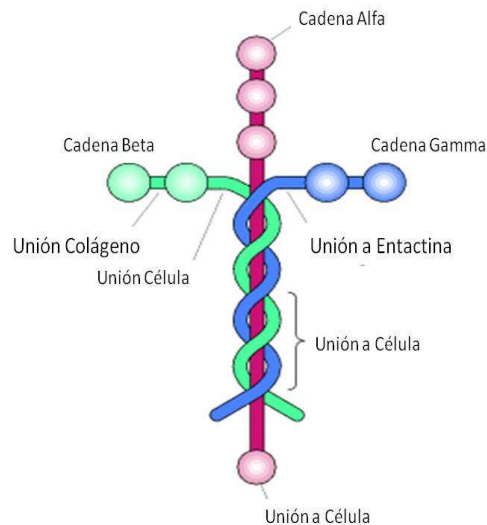


Figura 11: Esquema modificado de molécula de laminina con sus respectivos dominios.

Esquema original: (<http://nadeau-bonilla.blogspot.com/search?q=laminin>).

En su estructura se encuentran secuencias peptídicas de tipo funcional que promueven adhesión y migración de diversos tipos celulares, incluyendo células

metastásicas (Beck et al, 1990). Los sitios activos presentes incluyen; YIGSR (Tyr- Ile- Gly- Ser-Arg) localizado en la cadena beta (Graf et al, 1987), IKVAV (Ile- Lys-Val-Ala-Val) y la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) ubicadas en los brazos largos y cortos respectivamente de la cadena alfa (Tashiro et al, 1989; Grant et al, 1989).

La principal función de la laminina es la adhesión de las células a las membranas basales. Además participa en la polaridad, diferenciación celular y media la unión de otras macromoléculas de matriz como colágeno IV, entactina y el proteoglicano heparán sulfato. También se encuentra implicada en formación de redes, filamentos y unión celular a través de integrinas, que determina otras funciones como migración celular, diferenciación y mantenimiento del fenotipo tisular (Colognto and Yurchenco, 2000; Aplin, 2002).

En el estroma endometrial humano, es posible detectar subunidades de laminina en el estroma perivascular en fase secretora tardía, evento relacionado con el surgimiento de células deciduales en esta fase (Church et al, 1996). Específicamente en tejido decidual se encuentran laminina 1 y 4, las que se encargarían de mediar la unión y propagación del trofoblasto (Alpin, 2002).

2.4.1- Laminina y decidualización

La expresión de laminina en decidua de ratón, fue detectada mediante anticuerpos policlonales de laminina 1, encontrándose depósitos rodeando las células del estroma decidualizado como también en epitelio vascular y la membrana basal (Wewer et al., 1986).

Armant (1991), concluyó que laminina 1 promovía tanto el anidamiento del blastocisto como la proliferación del trofoblasto (Alpin, 2002). Estudios posteriores se enfocaron en determinar la expresión de los tipos de cadenas de laminina presentes, analizando los niveles de RNAm codificantes de las cadenas beta 1 y gamma 1, encontrando como resultado, un amplia expresión de la cadena gamma 1 por toda la decidua, no obstante, la cadena beta se encontraba restringida solo al área primaria de decidualización del día 6 de gestación (Farrar and Carson, 1992). Para el 8° día, la

expresión de gamma 1 permanecía firme en todas las áreas, sin embargo la cadena beta 1 era reconocible en pequeñas cantidades solo en la decidua superficial. Al igual que las subunidades anteriores, la subunidad alfa 1 se encuentra relacionada con el estroma endometrial, localizándose en la decidua (Church et al, 1996).

Blankenship y Given (1995), observaron la presencia de laminina en la membrana basal del epitelio uterino y cual era su reacción frente a la implantación del blastocisto. Trabajaron con úteros de ratón entre los días 5 y 7 de la gestación ocupando técnicas de inmunohistoquímica para la localización de laminina. Los primeros resultados fueron registrados en la tarde del día 5 de gestación, donde se encontró al blastocisto cerca de la región antimesometrial del útero. La reacción para laminina fue encontrada claramente en la membrana basal del epitelio uterino, aun intacta y en la membrana basal del trofoblasto, precursora de la membrana de Reichert. En la decidua también fue observada la presencia de laminina rodeando las células cercanas al sitio de implantación. Ya en el día 6° de gestación, se aprecia una pérdida de reacción para laminina en la membrana basal del epitelio uterino. No obstante, un incremento de la inmunorreacción fue observada intracelularmente y en las áreas circundantes de las células deciduales. En el 7° día de gestación, la pérdida de laminina continua, al mismo tiempo que la membrana basal del epitelio.

2.3.- Aborto Espontáneo en Humanos

Los mecanismos que involucran la reproducción en humanos son altamente complejos especialmente el rol del factor inmunológico.

Entre el 10 al 15% de las gestaciones termina en aborto espontáneo. En estudios de fertilización *in vitro*, se determinó que la incidencia de abortos en embarazos múltiples era mucho menor que en embarazos únicos (Tunner et al 2003). El éxito de la implantación y el mantenimiento de los embriones implantados dependen de la calidad del embrión, de la calidad del sitio de implantación y de su interacción.

El aborto espontáneo es el embarazo que termina espontáneamente antes de la viabilidad del embrión (Reglan and Rai, 2000). Se estima que el 8 al 20% de los embarazos clínicamente reconocidos bajo las 20 semanas de gestación terminará en un aborto espontáneo, el 80% de estos ocurrirá antes de las 12 semanas (Harlap and Shiono 1980). Muchos de los embarazos se pierden espontáneamente antes de que la mujer reconozca que está embarazada y los signos clínicos de estos pueden confundirse con síntomas propios del fin de la menstruación.

Muchos factores pueden perjudicar la gestación. Las causas de un aborto espontáneo pueden residir en alteraciones genéticas, en la anatomía, en el sistema endocrino, en el sistema inmunológico, en el sistema de coagulación de la sangre, el medio ambiente y en muchos casos la causa es desconocida (Carp, 1988).

Los abortos espontáneos recurrentes se definen usualmente por 3 o más pérdidas consecutivas antes de las 20 semanas, situación que ocurre entre el 1 a 2% de las mujeres en etapa reproductiva. El 84% de estos abortos ocurre durante el primer trimestre (Carp et al 1988).

3.1.- Modelo de Aborto Espontáneo

La íntima asociación existente entre los tejidos maternos y embrionarios, es considerada una interesante paradoja inmunológica.

En gestaciones fisiológicas, los tejidos fetales no son atacados por el sistema inmune materno, a pesar del gran número de leucocitos presentes, como macrófagos en la decidua, los que pueden permanecer constantes durante toda la gestación. Sin embargo, un comportamiento anormal de estas células inmunitarias podría comprometer tanto la función trofoblástica, como el desarrollo placentario y repercutir en el desarrollo embrionario (Renaud and Graham, 2008).

Este fenómeno ha originado el interés de investigadores que intentan dar una explicación a los eventos ocurridos durante la gestación, tanto en condiciones normales como patológicas.

En la actualidad, es posible contar con un modelo animal de estudio para analizar los factores relacionados con los trastornos de la interfase materno-fetal en etapas tempranas de la gestación.

Este modelo hecho en ratón, ha sido descrito por Clark y col (1980) en el cual, la cruce entre hembras CBA/J y machos DBA/2 presenta una absorción embrionaria aproximadamente del 40%, con promedio entre el 20-30% hacia el día 12 de gestación. Con la ayuda de este modelo, se han abierto líneas de investigación sobre los posibles mecanismos que pudiesen estar involucrados con la muerte o sobrevida del embrión en desarrollo.

La mayoría de las informaciones generadas por el estudio en este modelo animal, se han enfocado en determinar la presencia semialogénica del feto, la relación existente con la tolerancia inmunocompetente de la madre, y como la respuesta inmunitaria materna puede estar relacionada con la sobrevida fetal (Duclos et al, 1996).

Las causas y los mecanismos de las pérdidas embrionarias aun no han sido esclarecidas. La evidencia existente supone un rol participativo de los macrófagos, puesto que se ha observado en este modelo un alto porcentaje de infiltrados de estas células. La infiltración tiene lugar poco tiempo después de ocurrida la implantación, hacia el día 6.5

de gestación, encontrándose en los sitios de implantación proporcionalmente al porcentaje de embriones que se reabsorberán. La reabsorción es caracterizada por una necrosis focal observada en la unión del trofoblasto fetal con la decidua, donde se aprecia un infiltrado de leucocitos polimorfonucleares, tanto en los sitios de necrosis, como a lo largo de las paredes de los vasos en la decidua (Clark y cols, 1998)

Dada que la MEC ejerce un rol importante durante las etapas iniciales de la gestación, asociados a modificaciones en el estroma endometrial, se consideraría que las moléculas a estudiar; Colágeno, Fibronectina, Tenascina y Laminina estarían relacionadas con las alteraciones tisulares detectadas en el endometrio de ratones durante la absorción embrionaria.

CAPITULO 2:

DELIMITACION, TIPO DE ESTUDIO, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Análisis de la distribución de moléculas de la Matriz Extracelular del endometrio durante la absorción embrionaria entre los días 6.5 y 10.5 de gestación en un modelo animal de Aborto Espontáneo y comparación con endometrios de animales control.

TIPO DE ESTUDIO

Cohorte longitudinal prospectivo.

HIPOTESIS

Existen diferencias en la distribución de moléculas de la matriz extracelular del endometrio en condiciones de aborto espontáneo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la distribución de moléculas de la matriz extracelular del endometrio de ratón durante las etapas iniciales de la gestación en un modelo animal de aborto espontáneo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Describir, a través de técnicas histoquímicas, la distribución de colágenos fibrilares del endometrio en un modelo de aborto espontaneo entre los días 6.5 y 10.5 de la gestación , comparado con el endometrio de animales control.

-Describir, a través de técnicas inmunohistoquímicas, la distribución de glicoproteínas como: Fibronectina, Tenascina y Laminina del endometrio en un modelo de aborto espontaneo entre los días 6.5 y 10.5 de la gestación, comparado con el endometrio de animales control.

CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratones procedentes de la Universidad de Berlín, Alemania, cuyos tejidos uterinos embebidos en parafina fueron enviados vía aérea a Chile y recepcionados por el Dr. Sebastián San Martín en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

El modelo animal empleado para la obtención de los tejidos corresponde a ratones hembras de la cepa CBA/J y machos de la cepa CBA/2J, cruce establecida en la literatura como modelo animal de aborto espontáneo. El control normal de gestación, corresponde a ratones hembras de la cepa CBA/J y machos de la cepa Balb/c, cruce que no presentan alteraciones reproductivas.

Al momento de la cruce, los ratones fueron ubicados en la proporción de 3 hembras en contacto con un macho reproductor durante la noche. Al día siguiente, se evaluó la presencia de tapón vaginal, lo que es considerado como signo positivo de cópula. El momento en el que se observó el tapón vaginal fue considerado como 0,5 días de gestación (dg) (12 horas de gestación).

Ambos grupos de animales se mantuvieron en el bioterio de Experimentación Animal de la Universidad de Berlín en condiciones de fotoperiodo controlado (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) con agua y comida *ad libitum*, hasta el momento de su sacrificio y posterior recolección de tejidos uterinos.

PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS

Se utilizaron úteros grávidos de los días 6.5, 7.5, 8.5 y 10.5, de ambos modelos experimentales. En estos días de la gestación los ratones hembras preñadas fueron anestesiadas con Avertin y eutanizadas por dislocación cervical. Los procedimientos experimentales y el manejo de los animales de experimentación fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Berlín, Alemania. Posterior a la eutanasia, se

colectaron los úteros, los cuales fueron fijados en solución de Methacarn (metanol, cloroformo y ácido acético, 6:3:1) por 4 horas a 4°C. Posteriormente los tejidos fueron deshidratados en alcohol absoluto, aclarados en xilol y embebidos en parafina a 58°C .

El procesamiento de los tejidos hasta la fijación de los úteros en parafina se realizó en la Universidad de Berlín, Alemania.

Cada bloque de parafina recepcionado, contenía dos o más sitios de implantación los que se cortaron en un micrótomos a 5 µm de espesor y los cortes obtenidos se observaron al microscopio óptico para visualizar el plano de corte.

Los cortes obtenidos para cada día de gestación fueron adheridos a portaobjetos previamente preparados con solución de Poly-L-lysine al 0.1% (Sigma-Aldrich) identificando cada corte con numeración secuencial y codificación según edad gestacional y modelo estudiado (normal y aborto). Posteriormente se llevaron a la estufa durante una hora a 60°C para su secado.

Métodos Histoquímicos

Esta técnica fue utilizada para la identificación de colágenos fibrilares. Para esta técnica los cortes se desparafinaron en xilol e hidrataron en alcohol durante 10 minutos cada uno hasta llegar al agua destilada. Luego las laminas fueron inmersas en solución de Pricosirius a temperatura ambiente por una hora.

Posteriormente se realizó la tinción de Hematoxilina por 10 segundos para terminar con la deshidratación en alcoholes ascendentes, la aclaración en xilol y el montaje con resina sintética.

Métodos Inmunohistoquímicos

Esta técnica fue utilizada para la identificación de glicoproteína (fibronectina, laminina y tenascina). Los cortes utilizados para esta técnica se desparafinaron en xilol e hidratados en alcoholes descendentes por un tiempo de 30 minutos cada uno hasta el agua destilada. Las láminas destinadas para fibronectina y tenascina pasaron por recuperación antigénica en solución de buffer Citrato de Sodio a 90°C. al interior de una vaporera por 20 minutos, luego se dejaron en reposo durante 20 minutos más en la

misma solución. Para laminina se efectuó digestión enzimática con tripsina 0,002% a 25°C. durante 10 minutos y posteriores dos baños de PBS 0.1 M (solución salina tamponada de pH 7,2-7,4) con hielo por 5 minutos cada uno y un baño de PBS 0.1M a temperatura ambiente por 5 minutos. Todos los cortes fueron incubados en una solución de peróxido de hidrogeno al 3% en PBS durante 30 minutos para el bloqueo de la peroxidasa endógena. Para disminuir la tinción de los sitios inespecíficos, los cortes se incubaron con Cas-Block (Zymed) por 10 minutos y con suero normal de cabra al 5% en PBS-Tween 20 por 30 minutos.

Luego los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario correspondiente a cada uno durante toda la noche (tabla 1.1) a 4°C. en una cámara húmeda para evitar su deshidratación.

Al día siguiente los cortes fueron lavados con PBS 0.1M e incubados con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa (1:500) en PBS, por una hora a 25°C.

Para la revelación se utilizó el cromógeno NovaRed (Vector) a un tiempo determinado para cada anticuerpo. En seguida se realizó un lavado en agua destilada y se realizó la coloración de contraste nuclear con Hematoxilina de Mayer (Merck) por 10 segundos. A continuación se deshidrataron en alcoholes ascendentes y se aclararon en xilol para su montaje con resina sintética (Permount). Para dar confiabilidad a la interpretación de la inmunohistoquímica se utilizaron controles negativos y positivos.

Los protocolos empleados en este estudio (anexo) han sido aplicados y estandarizados en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas pertenecientes al Centro de Investigación en Biología de la Reproducción (CIBR) de la Universidad de Valparaíso.

Las imágenes fueron visualizadas con un microscopio Olympus IX81 y capturadas con una cámara digital DP71 (Olympus).con el programa de adquisición de imágenes Image Proplus (Media Cybernetic)

TABLA 1.1: Anticuerpos y Enzimas

Anticuerpo	Pre-tratamiento	Dilución anticuerpo en PBS/Tween 20 al 0.3%	Anticuerpo secundario y dilución
Anti-Laminina Policlonal (Neo Markers anti-ratón hecho en conejo)	Digestión Enzimática con Tripsina 0,002%	1:250	IgG de Conejo Hecho en Cabra + Peroxidasa 1:500
Anti-Fibronectina Anticuerpo Policlonal (Chemicon – AB2040) anti-ratón hecho en conejo	Recuperación Antigénica Buffer Citrato de Sodio	1:250	IgG de Conejo Hecho en Cabra + Peroxidasa 1:500
Anti-Tenascina Anticuerpo Policlonal (Chemicon – AB19013) anti-ratón hecho en conejo	Recuperación Antigénica Buffer Citrato de Sodio	1:50	IgG de Conejo Hecho en Cabra + Peroxidasa 1:500

CAPITULO 4: RESULTADOS

Colágeno

Gestación normal día 6.5

Hacia la región mesometrial se observa tinción para colágeno, con distribución fibrilar en el miometrio rodeando a cada célula en la capa circular interna y rodeando a los haces musculares de la capa longitudinal externa. Se observa colágeno alrededor de los vasos sanguíneos y glándulas uterinas.

En la región no decidualizada hacia la región mesometrial se aprecian células alargadas de citoplasmas y núcleos claros con una débil tinción para colágeno, encontrándose de igual forma en la región predecidual hacia la porción lateral del endometrio.

En la región predecidual no se observa tinción para colágeno.

En la región antimesometrial se encuentran células deciduales voluminosas con citoplasma claro y algunas poseen uno o más núcleos. El colágeno se observa entre las células con una disposición fibrilar. En la región de la cripta de implantación entre el embrión y el estroma decidualizado se observa una intensa marcación para colágeno.

Gestación normal día 7.5

Hacia la región mesometrial se presenta tinción para colágeno, con distribución fibrilar rodeando a cada células en la capa circular interna y rodeando a los haces musculares de la capa longitudinal externa. Se observa colágeno alrededor de los vasos sanguíneos y glándulas uterinas. En la región no decidualizada hacia la región mesometrial se aprecia una débil tinción para colágeno, con células alargadas de citoplasmas y núcleos claros, encontrándose de igual forma en la región predecidual en la porción lateral del endometrio.

En la región predecidual hay un aumento del tamaño de las células que presentan uno o más núcleos, con cromatina laxa. En la decidua se observan células deciduales de gran volumen con menor marcación positiva para colágeno.

En la región de implantación encontramos presencia de colágeno con distribución homogénea alrededor del embrión y en las regiones laterales.

Gestación normal día 8.5

Hacia la región mesometrial se observa una difusa tinción para colágeno entre las células de la capa circular interna del miometrio y rodeando a los haces musculares en la capa longitudinal externa. La marcación se observa alrededor de los vasos sanguíneos y glándulas uterinas en toda su extensión. Hacia la región antimesometrial a nivel del miometrio se observa de una manera similar que la observada en la región mesometrial.

Se observa una tinción para colágeno rodeando los sinusoides y al interior de estos mismos sinusoides. Se aprecian células natural killer uterinas distribuidas al interior de los sinusoides y cercanos al embrión.

Rodeando al embrión hacia zona mesometrial se observa infiltrado eritrocitario y leucocitario. En toda su extensión se observa la membrana de Reichert y la nueva luz uterina, presentando marcación para colágeno en su lámina basal de carácter uniforme.

Hacia la región antimesometrial se observan células deciduales, globulosas, de citoplasma claro, con uno o más núcleos prominentes en relación a su citoplasma. Cada núcleo presenta más de un nucléolo. La marcación para colágeno es difusa y sin carácter fibrilar. Se observa una menor visualización de la región predecidual producto del crecimiento del embrión.

Gestación normal día 10.5

Se observa marcación para colágeno en la capa muscular interna del miometrio delimitado entre las células, y en la capa muscular longitudinal externa rodeando a los haces con una distribución uniforme y fibrilar. Tinción para colágeno positiva alrededor de los vasos sanguíneos.

En la región antimesometrial hay presencia de células decidualizadas con núcleos grandes únicos, se observa una escasa tinción para colágeno con distribución difusa.

Hacia la región mesometrial se observan una tinción para colágeno de manera fibrilar rodeando los sinusoides, con marcación difusa para colágeno alrededor de cada célula. Al interior de los éstos sinusoides se encuentran células natural killer uterinas.

La región antimesometrial se observa disminuida por el crecimiento embrionario, en ella la presencia de células decidualizadas con núcleos prominentes, multinucleados constituidos con más de un nucléolo. La tinción para colágeno se presenta difusa entre las células.

Rodeando al embrión hay un gran infiltrado eritrocitario y leucocitario, hacia la región mesometrial se observan células en degeneración. Se observa tinción para colágeno rodeando a la lámina basal perteneciente a la membrana de Reichert y rodeando a la lámina basal de la nueva luz uterina de carácter uniforme y fibrilar.

Aborto espontaneo día 6.5

En el miometrio se observa tinción para colágeno alrededor de los haces musculares de la capa muscular externa y entre las células de la capa muscular interna. Hacia la región mesometrial la tinción para colágeno es más débil. En la región no decidualizada tanto en dirección mesometrial como en la región antimesometrial se observa una tinción cualitativamente más débil para colágeno en relación a los úteros de gestación normal.

En la región antimesometrial se observan células deciduales con citoplasmas intensamente teñidos con el colorante y poco definidas sin aspecto fibrilar alrededor de las células.

Aborto espontaneo día 7.5

En esta edad gestacional, la región con mayor reacción a la tinción de Pricosirius, fue observada en el miometrio. La expresión de colágeno de aspecto fibrilar entre las células en la capa circular interna y débilmente rodeando al haz muscular de la capa longitudinal externa. Además se observa marcación fibrilar de colágeno alrededor de las glándulas uterinas y vasos sanguíneos.

En la región mesometrial, se observan células no decidualizadas, de tamaño pequeño con amplios espacios intercelulares. En esta región no se observa marcación para colágeno entre las células no deciduales, sin embargo, si se observa tinción positiva en las áreas que rodean inmediatamente a las glándulas y a los vasos sanguíneos.

En la cripta de implantación embrionaria, se puede observar células deciduales grandes, con núcleos voluminosos, con presencia de uno o más núcleos, dejando escaso espacio citoplasmático. La tinción para colágeno es débil y difusa. Se presenta un infiltrado leucocitario y eritrocitario rodeando al embrión.

Aborto espontáneo día 8.5

En el miometrio, se observa marcación para colágeno con distribución difusa en relación a la región antimesometrial. La tinción está presente rodeando el haz muscular de la capa longitudinal externa y entre las células en la capa muscular interna, en ambas su distribución es delimitada y homogénea.

En la región mesometrial, inmediatamente adyacente a la capa muscular, se observan células no decidualizadas, con una marcación débil de colágeno en relación a la zona miometrial, con núcleos aumentados de tamaño.

Hacia la región antimesometrial, no se observa tinción.

En la región antimesometrial, hay presencia de células deciduales que se observan voluminosas, aumentadas de tamaño, con núcleos prominentes, muchas veces multinucleados, con escaso citoplasma y una reducción de los espacios extracelulares. En esta región la marcación para colágeno es débil y se distribuye difusamente. Sin

embargo, alrededor de las glándulas y vasos sanguíneos hay una marcación más delimitada.

Las regiones que se encuentran adyacentes a la cripta de implantación, muestran infiltración eritrocitaria, que se acompaña de células de la línea linfocitaria. Se observa a su vez, células deciduales maduras similares a las anteriormente descritas. Hacia la región lateral cerca del embrión, las células se disponen agrupadas en sinusoides, rodeados por colágeno con distribución fibrilar. Rodeando al embrión se observa también un infiltrado eritrocitario.

En todas las capas, es posible observar la marcación de colágeno alrededor de las glándulas y de los vasos sanguíneos presentes.

Aborto espontáneo día 10.5

Se observa en el miometrio una marcación para colágeno entre las células de la capa interna y rodeando al haz en la capa externa hacia el área antimesometrial. Inmediatamente adyacente a la capa muscular interna se puede observar una población de células en diferentes estadios deciduales.

Hacia la región mesometrial las células deciduales se encuentran en diversos estadios, con núcleos grandes y algunos citoplasmas claros. Se observa marcación para colágeno en los laberintos placentarios presentes en la región adyacente al embrión.

Hacia la región antimesometrial el espacio entre células es menor por el crecimiento del embrión. Se aprecia un epitelio de carácter simple y plano que rodea al embrión llamado la nueva luz uterina con marcación positiva para colágeno y distribuida homogéneamente en toda su extensión. Alrededor del embrión se observa un infiltrado eritrocitario y células natural killer uterinas.

Fibronectina

Gestación Normal día 6.5

En toda la extensión del miometrio, en el tejido conjuntivo que rodea a ambas capas musculares se observa tinción para fibronectina. En la región mesometrial, se aprecia claramente depósitos de fibronectina entre las células no decidualizadas y rodeando los vasos sanguíneos. En la región antimesometrial, la tinción para fibronectina es clara y limitada, rodeando las células no decidualizadas. Hacia el área de células pre deciduales, la marcación para fibronectina se torna cada vez más débil hasta no observarse en las células decidualizadas. La tinción se observa también en células embrionarias en formación.

Gestación Normal día 7.5

La marcación para ambas capas musculares se mantiene en relación a la edad gestacional anterior. Hacia el área mesometrial, se aprecia inmunoreacción entre las células no decidualizadas. Hacia la dirección antimesometrial, esta reacción se torna heterogenea, rodeando a las células pre deciduales y vasos sanguíneos mientras que en el área antimesometrial propiamente tal la marcación es positiva y delimitada en las células no decidualizadas. En la región decidualizada, la tinción es clara entre las células y la inmunoreacción entre las células embrionarias se observa débil.

Gestación Normal día 8.5

La inmunorreacción para fibronectina en el miometrio se mantiene sin modificaciones con respecto a los días gestacionales anteriores. En la región mesometrial se aprecian depósitos de fibronectina que se encuentran rodeando la población de células no decidualizadas. Hacia el área antimesometrial, la marcación se torna difusa con respecto a la edad gestacional anterior y en las células no decidualizadas. En las células pre deciduales la tinción se presenta heterogéneamente alrededor de éstas, mientras que en la región decidualizada se muestra una tinción clara con una disposición de

fibronectina rodeando las células. Es posible apreciar también que la marcación positiva para fibronectina se encuentra entre las células gigantes del trofoblasto, así como entre las capas celulares del embrión en formación.

Gestación Normal día 10.5

La marcación para fibronectina se mantienen en el miometrio en condiciones similares a las obtenidas en edades gestacionales anteriores. En la región mesometrial del útero la marcación de fibronectina se aprecia distribuida heterogéneamente, rodeando a las células deciduales y no siendo posible su observación en algunos sectores. En el polo opuesto hacia la región antimesometrial, se aprecia una disminución de ésta área debido al aumento del tamaño embrionario, siendo apreciable una marcación débil y difusa para fibronectina.

Aborto Espontáneo día 6.5

Las capas musculares del útero presentan una inmunorreacción similar a la encontrada en la gestación normal. En la región mesometrial, la marcación para fibronectina es positiva, cubriéndola débilmente y siendo distribuida entre las células no decidualizadas y vasos sanguíneos. En el área antimesometrial, se aprecia inmunorreacción para esta molécula, distribuyéndose homogéneamente entre las células, glándulas endometiales y vasos sanguíneos. A medida que las células comienzan a perder sus características fibroblásticas, la tinción se torna cada vez más débil, apreciándose así entre células pre deciduales, pero no siendo visible, entre las células deciduales.

Aborto Espontáneo día 7.5

En el miometrio la marcación para fibronectina se mantiene sin modificaciones. En el sector antimesometrial, se observa reacción positiva y delimitada para fibronectina entre células no decidualizadas y cercanas al epitelio. A medida que las células comienzan a perder sus características fibroblásticas, la tinción se torna cada vez más

débil, hasta el punto de no ser posible observarla en la población de células deciduales. Sin embargo, en las criptas de implantación, se visualiza inmunorreacción para fibronectina.

Aborto Espontáneo día 8.5

La expresión de fibronectina en el miometrio se mantiene de igual forma que en edades gestacionales anteriores. En la región mesometrial, se observa tinción positiva con distribución heterogénea entre las poblaciones celulares. Hacia el área antimesometrial, la reacción es positiva solo en la población celular no decidualizada y rodeando a las glándulas. En las células decidualizadas, no se visualiza reacción.

Aborto Espontáneo día 10.5

En el miometrio, se observa inmunorreacción para fibronectina, pero a diferencia de las edades gestacionales anteriores, ésta es débil. En el área mesometrial, la reacción es heterogéneamente positiva en las células no decidualizadas. En la región antimesometrial, se aprecian espacios muy reducidos debido al aumento del tamaño del útero grávido. Es posible observar reacción positiva, pero débil para fibronectina, rodeando a las células gigantes del trofoblasto.

Tenascina

Gestación Normal día 6.5

La capa muscular interna lisa es reactiva a tenascina de manera débil y heterogénea. Hacia la región mesometrial, la marcación se distribuye ampliamente rodeando la población celular no decidualizada y predecidua. En el área antimesometrial la reacción es positiva para células no deciduales y predecidua, siendo débil en la región decidua e inexistente en aquellas células deciduales que rodean al embrión.

Gestación Normal día 7.5

En esta edad gestacional, la capa muscular externa e interna presentan reacción al anticuerpo, sin embargo se aprecia débil y heterogénea su marcación. En células no decidualizadas del área mesometrial, no se presenta marcación para tenascina en toda su extensión. En el área antimesometrial la reacción se presenta en la población celular predecidua y decidua, siendo en esta última débilmente observada. Hay completa ausencia en células no decidualizadas.

Gestación Normal día 8.5

En esta edad gestacional, la marcación se expresa en ambas capas musculares. Hacia el área mesometrial no se observa marcación en las células no decidualizadas. Se observa un patrón diferente en las células predeciduales y deciduales, en la que si se observa tenascina, siendo débil en la población decidualizada. Las células no deciduales de la región antimesometrial no presentan marcación para tenascina, pero si la presencia se hace evidente en la pre-decidua. En las células deciduales la marcación es débil, pero negativa en aquellas células deciduales que rodean al embrión.

Gestación Normal día 10.5

La distribución de tenascina en el miometrio está débilmente distribuida del mismo modo que las edades gestacionales anteriores. Hacia el área mesometrial, no se observa reacción al anticuerpo, mientras que en la porción antimesometrial, la reacción se limita a células pre-deciduales, siendo negativa la inmunoreacción en la población de células no decidualizada y decidualizadas.

Modelo Aborto día 6.5

En el miometrio, se aprecia marcación positiva para tenascina, principalmente en la capa interna. En la región mesometrial la forma en que se distribuye la tenascina es de manera heterogénea y difusa. Se hace presente en la región predecidual y decidual, siendo negativa en las células no decidualizadas. En la región antimesometrial se observa el mismo patrón en cuanto a la marcación de tenascina, observándose su distribución aún más difusa.

Modelo de Aborto día 7.5

En la capa longitudinal externa del miometrio no se observa marcación para tenascina, mientras que en la capa circular interna la presencia de esta molécula se encuentra débil. En dirección hacia mesometrial en las células decidualizadas, predecidual y no decidualizada no se observa la presencia de tenascina, así como hacia la región antimesometrial que presenta las mismas características.

Modelo Aborto día 8.5

Ambas capas musculares del miometrio son positivas a tenascina, pero se observa más intensamente hacia el área mesometrial del útero, sin embargo, aquí en las poblaciones celulares no decidualizadas, predeciduales y desidualizadas no se observa reacción para tenascina. La marcación es posible observarla muy débil y heterogéneamente, en la población de células predeciduales ubicadas antimesometrialmente. Esta reacción ya no es observable en las células decidual es.

Modelo Aborto día 10.5

La distribución apreciada en las capas musculares del miometrio, se mantiene sin modificación con respecto a la gestación anterior. Ya en la región mesometrial, no es posible observar marcación para tenascina. La región antimesometrial no se aprecia reacción en toda su extensión.

Laminina

Gestación Normal día 6.5

La inmunorreacción para laminina, es visualizada claramente en ambas capas musculares del miometrio. Hacia el área mesometrial, se aprecia reacción en la población de células no decidualizadas. A su vez la marcación es visible alrededor de los vasos sanguíneos. En la población de células deciduales y pre-deciduales no es posible visualizar reacción. En la región antimesometrial, las células deciduales no presentan positividad para laminina, siendo reactiva sólo en esta área, en la membrana basal de los vasos sanguíneos. La reacción para laminina también se visualizó entre las células embrionarias.

Gestación Normal día 7.5

En esta edad gestacional, ambas capas musculares del miometrio muestran una reacción positiva bien delimitada para laminina. En el área mesometrial, la marcación sigue el patrón observado en la edad gestacional anterior.

En la región antimesometrial, la reacción se torna heterogénea y débil en la población celular no decidual y pre-decidual, siendo bien delimitada en las membranas de glándulas y vasos sanguíneos. En la población decidualizada, la reacción para laminina está asociada a los vasos sanguíneos.

Gestación Normal día 8.5

A diferencia de las edades gestacionales anteriores, la inmunorreacción en el miometrio se torna heterogénea y débil en ambas capas musculares. Hacia la región mesometrial, la reacción es débil en células no deciduales observándose más delimitadamente en la membrana de vasos sanguíneos. En el área antimesometrial, la marcación se distribuye débil y heterogéneamente en las membranas de células pre-decidualizadas y vasos sanguíneos. Las células deciduales presentan una muy débil marcación.

Gestación Normal día 10.5

El miometrio presenta un patrón similar de reacción que la encontrada en la edad gestacional anterior. En el área mesometrial, la marcación se visualiza muy débil en la población celular, siendo claramente delimitado en la membrana de vasos sanguíneos. Hacia antimesometrial la reacción es débil y heterogénea visualizada principalmente en la membrana de glándulas y vasos. En las células deciduales la marcación es muy débil y heterogénea siendo en algunos sectores negativa.

Aborto espontáneo día 6.5

El miometrio presenta reacción positiva para laminina en ambas capas musculares distribuido homogéneamente, presentando un patrón similar al observado a esta misma edad gestacional en la gestación normal. En el área mesometrial se aprecia positividad de la reacción en la población no decidual y vasos sanguíneos, tornándose débil en las células pre-deciduales y deciduales. Hacia la región antimesometrial la marcación esta principalmente ubicada en los vasos sanguíneos, siendo muy débil en las células no deciduales, al igual que en la población pre-decidual y decidual.

Aborto espontáneo día 7.5

Se observa marcación positiva de carácter heterogéneo y débil en las capas musculares circular interna y longitudinal externa. Las células no decidualizadas de el área mesometrial presentan una débil reacción que se expresa más delimitadamente en la membrana de los vasos sanguíneos, como se caracteriza en toda la extensión del tejido. Hacia la región antimesometrial la marcación se expresa heterogéneamente en las células no decidualizadas. Ya en las células decidualizadas su marcación se vuelve cada vez más débil.

Aborto espontáneo día 8.5

El comportamiento de la reacción en ambas capas musculares del útero, corresponde al mismo patrón descrito en la gestación anterior. La reacción para laminina esta presente en el área mesometrial y antimesometrial como observado en la gestación normal a esta edad. Débil marcación en la población no decidualizada y pre-decidual. En la población decidualizada la marcación es débil. Se encuentra laminina en las membranas de los vasos sanguíneos y glándulas.

Aborto espontáneo día 10.5

El miometrio presenta un patrón similar de reacción a la encontrada en gestación normal. En el área mesometrial, la marcación se visualiza muy débil en la población celular, siendo claramente delimitado en la membrana de vasos sanguíneos. Hacia antimesometrial la reacción es débil y heterogénea visualizada principalmente en la membrana de glándulas y vasos. En las células deciduales la marcación es muy débil y heterogénea siendo en algunos sectores negativa.

Discusión

Colágeno

La técnica de histoquímica realizada para la detección de colágeno en el estroma endometrial, mostró diferencias en la distribución de esta proteína, encontrándose tempranamente en el día 6.5 de gestación principalmente en la región antimesometrial del endometrio.

Como detallan investigaciones realizadas para la detección de colágeno en el tejido endometrial de ratones durante la gestación, se expresan principalmente 3 tipos de colágenos: I, III y V (Spiess, 2006). Cada uno de ellos tiene una distribución determinada y cumple una función específica durante la gestación. El colágeno tipo I a partir del quinto día de gestación se expresa de manera intensa y continua. Su reactividad no se observa en la membrana de Reichert's y en la decidua madura alrededor de las criptas de implantación (Clark et al, 1993). A medida que avanza la gestación el colágeno va desapareciendo en la predecidua, y en el estroma no decidualizado se mantiene en niveles bajos. El colágeno tipo III se ha observado alrededor de las células endometriales y en toda la región endometrial. Su expresión posee una variación bien marcada tanto en la decidua madura como en la predecidua (Clark et al, 1993). Este colágeno es el único que se presenta en la interface materno-fetal en el periodo en que ocurre la implantación del blastocisto sugiriendo un rol específico en la adhesión e invasión del trofoblasto (Spiess and Zorn, 2006). El colágeno tipo V se asocia al colágeno tipo I y es encontrado en el endometrio de ratones presentándose significativamente en el endometrio al séptimo día de gestación.

A pesar que en esta investigación no se logra establecer el tipo de colágeno expresado, si se hizo posible observar diferencias tanto en la presencia/ausencia, como en la distribución generalizada (homogeneidad/heterogeneidad) de esta molécula, siendo de esta manera identificada en el tejido endometrial durante el desarrollo gestacional entre los días 6.5 y 10.5, tanto en úteros de ratones control, como en aquellos de aborto espontáneo. Los colágenos tipo I, III y V se expresan mayormente en el séptimo día de gestación, periodo en que la decidua antimesometrial alcanza su mayor desarrollo. La

gran expresión de estos colágenos se observaron en la región predecidual, donde la presencia de sus células que la conforman posee una gran actividad metabólica específicamente entre célula y célula durante la gestación (Oliveira et al, 1991).

La expresión de colágeno en los animales control fue claramente detectable en el día 6.5 de gestación con patrones similares a los ya descrito en investigaciones anteriores, que detallan una expresión de esta molécula en el 7° día de gestación, en el cual la decidua alcanza su máximo desarrollo (Clark et al, 1993).

En la gestación normal la presencia de fibras delgadas de colágeno se observan precozmente en las células no decidualizadas y a medida que procede la gestación, el colágeno comienza a disminuir en la predecidual, pero en la región no decidual se mantiene en niveles bajos (Clark et al, 1993; Spiess and Zorn, 2006), en un patrón homogéneo. Esta característica no se encuentra presente en el tejido endometrial del modelo de aborto espontáneo, donde no se observa la presencia de colágeno en el área no decidualizada desde edades gestacionales tempranas (día 6.5), patrón que se mantiene en todos los estadios superiores. Además, la distribución del colágeno en el modelo de aborto espontáneo, se exhibe desorganizado, puntiforme, sin característica fibrilar, comparado con la distribución homogénea y fibrilar observada en las gestaciones control. Estas se encuentran en la región mesometrial en las células no decidualizadas, y hacia la región antimesometrial en la decidua y criptas de implantación, sin embargo a nivel de los vasos sanguíneos y glándulas la marcación de colágeno se mantiene bien delimitada, al igual que la gestación control.

La falla en el mantenimiento del embrión en el tejido endometrial nos lleva a pensar que moléculas que participaron activamente durante la adhesión e invasión del embrión, preparando el tejido endometrial como es el colágeno, podrían haberse alterado en algún momento durante el desarrollo de la gestación. Si bien el organismo reconoce al embrión como un cuerpo extraño, es este mismo quien a través de distintos mecanismos fisiológicos logra hacerlo propio.

Las metaloproteinasas (MMPs), son una familia de genes (Massova et al, 1998; Nagase and Woessner, 1999) que pueden jugar un papel en la degradación de la MEC durante la invasión de blastocisto y remodelación tisular. Ocupan un rol central en la embriogénesis, participan en condiciones fisiológicas (proliferación celular, migración

celular, remodelación normal de los tejidos, angiogénesis, etc.). Su alteración puede producir procesos patológicos como ateromas, artritis, cáncer, artero sclorosis entre otros (Visse R, 2009). Son unas de las enzimas proteolíticas más importantes que digieren componentes de la MEC y son macromoléculas abundantes en la superficie celular (Dominik, 2008). Estas MMPs serían participantes activos durante la invasión del trofoblasto al degradar la MEC del tejido endometrial facilitando su penetración. Es así que a partir de la presente investigación y la literatura se plantea que la asociación de MMPs, del tipo MMP-2 (gelatinasa A) expresada en el endometrio durante la implantación, MMP-9 (gelatinasa B) expresada en las células gigantes del trofoblasto (PTG) durante la implantación, TIMP del tipo TIMP-1, TIMP-2 ambos expresados en el estroma indiferenciado fuera del tejido decidua, TIMP-3 expresada en la decidua primaria y los colágenos, en la degradación de la MEC del tejido endometrial, son factores determinantes en el proceso de decidualización e implantación, procesos que permiten la invasión del blastocisto y permiten el mantenimiento del embrión en los siguientes estadios (6.5 a 10.5). (Waterhouse et al, 1993; Alexander et al, 1996; Leco et al, 1996; Das et al, 1997).

El endometrio en condiciones normales genera cierta resistencia a esta invasión, característica otorgada por la acción de los colágenos presentes. Es aquí, donde las MMPs juegan un papel importante, cuando comienzan a degradar la MEC del tejido endometrial rompiendo los enlaces del colágeno. Muchos estudios in vitro han demostrado que las MMPs pueden degradar una variedad de sustratos de la MEC incluyendo colágenos y moléculas no colagénicas, lo que sugiere que pueden funcionar removiendo la MEC de las enzimas durante la migración celular (Ster nlicht et al, 2000). La inhibición de metaloproteinasas en vivo utilizando inhibidores de la metaloproteinasas altera la decidualización, resultando en una menor diferenciación de estas células (Alexander et al., 1996; Rechtman et al., 1999). Este hallazgo indica que las MMP son necesarias para una decidualización normal en los ratones. Sugerimos por lo tanto que el exceso de TIMP disminuye la actividad de las MMPs, no pudiendo la MEC ser degradada correctamente y el tejido endometrial se volvería aun más resistente a la invasión del embrión. Esto ocasionaría falla en los procesos de implantación y mantenimiento del blastocisto en la cavidad uterina .

La actividad de las MMPs es uno de los factores importantes en la decidualización e implantación, permitiendo que a través de sus diferentes tipos de MMPs y TIMPs se logre el éxito de estos procesos. Estudios que hicieron uso de técnicas de inmunohistoquímica han demostrado la co-localización de neutrófilos y MMP-9. La MMP9 se sintetiza en los neutrófilos en la última etapa de maduración en la médula ósea, se almacena en una forma latente dentro de gránulos de gelatinasa, y está listo para ser secretado en el sitio de la inflamación (Etsuko and Yoshinao, 2005). Esto sugiere que el proceso fisiológico inflamatorio aumentaría la producción de MMP-9, llevando a un exceso en la degradación de la MEC, por lo tanto a un mayor rompimiento de los enlaces de colágeno generaría finalmente mayor fragilidad al tejido.

Fibronectina

Los resultados encontrados en distribución de fibronectina en el modelo experimental de aborto espontáneo, exhiben diferencias en relación a las gestaciones normales.

Como lo descrito en la literatura, la fibronectina comienza a incrementarse tempranamente en la gestación en roedores, alrededor de los 4.5 y 5.5 días de gestación (Rider et. al., 1992; Slater and Murphy, 1999). Luego se comienza a incrementar hacia la zona de conversión estromal, presentando patrones de carácter fibrilar, los mismos encontrados en las inmunohistoquímicas realizadas a los úteros de ratón de gestaciones normales. Las principales diferencias se apreciaron tempranamente, en los días 6.5 de gestación, donde la distribución de esta molécula en el modelo experimental no presentaba un patrón ordenado, exhibiéndose heterogéneo y débil. Si bien, esta característica se mantuvo en las edades gestacionales superiores, las diferencias se tornaron cada vez más menores.

La fibronectina es un importante sustrato para la migración celular por lo que las modificaciones observadas en el modelo experimental podrían estar relacionadas con defectos en la implantación embrionaria e invasión del trofoblasto del modelo de aborto espontáneo.

Tenascina

Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunohistoquímica de tenascina (TN), arrojan diferencias evidentes en la distribución de esta molécula a medida que avanza la gestación.

Como descrito en la literatura, la presencia de tenascina en el tejido endometrial es apreciable en etapas precoces de la gestación, antes de que ocurra la invasión por parte del embrión, hacia el 5° día, donde se encuentran altas concentraciones de esta molécula. Sin embargo, y a pesar de que la marcación disminuye, aún es posible encontrarla en forma fibrilar en el estroma antimesometrial hacia el día 7.5 de gestación (Aukhil et al, 1991). Se sugiere que la TN-C, juega un rol importante en la implantación pudiendo modular la adhesión de las células endometriales uterinas y por ende promoviendo la penetración del embrión (Carson et al, 1994). Si bien en el presente estudio no se realizaron técnicas para determinar que tipo específico de tenascina es la que influye directamente en la etapa de implantación, se demostró a través del análisis inmunohistoquímico en otros estudios que la expresión de TN-C no era detectada en el endometrio de ratones no gestantes, mientras que en animales en gestación la expresión en el estroma uterino en el día 0 fue evidente mediante estimulación mecánica (Naomi, et al 2000).

Resultados indican que la IL-1 alfa está involucrada en la interacción entre las células epiteliales y las células estromales y que la directa estimulación por IL -1alfa secretada por células del epitelio, podrían ser los reguladores de la expresión de TN-C por las células del estroma uterino (Naomi et al, 2000). Es así como la expresión de la Tenascina C en el estroma uterino durante la gestación en ratones parece ser regulada por la interacción del epitelio y las células estromales, además de una influencia hormonal notable (Naomi et al, 2000).

La pérdida de TN observada en los resultados de esta investigación puede estar relacionada con alteraciones en el proceso de implantación embrionaria y falla en la formación del embrión y la placenta.

Laminina

Los resultados obtenidos en la investigación, demostraron la presencia de diferencias en la distribución de laminina, desde etapas tempranas de las gestaciones estudiadas (día 6.5) en comparación a los úteros control.

La expresión de laminina en el proceso de gestación, es de carácter temprano, no obstante, es posible identificar su presencia en estadios posteriores.

Durante la invasión por parte del trofoblasto hacia el tejido endometrial, se comienzan a suceder diversos eventos de remodelación que permiten el correcto desarrollo de este proceso. Para este efecto, es necesario que se suceda un remodelamiento de los componentes de la MEC, incluyendo a la molécula de laminina. Como lo documentado por Blankenship y Given, hacia el día 6 de gestación, se comienza a apreciar una pérdida de laminina en la membrana basal del epitelio uterino, mostrando un claro patrón de remodelamiento ante la invasión trofoblástica. A pesar de esta situación, y en su carácter de molécula adhesiva, la laminina sigue estando presente en el tejido, teniendo como función una posible participación en la adhesión de las células en la lámina basal que las sustenta.

En la presente investigación, se pudo comprobar que existen diferencias de distribución de laminina en úteros de modelo de aborto, que en conjunto con las moléculas estudiadas, podrían estar implicadas en el proceso de aborto espontáneo, impidiendo un normal proceso de invasión y adhesión celular.

En la actualidad, diversos autores han tratado de dilucidar las posibles razones que desencadenarían la infertilidad y los abortos recurrentes. Por razones éticas, los estudios relacionados con este tema han sido realizados en ciclos no gestacionales, por lo que el conocimiento acerca del proceso de implantación y comunicación entre el blastocisto y el endometrio proviene de animales de estudio.

Fisiológica e histológicamente el desarrollo normal del endometrio es crítico para la receptividad endometrial y normal implantación. Irregularidades en la remodelación de la matriz extracelular del estroma endometrial ha sido asociado con anomalías histológicas, desordenes menstruales y defectos en la implantación. Por otro lado, se ha sugerido que el factor endometrial ya sea a nivel de tejido o molecular explica algunos

casos de infertilidad y abortos recurrentes la cual permanece de etiología desconocida (Thiennu H and Zena W, 2000).

Estudios realizados a mujeres con aborto recurrente y infertilidad inexplicable, comprobaron un aumento en los niveles de síntesis de RNAm de colágeno tipo I, MMP -2 y catepsina, en comparación con las mujeres control, con lo que se pudo concluir que la matriz extracelular participa en la receptividad endometrial y en la normal implantación, siendo las diferencias en la MEC, las posibles explicaciones al desencadenamiento de estos 2 procesos. (Yokimma et al 2002). Existe además la evidencia de un factor que regula la transcripción de diversos genes, entre ellos el de las MMPs, el ETS -2. Se ha documentado que deficiencia de ETS-2 ocasiona la muerte del ratón en la embriogénesis temprana, observándose alteraciones desde estadios tempranos, hacia el día 6.5, donde el cono ectoplacentario es pequeño, lo que es aparentemente causado por una falla en la migración trofoblástica reflejado en una pequeña cantidad de tejido trofoblastico desplegado (Thiennu H and Zena W, 2000).

La actividad de las MMTs en el endometrio se muestran dependiendo de la fase del ciclo menstrual y de los niveles de hormonas esteroidales, donde TIM -1 y 2 son expresados a niveles estables en el endometrio proliferativo y secretorio, habiendo un marcado aumento de TIM-3 durante la fase secretora, lo que sugiere un rol en la preparación para la decidualización e implantación (Higuchi et al, 1995). Es así como la disminución de esta MMT podría en el endometrio durante estadios tempranos e n la invasión del trofoblasto crear un desbalance en el control de la degradación de la MEC por el trofoblasto y subsecuentemente desglosar al endometrio y generar el fracaso de la implantación. Alternativamente según otros autores la disminución de los niveles de TIM-3 podría predisponer a las células predecidualizadas a la apoptosis (Whiteside et al, 2001).

Debido a la importancia en la remodelación de la MEC, se podría decir que la implantación del embrión, es un proceso invasivo, que involucra una extensiva degradación y remodelación de la MEC del estroma endometrial. En vivo, las células gigantes del trofoblasto expresan altos niveles de MMP -9, cuando existe una deficiente producción de esta metaloproteinasas se produce una disminución en la migración y degradación de la matriz extracelular por parte de estas células.

En el presente estudio, se pudo establecer diferencias de distribución de las moléculas de colágeno, fibroectina, tenascina y laminina, la cual podría estar potencialmente influenciada por una deficiente o inadecuada remodelación de la matriz extracelular en el modelo de aborto espontáneo.

Conclusiones

- Existen diferencias de distribución de colágeno, fibronectina, tenascina y laminina en el tejido endometrial en el modelo de aborto espontáneo de ratón en comparación al control.
- La síntesis y degradación defectuosa de las metaloproteinasas de matriz estarían involucradas en el fenómeno de aborto espontáneo.

Sugerencias

- Debido a las similitudes de reproducción y desarrollo embrionario, estos resultados se pueden extrapolar a condiciones humanas e incentivar estudios clínicos orientados a mujeres con problemas de fertilidad.
- Los resultados obtenidos en la histoquímica de colágeno podrían ser complementados con inmunohistoquímica para determinar la distribución de los tipos de colágenos.

Bibliografía

Abrahamsohn P., Zorn T. (1993) *“Implantation and Decidualization in Rodents”*. The Journal of Experimental Zoology vol 266, 603-628.

Alexander C., Hansell E., Behrendtsen O., Flannery M., Kishnani N., Hawkes S. and Werb Z. (1996) *“Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation”*. Development vol. 122, 1723-1736.

Andrade C, Abrahamsohn P, Godinho F, Sammuel E and Zorn T. (1996) *“Death and replacement of uterine epithelial cell during oil-induced deciduoma development in the mouse”*. The anatomical records vol. 244, 316-326.

Aplin J. (1997) *“Adhesion Molecules in Implantation”*. Reviews of Reproduction vol. 2, 84–93.

Armant D. (2005) *“Blastocyst don't it Alone. Extrinsic Signals Fine-Tune the Intrínscico Development Program of Trophoblast Cells”*. Developmental Biology vol. 280, 260-278.

Bany B., Harvey M. and Schultz G. (2000) *“Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization”*. Journal of Reproduction and Fertility vol. 120, 125-134.

Barbiaz B., Romagnano L., Afonso S., and Kurilla G. (1996) "*Localization and Expression of Fibronectin During Mouse Decidualization in Vitro: Mechanisms of Cell: Matrix Interactions*". *Development Dynamics* vol. 206, 330-342.

Blankenship T. and Given R. (1995) "*Loss Laminin and type IV Collagen in Uterine Luminal Epithelial Basement Membranes during blastocyst implantation in the mouse*". *The Anatomical Record* vol. 243, 27-36.

Beck K., Hunter I. and Engel J. (1990) "*Structure and Function of Laminin: Anatomy of a Multidomain Glycoprotein*". *FASEB Journal* vol. 4, 148-160.

Bertoja A., Zenclussen M., Casalis P., Sollwedel A., Schumacher A., Woiciechowsky C., Volk H. and Zenclussen A. (2005). "*Anti -P and E-selectin Therapy Prevents Abortion in the CBA/J x DBA/2J Combination by Blocking the Migration of Th1 Lymphocytes into Fetal-Maternal Interface*". *Cellular Immunology* vol. 238, 97-102.

Bijovsky A., Zorn T., Abrahamsohn P. (1992) "*Remodeling of the Mouse Endometrial Stroma During the Preimplantation Period*". *Acta Anatomica* vol. 144, 231-234.

Birk D., Fitch J., Barbiaz J., Doane K. And Linsenmayer T. (1990) "*Collagen Fibrillogenesis in Vitro: Interaction of Types I and V Collagen Regulates Fibril Diameter*". *Journal of Cell Science* vol. 95, 649-657.

Blankenship T. and Given R. (1992) "*Penetration of the Uterine Epithelial Basement Membrane During Blastocyst Implantation in the Mouse*". *The Anatomical Record* vol. 233, 196-204.

Blankenship T. and Given R. (1995) "*Loss of Laminin and Type IV Collagen in Uterine Luminal Epithelial Basement Membranes During Blastocyst Implantation in the Mouse*". The Anatomical Record vol. 243, 27-36.

Blois S., Tometten M., Kandil J., Hagen E., Klapp B., Margni R. and Arck P. (2005) "*Intercellular Adhesion Molecule-1/LFA Cross Talk is a Proximate Mediator Capable of Disrupting Immune Integration and Tolerant Mechanism at the Feto-Maternal Interface in Murine Pregnancies*". The Journal of Immunology vol. 174, 1820-1829.

Clark D., Chaouat G., Arck P., Mittrucker W. and Levy G. (1998) "*Cutting Edge: Cytokine-Dependent Abortion in CBA X CBA/2 Mice is Mediated by the Procoagulant Fgl2 Prothrombinase*". The Journal of Immunology vol. 160, 545-549.

Colognato H. and Yurchenco P. (2000) "*Form and Function: The Laminin Family of Heterodimers*". Development Dynamics vol. 218, 213-234.

Chiquet-Ehrismann R. (2004) "*Molecules in Focus Tenascins*". The International Journal of Biochemistry & Cell Biology vol. 36, 986-990.

Chun-Bo Teng, Hong-Lu Diao, Hong Ma, Li-Bin Xu, Xing-Hong Ma and Zeng-Ming Yang. (2004) "*Differential expression and activation of STAT 3 during mouse embryo implantation and decidualization*". Molecular reproduction and development vol. 69, 1-10.

Chun-Bo Teng, Hong-Lu Diao, Hong Ma, Jing Cong, Hao Yu, Xing-Hong Ma, Li-Bin Xu, and Zeng-Ming Yang (2004). “*Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3) Expression and Activation in Rat Uterus During Early Pregnancy*”. *Reproduction* vol. 128, 197–205.

D’Hauterive P., Charlet-Renard C., Goffin F., Foidart M. and Geenen V. (2002) “*La Fenêtre Implantatoire*”. *J. Gynecol Obstet Biol Reprod* vol. 31, 440-455.

D’ Souza S., Daikoku T., Farach-Carson M. and Carson D. (2007) “*Heparanase expression and function during early pregnancy in mice*”. *Biology of the Reproduction* vol. 77, 443-441.

Damsky C., Sutherland A. and Fisher S. (1993) “*Extracellular Matrix 5: Adhesive Interactions in Early Mammalian Embryogenesis, Implantation and Placentation*”. *FASEB Journal*, 1320-1329.

Denker H. (1993) “*Implantation: “A Cell biological paradox”* . *The Journal of Experimental Zoology* vol. 266, 541-558.

Dey S., Lim H., Deas S., Reese J., Paria B., Daikoku T. and Wang H. (2004) “*Molecular cues to implantion*”. *Endocrine Reviews* vol. 25, 341-373.

Dixon M., Chien E., Osol G., Callas P. and Bonney E. (2006) “*Failure of Decidual Arteriolar Remodeling in the CBA/J X DBA/2 Murine Model of Recurrent Pregnancy Loss is Linked to Increased Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 (TIMP-2)*”. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* vol. 194, 113- 119.

Duclos A., Haddad E., Chalifour L. and Baines M. (1996) "*Embryo Infiltration by Maternal Macrophages is Associated with Selective Expression of Proto-Oncogenes in a Murine Model for Spontaneous Abortion*". *Biology of Reproduction* vol. 54, 1088-1095.

Daimon E. and Wada Y. (2005) "*Role of Neutrophils in Matrix Metalloproteinase Activity in the Preimplantation Mouse Uterus*". *Biology of Reproduction* vol. 73, 163-171.

Fouladi-Nashta A., Jones C., Nijjar N., Mohamet L., Smith A., Chambers I. and Kimber S. (2005) "*Characterization of the Uterine Phenotype During the Peri-Implantation Period for LIF-null, MF1 Strain Mice*". *Developmental Biology* vol. 281, 1– 21.

Ghaemi S., Salehnia M. and Valojerdi M. (2008) "*The Effect of Progesterone and Exogenous Gonadotropin on Preimplantation Mouse Embryo Development and Implantation*". *Exp. Anim.* Vol. 57, 27-34.

Glasser S. and Clark J. (1975) "*A determinant role for progesterone in the development of uterine sensitivity to decidualization and ovo-implantation*". *Symp Soc Dev Biol* vol. 33, 311-345.

Graf J., Ogle R., Robey F., Sasaki M., Martin G., Yamada Y. and Kleinman H. (1987) "*A Pentapeptide from the Laminin B1 Chain Mediates Cells Adhesion and Binds the 67000 Laminin Receptor*". *Biochemistry* vol. 226, 6896-6900.

Grant D., Tashiro K., Segui-Real B., Yamada Y., Martin G. and Kleinman H. (1989) "*Two Different Laminin Domains Mediate the Differentiation of Human Endothelial Cells into Capillary-Like Structures in Vitro*". *Cell* vol. 58, 933-943.

Greca C., Bonciani H., Dietrich C, Abrahamsohn P. and Zorn T. (2000) *“Ultrastructural Cytochemical Characterization of Collagen-Associated Proteoglycans in the Endometrium of Mice”*. The Anatomical Record vol. 259, 413–423.

Hsia H. and Schwarzbauer J. (2005) *“Meet the Tenascins: Multifunctional and Mysterious”*. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 280, No. 29, 26641–26644.

Imakawa. Chang K. and Christenson R. (2004) *“Pre-Implantation Conceptus and Maternal Uterine Communications: Molecular Events Leading to Successful Implantation”*. Journal of Reproduction and Development Vol. 50, No 2, 155-169.

Iwahashi M. and Nakano R. (1998) *“Decreased Type V Collagen Expression in Human Decidual Tissues of Spontaneous Abortion During Early Pregnancy”*. F. Clin Pathol vol. 51, 44-46.

JoAnne J., Chiquet-Ehrismann R., Erickson H. and Carson D. (1994) *“Tenascin is Induced at Implantation Sites in the Mouse Uterus and Interferes with Epithelial Cell Adhesion”*. Development vol. 120, 661-671.

Jokimaa V., Oksjoki S., kujari H., Vuorio E. and Anttila L. (2002) *“Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with unexplained infertility and recurrent miscarriages”*. Molecular Human reproduction vol. 12, 1111-1116.

Jones F. and Jones P. (2000) *“The Tenascin Family of ECM Glycoproteins: Structure, Function, and Regulation During Embryonic Development and Tissue Remodeling”*. Developmental Dynamics vol. 218, 235–259.

Junqueira L, Bignolas G. and BrentaniR. (1979). *“Picrosirius Staining Plus Polarization Microscopy, a Specific Method for Collagen Detection in Tissue Sections”*. Histochemical Journal 11, 447-455.

Kennedy T., Gillio-Meina C. and Phang S. (2007) *“Prostaglandins and the Initiation of Blastocyst Implantation and Decidualization”*. Reproduction vol. 134, 635–643.

King A. (2000) "*Uterine leukocytes and decidualization*". Human Reproduction vol. 6, 28-36.

Kimber S. (2005) "*Leukaemia Inhibitory Factor in Implantation and Uterine Biology*". Reproduction vol. 130, 131-145.

Lee K. and DeMayo F. (2004) "*Animal Models of Implantation*" Reproduction vol. 128, 679–695.

Li Chen, Masaaki Nakai, Robert J. Belton Jr. and Romana A. Nowak. (2007). "*Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases during mouse embryonic development*". Reproduction 133, 405-414.

Lim H. and Dey S. (2008) "*HB-EGF: A Unique Mediator of Embryo-Uterine Interactions During Implantation*". Yexcr-07874; No. of Pages: 8; 4c: 4.

Lopata A., Bentin-ley U. and Enders A. (2002) "*Pinopodes and implantation*". Rev Endocr Metab Disord. vol. 2, 77-86.

Lucena S., Piñango C. and Guerrero B. (2006) "*Fibronectina, Estructura y Funciones Asociadas a la Hemostasia*". Investigación Clínica vol. 48, 249-262.

Luman C. and Rogers A. (1981) "*Pericytes in the stroma of the rat uterus*". Journal of Reproduction and Fertility vol. 63, 267-270.

Noda N., Minoura H, Nishiura R., Toyoda T, Imanaka-Yoshida K, Sakakura T. and Yoshida T. (2000) *“Expression of Tenascin-C in Stromal Cell of the Murine Uterus During Early Pregnancy: Induction by Interleukin-1alfa, Prostaglandin E2, and Prostaglandin F2 alfa”*. *Biology of Reproduction* vol. 63, 1713-1720.

Michie H, and Head J. (1994) *“Tenascin in Pregnant and Non-Pregnant Rat Uterus: Unique Spatio-Temporal Expression during Decidualization”*. *Biology of Reproduction* vol. 50, 1277-1286.

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

Paria B., Huet-Hudson Y. and Dey S. (1993) *“Blastocyst's State of Activity Determines the "Window" of Implantation in the Receptive Mouse Uterus”*. *Developmental Biology* Vol. 90, 10159-10162.

Paria B., Ma W., Tan J., Raja S., Deas S., Dey S. and hogan B. (2001) *“Celular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors”* . *PNAS* vol. 98, 1047-1052.

Song H. and Lim H. (2006) *“Evidence for Heterodimeric Association of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Receptor and Gp130 in the Mouse Uterus for LIF Signaling During Blastocyst Implantation”*. *Reproduction* vol. 131, 341–349.

Song H., Han K. and Lim H. (2007) *“Progesterone Supplementation Extends Uterine Receptivity for Blastocyst Implantation in Mice”*. *Reproduction* vol. 133, 487-493.

Spiess K, and Zorn T. (2007) *“Collagen Types I, III, and V Constitute the Thick Collagen Fibrils of the Mouse Decidua”*. *Microscopy Research and Technique* vol. 70, 18–25.

Romagnano L. and Barbiaz B. (1993) *“Mechanisms of Murine Trophoblast Interaction with Laminin”*. *Biology of Reproduction* vol. 49, 374-380.

Song H., Lim H., Das S., Paria B. and Dey S. (2000) "*Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF- deficient mice*". *Mol endocrinology* vol. 8, 1147-1161.

Skrzypczak J., Wirstlein P. and Mikolajczyk M. (2006). "*Could the defects in the endometrial extracellular matrix during the implantation be a cause for impaired fertility?*". *Journal Reprod Immunol* vol. 57. 40-48.

Tan Y., Tan D., He M., Gu M., Wang Z., Zeng G. and Duan E. (2005) "*A model for Implantation: Coculture of Blastocyst and Uterine Endometrium in Mice*". *Biology of Reproduction* vol. 72, 556-561.

Tashiro. K., Sephel G., Grestorex D., Sasaki M., Shirashi N., Martin G., Kleinman H. and Yamada Y. (1989) "*A Synthetic Peptide Containing the IKVAV Sequence from the a Chain of Laminin Mediates Cells Attachment, Migration and Neurite Outgrowth*". *Biological Chemistry Journal* vol. 264, 174-182.

Thiennu H. Vu and Zena Werb. (2000). "*Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology*". *Genes Dev* vol. 14, 2123-2133.

Tuckerman E, Laird S, Stewart R, Wells M and Li T. (2004). "Markers of endometrial function in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a comparison between morphologically normal and retarded endometrium" *Human reproduction* 1, 196-205.

Ueda O., Yorozu K., Kamada N, Jishage K., Kawase Y., Toyoda Y. and Suzuki H. (2003) "*Possible Expansion of "Window of Implantation" in Pseudopregnant Mice: Time of implantation of Embryos at Different Stages of Development Transferred into the Same Recipient*". *Biology of Reproduction* vol. 69, 1085-1090.

Visse R. and Nagase H. (2003) "*Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry*". *Circ Res.* Vol. 92, 827-839.

Wakitani S., Hondo H., Phichitraslip T., Stewart C. and Kiso Y. (2008) "*Upregulation of Indian Hedgehog Gene in the Uterine Epithelium*"

Wewer U., Damjanov A., Weis J., Liotta L. and Damjanov I. (1986). "*Mouse Endometrial Stromal Cells Produce Basement-Membrane Components*". *Differentiation* vol. 32, 49-58.

Wenstrup R., Florer J., Brunskill E., Bell S., Chervoneva I. and Birk D. (2004) "*Type V Collagen Controls the Initiation of Collagen Fibril Assembly*". *The Journal Of Biological Chemistry* vol. 279, No. 51, 53331–53337.

Zang C., Duan E., Cao Y., Jiang G. and Zeng G. (2000) "*Effect of 32/67 KDa Laminin-Binding Proteína Antibody on Muose Embryo Implantation*". *Journal of Reproduction and Fertility* vol. 119, 137-142.

Zheng L., Ojcius D. and Young J. (1993) "*Perforin-Expressing Cells During Spontaneous Abortion*". *Biology of Reproduction* vol. 48, 1014-1019.

Zorn T., Bijovsky T., Bevilacqua E. and Abrahamsohn P. (1989) "*Phagocytosis of collagen by mouse decidual cells*". *The Anatomical Record* vol. 225, 96-100.

LIBROS

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2000). *“Molecular Biology of The Cell”*. 4º Edición.

Aplin J. (2002). *“The Endometrium: Endometrial Extracellular Matrix”*. Cap. 23 354-368.

Coleman D., Kaliss N., Dagg C., Russell E., Fuller J, Staats J, Green M. (1966) *“Biology of the Laboratory Mouse”*. 2º Edition.

Geneser F. (2000). *“Histología sobre bases biomoleculares”*. 3º edición

Karp G. (1998). *“Biología Celular y Molecular”*. 3º Edición.

Kneis T. and Vale R. (1999). *“Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins”*. 2º Edición.

Lodish H., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2002). *“Biología Celular y Molecular”*. 4º Edición.

Zorn T (2005). *“Celulas-uma abordagem multidisciplinar”* 1º Edición

Tesis

Spiess K. and Zorn T. (2006) *“Distribuição temporal e espacial dos colagenos I, III e V na decidua de camundongo: estudio inmunocitoquímico en microscopia de e electrônica”*.

San Martin S. (2003) *“Caracterização e distribuição de proteoglicanos da matriz extracelular do útero durante as fases iniciais da gestação em camundongos efeitos da castração e da reposição hormonal”*.

Paginas Web

Franklin H. Bronson, Charles P. Dagg, and George D. Snell. *“Reproduction”*.
<http://www.informatics.jax.org/greenbook/chapters/chapter11.shtml>.

George D. Snell and Leroy C. Stevens. *“Early Embryology”*.
<http://www.informatics.jax.org/greenbook/chapters/chapter12.shtml>.