Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

"Rol de RECK en la invasión del trofoblasto y remodelación de las arterias uterinas durante la gestación en modelo murino"

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Macarena Andrea Aguilera Olguín

Director de Tesis: Sebastián San Martín Henríquez

Codirector de Tesis: Jaime Gutiérrez Pérez
Ivo Carrasco Wong

Marzo / 2023

Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

"Rol de RECK en la invasión del trofoblasto y remodelación de las arterias uterinas durante la gestación en modelo murino"

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Macarena Andrea Aguilera Olguín

Director de Tesis: Sebastián San Martín Henríquez
Codirector de Tesis: Jaime Gutiérrez Pérez
Ivo Carrasco Wong

Marzo / 2023

Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

"Rol de RECK en la invasión del trofoblasto y remodelación de las arterias uterinas durante la gestación en modelo murino"

Macarena Andrea Aguilera Olguín

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Sebastián San Martín Henríquez en el laboratorio de la Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. XXXX XXXXX Presidente Comisión	Dr.XXX XXXXXX Profesor Informante	Dr. XXXX XXXXXX Profesor Informante

Dr. XXXX XXXXXX
Director de Tesis

Ciudad, Chile
201X

ABREVIATURAS

MEC: matriz extracelular
MMPs: metraloproteinasas
Dg: de gestación
CGT: células gigantes trofoblásticas
P-CGT: células gigantes trofoblásticas parietales
SpA-CGT: *spiral artery-associated* a CGT
C-CGT: células gigantes trofoblásticas de canal
Ch-CGT: *channel* CGT
ADN: ácido desoxirribonucleico
NK: natural killer
TM: triángulo mesometrial
TGF-β: factor de crecimiento transformante β
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial
RECK: reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs
EGF: factor de crecimiento epidérmico
SPI: inhibidor de serina proteasa
ADNC: ácido desoxirribonucleico complementario
GPI: glicosi-fosfatidil inositol
RUPP: ratas de presión de perfusión uteroplacentaria reducida
WT: wild type
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PAS: Periodic Acid-Schiff
PBS: buffer fosfato salino
HRP: Péroxidasa de rábano picante
VWf: factor Von Willebrand
ADAM: desintegrina y metaloproteasa

ÍNDICE

RESUMEN **1**

INTRODUCCIÓN **2**

1. ANATOMÍA DEL ÚTERO MURINO Y CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS **2**

2. FECUNDACIÓN E IMPLANTACIÓN MURINA **3**

3. PLACENTACIÓN **7**

3.1. Día 7.5 a 9 dg 7

3.1. Día 10 dg 7

3.2. Día 12 dg 8

3.3. Día 14 dg 9

4. PROCESO DE INVASIÓN DE LAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS **10**

5. REMODELACIÓN DE LAS ARTERIAS ESPIRALADAS UTERINAS **11**

6. REGULADOR DE METALOPROTEINASAS: PROTEÍNA RICA EN CISTEÍNA INDUCTORA DE REVERSIÓN CON MOTIVOS KAZAL (RECK) **13**

7. RECK Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO **14**

HIPÓTESIS **16**

OBJETIVO GENERAL **16**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS **16**

METODOLOGÍA **17**

1. CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO **17**

2. MODELO ANIMAL **17**

3. TAMAÑO DE LA MUESTRA **18**

4. RECOLECCIÓN DE PLACENTAS **18**

5. GENOTIPIFACIÓN DE LOS PROGENITORES Y EMBRIONES **19**

6. PROCESAMIENTO DE PLACENTAS: **20**

6.1 HEMATOXILINA-EOSINA 20

7. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS **21**

7.1. PAS 21

8. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA: **21**

9. TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA 23

10. CAPTURA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES 24

10.1. Captura de imágenes 24

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 26

12. CONSIDERACIONES ÉTICAS: 26

RESULTADOS 27

1. GENOTIPIFICACIÓN DE PROGENITORES Y EMBRIONES 27

2. RECOLECCIÓN, MACROSCOPÍA DE CUERNOS UTERINOS 28

3. DESCRIPCIÓN GENERAL E IDENTIFICACIÓN DE LAS ZONAS EN LOS SITIOS DE IMPLANTACIÓN DURANTE EL DÍA 10, 12 Y 14 DG. 29

4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL PROCESO DE INVASIÓN Y REMODELAMIENTO DE LAS ARTERIAS ESPIRALADAS EN PLACENTAS DE EMBRIONES SILVESTRES ($RECK^{+/+}$), HETEROCIGOTO ($RECK^{+/-}$) Y KNOCKOUT ($RECK^{-/-}$) PARA RECK EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS 10, 12, 14 dg 36

5. DETERMINAR LA DISTRIBUCIÓN DE RECK EN PLACENTAS DE EMBRIONES SILVESTRES ($RECK^{+/+}$) Y HETEROCIGOTO ($RECK^{+/-}$) PARA RECK EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS 10, 12, 14 dg 56

DISCUSIÓN. 63

CONCLUSIONES 70

BIBLIOGRAFÍA 71

ANEXOS 79

ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE COLA DE RATÓN. 79

ANEXO 2. PROTOCOLO DE PCR. 80

ANEXO 3. PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DE PLACENTAS 81

ANEXO 4. TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA 82

ANEXO 5. TÉCNICA DE PAS 83

ANEXO 6: PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-ALPHA SMA. 85

ANEXO 7. PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-RECK 88

ANEXO 8. PROTOCOLO BLOTTO INMUNO 10X 91

ANEXO 9. PROTOCOLO INMUNOFLUORESCENCIA PAN-CKS 92

ANEXO 10. PROTOCOLO INMUNOFLUORESCENCIA VWf 94

ANEXO 11. ACTA DE APROBACIÓN BIOÉTICO. 96

ANEXO 12. ACTA DE SEGUIMIENTO BIOÉTICO. 97

ANEXO 13. CONTROL NEGATIVO DE INMUNOHISTOQUÍMICA ANTICUERPO SECUNDARIO IGG DE CABRA ANTI-CONEJO CONJUGADO CON HRP. 98

ANEXO 14. CONTROL NEGATIVO DE INMUNOFLUORESCENCIA ANTICUERPO SECUNDARIO IGG DE CABRA ANTI-CONEJO CONJUGADO ALEXA FLUOR™ 568 E IGG DE CABRA ANTI-MOUSE CONJUGADO ALEXA FLUOR™ 488 99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del útero de ratón..... 2
Figura 2. Diagrama de las primeras etapas del desarrollo embrionario 4
Figura 3. Implantación y diferenciación de células durante el desarrollo temprano..... 5
Figura 4. Desarrollo de la placenta en día 10 dg. 8
Figura 5. Desarrollo de la placenta en día 12 dg 9
Figura 6. Desarrollo de la placenta en día 14 dg 10
Figura 7. Esquema de cambios asociados a remodelación en las arterias uterinas.....12
Figura 8. Esquema de procesos asociados a la remodelación de las arterias uterinas espiraladas.....12
Figura 9. Estructura primaria de RECK y funciones conocida.....14
Figura 10. Esquema de diseño experimental 17
Figura 11. Representación de identificación del tapón vaginal.....18
Figura 12. Disección de todo el cuerno uterino. 19
Figura 13. Genotipificación de F0.....27
Figura 14. Obtención de cuernos uterinos de hembra heterocigota para RECK. 28
Figura 15. Obtención de cuernos uterinos de hembra heterocigota para RECK. 29
Figura 16. Obtención de cuernos uterinos de hembra heterocigota para RECK. 29
Figura 17. Morfología de sitios de implantación de días 10, 12 y 14 dg 31
Figura 18. Microfotografías de zona de miometrio de días 10, 12 y 14 dg. 32
Figura 19. Microfotografías de zona de la Decidua proximal de días 10, 12 y 14 dg....33
Figura 20. Microfotografías de zona de Células Gigantes trofoblásticas de días 10, 12 y 14 dg. 34
Figura 21. Microfotografías de zona del Laberinto de días 12 y 14 dg.....35
Figura 22. Resumen de los cambios significativos de placentas $RECK^{+/-}$ al comparar con $RECK^{+/-}$ en día 12 dg.....38
Figura 23. Invasión del trofoblasto en placentas de día 12 dg. 40

Figura 24. Invasión del trofoblasto en placentas de día 14 dg. 41
Figura 25. Grosor de la pared de las arterias uterinas espiraladas ubicadas en miometrio, triángulo mesometrial (TM) y decidua (D).....43
Figura 26. Porcentaje que ocupa la pared de las arterias uterinas según ubicación y periodo de gestación.....44
Figura 27. Depósito de fibrinoide en placentas día 10 dg en triángulo mesometrial (TM) y decidua (D).....46
Figura 28. Depósito de fibrinoide en placentas día 12 dg en triángulo mesometrial (TM) y decidua (D).....47
Figura 29. Depósito de fibrinoide en placentas día 14 dg en triángulo mesometrial (TM) y decidua (D).....48
Figura 30. Capa muscular en arterias de placenta día 10 dg 50
Figura 31. Capa muscular en arterias de placenta día 12 dg 51
Figura 32. Capa muscular en arterias de placenta día 14 dg 52
Figura 33. Tipo celular que recubre el lumen de las arterias uterinas de placenta día 12 dg. 54
Figura 34. Tipo celular que recubre el lumen de las arterias uterinas de placenta día 14 dg. 55
Figura 35. Ubicación de Reck en sitios de implantación de días 10, 12 y 14 dg.....57
Figura 36. Ubicación de Reck en miometrio de días 10, 12 y 14 dg.....58
Figura 37. Ubicación de Reck en triángulo mesometrial de días 10, 12 y 14 dg 59
Figura 38. Ubicación de Reck en decidua de días 10, 12 y 14 dg 60
Figura 39. Ubicación de Reck en células gigante trofoblásticas de días 10, 12 y 14 dg61
Figura 40. Ubicación de Reck en laberinto días 12 y 14 dg.. 62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers utiliados para genotipificación de ratones $RECK^{+/+}$, $RECK^{+/-}$ y $RECK^{-/-}$ …… 20
Tabla 2. Listado y detalle de anticuerpos…… 22
Tabla 3. Listado y detalle de anticuerpos…….. 23-24
Tabla 4. Número de placentas según cigocidad y periodo de gestación……..…… 28
Tabla 5. Número de reabsorciones según periodo de gestación obtenidos……..28

RESUMEN

La placenta es un órgano esencial para el desarrollo, donde la invasión del trofoblasto y la remodelación de las arterias uterinas son procesos claves que ocurren al inicio del embarazo. Se ha evidenciado que el éxito de remodelación de las arterias uterinas depende de la invasión del trofoblasto depende la lo cual es facilitado por proteasas que degradan componentes de la matriz extracelular (MEC).

RECK es un regulador negativo de metaloproteinasas (MMPs), que participa en la regulación de la MEC, en procesos de invasión y angiogénesis. El objetivo de este estudio fue describir el rol de RECK durante el desarrollo temprano de la placenta en un modelo murino. Los resultados mostraron que placentas $RECK^{+/-}$ presentan una invasión en zonas de tejido materno más profundos y remodelamiento de arterias espiraladas uterinas más avanzados en día 12 dg al comparar con placentas $RECK^{+/+}$, significando que la carga genética de RECK estaría regulando que eventos como invasión y remodelación ocurran de manera más acelerada. Además, placentas $RECK^{-/-}$ evaluadas en día 10 dg, no presentaron cambios significativos. Proponemos que sería por una respuesta del tejido materno que también forma parte de la regulación de la invasión, sin embargo, son antecedentes que no eran parte del enfoque de estudio y quedan por estudiar.

Este es uno de los primeros estudios que describe la presencia de RECK en tejido placentario y materno en días 10, 12 y 14 de gestación mostrando que no solo cumple un rol regulador en la angiogénesis del embrión como era de conocimiento, sino que también un rol regulador de los procesos de invasión del trofoblasto y remodelamiento de las arterias uterinas espiraladas, como también la temporalidad de éstos.

INTRODUCCIÓN

El embarazo es un proceso que considera la implantación exitosa del blastocisto y el desarrollo óptimo de la placenta, que resulta ser el primer órgano en formarse durante la embriogénesis. La placenta forma parte de la interfaz materno-fetal y promueve el crecimiento del embrión y el feto mediante diferentes funciones(1–3), entre ellas, *endocrina*, *nutricional*, a través del suministro de nutrientes y oxígeno, como también *eliminación de desechos*(4). Estas funciones la logra esencialmente, mediando el intercambio de estos mediadores metabólicos entre la sangre materna y fetal(5).

1. ANATOMÍA DEL ÚTERO MURINO Y CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS

El útero del ratón es de tipo dúplex, esto quiere decir que está compuesto por dos cuernos independientes asociados a un oviducto y que terminan en un cérvix uterino(6) (ver Fig. 1). Cada oviducto tiene 3 divisiones anatómicas: el infundíbulo que corresponde a la zona cercana al ovario y que recibe los ovocitos, la ampolla donde ocurre la fecundación y el istmo conectado al útero(7). El útero está irrigado por la rama uterina de la arteria ovárica que permite el ingreso de la sangre en la porción craneal y el ingreso de forma caudal por la arteria uterina, ambas ubicadas en el mesometrio(3,8).

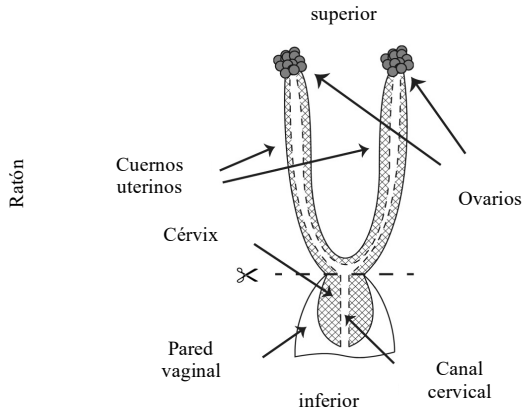


Figura 1. Esquema del útero de ratón. El tracto reproductivo del ratón se encuentra con cada ovario asociado a un cuerno uterino que confluyen en el cérvix (Modificado de Yoshida K; et al. 2019).

Las hembras murinas presentan cambios morfo-funcionales en los órganos genitales, organizados en un ciclo estral que está subdividido en 4 fases. La fase de *Proestro* (1 a 1,5 días) que corresponde al periodo pre-ovulatorio, caracterizado por un crecimiento del tracto genital con engrosamiento de la mucosa uterina, leve hiperemia venosa y en el cérvix. Luego se presenta el *Estro* (1 a 3 días), periodo ovulatorio o etapa en que la hembra está receptiva sexualmente y se caracteriza por hiperemia venosa en la vulva. El *Metaestro* (1 a 5 días) presenta cambios degenerativos con epitelio queratinizado de la vulva. Finalmente en la fase de *Diestro* (2 a 4 días) o periodo de reposo, se genera mucosidad en la vagina(9–11). Finalmente, el periodo de gestación murino dura aproximadamente 19 a 22 días, obteniendo una camada que varía según la cepa murina alcanzando un rango de 2 a 13 crías en promedio(4,12).

2. FECUNDACIÓN E IMPLANTACIÓN MURINA

El ovocito durante la ovulación libera factores químicos que promueven la llegada del espermatozoide(13). Aproximadamente 72 horas posterior a la fecundación, el cigoto que avanza desde el oviducto, se divide en varias células a lo que se les denomina blastómeras, formando una masa multicelular que llega a los cuernos uterinos como mórula o blastocisto temprano(14). Al ingresar al útero, se ubican en las criptas de implantación formadas en la región antimesometrial formando el blastocisto (ver Fig. 2)(15). Durante el periodo de pre-implantación es posible distinguir 2 conjuntos celulares en el blastocisto, la *masa celular interna,* que dará origen al embrión y el *trofoectodermo* que se diferencia en los distintos tipos de células trofoblásticas después de la implantación, y que serán las principales encargadas de formar la placenta(16).

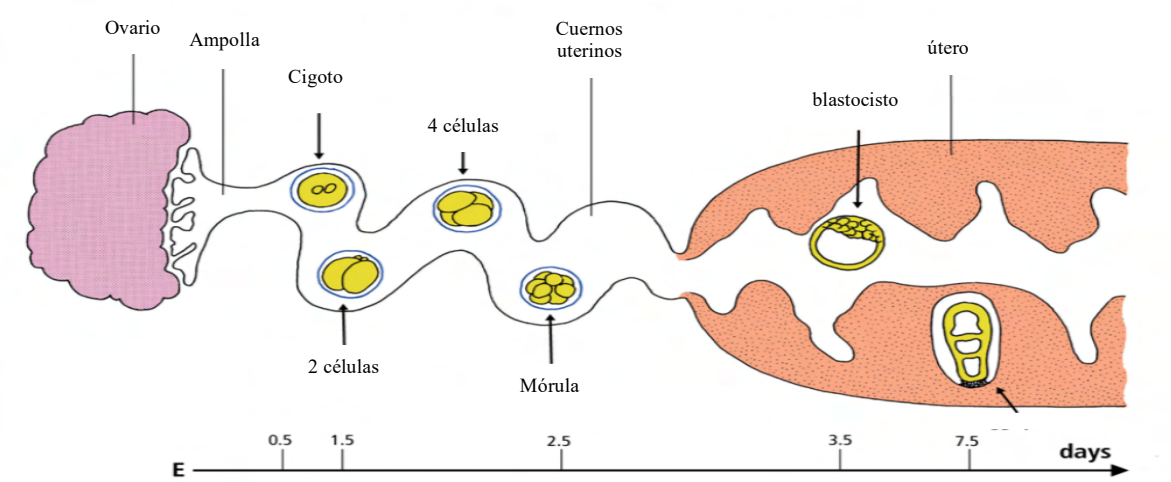


Figura 2. *Diagrama de las primeras etapas del desarrollo embrionario. Se presentan las diferentes estructuras anatómicas del ratón con los primeros cambios durante el desarrollo temprano y sus estadíos. (Modificado de Carretero, A; et al. 2017)*

El periodo de implantación se inicia, cercano al día de gestación (dg) número 4 o 4 dg, con el aumento de la permeabilidad vascular en el sitio de fijación del embrión y termina cercano al día 7.5 dg con la formación del saco vitelino y la nutrición histiotrófica (Ver Fig. 3). Durante este periodo los niveles de estrógeno y progesterona liberados por el cuerpo lúteo promueven la receptividad uterina, induciendo la proliferación de células estromales endometriales y el proceso de decidualización, permitiendo la unión y posterior implantación del blastocisto al endometrio(17–19).

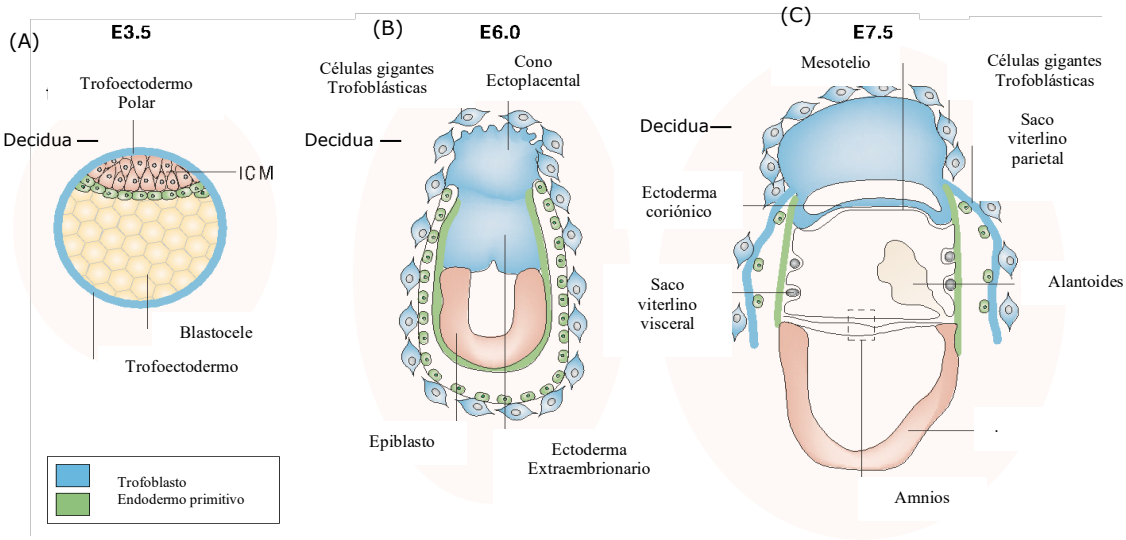


Figura 3. *Implantación y diferenciación de células durante el desarrollo temprano. (A)Día 3.5 dg: llegada del Blastocisto con la diferenciación del trofoectodermo, masa celular interna y blastocele. (B)Día 6.0 dg: Se diferencian las células gigantes trofoblásticas, se forma el cono ectoplacentario y ectoderma extraembrionario. (C)Día 7.5 dg: células gigantes trofoblásticas continúan invadiendo y se origina el alantoides a partir del mesoderma extraembrionario (Modificado de Rossant, J; et al. 2001).*

Durante la implantación, el trofoectodermo (capa de células más externas que envuelve al blastocisto) que no está en contacto directo con la masa celular interna, denominado *trofoectodermo mural*, deja de dividirse. Aproximadamente al día 5.5 dg(20) se diferencia en las células gigantes trofoblásticas (CGT) parietal primarias (P-CGT)(2,21). Estas se caracterizan por ser poliploides, como consecuencia de la duplicación del ADN (ácido desoxirribonucleico) sin una posterior mitosis (endoreplicación), lo que les permite aumentar su tamaño celular favoreciendo la vida útil a través del aumento de la tolerancia al estrés y resistencia a señales apoptóticas(22), además presentan capacidad fagocítica, función endocrina por la liberación de citoquinas y hormonas reguladoras, y median la invasión del endometrio mediante la liberación de proteasas (activador del plasminógeno uroquinasa y metaloproteinasas)(4,5,16). La regulación del proceso de invasión de estas células, es considerado crítico, ya que si se vuelve ilimitada podría provocar un crecimiento tumoral, mientras que si es insuficiente impide el desarrollo óptimo del embrión(5).

Por otro lado, se distingue el *trofoectodermo polar* ubicado próximo a la masa celular interna que continúa proliferando y diferenciándose durante el día 6.5 dg(20) formando el ectodermo extraembrionario y el cono ectoplacentario que luego desarrollará la placenta(2,5). El ectodermo extraembrionario situado hacia el tejido fetal, dará origen al laberinto compuesto por sincitiotrofoblasto I y II(7) y tiene como principal función ser una barrera protectora, de intercambio y endocrina(23). Por otro lado, el cono placentario ubicado próximo al tejido materno formará la zona de unión, estructura de la placenta que se ubica entre la decidua y el laberinto, está compuesto por subespecializaciones células gigantes trofoblásticas, el espongiotrofoblasto y las células trofoblásticas ricas en glucógeno y también es considerado como principal compartimento endocrino(4,24,25).

Las subespecializaciones de las CGT considera a las que están asociadas con las arterias uterinas espiraladas (SpA-CGT), las de canal (C-CGT), *"channel"* (Ch-CGT) y las P-CGT secundarias(21), las cuales se diferencian en el día 7.5 dg(20) separan el tejido embrionario de la decidua materna y las células endoteliales, cuyas características son similares a las P-CGT primarias, responsable de tomar contacto con los vasos uterinos, promoviendo la remodelación de las arterias espiraladas uterinas, necesaria para la correcta perfusión de sangre materna hacia la placenta(4,5,26). El espongiotrofoblasto está ubicado en la capa media de la placenta, entre las P-CGT secundarias y el laberinto. Se caracterizan por ser compactas y con un núcleo levemente más grande que las células ricas en glucógeno. Las células trofoblásticas ricas en glucógeno almacenan pequeñas cantidades de glucógeno desde el día 5.5 dg y aumentan en número notoriamente cercano al día 13 dg como agrupaciones con núcleos delimitados y un citoplasma aparentemente vacío(4,5,27).

Durante la placentación se presentan cambios hemodinámicos, vasculares y uterinos para lograr un suministro de sangre y nutrientes suficientes para el embrión y feto en desarrollo(28,29); siendo la remodelación de las arterias espiraladas uterinas un proceso relevante durante la placentación temprana(30,31), ya que el fracaso está vinculado directamente con diversas patologías del embarazo en humanos(32) y que pueden emularse en modelos murinos presentando signos como el aumento de la

resistencia vascular sistémica, hipertensión, proteinuria, crecimiento placentario deficiente, disminución del transporte de nutrientes y bajo peso del feto(33,34).

3. PLACENTACIÓN

3.1. Día 7.5 a 9 dg

Durante este periodo las células P-CGT primarias inician el proceso de invasión temprano hasta las arterias uterinas espiraladas ubicadas en la decidua materna, facilitado por 2 procesos; uno intersticial erosionando la capa de músculo liso e integrándose en el revestimiento endotelial y otro endovascular, ambos permitiendo que la sangre materna irrigue hacia la placenta. El proceso de invasión a su vez, da inicio a la remodelación vascular que otorga la capacidad funcional de la placenta(25).

El mesoderma extraembrionario durante este periodo da origen al alantoides, ubicado en el límite de los tejidos embrionarios y extraembrionarios. Durante el día 8.5 dg ocurre la unión entre el alantoides y el corion, lo que permite que las células mesodérmicas extraembrionarias estén en contacto con el ectoderma coriónico que comenzará a invaginarse desencadenando la diferenciación del sincitiotrofoblasto que formará el laberinto(25).

3.1. Día 10 dg

Comienza la fase de gestación donde se forman las capas de la placenta corioalantoídea compuesta por laberinto, zona de unión y decidua(7). Entre los días 9.5 y 10.5 dg, el sincitiotrofoblasto forma la barrera interhemal (superficie que permite el transporte) compuesta por 3 capas: sincitiotrofoblasto tipo I, tipo II y el mesoderma extraembrionario que dará origen a los capilares fetales. La formación de los vasos embrionarios en el día 10 dg ubicados en el laberinto son indicadores del inicio de la circulación placentaria(18). Defectos en el desarrollo temprano del laberinto generan una placa coriónica con escasa superficie de contacto y poco crecimiento de los vasos sanguíneos fetales provocando la muerte fetal durante los días 10.5 a 12.5 dg(35).

Mientras el laberinto se desarrolla, es sostenido por una capa compacta de células del espongiotrofoblasto pertenecientes a la zona de unión que separa al laberinto de las

P-CGT primarias(36) (Ver Fig. 4). Además, inician los cambios en las arterias espiraladas uterinas que resultará en vasos de mayor calibre y con reducida capa muscular(37).

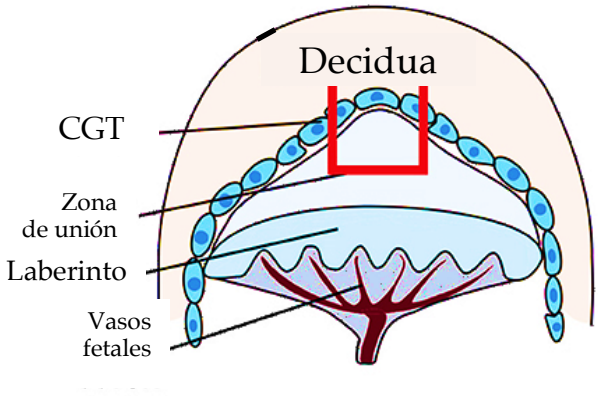


Figura 4. Desarrollo de la placenta en día 10 dg. Se logra distinguir el inicio de la formación del laberinto, sostenido por una capa de espongiotrofoblasto ubicado en la zona de unión *que lo separa de las CGT (células gigantes trofoblásticas) (Modificado:* Woods, L; et al. 2018*).*

3.2. Día 12 dg

Durante este periodo en adelante, las P-CGT secundarias invaden la decidua asociándose a los espacios sanguíneos maternos. La zona de unión estará compuesta por el espongiotrofoblasto, las células ricas en glucógeno y las P-CGT secundarias(27,38) (Ver Fig. 5), que producirán altas concentraciones de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas siendo el principal compartimiento endocrino(25).

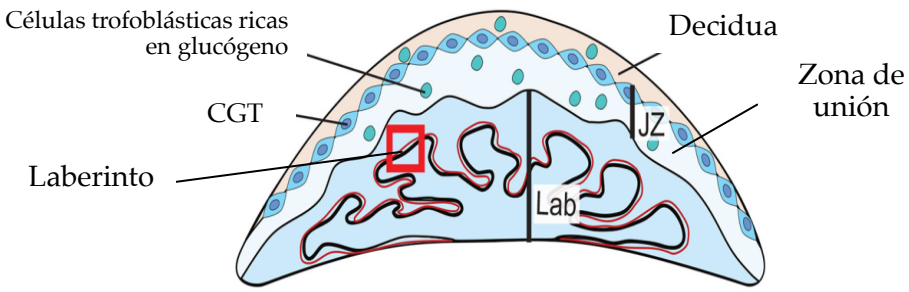


Figura 5. Desarrollo de la placenta en día 12 dg. Se observa el laberinto, la zona de unión, y la capa de CGT (células gigantes trofoblásticas) tomando contacto con la decidua (Modificado: Woods, L; et al. 2018*).*

Se han observado cambios asociados a la remodelación de las arterias uterinas desde el día 10 dg, donde no se observan diferencias en el número de estas arterias, pero sí se aprecia un aumento de aproximadamente el doble del diámetro de los vasos que se puede observar ya en el día 14 dg(39). Hasta el día 12 dg, las P-CGT primarias son las que mayormente han invadido la decidua, observándose tanto peri como endovascular(39). Cercano al día 12 y 12.5 dg existe una invasión más profunda considerado como un periodo relevante para evaluar cambios vasculares(40).

La cantidad de células trofoblásticas ricas en glucógeno disminuyen progresivamente en la zona de unión desde el día 13 dg, ya que migran, invaden la decidua y rodean las arterias espiraladas uterinas cuyo proceso se mantiene hasta los días 15 a 18 dg(27,38). Se ha observado que las células ricas en glucógeno muestran una invasión intersticial difusa en la decidua, y no siempre se encuentran asociadas alrededor de los vasos(39).

3.3. Día 14 dg

A partir de este periodo gestacional se pueden observar todas las estructuras de una placenta madura, considerando laberinto, zona de unión, decidua y vasos sanguíneos fetales(41) (Ver Fig. 6). Las células ricas en glucógeno están junto al espongiotrofoblasto como también cercano a las células gigantes trofoblásticas. El laberinto presenta una mayor densidad en los capilares fetales como en espacios sanguíneos maternos(2).

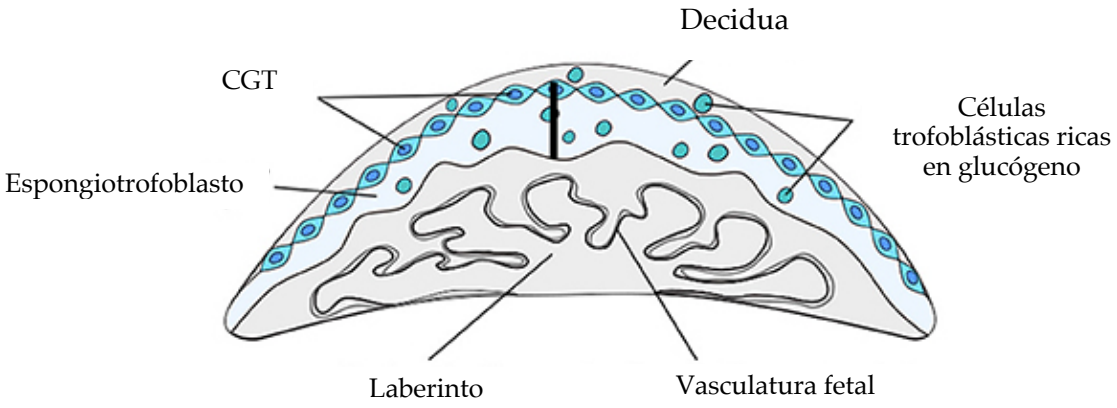


Figura 6. *Desarrollo de la placenta en día 14 dg. Estructuras de una placenta madura. Laberinto con mayor densidad de capilares fetales rodeado de espongiotrofoblasto y trofoblasto de células ricas en glucógeno conforman la zona de unión, capa de CGT (células gigantes trofoblásticas) y remodelación de las arterias espiraladas uterinas (Modificado: Woods, L; et al. 2018).*

En la placentación el proceso de invasión de las células trofoblásticas está altamente regulado por el entorno, a través de la liberación de niveles altos de MMPs (metaloproteinasas) principalmente de las P-CGT(42), como también a través de la liberación de inhibidores de enzimas proteolíticas(18).

4. PROCESO DE INVASIÓN DE LAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS

Existen dos mecanismos de invasión durante la placentación murina, la invasión *intersticial* y la *endovascular*. En el caso de la especie mus musculus la invasión alcanza hasta la decidua sin llegar al miometrio a diferencia del humano que alcanza un tercio del miometrio(43). El proceso de invasión de las células trofoblásticas es altamente controlado entre otras proteínas, por proteínas activadoras e inhibidoras de proteasas, que permiten la degradación y remodelación de la matriz extracelular como también la fagocitosis. Se ha demostrado que al menos 3 tipo de proteasas están involucradas en facilitar el proceso de invasión, las metaloproteinasas de la matriz (principalmente MMP-2, -9 y -11), las serina proteasas (activador del plasminógeno uroquinasa) y la cisteína proteasa liberadas por la decidua así como por las células del trofoblasto(18).

Una de las funciones más estudiadas de estas endopeptidasas es la degradación de la MEC, sin embargo, también se ha demostrado una actividad asociada a modulación de mediadores de inflamación, intervención en la cicatrización y en relación a la vasculatura como intermediarias de la migración, proliferación y apoptosis de células endoteliales y músculo liso(44).

5. REMODELACIÓN DE LAS ARTERIAS ESPIRALADAS UTERINAS

La sangre materna logra el contacto con el sitio de implantación mediante la arteria radial que ingresa al triángulo mesometrial donde se ramifica en 5 a 10 arterias espiraladas uterinas, luego atraviesan la decidua proximal y convergen formando 1 a 4 canales que atraviesan la zona de unión y laberinto(43,45). El triángulo mesometrial (TM) está ubicado hacia lado mesometrial del útero y presenta células decidualizadas, células NK (*natural killer*), macrófagos y las arterias uterinas espiraladas(43). Las arterias uterinas espiraladas atraviesan la decidua presentando diferencias estructurales según su ubicación. En la decidua se pueden observar vasos sanguíneos revestidos por endotelio; como también se pueden observar vasos sanguíneos donde el endotelio es reemplazado por células trofoblásticas(45).

La remodelación de las arterias uterinas espiraladas confiere una disminución de la resistencia vascular aumentando su capacidad de flujo sanguíneo y una mejora en la perfusión placentaria para permitir el desarrollo fetal(28,46) (Ver Fig. 7). Lo mencionado anteriormente, requiere de cambios progresivos que implican una pérdida de la capa de músculo liso que rodea las arterias uterinas espiraladas, fenómeno que hasta la fecha se desconoce si es por apoptosis o desdiferenciación, pero también requiere del reemplazo parcial y transitorio de células endoteliales por células trofoblásticas(47–49). En paralelo las células trofoblásticas depositan fibrinoides compuesto por fibronectina, colágeno IV y laminina. Todos estos cambios permiten la formación de una membrana basal donde se pueda volver a revestir por endotelio y lograr mantener la integridad de los vasos(46,49) (Ver Fig. 8).

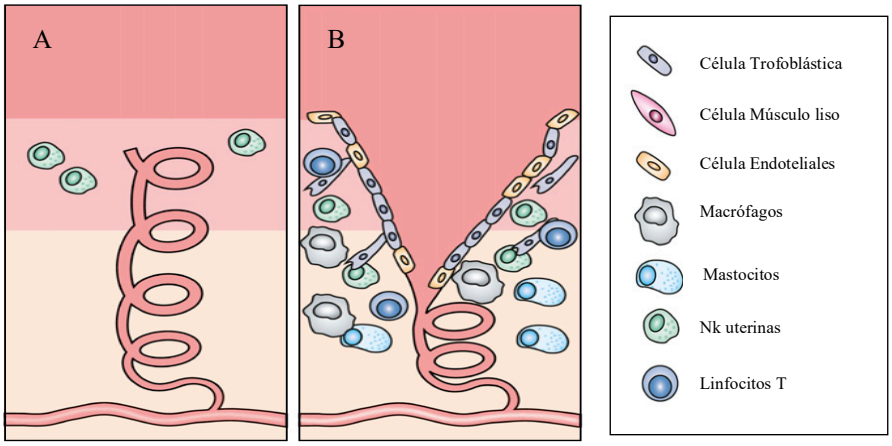


Figura 7. *Esquema de cambios asociados a remodelación en las arterias uterinas. (A): Arteria uterina no remodelada. (B): Arteria uterina en proceso de remodelación. (Modificado de: Schumacher, A; et al. 2018)*

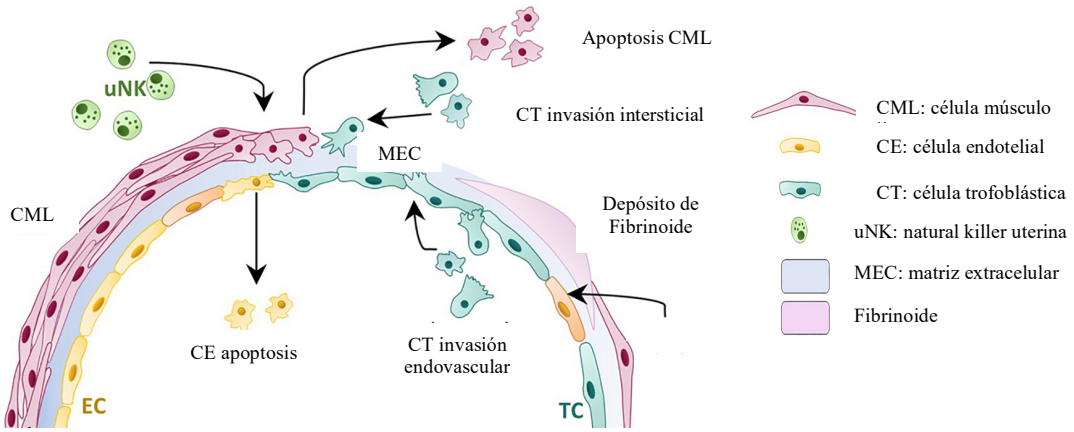


Figura 8. *Esquema de procesos asociados a la remodelación de las arterias uterinas espiraladas. Los trofoblastos de invasión endovascular tendrán contacto en inicio con el endotelio a diferencia de los con invasión intersticial que tendrán contacto al comienzo con CML permitiendo el reemplazo celular y modificación de la matriz extracelular (Modificado de: Vogtmann, R; et al. 2021).*

Para el día 10 dg la arteria uterina se ramifica en arterias más pequeñas en el triángulo mesometrial de cada sitio de implantación, aquellas que atraviesan la decidua tienen un patrón en espiral y no continúan ramificándose, en lugar de eso, convergen para llevar sangre al laberinto(30,50).

Durante la remodelación vascular, la integridad estructural de los vasos sanguíneos es mantenida por la matriz extracelular. La modificación de la MEC, a medida que el proceso de remodelación avanza, es llevada a cabo por MMPs sintetizadas por las células endoteliales (MMP-1 y MMP-9), células del músculo liso (MMP-2, MMP-9 y MMP-12), trofoblasto invasivo (MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-12 y MT1-MMP) y otras células (NK, macrófagos).

La regulación de la invasión del trofoblasto mediada por MMPs principalmente en etapas tempranas es un evento muy importante para una implantación y placentación exitosa(51). Se ha demostrado que en modelos RUPP (ratas de presión de perfusión uteroplacentaria reducida) existe menor actividad de las MMPs en útero y placenta lo que generó un aumento de los componentes de la MEC como el colágeno, esto a su vez llevó a una disminución del área placentaria(52). El déficit de MMP-9 en modelo murino generó anomalías placentarias como restricción del crecimiento y síntomatología similar a preeclampsia(53). Múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que MMP-2 como MMP-9 juegan un rol en la invasión y remodelación arterial uterina y que cambios en su actividad puede llevar a patologías del embarazo como la preeclampsia(54–56). Por los antecedentes mencionados, es que se vuelve necesario entender el rol de los reguladores de MMPs durante las etapas tempranas de la gestación, tales como, la proteína RECK.

6. REGULADOR DE METALOPROTEINASAS: PROTEÍNA RICA EN CISTEÍNA INDUCTORA DE REVERSIÓN CON MOTIVOS KAZAL (RECK)

La proteína rica en cisteína inductora de reversión con motivos Kazal (RECK) es una glicoproteína reguladora de metaloproteinasas(57). La proteína RECK, se compone de 971 aminoácidos, contiene varios motivos que presentan las proteínas extracelulares (péptido de señal N-terminal, señal de anclaje glicosilfosfatidilinositol C-terminal o GPI, repeticiones de 6-cisteínas, repeticiones similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y tres motivos similares al inhibidor de la serina proteasa (SPI) de tipo Kazal(58)) (Ver Fig. 9) y comparte identidad de ADNc (ADN complementario) en un 93% entre humano y ratón. Es de localización extracelular y está anclada a la membrana plasmática(59). Se expresa en distintos tejidos durante el desarrollo(60) y participa en

diversos procesos, como la regulación de la integridad de la matriz extracelular, invasión, metástasis y angiogénesis(59,61,62).

Se ha observado que RECK posee una función antagónica a la actividad de distintas MMPs (Ver Fig. 9), en particular sobre MMP-9, MMP-2, MT1-MMP(63) y ADAM10(64). Sin embargo, se distingue de otros inhibidores de metaloproteinasas en que está anclado a través de un tallo de glicosi-fosfatidil inositol (GPI) a la membrana permitiendo regular los eventos proteolíticos en la superficie celular(62); aunque, también se ha descrito su liberación desde la membrana, mediado por enzimas como glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa C(65), bloqueando la actividad previamente descrita(66,67). A diferencia de otros inhibidores de MMPs, como son los TIMP, cuya deleción génica no conlleva a grandes alteraciones durante la preñez(57), ratones que carecen del gen funcional RECK mueren cercano al día 10.5 de gestación mostrando alteraciones graves en tejidos mesenquimales y organogénesis(63).

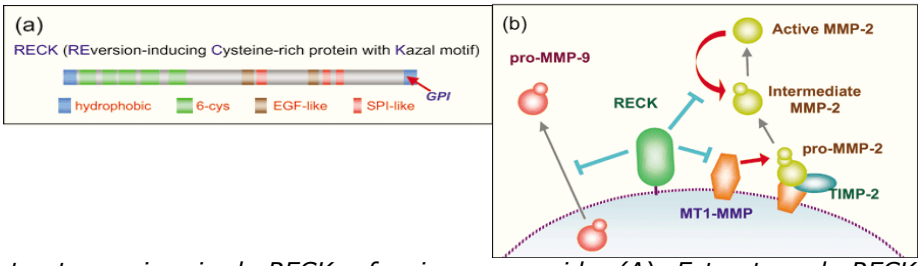


Figura 9. *Estructura primaria de RECK y funciones conocida. (A): Estructura de RECK: péptido señal N-terminal, señal de anclaje GPI, repetición de 6 cisteínas, repeticiones EGF-like y 3 motivos SPI-like. (B): Funciones conocidas de RECK: regulación de metaloproteinasas de la matriz (Noda, M; et al. 2007).*

7. RECK Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Los estudios de RECK y el desarrollo embrionario debido a la letalidad de los ratones deficientes en RECK, han sido dirigido principalmente al embrión(55,59,60), en los que se ha evidenciado una hemorragia evidente a nivel cerebral y abdominal, sumado a pérdida de la organización de tejidos especialmente a nivel de la red vascular(68) y poco se sabe de RECK en el desarrollo de la placenta donde se ha asociado principalmente a procesos de invasión y angiogénesis, aún cuando regula dos MMPs muy relevante en la placentación(62).

En este sentido se ha encontrado un aumento en la expresión de RECK en placentas humanas con preeclampsia lo que se relacionaría con una disminución en la invasión,

resultados que fueron complementados *in vitro* con línea celular de trofoblasto humano del primer trimestre HTR8/SvNeo donde se sobreexpresó RECK y resultó en una disminución de la actividad de MMPs, una menor migración e invasión celular(69). Sin embargo, el desarrollo placentario incorpora múltiples procesos como implantación, invasión y remodelamiento de las arterias uterinas espiraladas donde el modelo *in vivo* resulta una buena alternativa para considerar todos los eventos. Debido a que estos eventos son parte del desarrollo placentario temprano no son plausibles en seres humanos y el modelo murino es útil para comprender los mecanismos del desarrollo placentario(70).

Se ha demostrado que la mayoría de las mutaciones que conllevan la muerte fetal entre los días 9.5 y 14.5 dg, los que están vinculado principalmente a una placenta defectuosa, sin embargo, en relación a RECK mucho de los estudios en embriones de ratón KO no han indagado en los cambios y alteraciones asociados a dicho órgano(71). Es así como hasta la fecha se conoce que durante el desarrollo placentario los procesos de invasión y remodelamiento de las arterias uterinas espiraladas son clave para un embarazo exitoso, procesos que en el murino ocurren inicialmente en días 10 dg y 12 dg principalmente. Acompañado de esto, la participación de MMPs es relevante para favorecer el proceso de invasión y estas están reguladas por distintas proteínas como RECK que destaca del resto por estar anclada a la membrana celular. También se ha evidenciado que embriones *knockout* de RECK, mueren en día 10.5 dg periodo que podría estar asociado con una placenta defectuosa.

Basado en los antecedentes previos, es que surge la inquietud de estudiar RECK en el desarrollo de la placenta planteándose la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué rol cumple RECK en los procesos de invasión del trofoblasto y remodelación de las arterias espiraladas durante la gestación?. Para responder a la pregunta se trabajó con sitios de implantación de ratones de la cepa C57BL/6: silvestres (*Reck*$^{+/+}$), heterocigoto (*Reck*$^{+/-}$) y knockout (*Reck*$^{-/-}$) nacidos a partir de progenitores heterocigoto (*Reck*$^{+/-}$*),* donde se evaluó las diferencias en el proceso de invasión del trofoblasto y remodelación de las arterias espiraladas uterinas durante los periodos 10, 12 y 14 de gestación.

HIPÓTESIS

La disminución o ausencia de RECK incrementa la invasión del trofoblasto y remodelación de las arterias espiraladas uterinas en periodos tempranos del desarrollo de la placenta murina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol de RECK en el proceso de remodelación de las arterias espiraladas uterinas durante periodos tempranos de la placentación en un modelo murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir morfológicamente el proceso de invasión y remodelamiento de las arterias espiraladas uterinas en placentas de embriones silvestres (*Reck*$^{+/+}$), heterocigoto (*Reck*$^{+/-}$) y knockout (*Reck*$^{-/-}$) para *Reck* en los estados embrionarios 10, 12, 14 dg.

- Determinar la distribución de RECK en útero y placentas de embriones silvestres (*Reck*$^{+/+}$) y heterocigoto (*Reck*$^{+/-}$) en los estados embrionarios 10, 12, 14 dg.

METODOLOGÍA

1. CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO

Estudio de tipo transversal y descriptivo diseñado para evaluar el rol de RECK que fue considerada como variable independiente en los procesos de invasión y remodelamiento de las arterias espiraladas establecidas como variable dependiente. El diseño experimental propone el uso de 3 grupos experimentales: knockout (*Reck*$^{-/-}$), silvestre (*Reck*$^{+/+}$) y heterocigoto (*Reck*$^{+/-}$) evaluado en los días 10 dg que corresponde a formación inicial de la placenta, día 12 dg a invasión del trofoblasto y remodelación de las arterias uterinas y día 14 dg una placenta madura. A razón de que los embriones knockout para *Reck (Reck*$^{-/-}$*)* mueren cercano al día 10.5 dg, éstos solo fueron evaluado en el periodo 10 de gestación. (Ver Fig. 10)

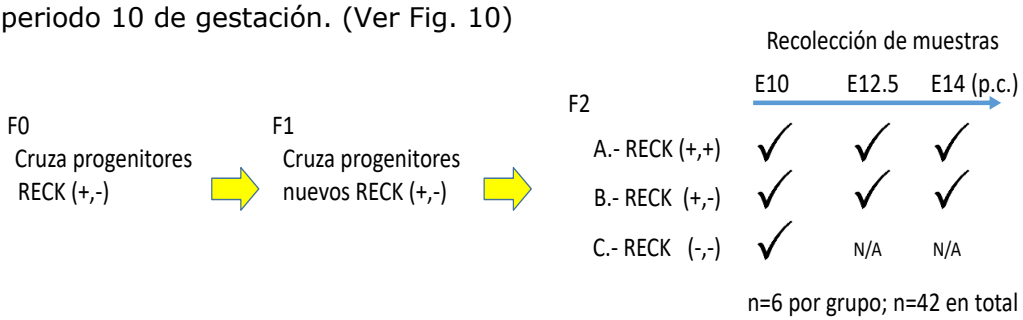


Figura 10. *Esquema de diseño experimental. Se recibió una pareja de ratones mutantes (F0). Se cruzarán progenitores nuevos para obtener el n estimado F1. A partir de F1 se obtuvo los embriones con sus placentas respectivas.*

2. MODELO ANIMAL

Ratones machos de la cepa C57BL/6 heterocigotos para RECK (*Reck*$^{+/-}$) (F0) fueron donados gentilmente por el Dr. Takahashi, Kanasawa University, Kanasawa, Japón(62). Este modelo se obtuvo por inserción del vector PGK-neo-DTA por electroporación en células madres embrionarias de la cepa C57BL/6 y seleccionados por resistencia a G418(62). Estos ratones machos (*Reck*$^{+/-}$) se cruzaron con hembras wild type (WT) en periodo de estro para obtener nuevos progenitores (F1). Estos progenitores fueron genotipificados para realizar la cruza entre machos y hembras heterocigotas de máximo 7 meses de edad (*Reck*$^{+/-}$*)* y así recolectar las placentas objetivo.

Las cruzas se confirmaron a partir del reconocimiento del tapón vaginal considerado como día 0, o a través de un frotis del cérvix revisado a las 8:00 am todos los días (Ver Fig 11).

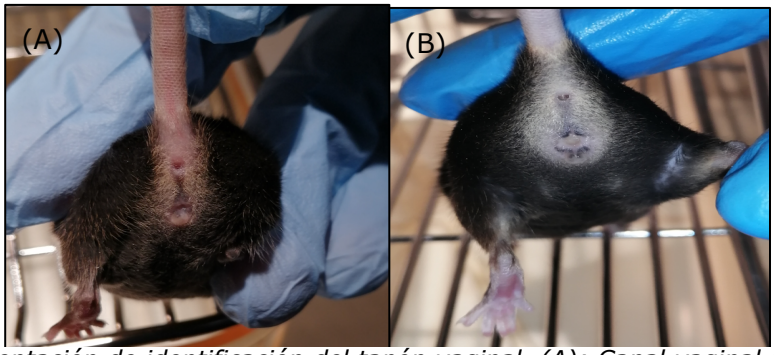


Figura 11. *Representación de identificación del tapón vaginal. (A): Canal vaginal sin tapón. (B): Canal vaginal con tapón. (Fotografía tomada en Bioterio de Universidad de Valparaíso, Chile)*

3. TAMAÑO DE LA MUESTRA

La estimación del número de ratones (embriones) con sus respectivas placentas necesaria para llevar a cabo este proyecto, fue calculada utilizando la aproximación de comparación de promedios con la fórmula n=[2x(Zα+Zβ)2 xS2]/d2(72). Se consideró como variable para el cálculo, la diferencia en el área de lumen de las arterias espiraladas uterinas, en una condición de falla en la invasión del trofoblasto en ratones. Kieckbusch et al (2015)(40) mostraron que en ratones a los que se le eliminaron las células trofoblásticas, el área del lumen de las arterias espiraladas se reduce drásticamente; 1577 ± 526 μm^2 para el Control y 497.3 ±151 μm2 para el grupo en estudio (promedio ± DE)(40). De este modo, ingresando los valores en la fórmula: Zα=1,645 (p<0,05) y Zβ=1,282 (poder de 0,9), S^2= 276676 (varianza del grupo control) y d2= 1x106 (la diferencia mínima esperada); obtenemos que deberán ser colectadas 6 placentas por cada grupo experimental (cigocidad/tiempo de preñez); con un total de 42 placentas con sus respectivos embriones en experimentación.

4. RECOLECCIÓN DE PLACENTAS

A partir de la cruza de F1 (entre ratones heterocigotos *Reck*$^{+/-}$), se obtuvo las placentas y embriones (F2) de los 3 grupos experimentales: knockout (*Reck*$^{-/-}$), silvestre (*Reck*$^{+/+}$) y heterocigoto (*Reck*$^{+/-}$). Las hembras preñadas fueron eutanasiadas por

dislocación cervical y las placentas fueron recolectadas mediante disección de todo el cuerno uterino y mesotelio, y luego aisladas por cada sitio de implantación con su respectivo embrión y codificadas según número correlativo de hembra (R1, R2, etc.), ubicación derecha o izquierda en el cuerno uterino (D ó I) y número correlativo contando desde el cérvix hasta el ovario (D1, D2, I1, I2, etc). (Ver Fig. 12).

(A) (B)

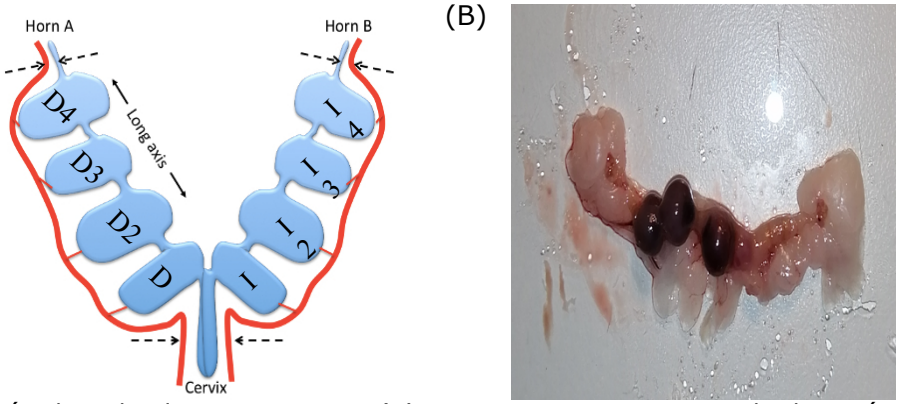


Figura 12. Disección de todo el cuerno uterino. (A): Esquema que representa la disección de los cuernos uterinos y cérvix con 3 sitios de implantación (Modificado de: Kieckbusch, et al. 2015). (B):Macroscopía de cuernos uterinos de hembra WT al día 9 dg (Fotografía tomada en Bioterio de Universidad de Valparaíso, Chile).

Criterios de exclusión:

- Se excluyeron las hembras (RECK $^{+/-}$) que tuvieran más de 1 año de vida, ya que existe mayor riesgo de muerte fetal, alteración de la concentración de progesterona que genera alteración en la función endometrial y aumenta la probabilidad de patologías asociadas al embarazo por envejecimiento.
- Sitios de implantación destruidos durante el procedimiento de separación del embrión.

5. GENOTIPIFACIÓN DE LOS PROGENITORES Y EMBRIONES

La identificación de cada animal (F1) fue mediante crotal metálico con código numérico ubicado en la oreja. La cigocidad se determinó a partir de muestras a partir de corte del extremo de la cola, se extrajo ADN mediante digestión enzimática y fueron analizados con la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional a través de los siguientes primer indicados en Tabla 1 (Para más detalle de protocolo de extracción de ADN y protocolo PCR ver Anexo 1 y 2).

Tabla 1. Primers utilizados para genotipificación de ratones $RECK^{+/+}$, $RECK^{+/-}$ y $RECK^{-/-}$.

Forward mutante: 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3'	Producto PCR: 270bp
Reverse mutante: 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3'.	
Forward wild type: 5'-TTGGCTTTGAGGGGAGGCCAGGTAACACGC-3'	Producto PCR: 350bp
Reverse wild type: 5'-CCCTGGACCCTGGCTCTTTGTTATGGGCCA-3'	
Forward wild type: 5'CGGGAAGCACGAGTTCGTGT-3'	Producto PCR: 636bp
Reverse wild type: 5'AGTGCCTCAGCGCTCCAAGA3'	

Posteriormente fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1,5%. De igual forma, se extrajo el ADN de los embriones obtenidos en F2 para determinar su cigocidad. La genotipificación fue realizada en ciego, para esto, se codificaron las placentas en sistema numérico cuya genotipificación fue revelada al momento de realizar el análisis estadístico.

6. PROCESAMIENTO DE PLACENTAS:

Las placentas y tejidos uterinos se fijaron en paraformaldehído al 4%, se deshidrataron en serie de alcoholes ascendentes, se aclararon en pasos por xilol y se impregnaron en parafina líquida (Para más detalles ver Anexo 3). La inclusión con parafina se realizó en moldes metálicos agregando parafina, la muestra y sobre éste un cassette de plástico para formar los tacos de parafina. Luego se realizaron cortes seriados en un micrótomo hasta llegar al plano medio sagital (unión corioalantoica que refiere a decidua, zona de unión y laberinto) como referencia. Los cortes fueron de un grosor de 4 µm, y se depositaron en un recipiente con agua fría más 10ml de alcohol de 95º y luego se dejaron en un baño de estirado a 40ºC, fueron montadas en portaobjetos con carga y se dejaron secar en estufa a 60ºC por una hora. Luego fueron almacenados a 4ºC para posteriormente ser procesados con la técnica correspondiente.

6.1 HEMATOXILINA-EOSINA

Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una serie de xiloles y alcoholes de grados descendente respectivamente hasta el agua corriente. Se dejaron en hematoxilina de Harris por 5 minuto y luego en agua corriente por 10 minutos. Se dejaron por 5 minutos en alcohol de 95º y por 4 segundos en eosina para proceder a

deshidratar con alcoholes de grados ascendentes, pasos por xilol y montaje con medio hidrófobo (Para más detalle ver anexo 4).

7. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

7.1. PAS

La técnica de PAS (Periodic Acid-Schiff) se utilizó para teñir el material fibrinoide depositado en el proceso de remodelación de las arterias uterinas por el trofoblasto. Para esta técnica los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una serie de xiloles y alcoholes de grados descendente respectivamente hasta el agua destilada. Se dejó en ácido peryódico al 0,5% a temperatura ambiente y se lavó en agua destilada para detener la reacción. Los cortes se sumergieron en Reactivo de Schiff, se lavaron en agua destilada, se realizó contraste nuclear con Hematoxilina de Harris y se lavaron en agua corriente para el viraje. Finalmente se deshidrataron con alcoholes de grados ascendentes, se aclararon en pasos por xilol y se montaron con medio hidrófobo (Para más detalle ver anexo 5).

8. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA:

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica, para identificar la presencia de marcadores celulares y proteínas en el tejido completo correspondiente a los sitios de implantación. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una serie de xilol y alcoholes de grados descendente y lavados en agua destilada (5 minutos cada uno).

Para los anticuerpos y procedimientos que lo requirieron, se realizó recuperación antigénica sumergiendo las muestras en solución buffer citrato a pH 6.0 (previamente calentado por 25 minutos) durante 20 minutos a 95ºC en una vaporera (Oster). Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente manteniendo las placas en buffer durante 15 minutos para luego lavar en agua destilada por 10 minutos. Se efectuaron 3 lavados en PBS (tampón fosfato salino) a pH 7,2 por 5 minutos cada uno.

Se realizó bloqueo de peroxidasa endógena sumergiendo las placas en peróxido de hidrógeno (Merck) al 3% en PBS a temperatura ambiente durante 30 min utilizando un

agitador orbital (Labnet). Se procedió a lavar 3 veces en PBS a pH 7,2 por 5 minutos cada uno. Para evitar marca de sitios inespecíficos en una cámara húmeda, los cortes fueron marcados con un lápiz hidrófobo y se les aplicó una solución de Cas-Block (Invitrogen) durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se incubaron en suero normal de cabra (Gibco®) al 5% diluido en PBS/Tween 20 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La incubación del anticuerpo primario (ver tabla 2) fue aplicado en una dilución en PBS/Tween 20 estandarizada previamente y se incubaron durante toda la noche a 4ºC. Al día siguiente las placas fueron lavadas con 3 cambios en PBS e incubados con el anticuerpo secundario respectivo conjugado con Péroxidasa de rábano picante (HRP, Jackson ImmunoResearch) en una dilución en PBS a pH 7,2 estandarizada previamente, durante una hora a temperatura ambiente.

Se continuó con lavados en PBS por 5 minutos cada uno. Seguidamente se realizó el revelado cromogénico con NovaRed – Kit (Vector® Prolab LTDA.) en un tiempo estandarizado a cada anticuerpo y se realizó un lavado con agua destilada. Se realizó contraste nuclear con Hematoxilina de Harris por 30 segundos, se lavó en agua corriente por 8 minutos para el viraje. Finalmente se deshidrataron los cortes en alcoholes de grados ascendentes, se aclaró en xiloles y se cubrieron con medio de montaje hidrófobo (Entellan, Merck). Para mayor detalle de cada protocolo, ver Anexo 6 y 7.

Tabla 2. Listado y detalle de anticuerpos.

Anticuerpo Primario	Código y empresa	Isotipo y Origen	Recuperación Antigénica	Dilución	Anticuerpo Secundario
α-SMA	Ab5694 Abcam	Policlonal de conejo	Buffer Citrato	1:500	IgG de cabra, anti-conejo. Conjugado en HRP (1:500 en PBS)
Reck	D8C7 Cell Signaling Technology	Policlonal de conejo	Buffer citrato	1:600	IgG de cabra, anti-conejo. Conjugado en HRP (1:500 en PBS)

9. TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

La técnica de inmunofluorescencia se realizó para identificar tipos celulares y proteínas lo que permitió realizar marcaje simultáneo de varios anticuerpos en los sitios de implantación. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una serie de xilol y alcoholes de grados descendente y lavados en agua destilada (5 minutos cada uno).

Para los anticuerpos que lo requirieron, se realizó recuperación antigénica en solución buffer citrato a pH 6.0 (que fue previamente calentado por 25 minutos) durante 20 minutos a 95ºC en una vaporera (Oster). Se dejaron enfriar a temperatura ambiente manteniendo las placas en buffer durante 15 minutos y se lavó en agua destilada por 10 minutos. Se efectuaron 3 lavados en PBS a pH 7,2 por 5 minutos cada uno.

Se procedió a lavar 3 veces en PBS a pH 7,2 por 5 minutos cada uno. Para evitar marca de sitios inespecíficos en una cámara húmeda, los cortes fueron marcados con un lápiz hidrófobo y se les aplicó suero normal de cabra (Gibco®) al 5% diluido en PBS/Tween 20 durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se dejó en bloqueo con BSA al 5% en Blotto inmuno 1X, pH 7,7 (preparado según Anexo 8).

La incubación del anticuerpo primario (ver tabla 3) fue aplicado en una dilución en BSA 5% blotto inmuno estandarizada y se dejó toda la noche a 4ºC. Al día siguiente las placas fueron lavadas con 3 cambios en PBS a pH 7,2 por 5 minutos cada uno e incubados con el anticuerpo secundario respectivo conjugado con fluoróforos en una dilución estandarizada en PBS a pH 7,2, durante una hora a temperatura ambiente.

Tabla 3. Listado y detalle de anticuerpos.

Anticuerpo Primario	Código y empresa	Isotipo y Origen	Recuperación Antigénica	Dilución	Anticuerpo Secundario
Pan-keratin	760-2595 Ventana	Anticuerpo monoclonal de ratón	Buffer citrato	RTU	Alexa FLuor™ 488 goat-anti mouse IgG (H+L) 1:500

von Willebrand factor	A0082 Dako	Anticuerpo policlonal de conejo	Buffer citrato	1:250	Alexa FLuor™ 568 goat-anti rabbit IgG (H+L) 1:500

Se continuó con 3 cambios en PBS a pH 7,2 por 5 minutos cada uno. Seguidamente se dejaron en Sudan Black por 1 minuto y se realizó un lavado con agua destilada durante 5 min para eliminar el exceso del colorante. Finalmente se montó en medio hidrófilo Fluoromount G con Dapi que incorpora la marca nuclear. Para mayor detalle de cada protocolo, ver Anexo 9 y 10.

Controles de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia: en el mismo portaobjetos, el primer corte como control positivo se incubó con anticuerpo primario correspondiente y al segundo corte como control negativo se le aplicó solución de PBS reemplazando el anticuerpo primario como control negativo externo.

10. CAPTURA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

10.1. Captura de imágenes

Para la técnica de Hematoxilina y Eosina, como también para la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpo Reck se realizó digitalización de todas las láminas en aumento 40X con el equipo Aperio Versa (Leica) obteniendo una panorámica de todo el tejido con la posibilidad de aumento hasta 400x.

Además, para la técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo α-SMA como también para la técnica histoquímica de PAS se utilizó un microscopio óptico (Olympus CX43) con cámara (Euromex) donde se realizaron capturas a través del software ImageFocusAlpha en aumento 400X de todas las secciones encontradas de las arterias uterinas espiraladas ubicadas en la decidua, triángulo mesometrial y miometrio. Por otro lado, para la técnica de inmunofluorescencia con doble marcaje de Pan-Citoqueratina y VWf (*Von Willebrand factor*) se utilizó un microscopio de fluorescencia (Microscopio Zeiss Axiovert) con cámara (AxioCam) a través del software AxioVision 4.8.2 para obtener capturas en aumento 400X de todas las secciones encontradas de las arterias uterinas espiraladas ubicadas en la decidua, triángulo mesometrial y miometrio.

Finalmente, para la técnica de inmunofluorescencia con el anticuerpo Pan-Citoqueratina, se utilizó un microscopio de fluorescencia (Microscopio Zeiss Axiovert) con cámara (Axiocam) a través del software AxioVision 4.8.2 obteniendo múltiples capturas en aumento de 200X de todo el tejido para posteriormente realizar una reconstrucción manual panorámica del tejido completo.

9.2 Análisis de imágenes

En general para el análisis y procesamiento de las imágenes se utilizaron 2 software: Image J y ImageScopex64.

El software ImageScopex64 se utilizó para realizar el análisis y procesamiento de las microfotografías derivadas de la digitalización de láminas (Hematoxilina y Eosina, inmunohistoquímica con anticuerpo RECK). En ambas técnicas se utilizó para la descripción de las estructuras formadas en los días 10, 12, y 14 de gestación respectivas a cada genotipo.

El software Image J, fue utilizado para el resto de las técnicas utilizadas. Para analizar el engrosamiento de la pared de los vasos sanguíneos se utilizaron las microfotografías con la técnica de α-SMA, se calculó el área completa como el área del lumen para calcular el porcentaje que ocupaba la pared del vaso (equivalente al área desde la capa de músculo liso a endotelio). En el caso de α-SMA como también de la técnica de PAS, se separaron los canales colorimétricos según la técnica respectiva con el ítem "*Color deconvolution*", se delimitó cada arteria y se obtuvo el porcentaje de área de marca delimitando el *"Threshold"*. Para la técnica de inmunofluorescencia con Pan-Cks luego de realizar la reconstrucción de las placentas completas se separaron los 2 canales (Pan-Cks: verde y Dapi:azul) y se delimitó el área de cada sección de la placenta (miometrio, triángulo mesometrial, decidua y laberinto) para evaluar el porcentaje de marca a través del "*Threshold*". Finalmente, para el doble marcaje con Pan-Cks y vWF se realizó el conteo del número de células en las arterias de color verde (Pan-Cks) y

color rojo (vWf) para obtener el porcentaje de cada tipo celular por arteria según la zona ubicada (miometrio, triángulo mesometrial o decidua).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron tabulados en una planilla excel separados por periodo de gestación (día 10, 12 y 14 dg) y ubicación en la placenta (miometrio, triángulo mesometrial y decidua). Para los casos donde se analizaron las arterias uterinas espiraladas, los datos obtenidos de todas las arterias por cada placenta fueron promediados, considerados como n=1 e ingresados al software. Se evaluó la distribución normal, y para los casos que cumplieron esta condición se les aplicó una prueba paramétrica con un post test; en caso contrario, un test no paramétrico con post test. Se debe destacar que para el día 14 dg solo se obtuvieron 3 placentas en total, por lo que solo se describieron y se presentaron los datos sin comparación estadística. Se estableció un intervalo de confianza del 95% y un error α del 5% para todos los casos. Todos los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism©.5.0.

12. CONSIDERACIONES ÉTICAS:

El presente proyecto, se enmarca en un proyecto titulado "Role of Reck in preeclampsia development: as a key regulator of cytotrophoblast invasiveness and spiral arteries remodeling" financiado por FONDECYT REGULAR 2018 (1180935) que fue aprobado por el comité institucional de bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso cuyo número de acta de aprobación es BS009/2018 y que fue renovado los años posteriores. (Para más detalle del acta de aprobación, ver Anexo 11 Y 12).

RESULTADOS

1. GENOTIPIFICACIÓN DE PROGENITORES Y EMBRIONES

Se cruzaron los 3 machos (RECK$^{+/-}$)(F0), con hembras WT para obtener nuevas camadas (F1). Estos 3 machos fueron genotipificados para corroborar la mutación del gen RECK en uno de sus alelos (Ver Fig 13). Para la primera genotipificación se utilizó la pareja de primer WT cuyo producto PCR fue de 636 pb y en el caso de la pareja de primer mutante el producto PCR fue 270 pb. De esto, se corroboró que los 3 machos mutantes presentaban la banda cuyo producto era de 270pb. El control de ratón WT solo presentó la banda de 636pb.

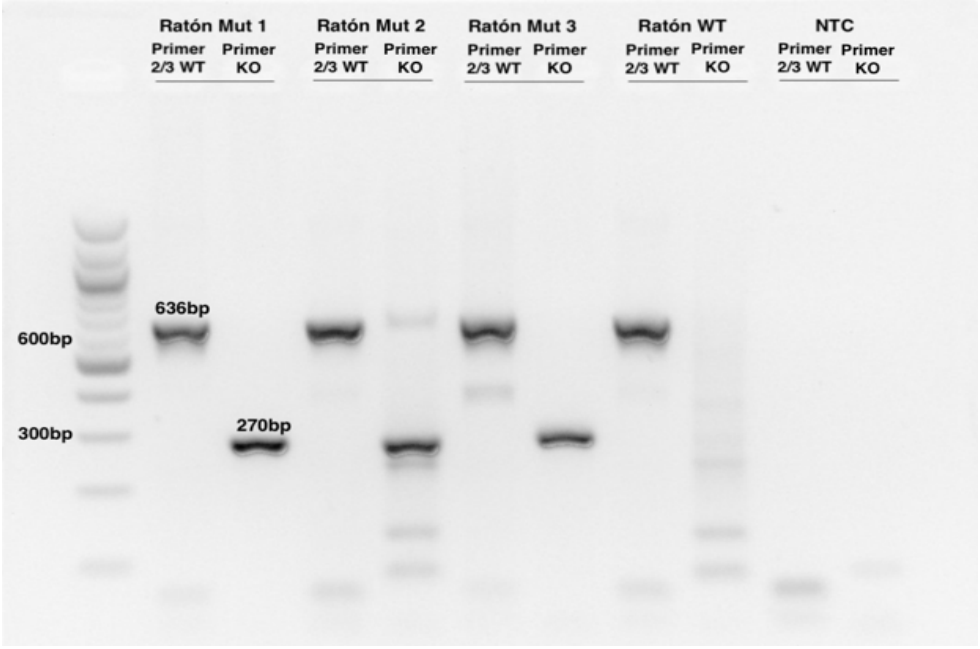


Figura 13. *Genotipificación de F0. Gel de agarosa 1,5% en TAE 0,5X de ADN amplificado por la técnica de PCR de 3 ratones machos mutantes (Ratón Mut 1, Ratón Mut 2 y Ratón Mut 3), 1 macho WT (Ratón WT) y control negativo de la técnica (NTC: no template control). Ladder: 100bp.*

Las nuevas camadas se distribuyeron en parejas reproductoras para mantener la colonia y otra parte de la camada como progenitores (F1). A partir de estos se obtuvieron las genotipificaciones de ADN extraído de corte del extremo de la cola de ratón.

En paralelo se extrajo ADN de los embriones que referían a sus respectivas placentas correspondiente a los días 10, 12 y 14 dg obteniendo las diferentes genotipificaciones

(ver Tabla 4). Además por cada cruza se obtuvieron reabsorciones que solo fueron cuantificadas, pero no fueron genotipificada ni analizadas para este proyecto de tesis (Ver tabla 5).

Tabla 4. Número de placentas según cigocidad y periodo de gestación obtenidas.

Periodo de gestación	Número de placentas	Cigocidad
10 dg	11	$RECK^{+/+}$
	11	$RECK^{+/-}$
	5	$RECK^{-/-}$
12 dg	7	$RECK^{+/+}$
	7	$RECK^{+/-}$
14 dg	2	$RECK^{+/+}$
	1	$RECK^{+/-}$

Tabla 5. Número de reabsorciones según periodo de gestación obtenidos.

Periodo de gestación	Número de reabsorciones
12 dg	4
14 dg	5

2. RECOLECCIÓN, MACROSCOPÍA DE CUERNOS UTERINOS

A partir de la cruza de parejas hemicigotas para RECK ($RECK^{+/-}$), se recolectaron los cuernos uterinos de días 10, 12 y 14 dg.

2.1 Cuernos uterinos obtenidos en día 10 dg

Para el día 10 dg se logró obtener 27 sitios de implantación (Ver Fig 14), cuyo diámetro máximo fue 4mm aproximadamente. Por cada hembra, se obtuvo, 3,4, 8 y 10 sitios de implantación respectivamente.

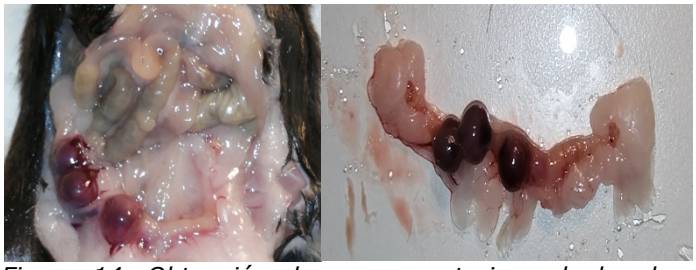


Figura 14. Obtención de cuernos uterinos de hembra heterocigota para RECK. Ejemplo de la recolección de cuernos uterinos obtenidos en día 10 dg. (Fotografía tomada en Bioterio de Universidad de Valparaíso, Chile).

2.2 Cuernos uterinos obtenidos en día 12 dg

Para el día 12 dg se logró obtener 14 sitios de implantación (Ver Fig 15), cuyo diámetro máximo fue de 8mm aproximadamente. Por cada hembra se obtuvo, 6 y 7 sitios de implantación respectivamente.

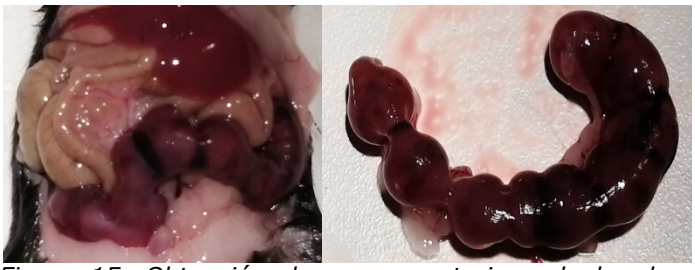


Figura 15. Obtención de cuernos uterinos de hembra heterocigota para RECK. Ejemplo de la recolección de cuernos uterinos obtenidos en día 12 dg. (Fotografía tomada en Bioterio de Universidad de Valparaíso, Chile).

2.3 Cuernos uterinos obtenidos en día 14 dg

Para el día 14 dg se logró obtener 3 sitios de implantación (Ver Fig 16), cuyo diámetro máximo fue de 1cm aproximadamente y color rojizo. Por cada hembra se obtuvo 1 y 3 sitios de implantación respectivamente.



Figura 16. Obtención de cuernos uterinos de hembra heterocigota para RECK. Ejemplo de la recolección de cuernos uterinos obtenidos en día 14 dg. (Fotografía tomada en Bioterio de Universidad de Valparaíso, Chile).

3. DESCRIPCIÓN GENERAL E IDENTIFICACIÓN DE LAS ZONAS EN LOS SITIOS DE IMPLANTACIÓN DURANTE EL DÍA 10, 12 Y 14 DG.

A medida que se va desarrollando la placenta murina se observan distintas estructuras según el periodo de gestación. Se observó que para los 3 genotipos ($RECK^{+/+}$, $RECK^{+/-}$ y $RECK^{-/-}$) en el día 10 dg los sitios de implantación desde materno a

fetal estaban formados por miometrio (M) donde se encontraban los vasos sanguíneos uterinos y fibras musculares, a continuación se encontraba el triángulo mesometrial (TM), decidua (D). En estas dos últimas secciones se encontraban los vasos sanguíneos uterinos, acompañado principalmente de células deciduales y células NK. Hacia el extremo antimesometrial en contacto con la decidua se observaron células gigantes (CG) trofoblásticas agrupadas (ver Fig 17, 18, 19 y 20).

En el día 12 dg para los 2 genotipos ($RECK^{+/+}$ y $RECK^{+/-}$) se encontraron las mismas estructuras ya mencionadas, pero las CG trofoblásticas se distribuían en hilera a lo largo de la decidua. Además, hacia el lado antimesometrial se encontraba formado el laberinto (L) compuesto en general por células de sincitiotrofoblasto y vasos fetales (ver Fig 18, 19, 20, 21 y 22). Finalmente en el periodo 14 para los 2 genotipos ($RECK^{+/+}$ y $RECK^{+/-}$), se encontraron las mismas estructuras ya descritas en el periodo anterior (ver Fig 17, 18, 19, 20 y 21).

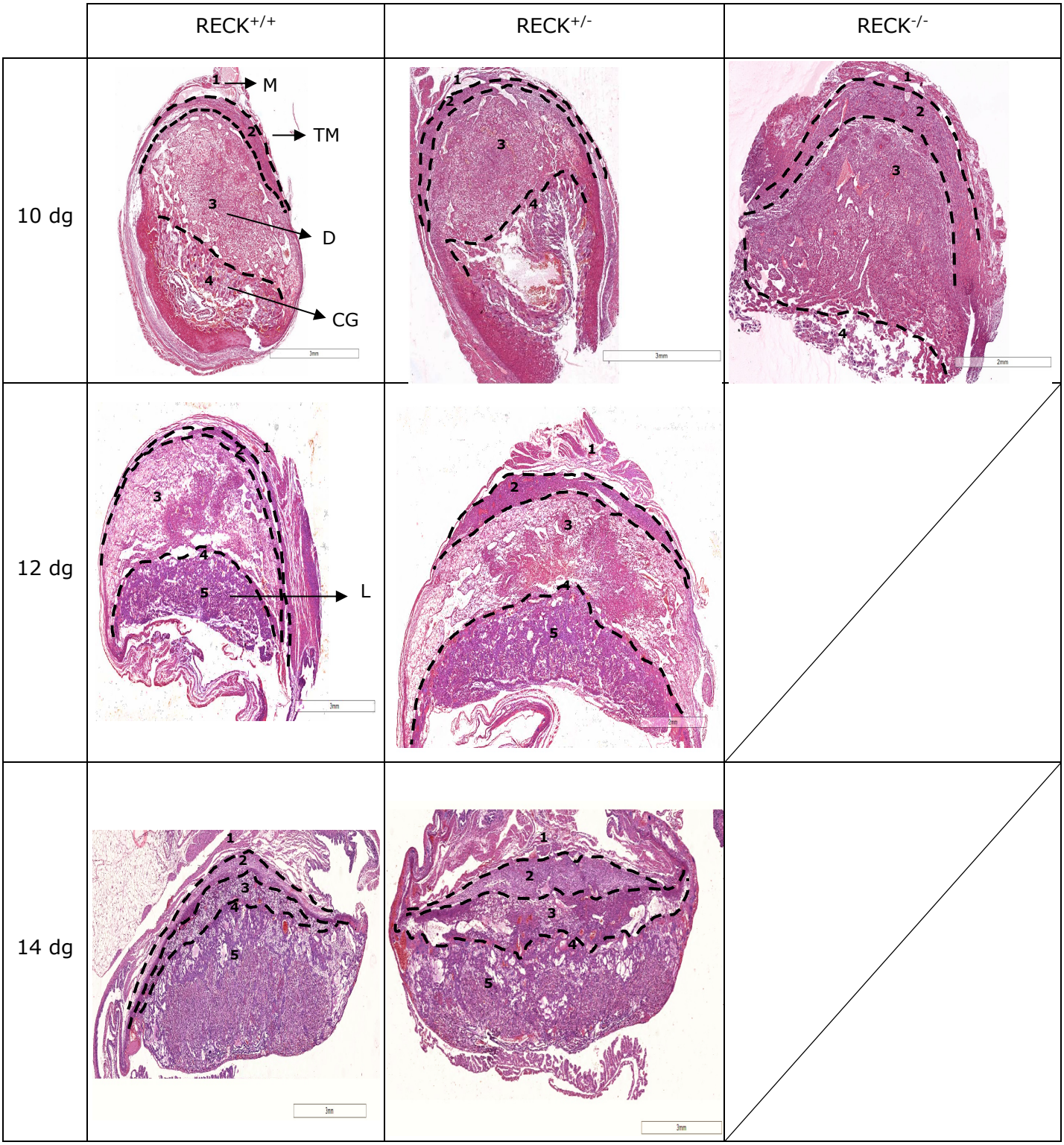


Figura 17. *Morfología de sitios de implantación de días 10, 12 y 14 dg. Morfología de las placentas de los distintos genotipos (RECK$^{+/+}$, RECK$^{+/-}$ y RECK$^{-/-}$) donde se encuentra el miometrio (1) hacia el lado materno, seguido por el triángulo mesometrial (2), decidua (3) que en el extremo opuesto al miometrio toma contacto con las células gigantes trofoblásticas (4). A partir del estadio 12 se observa el laberinto (5) en contacto con las células gigantes trofoblásticas.*

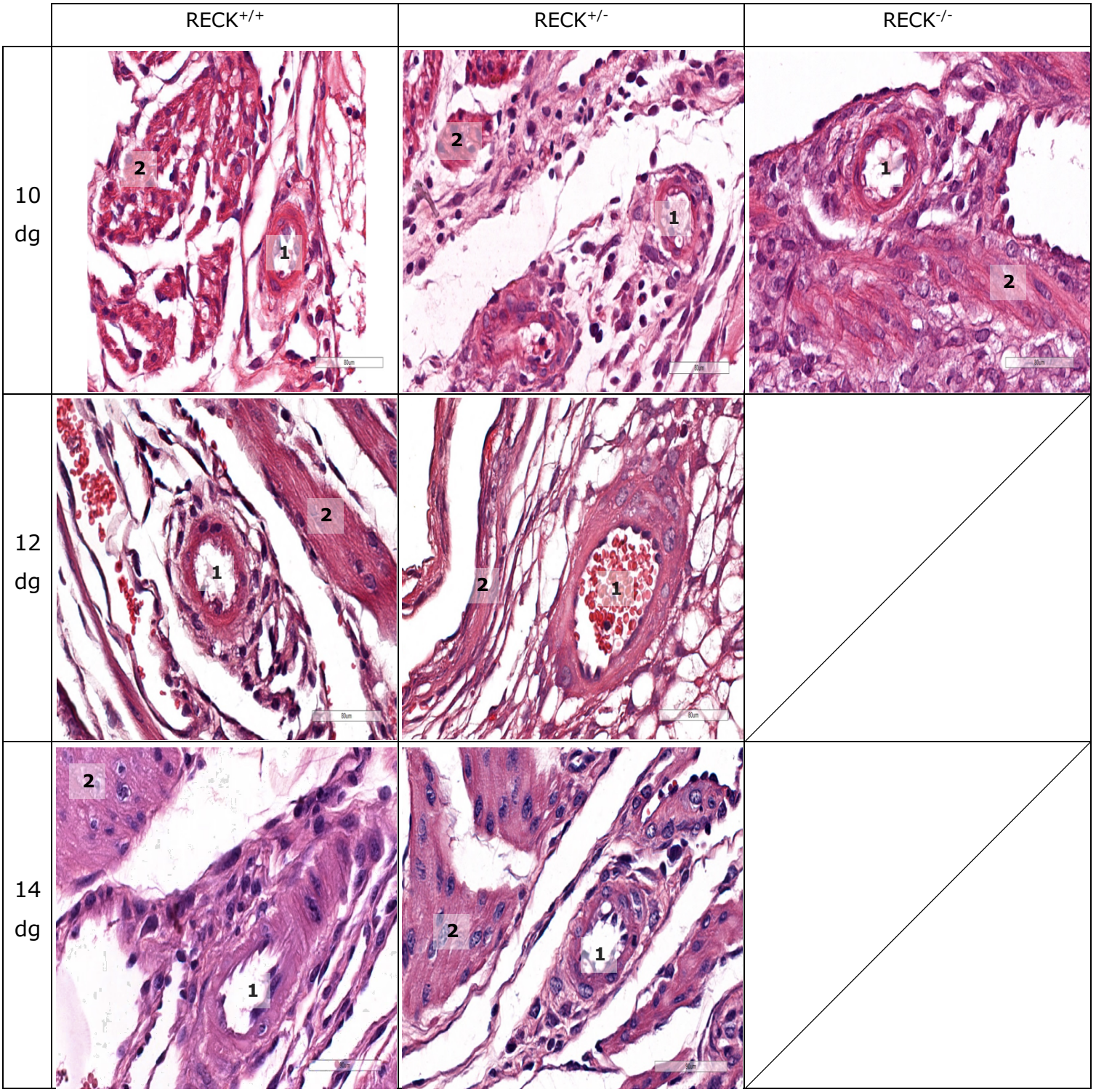


Figura 18. Microfotografías de zona de miometrio de días 10, 12 y 14 dg. En general se encuentran arterias uterinas (1), venas y fibras musculares esqueléticas (2).

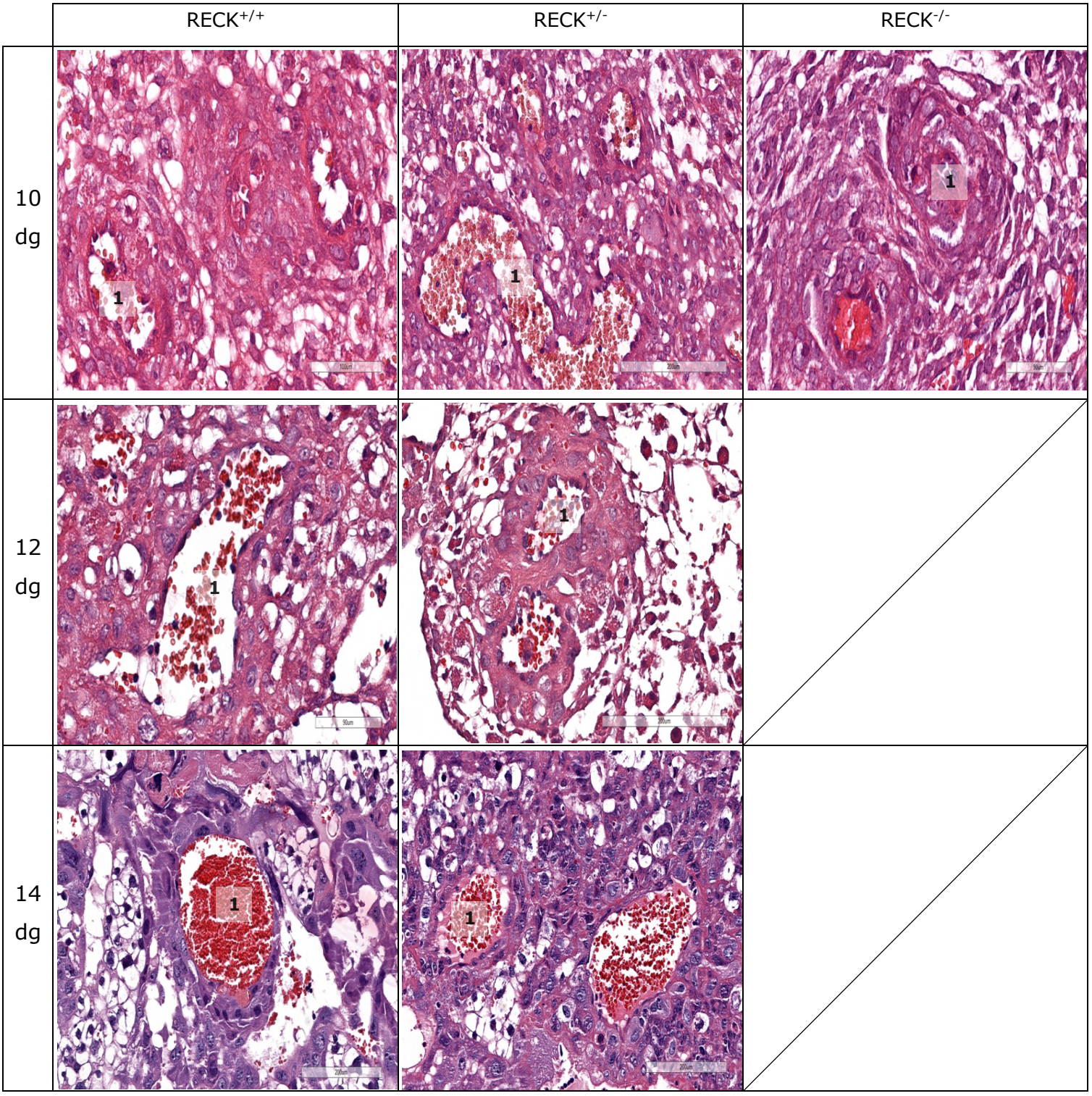


Figura 19. *Microfotografías de zona de la Decidua de días 10, 12 y 14 dg. En general se encuentran arterias uterinas espiraladas (1) y células deciduales.*

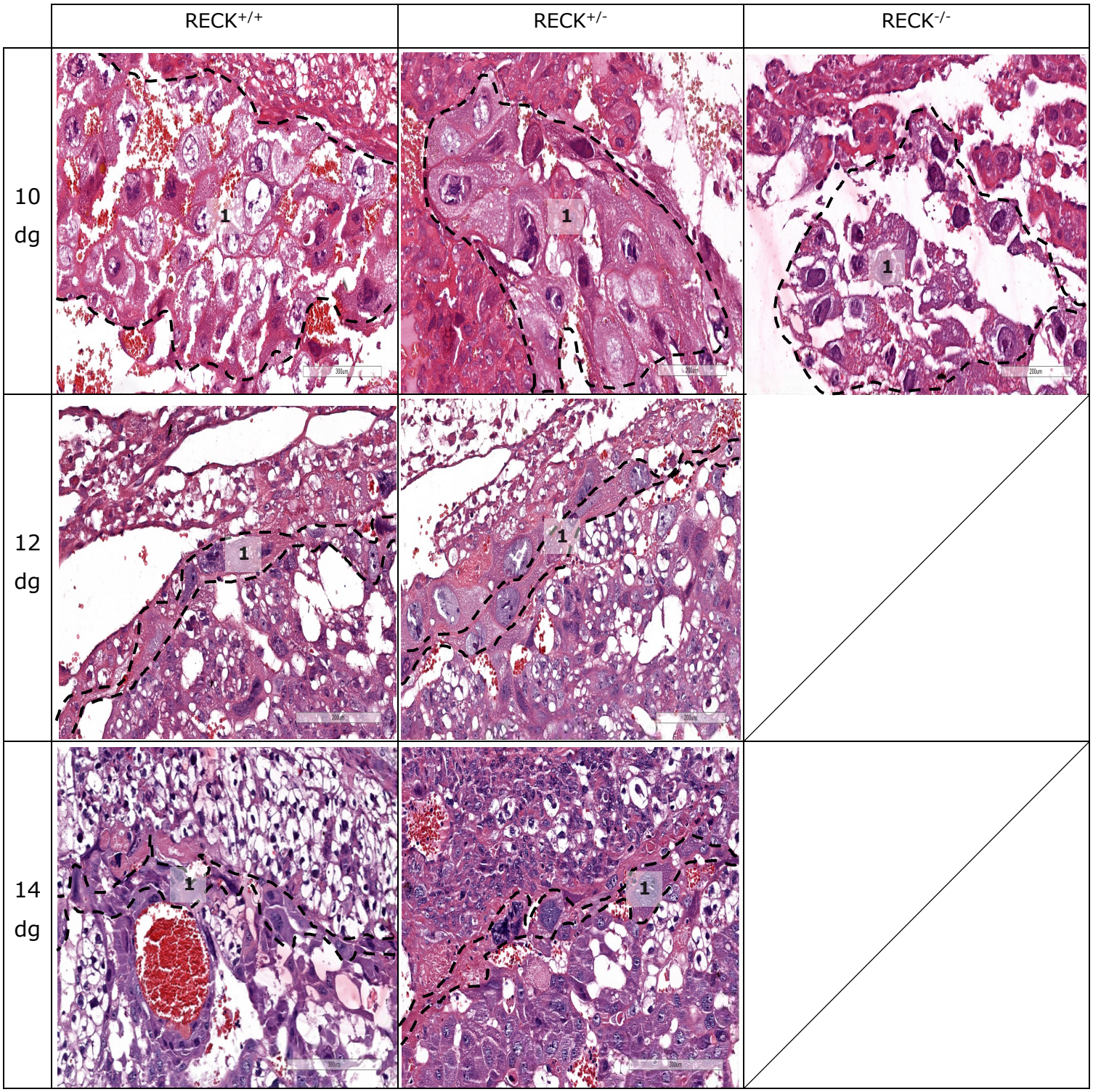


Figura 20. *Microfotografías de zona de Células Gigantes trofoblásticas de dóas 10, 12 y 14 dg. Las células gigantes (1) cambian de distribución pasando de agrupadas en día 10 dg a estar en hilera a lo largo de la decidua en estadio 12 dg y 14 dg.*

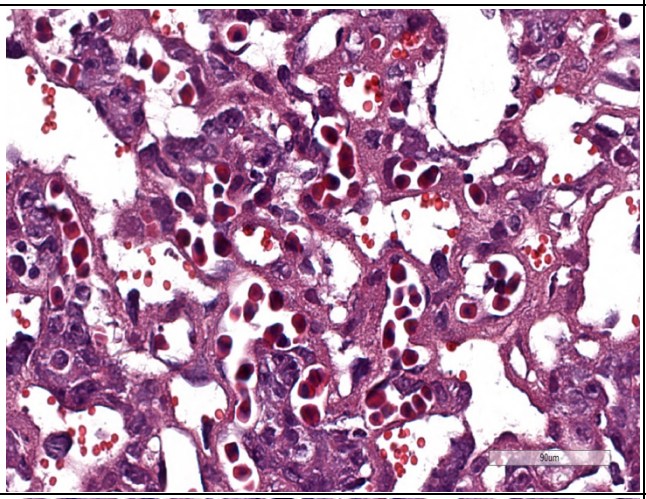
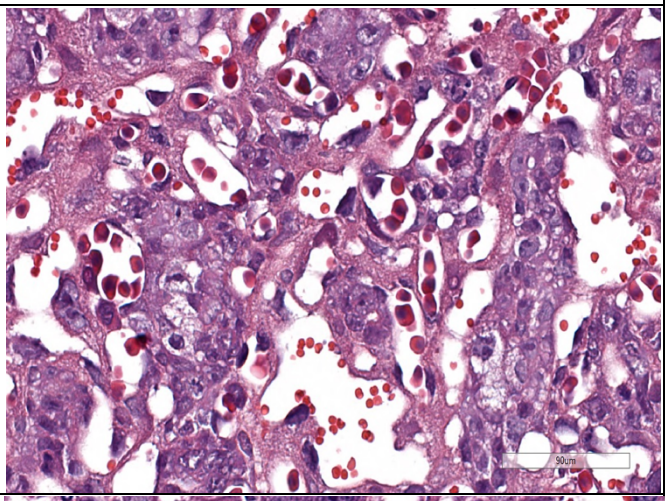
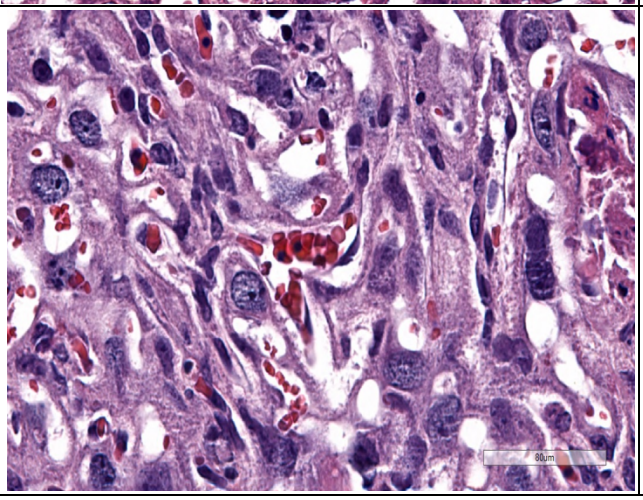
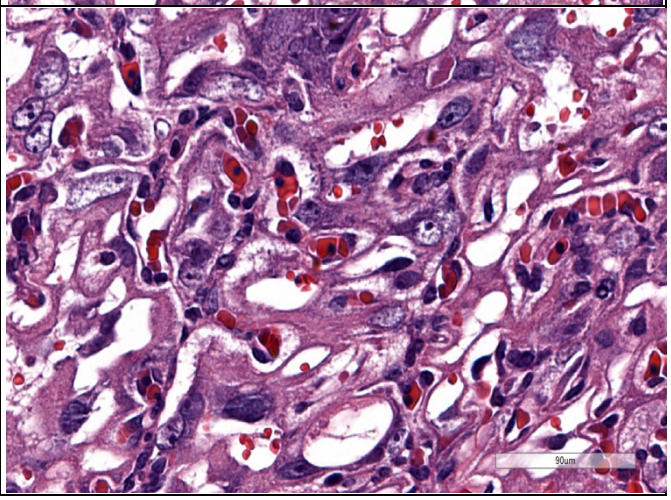
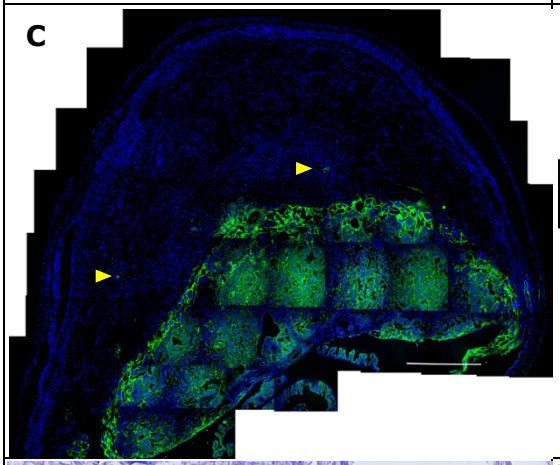
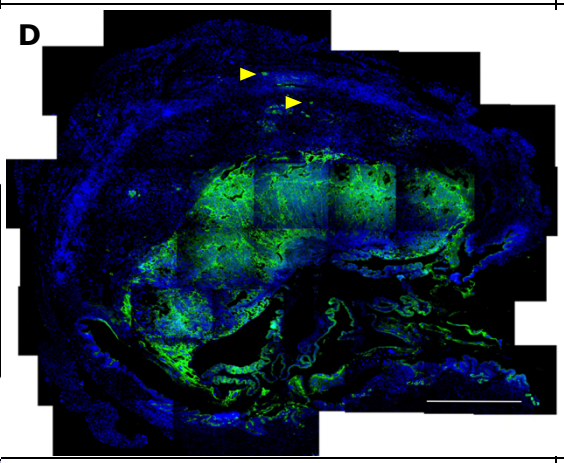
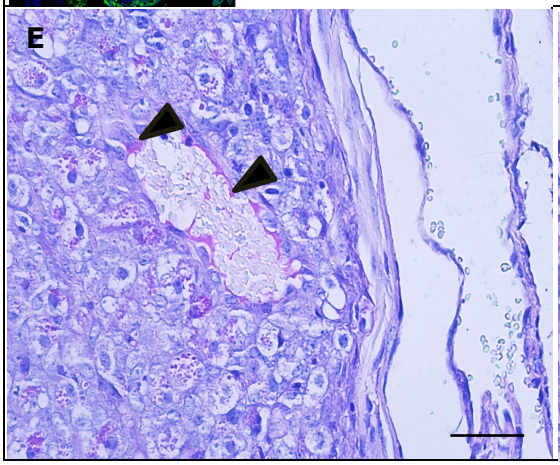
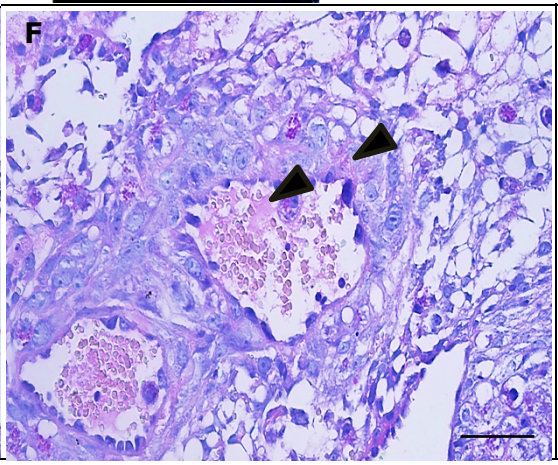
	RECK$^{+/+}$	RECK$^{+/-}$
12 dg		
14 dg		

Figura 21. *Microfotografías de zona del Laberinto de día 12 y 14 dg. En estos periodos de gestación, se observa la presencia del laberinto compuesto principalmente por células del sincitiotrofoblasto y vasos fetales que se distinguen por la presencia de glóbulos rojos nucleados.*

4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL PROCESO DE INVASIÓN Y REMODELAMIENTO DE LAS ARTERIAS ESPIRALADAS EN PLACENTAS DE EMBRIONES SILVESTRES (*RECK*$^{+/+}$), HETEROCIGOTO (*RECK*$^{+/-}$) Y KNOCKOUT (*RECK*$^{-/-}$) PARA *RECK* EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS 10, 12, 14 dg

Se ha descrito que durante el desarrollo placentario ocurre la invasión del trofoblasto, el cual está asociado con el remodelamiento de las arterias uterinas espiraladas en la decidua, fenómeno que morfológicamente se puede observar con distintos patrones que aquí se evaluaron para identificar la relación con los 3 grupos (cigocidades) para RECK.

Los resultados que más destacan en este análisis ocurrieron en el día 12 dg y en el grupo RECK$^{+/-}$ que presentó cambios vinculados con la invasión del trofoblasto antes que el control RECK$^{+/+}$ y en zonas más distantes al laberinto, por ejemplo, se encontraron células trofoblásticas en triángulo mesometrial mientras que el control en general presentó células en decidua. Esto se repitió cuando se analizaron los cambios asociados a remodelación de arterias uterinas espiraladas, ya que la disminución de la capa de músculo liso y el aumento del material fibrinoide fue notorio en el grupo RECK$^{+/-}$ a nivel de triángulo mesometrial. Finalmente la presencia y disposición de las células trofoblásticas en los vasos sanguíneos de la decidua también presentó cambios de manera previa en el grupo RECK$^{+/-}$ (Ver fig 22). Cada uno de los patrones evaluados se presentan en detalle en esta sección.

12 dg		
RECK$^{+/+}$	RECK$^{+/-}$	
		HEMATOXILINA Y EOSINA
		INVASIÓN TROFOBLÁSTICA (Pan-CK)
		DEPÓSITO DE FIBRINOIDE (PAS)

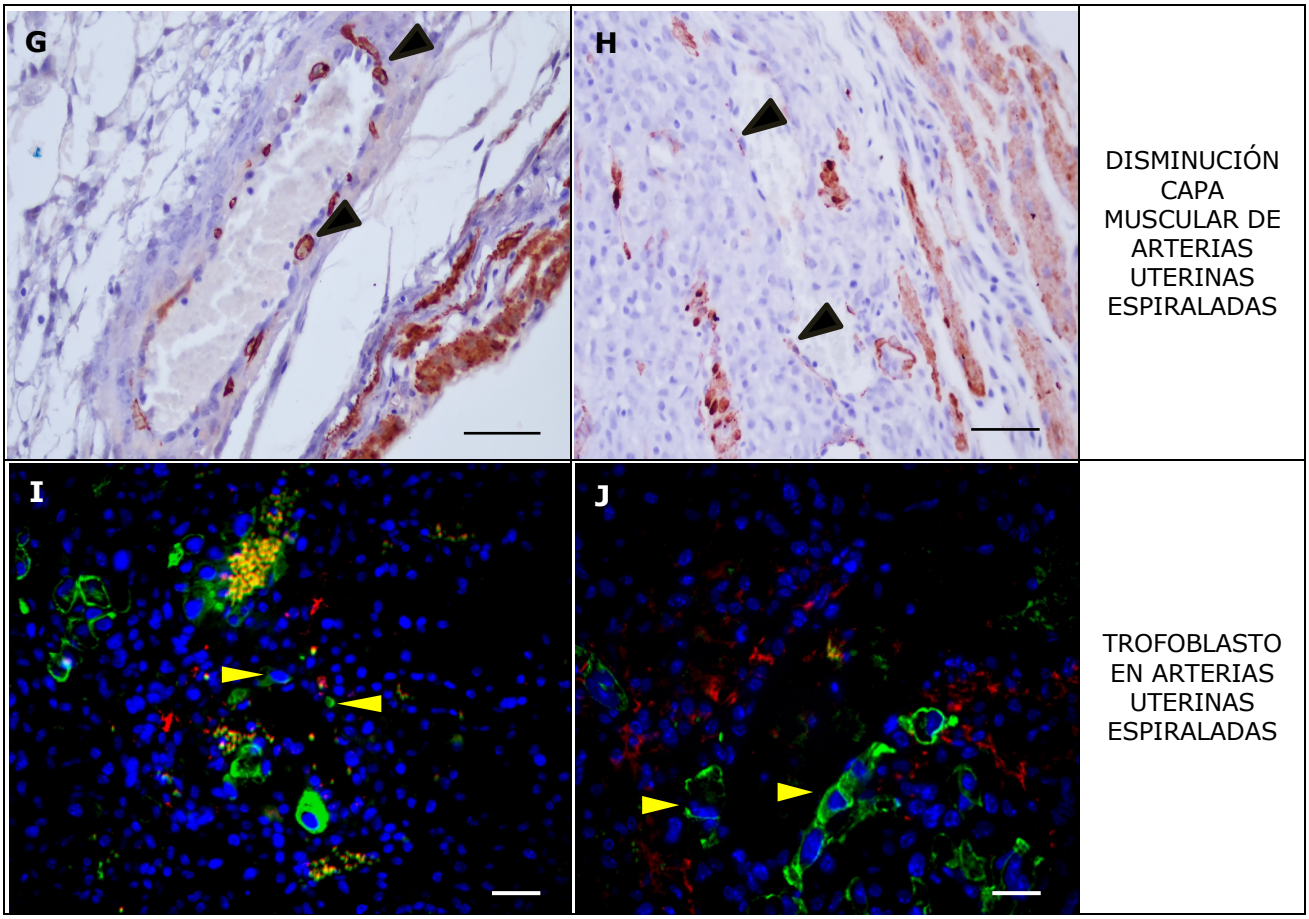


Figura 22. *Resumen de los cambios significativos de placentas RECK$^{+/-}$ al comparar con RECK$^{+/+}$ en día 12 dg. (A-B): identificación de las zonas formadas en día 12 dg como miometrio (1), triángulo mesometrial (2), decidua (3), CGT (4) y laberinto (5) (Hematoxilina-Eosina) (C-D) identificación de células trofoblásticas en zonas más distales del laberinto (punta de flecha amarilla). (E-F) Presencia de depósito de fibrinoide a nivel intraluminal y perivascular de arterias uterinas espiraladas ubicadas en triángulo mesometrial (punta de flecha negra). (G-H) identificación de células musculares a nivel de las arterias uterinas espiraladas ubicadas en triángulo mesometrial (punta de flecha negra). (I-J) presencia de células trofoblásticas en arterias uterinas espiraladas en decidua (punta de flecha amarilla). Barra escala de C-D: 1mm. Barra escala de E a J: 50 um*

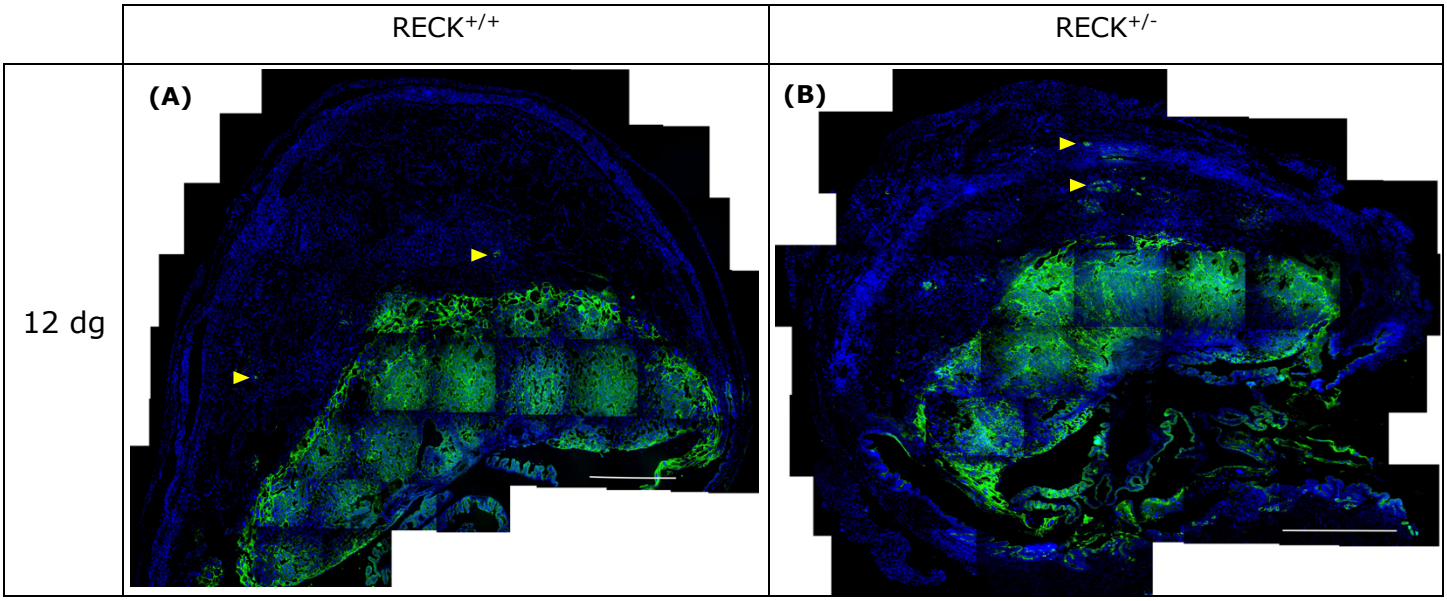
4.1 Evaluación de invasión de células trofoblásticas en tejido materno

Para caracterizar el proceso de invasión del trofoblasto en los diferentes eventos, se analizó el porcentaje del área de marca fluorescente verde que ocupaba en el área materna (decidua, triángulo mesometrial y miometrio) y aparte el porcentaje de marca fluorescente verde que ocupaba en área fetal (laberinto y zona de unión) de la marca referente a células trofoblásticas con el anticuerpo Pan-Cks observada con patrón citoplasmático.

En el día 12 dg el porcentaje de área de marca que se evaluó en el área referida al miometrio, triángulo mesometrial y decidua alcanzó un máximo de 4,5% correspondiente al grupo $RECK^{+/-}$ y un mínimo de 0,24% correspondiente al grupo $RECK^{+/+}$. En el área de las mismas estructuras en el día 14 dg alcanzó un máximo de 3,06% del área de marca correspondiente al grupo $RECK^{+/+}$ y un mínimo de 0,61% de área de marca correspondiente al grupo $RECK^{+/-}$. Se realizó un análisis estadístico no paramétrico del día 12 dg encontrando un aumento estadísticamente significativo en el grupo $RECK^{+/-}$ (Mediana: 1,53 y rango: 3,97) al comparar con el control $RECK^{+/+}$ (Mediana: 0,46 y rango: 0,5). En el día 14 dg no se aplicó pruebas estadísticas por tener solo 3 placentas en total. (Ver Fig. 23 y 24).

En relación al área de marca evaluada en laberinto y zona de unión (ZO), en día 12 dg se alcanzó un máximo de 75,35% correspondiente a $RECK^{+/-}$ y un mínimo de 23,5% de $RECK^{+/+}$. En día 14 dg un máximo de 84,51% de $RECK^{+/+}$ y un mínimo de 35,1% de $RECK^{+/-}$. Se aplicó un test estadístico paramétrico sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

En el ámbito descriptivo, se observó además que en día 12 dg en el grupo $RECK^{+/-}$ la marca verde fluorescente alcanzaba el triángulo mesometrial, a diferencia del grupo $RECK^{+/+}$ que en su mayoría alcanzaba la decidua.



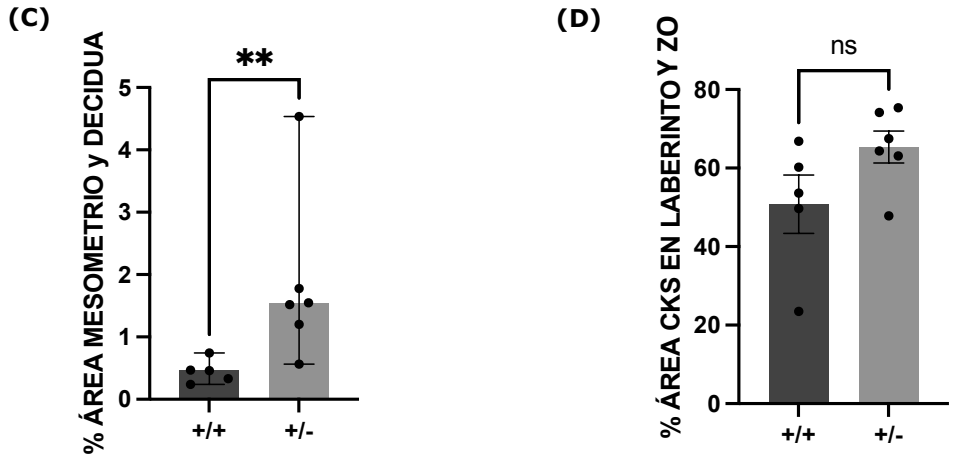


Figura 23. *Invasión del trofoblasto en placentas de día 12 dg. (A-B): representación de la reconstrucción de imágenes marcando células torfoblásticas en verde fluorescente (punta de flecha amarilla). (C-D) Gráficos que representan el porcentaje del área de marca verde fluorescente de células trofoblásticas según la zona en la placenta. (Gráfico C: Prueba no paramétrica Mann-Whitney de 2 vías, valores expresan Medianas y rangos, RECK$^{+/+}$ n=5, RECK$^{+/-}$ n=6, **p<0,01) (Gráfico D: Prueba paramétrica t-test, valores se expresan Media±Error estándar RECK$^{+/+}$ n=5, RECK$^{+/-}$ n=6, ns: not significant. Barra escala: 1mm.*

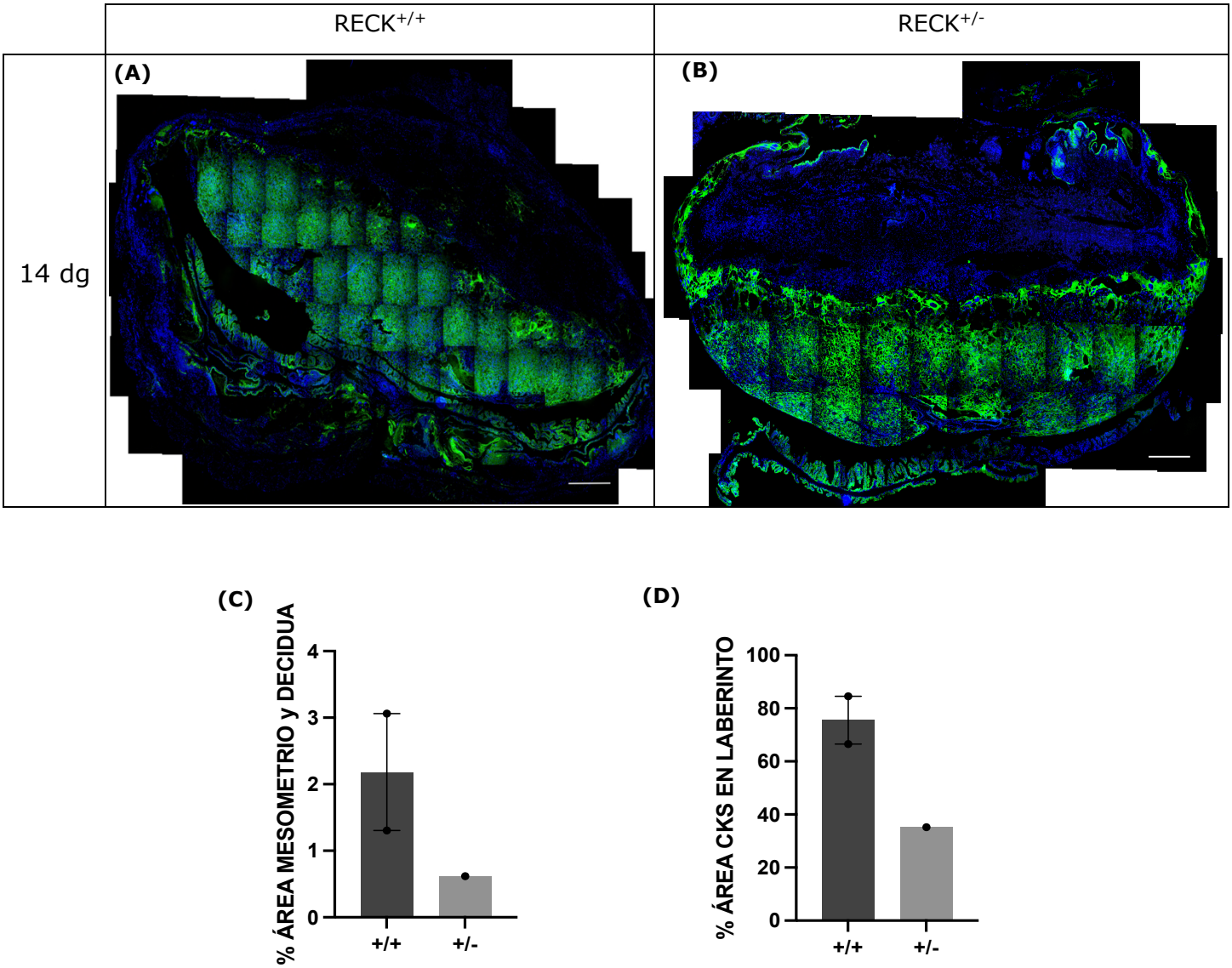


Figura 24. *Invasión del trofoblasto en placentas de día 14 dg. (A-B): representación de la reconstrucción de imágenes marcando células trofoblásticas en verde fluorescente. (C-F) Gráficos que representan el área de marca verde fluorescente que identifica las células trofoblásticas según la zona en la placenta. Barra escala: 1mm.*

4.2 Evaluación y descripción de la pared de arterias espiraladas en placentas días 10, 12, 14 dg

Para describir cambios en el engrosamiento de la pared de las arterias uterinas espiraladas se marcó el tejido con α-SMA para así delimitar el área completa del vaso y luego medir el área del lumen. De esta manera obtener el porcentaje de área que ocupa toda la pared de las arterias desde la capa de músculo liso hasta el endotelio (Ver Fig 25), se aplicó estadística descriptiva para evaluar el estado de los vasos.

A modo general (considerando las 3 cigocidades) durante el día 10 dg se observó que la pared de las arterias ocupaba un máximo de 97,38% del vaso y un mínimo de 52,31% en el miometrio. A nivel del triángulo mesometrial (TM) el valor máximo obtenido fue de 95,18% y un mínimo de 54,32%. En decidua (D) el valor máximo fue de 79,33% y un mínimo 47,1%.

En el día 12 dg considerando las 3 cigocidades, en la zona del miometrio se encontró un máximo de 89,88% y un mínimo de 48,17%. En triángulo mesometrial arrojó un valor máximo de 65,28% y un mínimo de 17,4%. En decidua (D) el valor máximo fue de 49,26% y un mínimo de 28,64%. Finalmente en el día 14 dg considerando las 3 cigocidades, en la zona de miometrio se alcanzó un máximo de 72,63% y un mínimo 65%. En triángulo mesometrial (TM) 44,41% y un mínimo de 27,57%. Y en decidua (D) un máximo de 35,49% y un mínimo de 17,09%.

En general se observa que a nivel de miometrio están los vasos más gruesos, patrón que se mantiene a lo largo de los 3 periodos de gestación. Por el contrario, en TM y en D existe una disminución del porcentaje del área relacionado a vasos menos gruesos a medida que aumenta el periodo de gestación encontrando valores más altos relacionado a vasos más gruesos en TM (ver Fig. 26).

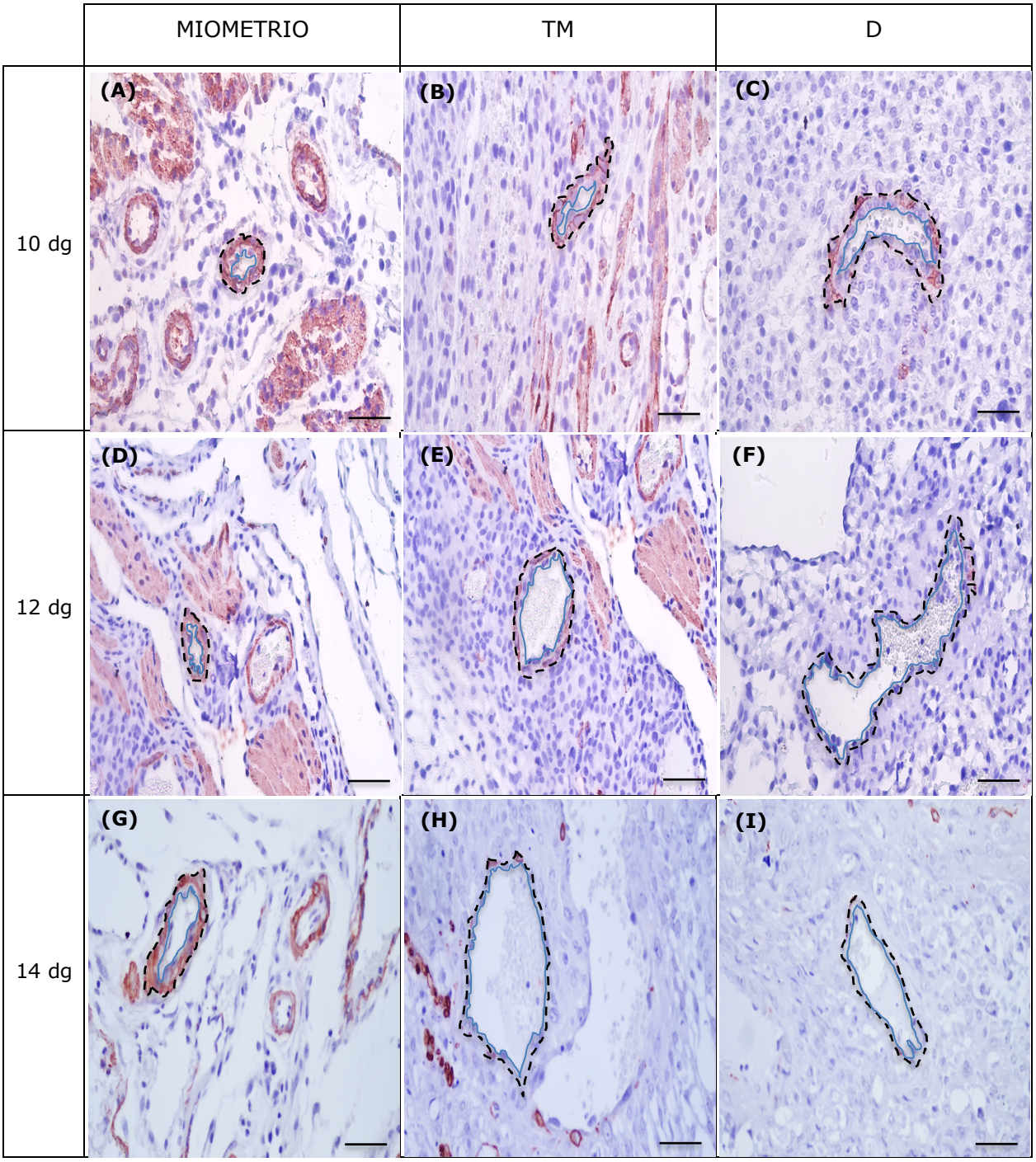


Figura 25. *Grosor de la pared de las arterias uterinas espiraladas ubicadas en miometrio, triángulo mesometrial (TM) y decidua (D). (A-I) Microfotografías referenciales de arterias analizadas delimitando área total (línea discontinua negra) y área de lumen (línea continua azul). Barra escala: 50um.*

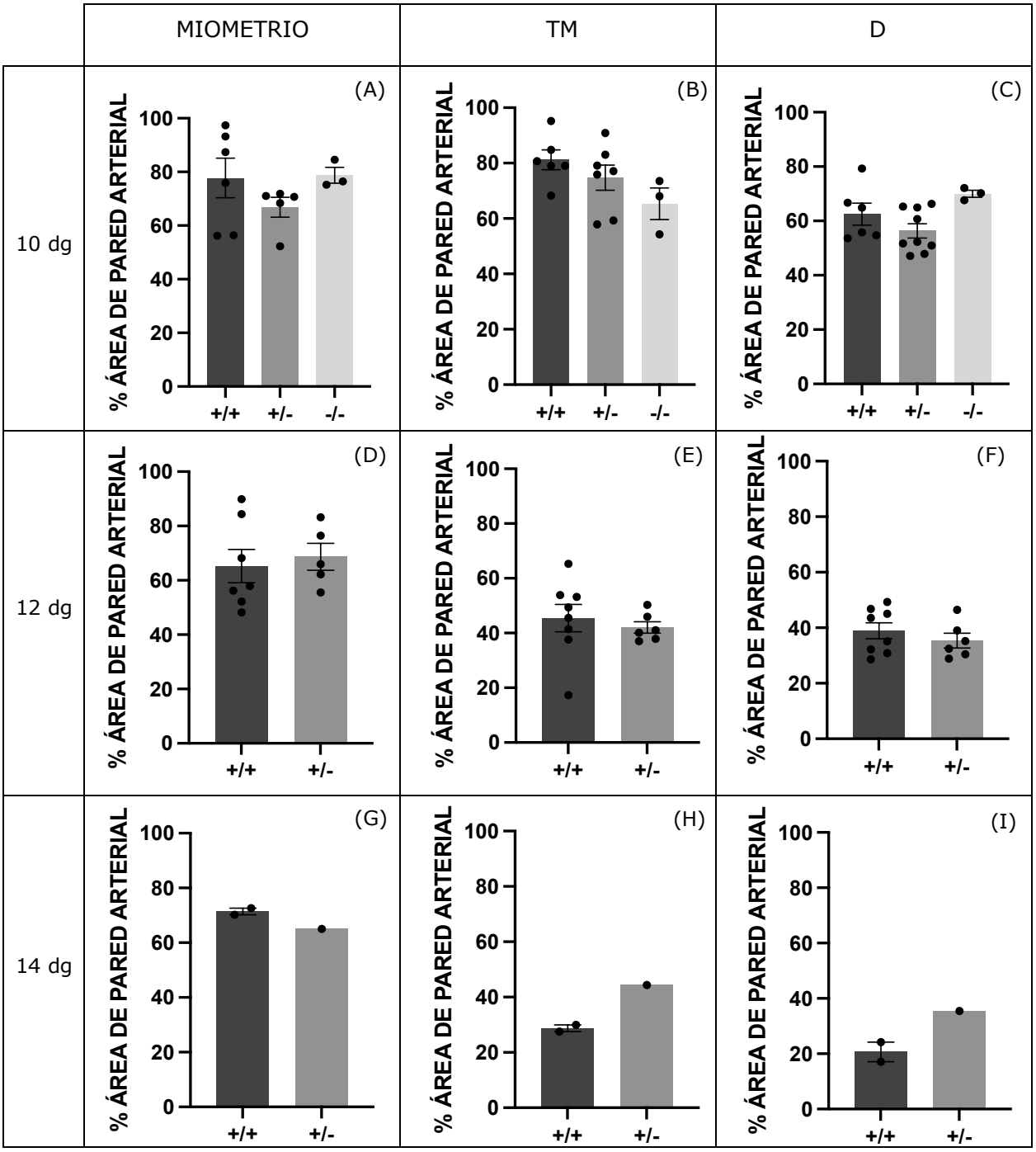


Figura 26. *Porcentaje que ocupa la pared de las arterias uterinas según ubicación y periodo de gestación. (A, D, G) Los promedios más altos se encuentran a nivel de miometrio independiente del periodo de gestación. (B, C) En el día 10 dg existe menor diferencias del engrosamiento entre miometrio, TM y D. (E, H) En los días 12 y 14 dg existe mayor diferencia del engrosamiento de los vasos entre miometrio y TM. (F, I) A nivel de decidua (D) se encuentran los valores más bajos a partir de los días 12 y 14 dg.*

4.3 Evaluación del depósito de fibrinoide en placentas días 10, 12, 14 dg teñidas con PAS

El depósito de fibrinoide fue evaluado a través de la tinción de PAS, el cual se observó de color magenta principalmente a nivel perivascular y en el lumen de los vasos sanguíneos. En general la marca se encontró en los 3 periodos de gestación y en las placentas provenientes a las 3 cigocidades ($RECK^{+/+}$, $RECK^{+/-}$, $RECK^{-/-}$).

Se consideró el porcentaje de área de la marca que se encontraba en las arterias uterinas. En el triángulo mesometrial (TM) en el periodo 10 dg se alcanzó un máximo de 25,3% de la marca y un mínimo de 1,7%. Por otro lado, en día 12 dg se alcanzó un máximo de 39,6% y un mínimo de 11,93% y en 14 dg un máximo de 52,4% y un mínimo de 40,11%. A su vez, en la decidua (D) en el periodo 10 dg se alcanzó un máximo de 27% de la marca y un mínimo de 7,69%, en día 12 dg se alcanzó un máximo de 39,38% y un mínimo de 18,97% y en día 14 dg un máximo de 40,44% y un mínimo de 17,33% cuyos porcentajes corresponden al promedio de la marca de las secciones de arterias provenientes a una placenta. En general en triángulo mesometrial y decidua como se ha descrito anteriormente se encontró un aumento del porcentaje de marca en las arterias uterinas a medida que era mayor el periodo de gestación.

En el periodo 10 dg el depósito de fibrinoide se ubicó en mayor proporción en el lumen de las arterias espiraladas uterinas. Al evaluar el porcentaje del área que ocupaba la marca en estos vasos sanguíneos y comparar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos ($RECK^{+/+}$, $RECK^{+/-}$, $RECK^{-/-}$) (Ver Fig. 27).

En los periodos 12 y 14 dg el depósito de fibrinoide se observó tanto a nivel del lumen de las arterias como también a nivel perivascular (ver Fig. 28 y 29). De las pruebas estadísticas se encontró que en día 12 dg al aplicar un test paramétrico, el depósito de fibrinoide ocupaba mayor área en $RECK^{+/-}$ (Media$\pm$Error estándar: 28,67$\pm$3,94) al comparar con el control $RECK^{+/+}$ (Media$\pm$Error estándar: 19,03$\pm$2,37). No se aplicó análisis estadístico en día 14 dg por tener 3 placentas en total.

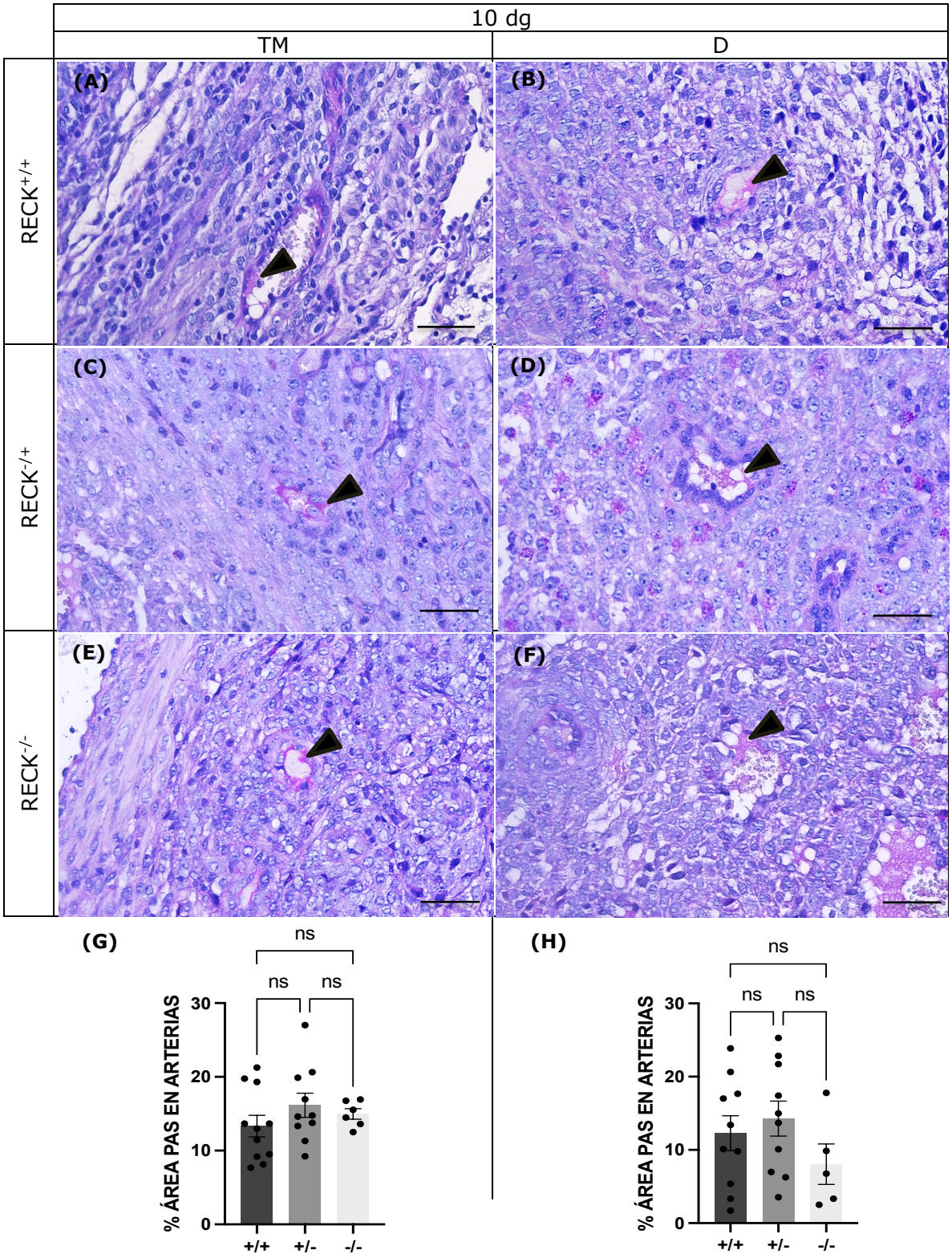


Figura 27. *Depósito de fibrinoide en placentas día 10 dg en triángulo mesometrial (TM) y decidua (D): (A-F): depósito de fibrinoide en color magenta ubicado principalmente en el lumen de las arterias (punta de flecha). (G, H) Gráfico del porcentaje de área de marca magenta en las arterias ubicadas en decidua, sin diferencias estadísticamente significativas al comparar entre las cigocidades. G y H: Prueba paramétrica t-test de dos vías, valores se expresan Media±Error estándar RECK$^{+/+}$ n=10, RECK$^{+/-}$ n=10 y RECK$^{-/-}$ n=5, ns: not significant. Barra escala: 50um.*

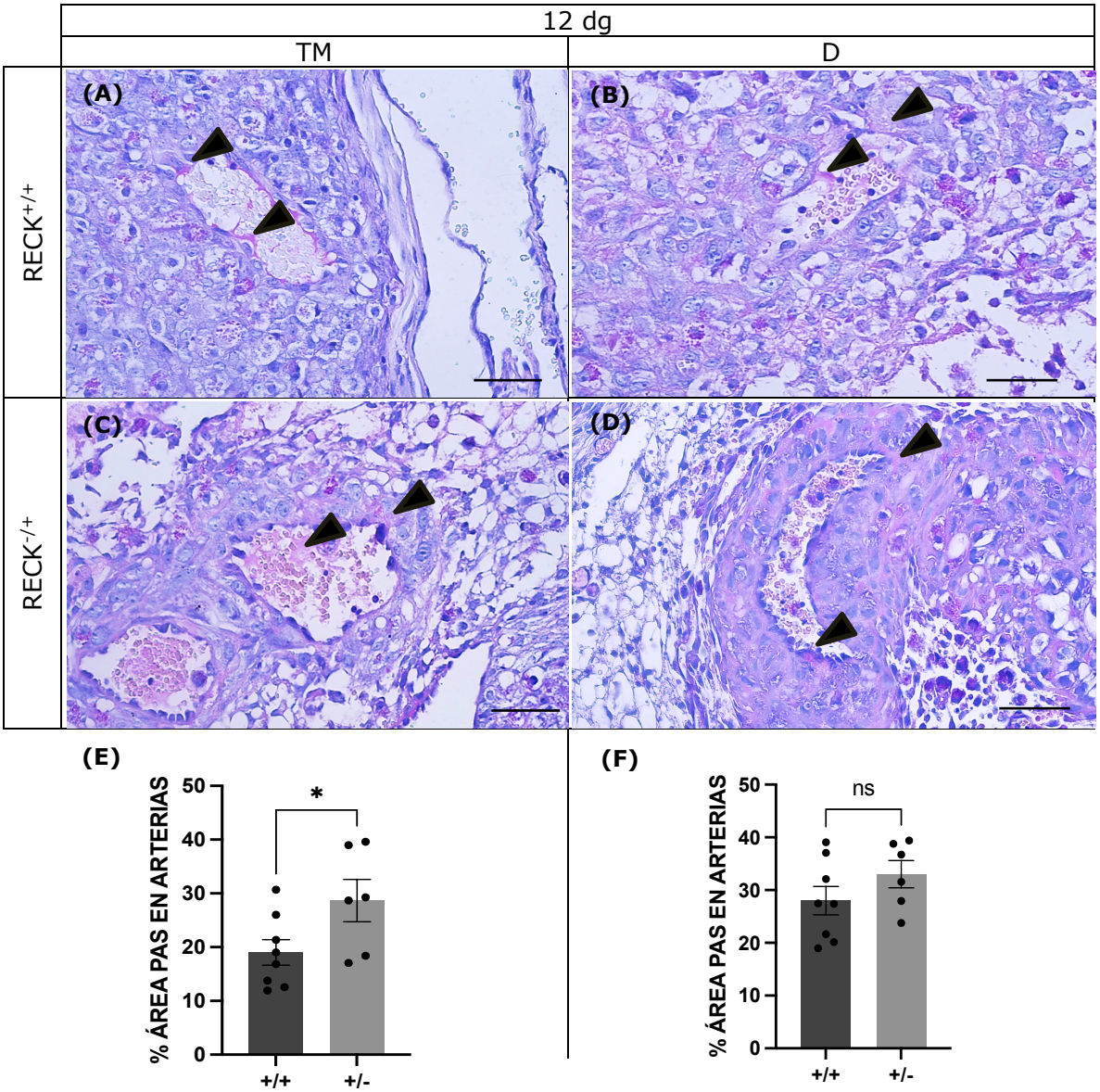


Figura 28. *Depósito de fibrinoide en placentas día 12 dg en triángulo mesometrial (TM) y decidua (D): (A-D): depósito de fibrinoide en color magenta ubicado en el lumen de las arterias y a nivel perivascular (punta de flecha). (E) Gráfico del porcentaje del área de marca magenta en las arterias ubicadas en TM con un aumento significativo en grupo RECK$^{+/-}$. (F) Gráfico del porcentaje del área de marcaje magenta en decidua sin diferencias significativas. G y H: Prueba paramétrica t-test de dos vías, valores se expresan Media±Error estándar RECK$^{+/+}$ n=8, RECK$^{+/-}$ n=6, *p<0,05, ns: not significant. Barra escala: 50um.*

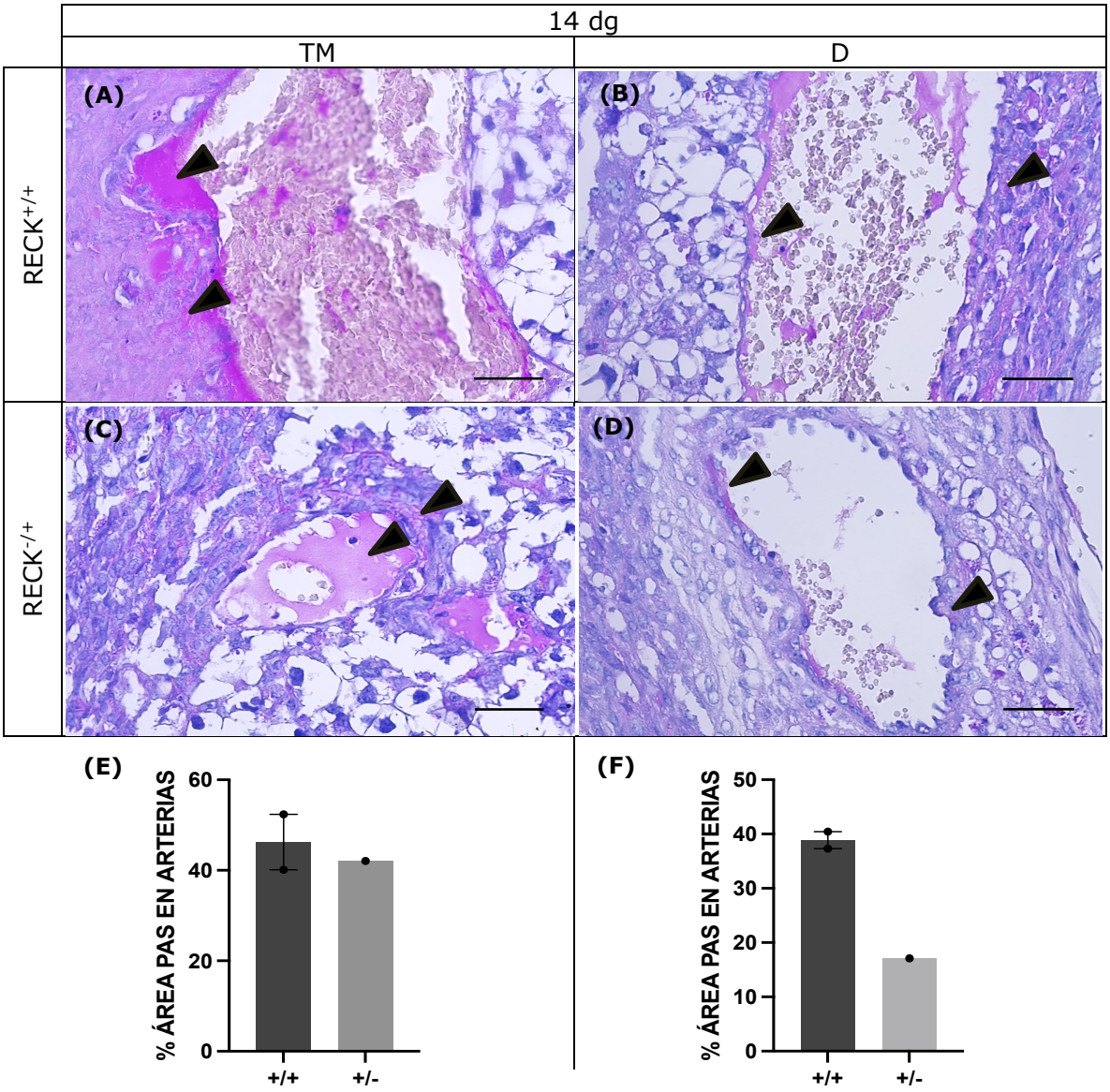


Figura 29. *Depósito de fibrinoide en placentas día 14 dg en triángulo mesometrial (TM) y decidua (D). (A-D): Depósito de fibrinoide en color magenta ubicado en el lumen de las arterias y a nivel perivascular (punta de flecha). (E-F) Gráfico del porcentaje de área del marcaje color magenta en arterias uterinas. Barra escala: 50um*

4.4 Evaluación del reemplazo de la capa muscular de las arterias espiraladas uterinas en placentas días 10, 12 y 14 dg.

Se ha descrito que la disminución de la capa de músculo liso que forma parte de las arterias que están ubicadas en la decidua está vinculado con el fenómeno de remodelación de los vasos durante el desarrollo placentario. Para evaluar este cambio se marcó el tejido con α-SMA y se evaluó el porcentaje de marca de color rojizo por sección de cada arteria según la ubicación y periodo de gestación. (Ver control negativo en Anexo 13)

En general, se observó una disminución del porcentaje del área marcado en periodos de gestación más avanzados. Así como también según la zona, obteniendo los valores más altos de la marca en miometrio y los menores en Decidua (D).

En días 10 dg a nivel de miometrio se obtuvo como porcentaje máximo de área un 65% y un mínimo 35,06% de marca en las arterias uterinas. A nivel del triángulo mesometrial (TM) el porcentaje máximo encontrado fue de 66,8% y un mínimo de 12,01% de marca, a este nivel se encontró una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de marca en el grupo $RECK^{+/-}$ (Mediana 23,92 y rango 19,37) al comparar con $RECK^{+/+}$ (Mediana 39,94 y rango 34,42). En decidua (D) el porcentaje máximo de área fue de 33,31% y como mínimo 6,61% sin diferencias estadísticamente significativas (ver Fig 30).

Al evaluar día 12 dg a nivel de miometrio se obtuvo como porcentaje máximo 83,28% y mínimo 42,56%. En TM, el porcentaje máximo alcanzó 24,78% y mínimo 5,47%. Se encontró una disminución estadísticamente significativa en $RECK^{+/-}$ (Media$\pm$Error estándar: 11,36$\pm$ 1,946) al comparar con $RECK^{+/+}$ (Media$\pm$Error estándar: 19,18$\pm$1,525). En D el porcentaje máximo fue de 11,15% y mínimo 0,83%. (ver Fig. 31). Finalmente, en día 14 dg a nivel de miometrio se obtuvo un porcentaje máximo de 73,13% y un mínimo 59,91%, en TM alcanzó un máximo de 13% y un mínimo de 5,79% y en D un máximo de 5,39% y un mínimo de 1,22%. No se aplicó prueba estadística por alcanzar solo 3 placentas en total (Ver Fig. 32).

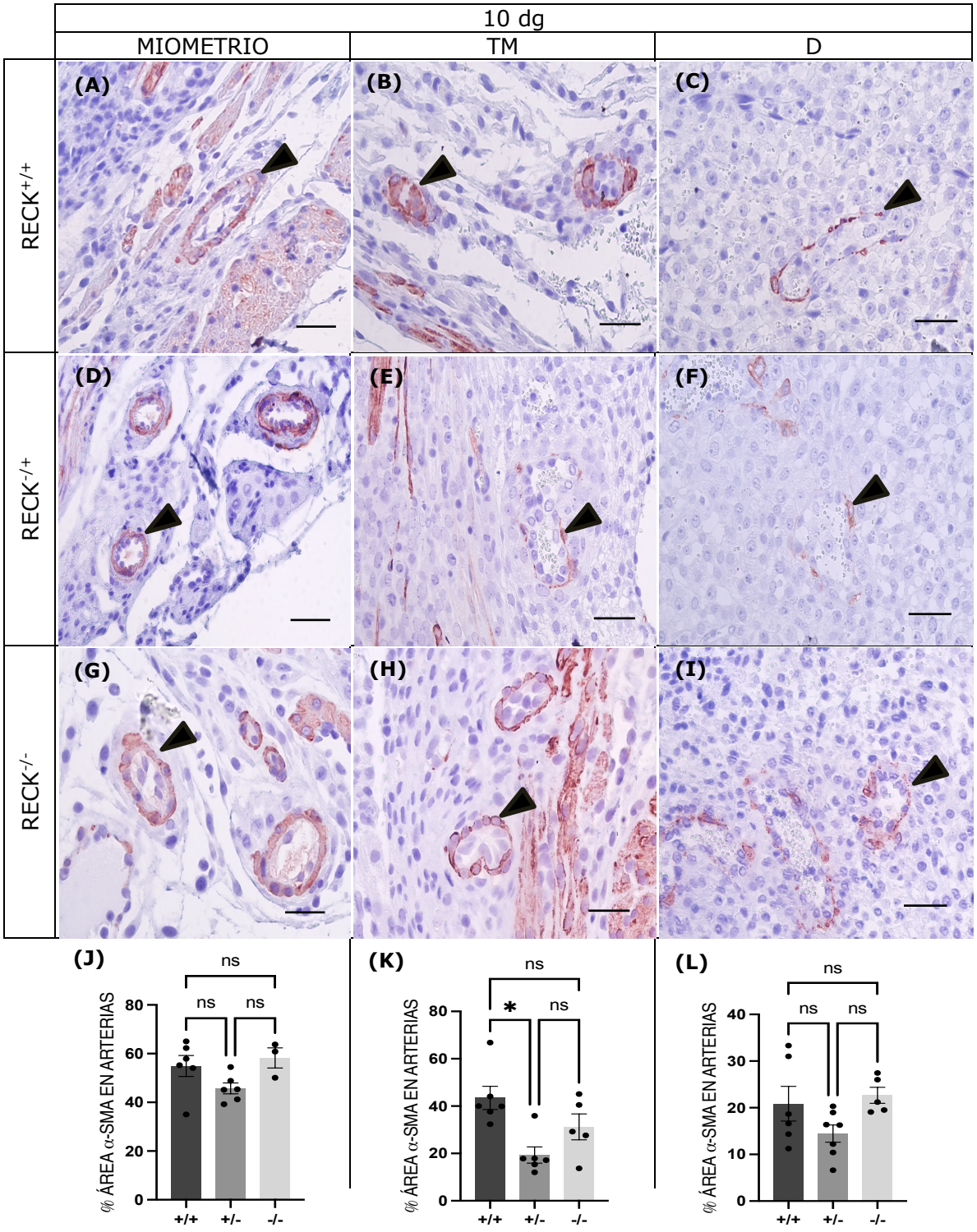


Figura 30. *Capa muscular en arterias de placenta día 10 dg. (A, D, G): identificación de la capa muscular en arterias ubicadas en miometrio (punta de flecha). (B, E, H) identificación de la capa muscular en arterias ubicadas en triángulo mesometrial (TM) (punta de flecha). (C, F, I) identificación de la capa muscular en arterias ubicadas en decidua (D) (punta de flecha). (J-L) Gráfico del porcentaje del área de marca rojiza en las arterias ubicadas en miometrio, TM y D. J,L: Prueba paramétrica Anova de una vía, valores se expresan en Media±Error estándar RECK$^{+/+}$ n=6, RECK$^{+/-}$ n=7, RECK$^{-/-}$ n=5. K: Prueba no paramétrica Kruskal Wallis de una vía, valores se expresan en Medianas y rangos RECK$^{+/+}$ n=6, RECK$^{+/-}$ n=6, RECK$^{-/-}$ n=5. *p<0,05, ns: not significant. Barra escala: 50um.*

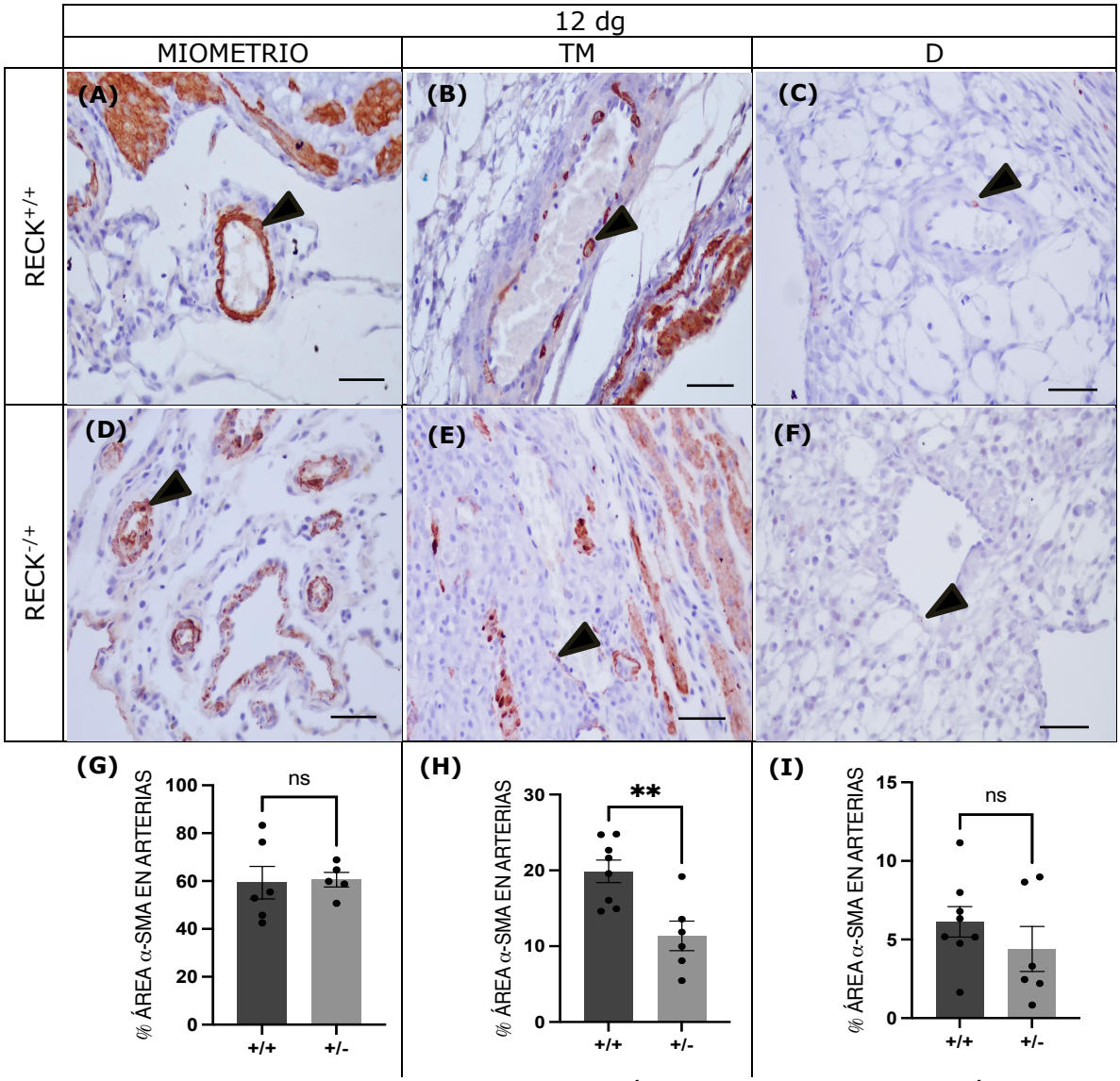


Figura 31. *Capa muscular en arterias de placenta día 12 dg. (A, D): identificación de la capa muscular en arterias ubicadas en miometrio (punta de flecha). (B, E) identificación de la capa muscular en arterias ubicadas en triángulo mesometrial (TM) (punta de flecha). (C, F) identificación de la capa muscular en arterias ubicadas en decidua (D) (punta de flecha). (G-I) Gráfico del porcentaje del área de marca rojiza en las arterias ubicadas en miometrio, TM y D. G-I: Prueba paramétrica t-test de dos vías, valores se expresan Media±Error estándar RECK$^{+/+}$ n=7, RECK$^{+/-}$ n=6, **p<0,01, ns: not significant. Barra escala: 50um.*

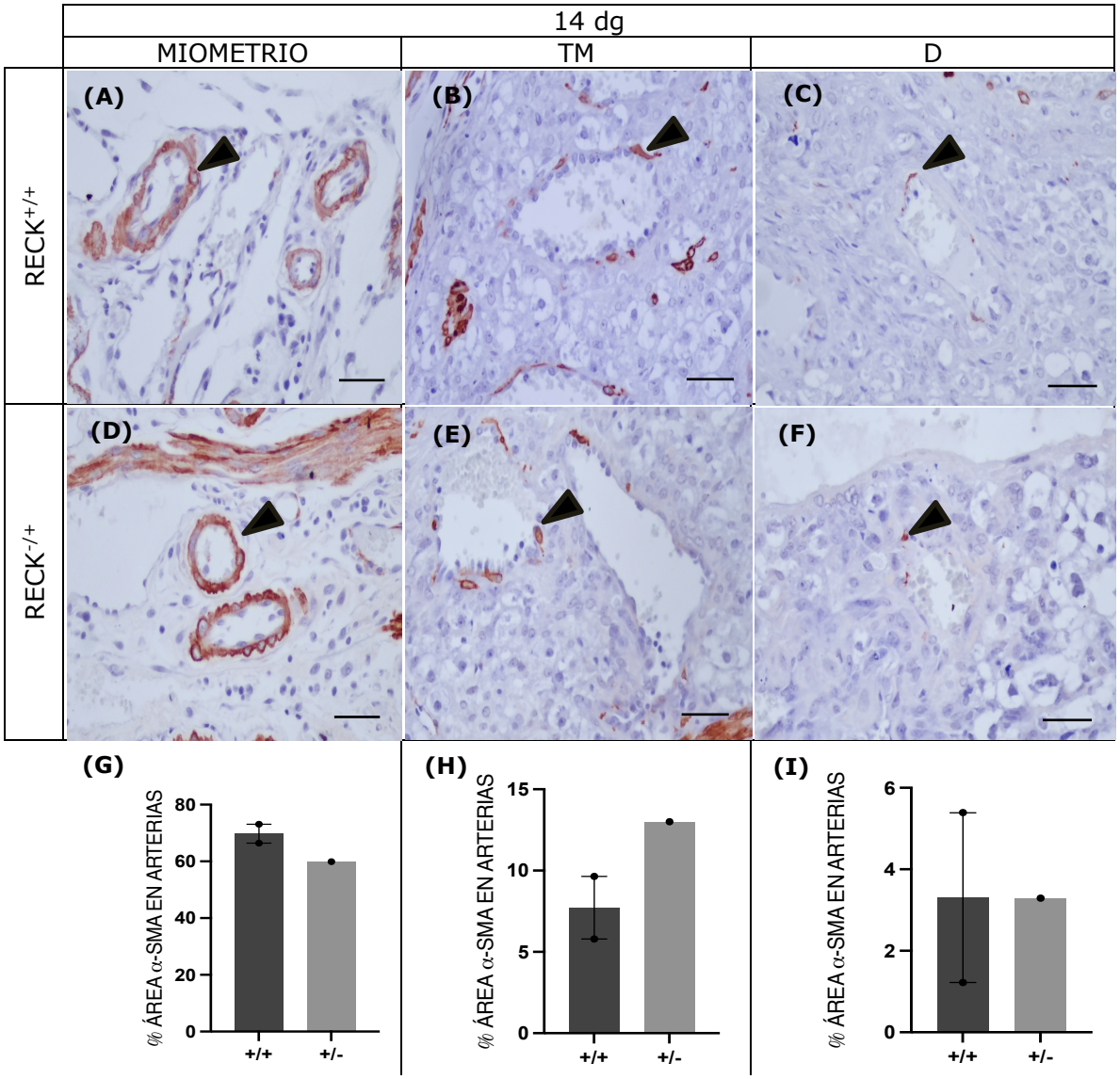


Figura 32. *Capa muscular en arterias de placenta día 14 dg. (A, D): identificación de la capa muscular en arterias ubicadas en miometrio (punta de flecha). (B, E) identificación de la capa muscular en arterias ubicadas en triángulo mesometrial (TM) (punta de flecha). (C, F) identificación de la capa muscular en arterias ubicadas en decidua (D) (punta de flecha). (G-I) Gráfico del porcentaje de área de marca rojiza en arterias uterinas. Barra escala: 50um.*

4.5 Descripción del tipo celular en las arterias espiraladas uterinas en placentas día 12 y 14 dg.

Otro patrón vinculado con la remodelación de las arterias espiraladas uterinas, es la llegada de células trofoblásticas a la capa de endotelio. Para esto, se describió la distribución de células trofoblásticas en las arterias (Ver control negativo en Anexo 14).

En el día 12 dg a nivel de miometrio las arterias estaban recubiertas en un 100% por células endoteliales tanto en $RECK^{+/+}$ como en $RECK^{+/-}$. El comportamiento en el triángulo mesometrial (TM) fue similar al miometrio, pero en la decidua (D) se observó la presencia de células trofoblásticas (Ver fig. 33).

En el periodo 14 dg se encontró que a nivel de miometrio las arterias se componían en un 100% de células endoteliales en ambos grupos. En triángulo mesometrial (TM) solo una de las placentas $RECK^{+/+}$ presentó células trofoblásticas en arterias uterinas. Finalmente, en decidua (D) ambos grupos presentaron células trofoblásticas en las arterias uterinas (ver Fig. 34).

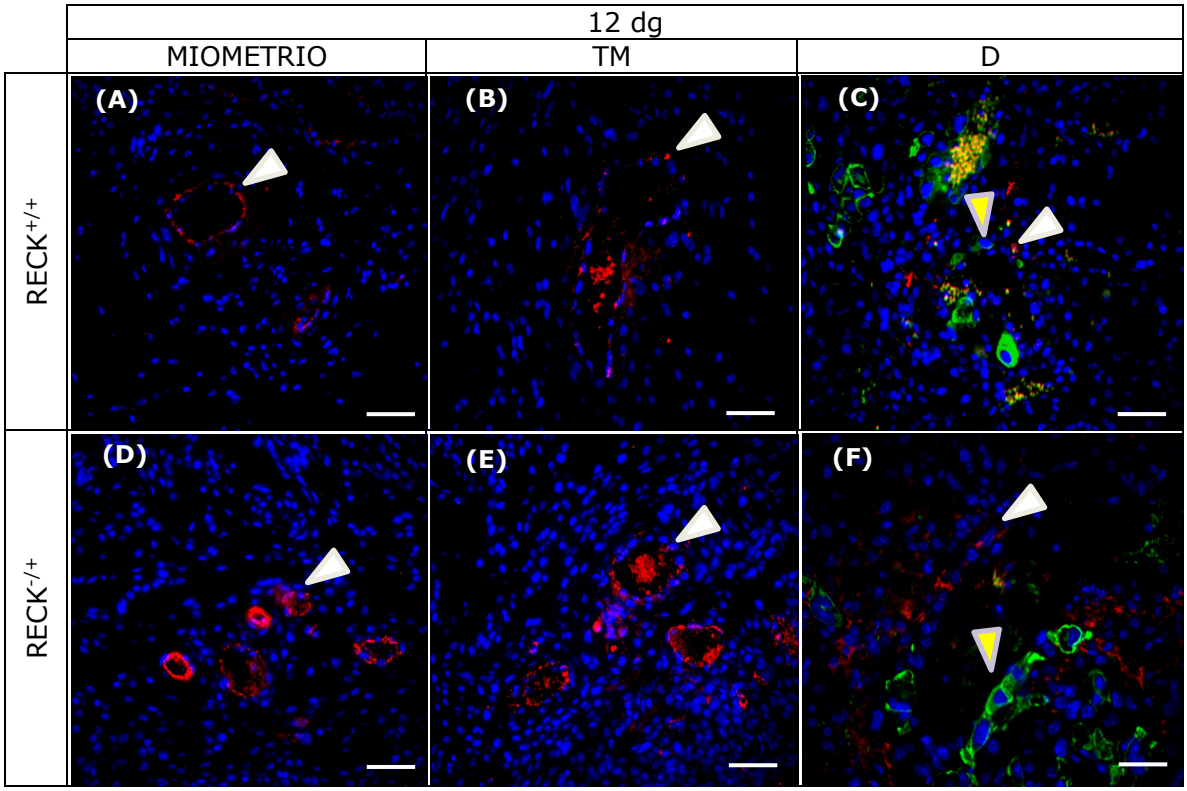


Figura 33. *Tipo celular que recubre el lumen de las arterias uterinas de placenta día 12 dg. (A, D): identificación del tipo celular en arterias ubicadas en miometrio (punta de flecha blanca indica células endoteliales con fluorescencia roja). (B, E) identificación del tipo celular en arterias ubicadas en triángulo mesometrial (TM) (punta de flecha blanca indica células endoteliales con fluorescencia roja). (C, F) identificación del tipo celular en arterias ubicadas en decidua (D) (punta de flecha blanca indica células endoteliales con fluorescencia roja y punta de flecha amarilla indica células trofoblásticas con fluorescencia verde). Barra escala: 50um.*

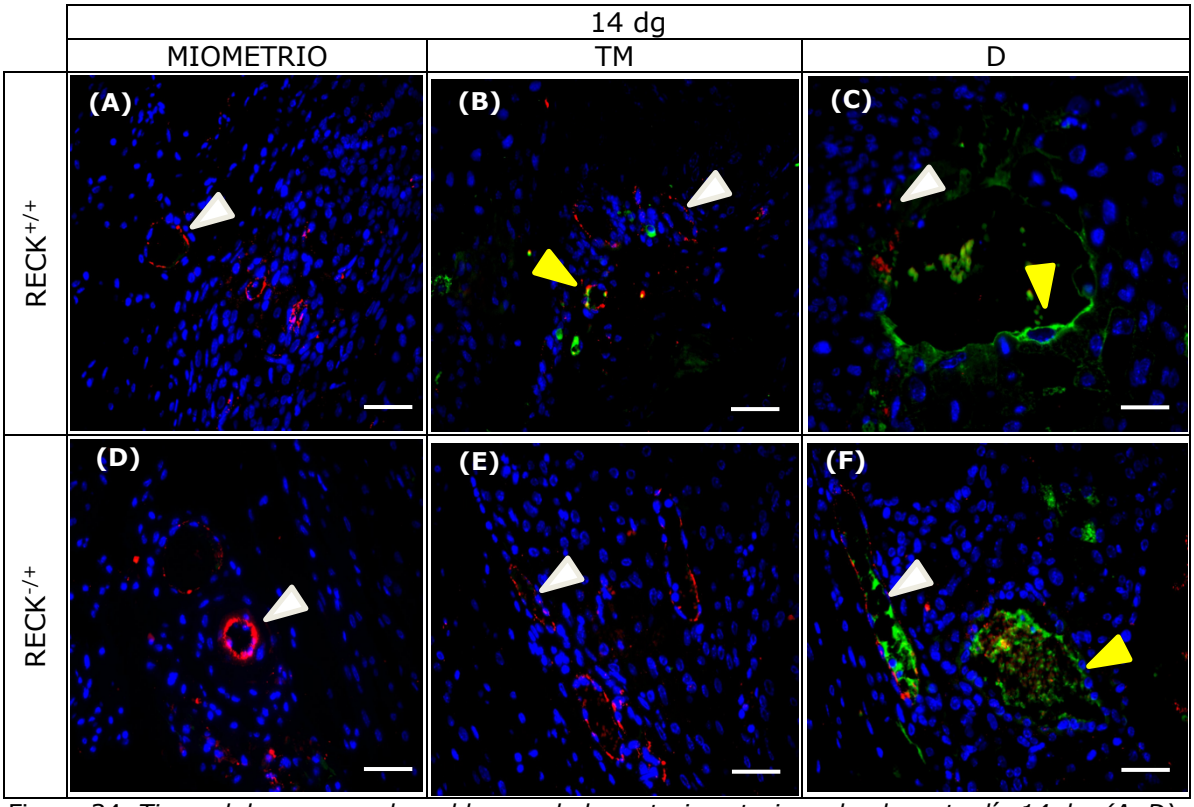


Figura 34. *Tipo celular que recubre el lumen de las arterias uterinas de placenta día 14 dg. (A, D): identificación del tipo celular en arterias ubicadas en miometrio (punta de flecha blanca indica células endoteliales con fluorescencia roja). (B, E) identificación del tipo celular en arterias ubicadas en triángulo mesometrial (TM) (punta de flecha blanca indica células endoteliales con fluorescencia roja). (C, F) identificación del tipo celular en arterias ubicadas en decidua (D) (punta de flecha blanca indica células endoteliales con fluorescencia roja y punta de flecha amarilla indica células trofoblásticas con fluorescencia verde). Barra escala: 50um.*

5. DETERMINAR LA DISTRIBUCIÓN DE RECK EN PLACENTAS DE EMBRIONES SILVESTRES (*RECK*$^{+/+}$) Y HETEROCIGOTO (*RECK*$^{+/-}$) PARA *RECK* EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS 10, 12, 14 dg

Para identificar y determinar la localización de RECK en placentas durante los diferentes eventos, se analizó la ubicación de la marca del anticuerpo RECK relacionado con el periodo de gestación. (Ver control negativo en Anexo 13)

Se identificó la marca de RECK de color rojizo en los 3 periodos de gestación estudiados con un patrón citoplasmático (ver Fig 35). En los 3 casos (días 10, 12 y 14 dg) se encontró a nivel de miometrio específicamente en el endotelio de las arterias uterinas (ver fig. 36). A nivel del triángulo mesometrial (TM) en día 10 dg se observó escaza marca asociada a las arterias uterinas, sin embargo, se encontró una marca más evidente en el grupo de RECK$^{-/-}$ a nivel de la decidua materna. En días 12 y 14 dg se observó rodeando las arterias y en la matriz extracelular (ver fig. 37). A nivel de decidua se encontró escaza señal en el periodo 10 dg ubicado en las arterias uterinas y una marca casi nula en la decidua en general. En días 12 y 14 dg la marca fue más evidente alrededor de las arterias uterinas (ver fig. 38).

La marca de RECK también se observó a nivel de las células gigante dependiente del periodo de gestación. Durante día 10 dg, no se observó marca evidente en este tipo celular, sin embargo, en día 12 dg se observó una señal de patrón citoplasmático evidente que se mantuvo en día 14 dg (ver fig. 39). Por otro lado la señal de RECK con patrón citoplasmático se observó en la zona del laberinto y zona de unión de días 12 y 14 dg (ver fig 40).

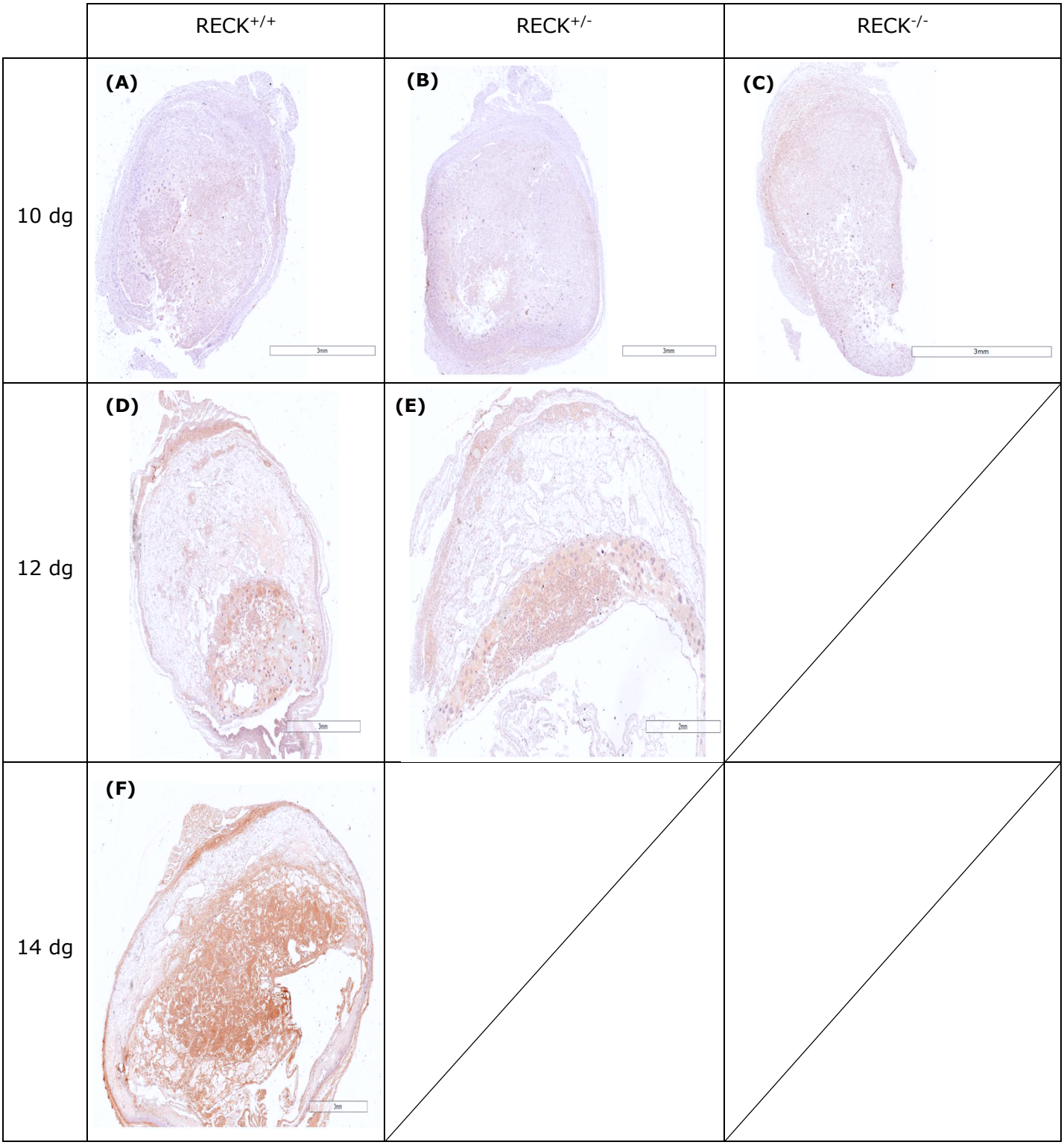


Figura 35. *Ubicación de Reck en sitios de implantación de días 10, 12 y 14 dg. (A-C) en día 10 dg se observa la presencia de RECK principalmente hacia tejido materno en las 3 cigocidades. (D-F) En días 12 y 14 dg se observa un patrón similar en ambas cigocidades ubicada en laberinto, zona de unión, arterias uterinas y miometrio.*

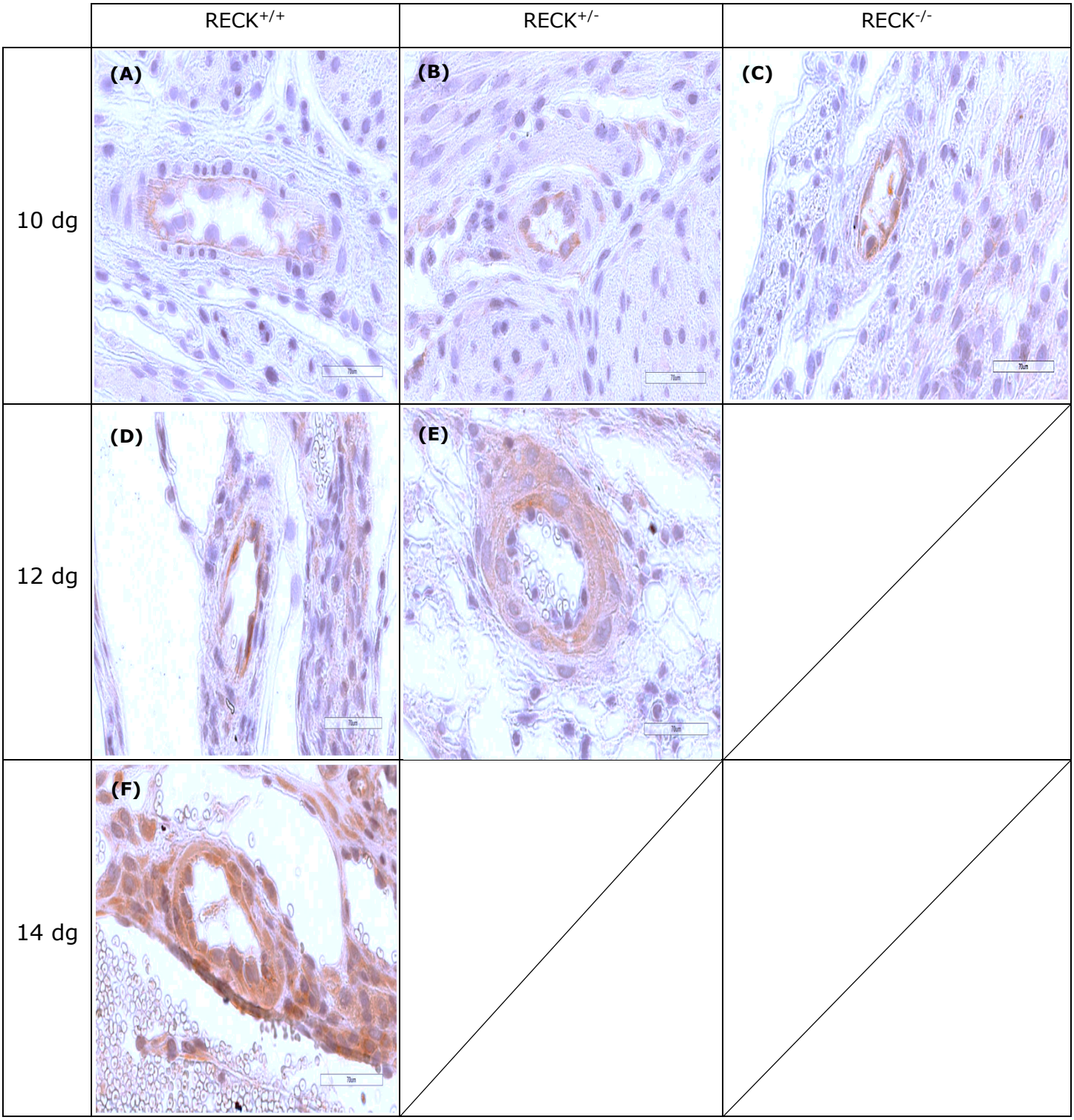


Figura 36. *Ubicación de Reck en miometrio de días 10, 12 y 14 dg. (A-F) en todos los periodos de gestación y cigocidades la marca de Reck se observó a nivel de arterias uterinas, principalmente en endotelio con patrón citoplasmático rojizo.*

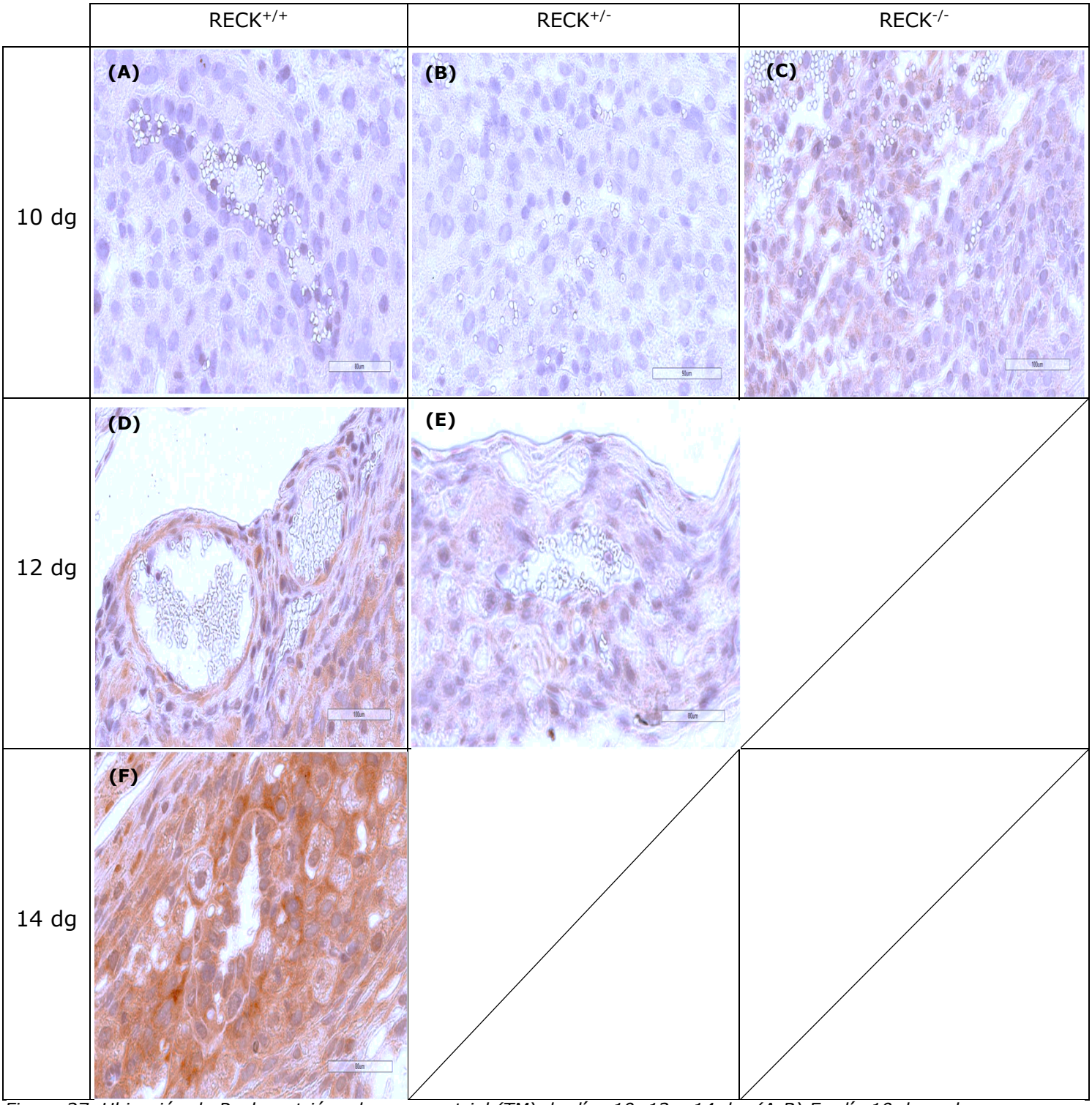


Figura 37. Ubicación de Reck en triángulo mesometrial (TM) de días 10, 12 y 14 dg. (A-B) En día 10 dg en los grupos RECK$^{+/+}$ y RECK$^{+/-}$ la marca a nivel de TM fue escaza y cercano a las arterias uterinas. (C) en día 10 dg en el grupo RECK$^{-/-}$ se observó una marca más evidente cercano a las arterias uterinas. (D-F) en días 12 y 14 dg se observó la marca color rojizo rodeando las arterias y las células con patrón citoplasmático.

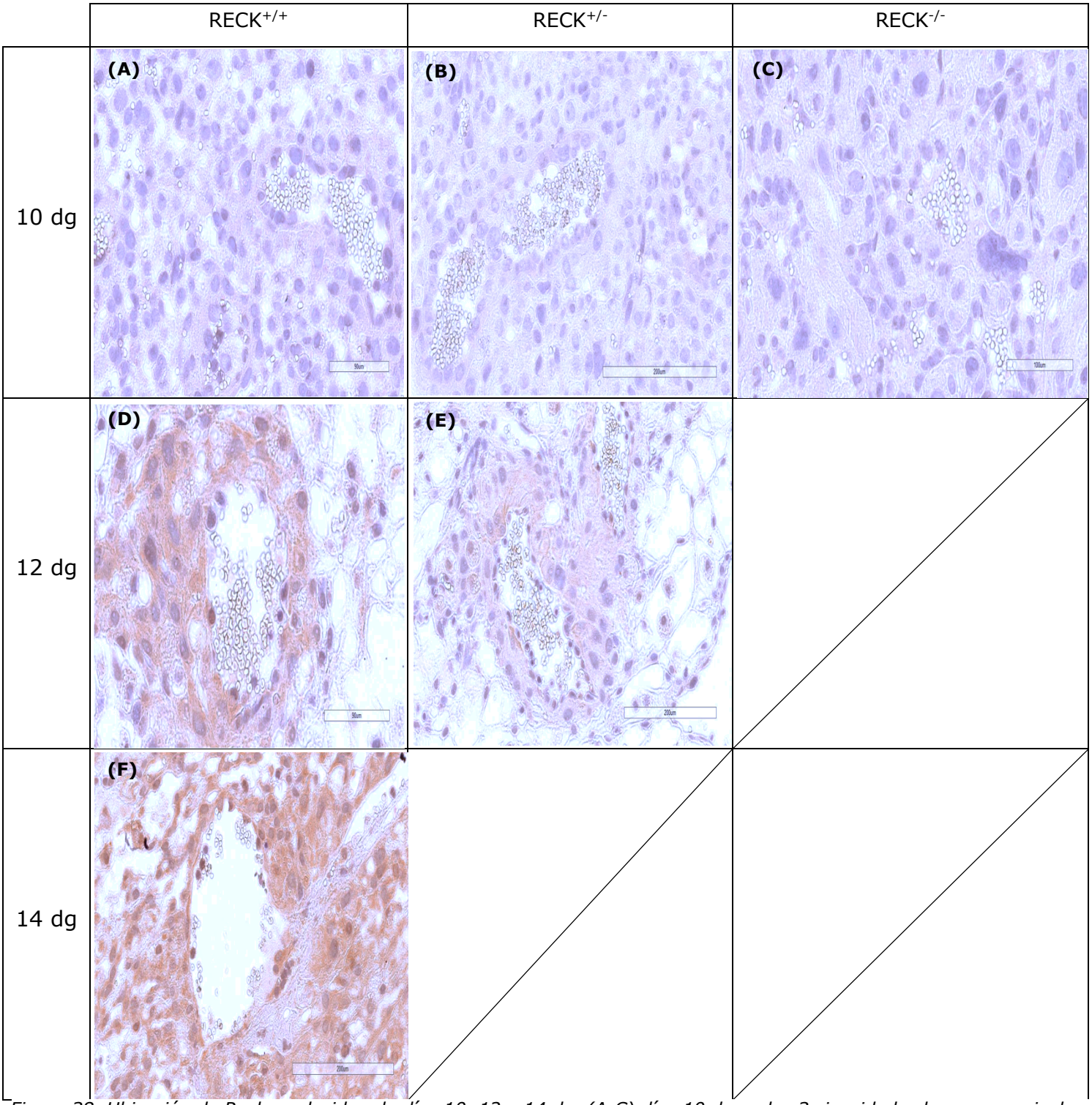


Figura 38. Ubicación de Reck en decidua de días 10, 12 y 14 dg. (A-C) días 10 dg en las 3 cigocidades la marca a nivel de decidua fue escaza y cercano a las arterias uterinas. (D-F) días 12 y 14 dg se observó la presencia de marca color rojizo rodeando las arterias y las células con patrón citoplasmático.

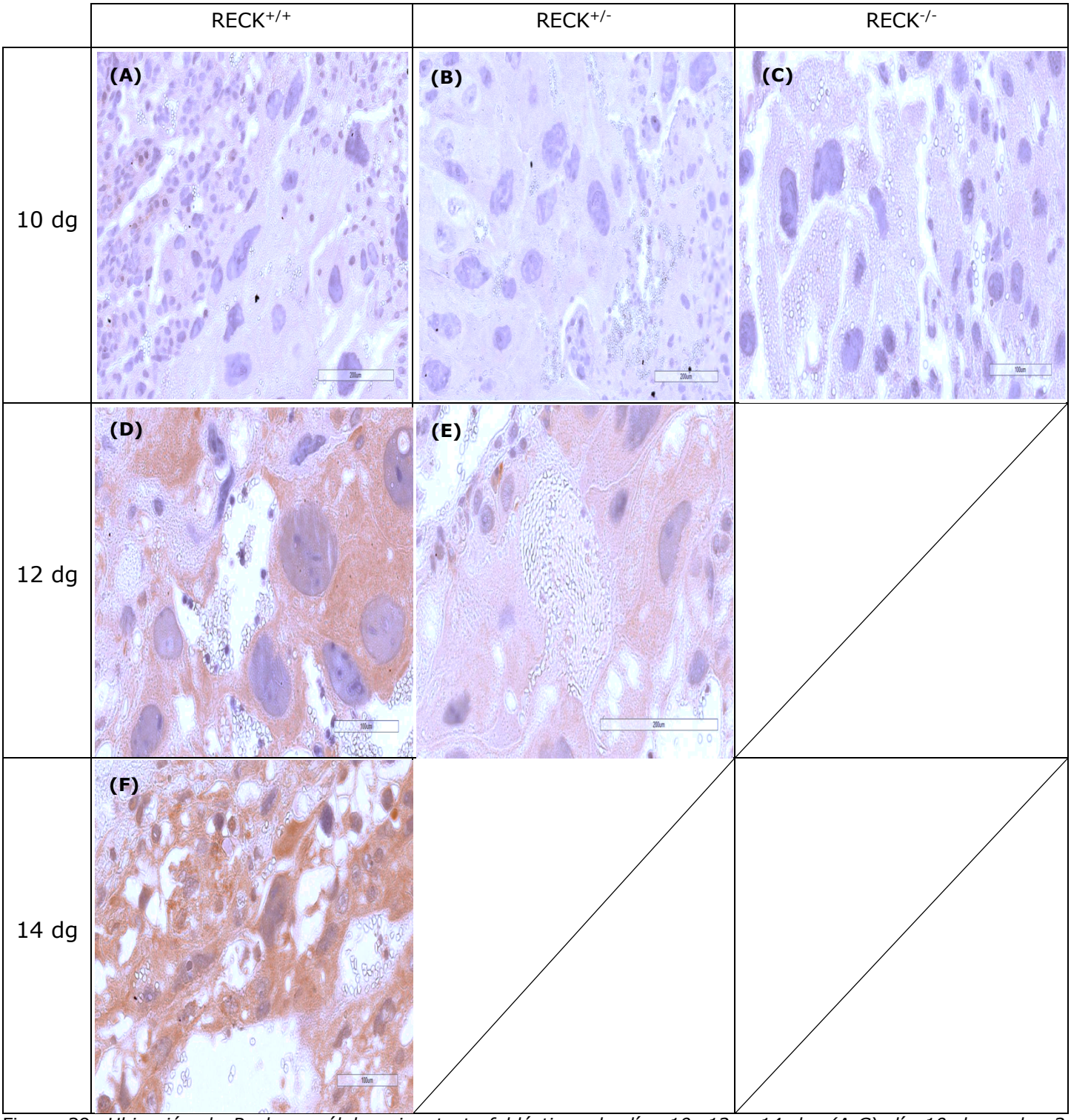


Figura 39. *Ubicación de Reck en células gigante trofoblásticas de días 10, 12 y 14 dg. (A-C) día 10 dg en las 3 cigocidades la marca a nivel de células gigantes trofoblásticas fue escaza. (D-F) se observó la presencia de marca color rojizo rodeando las arterias y las células con patrón citoplasmático.*

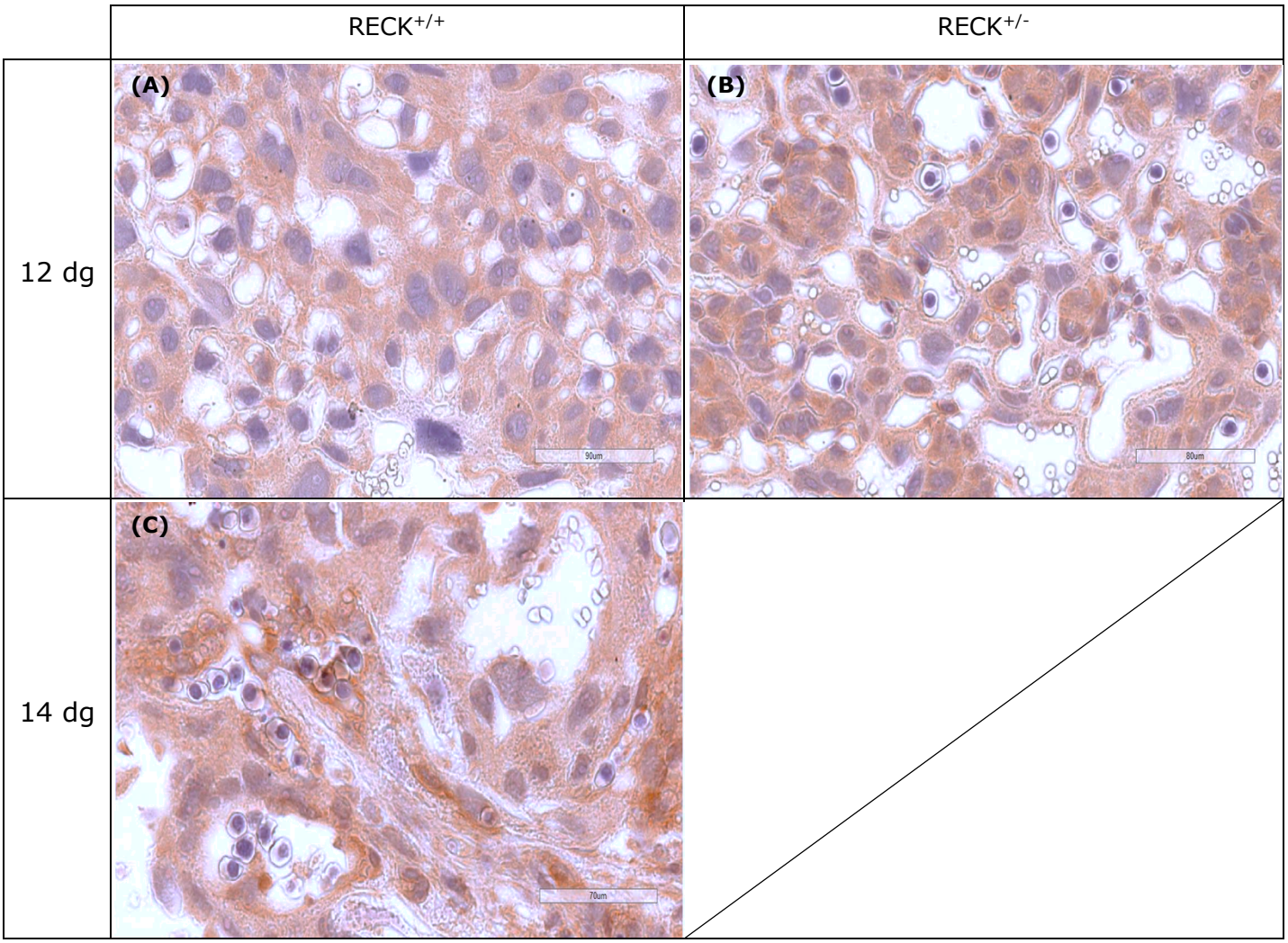


Figura 40. Ubicación de Reck en laberinto días 12 y 14 dg. (A-C) días 12 y 14 dg se observa marca a nivel del laberinto de patrón citoplasmático.

DISCUSIÓN.

El desarrollo de la placenta involucra procesos de remodelamiento vascular uterino que dependen de la interacción de las células trofoblásticas fetales con células endoteliales e inmunitarias maternas, si este proceso es exitoso aumenta el flujo de sangre materna hacia la placenta, permitiendo el correcto intercambio de nutrientes y desechos entre la sangre materna y fetal(73).

La progresión de este proceso de remodelación vascular fue evaluado como objetivo central de esta tesis a través del uso en un modelo murino. En particular, se evaluó la participación de RECK, una glicoproteína anclada a la membrana plasmática por un tallo de GPI(74). RECK se caracteriza por regular la invasión celular así como la angiogénesis y procesos de remodelamiento vascular en distintos contextos, aunque principalmente en el desarrollo tumoral(61,64). Nosotros planteamos evaluar el desarrollo placentario, invasión trofoblástica y remodelamiento vascular uterino en ratones hembra $RECK^{+/-}$ fecundadas por ratones macho de la misma cigocidad, permitiendo evaluar la función de RECK en embriones y placentas de las 3 cigocidades: $RECK^{+/+}$, $RECK^{+/-}$ y $RECK^{-/-}$.

Nuestros resultados muestran que en el periodo 12 dg en las placentas provenientes de embriones heterocigotos ($RECK^{+/-}$) se observa un aumento estadísticamente significativo del número de células trofoblásticas invadiendo el tejido materno (triángulo mesometrial y decidua) (Figura 23), comparado a lo observado en placentas control ($RECK^{+/+}$). Estos resultados sugieren que la disminución de la carga genética de RECK, promueve la invasión trofoblástica del tejido uterino en modelo murino. Además validan *in vivo* observaciones ya publicadas con ensayos *in vitro*, en los que se evaluó por ensayos de ganancia y pérdida de función de RECK en la línea celular de trofoblastos humano de primer trimestre, HTR8-SvNeo, que RECK actuaría como un inhibidor de la invasión celular a través de un mecanismo que involucra la disminución de la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9(69). Si bien, los ensayos ya publicados *in vitro* sugieren que RECK es un regulador negativo de la invasión celular y que potencialmente pudiera ser determinante de un correcto remodelamiento vascular, esto tiene limitaciones por lo que no puede ser demostrado *in vitro*. Adicional, en estos ensayos *in*

vitro se evaluó la invasión de los trofoblastos a través de una matriz comercial conocida como matrigel, que es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteínas de la matriz extracelular (MEC) que incluye como componente principal laminina con cerca del 60%, seguido de un 30% de colágeno IV, entre un 2 y 3% de proteoglicanos de heparán sulfato y en menor proporción entactina/nidógeno y distintos factores de crecimiento(75). Esta preparación no representa la composición de la MEC de la decidua, la que está enriquecida fundamentelamente en Colágeno I, III, IV y V, Fibronectina, y sólo una pequeña parte correponde a laminina(76). Otra de las variables respecto al tejido materno, es el contacto con todas las células deciduales, uNK, linfocitos, fibroblastos, entre otros(77–79), por todo esto, probarlo *in vivo* es necesario. Junto con lo anterior, hasta el momento no existe reporte alguno que estudie el rol de RECK en el remodelamiento vascular uterino, pero en nuestro laboratorio se han obtenido resultados aún no publicados en ensayos *in vitro* que sugieren este rol en RECK.

El proceso de remodelación arterial a nivel morfológico implica modificaciones como disminución del engrosamiento de la pared vascular, pérdida de la capa muscular de las arterias, depósito de fibrinoide y presencia de células trofoblásticas(80–82). Estos cambios morfológicos característicos los evaluamos en el desarrollo de la placenta de embriones $RECK^{+/+}$ sin encontrar cambios en relación a lo ya descrito(83,84). Observamos, a través de análisis de estadística descriptiva (con la descripción del grosor de la pared de arterias mediante la razón matemática entre área total del vaso:área del lumen) el engrosamiento de la pared de las arterias uterinas espiraladas desde el día 10 dg al 14 dg y encontramos que la arteria uterina espiralada es más gruesa en el periodo 10 dg y los valores más bajos se encontraron en día 14 dg, siendo una pared más delgada principalmente a nivel de la decidua(85,86).

La disminución del grosor de la pared se asocia con la pérdida de la capa muscular a nivel de las arterias uterinas espiraladas(81,87), la que se acompaña por el depósito de fibrinoide(81) lo que se cree actuaría como soporte del vaso remodelado(46,88). En placenta de ratones $RECK^{+/+}$ la pérdida de la capa muscular fue acompañada del aumento de depósito fibrinoide, cambios que aumentaron en función a la edad

gestacional desde día 10 a 14 dg, con una distribución del depósito de fibrinoide en día 10 dg que fue principalmente en el lumen de los vasos que se tornó más luminal y además perivascular en días 12 y 14 dg, como ya se ha descrito(46,89). Además se observó una pérdida significativa de la capa muscular a partir de día 10 dg y un aumento del depósito de fibrinoide significativo desde día 12 dg en el grupo $RECK^{+/-}$ al comparar entre las cigocidades, destacando que estos cambios significativos se encontraron en zonas más profundas del tejido materno la que denominamos como triángulo mesometrial. Esto sugiere que la disminución de la carga genética de RECK podría estar favoreciendo además de la invasión, el proceso de remodelación de las arterias uterinas espiraladas de manera anticipada y en zonas más profundas del tejido materno.

De estos resultados se debe destacar que a nivel de miometrio, zona donde está descrito que no existe contacto con el trofoblasto ni remodelación de las arterias uterinas en ratones(43) no hubo diferencias entre las cigocidades ni cambios asociados a remodelación vascular en las arterias uterinas, lo que sugiere que existe una regulación por parte del tejido materno.

Estos resultados son consistentes con la hipótesis planteada. Como ya se discutió, observamos un aumento de área invadida por trofoblasto en la decidua en el grupo $RECK^{+/-}$ durante día 12 dg, lo que propone según antecedentes descritos(90) un aumento en su capacidad de remodelar las arterias uterinas incorporándose en ellas. Sin embargo, y a pesar de que se ubicaban en las proximidades de las arterias de la decidua desde el periodo 12 dg; sólo en una de las placentas analizadas en día 14 dg se encontraron células trofoblásticas identificadas por la tinción con el anticuerpoo anti PAN-CK en las arterias uterinas espiraladas ubicadas en triángulo mesometrial. Estos resultados fueron llamativos, ya que se habían encontrado cambios de remodelación vascular tanto a nivel de decidua como del triángulo mesometrial en los periodos 10, 12 y 14 dg reflejado en aumento de depósito de fibrinoide y disminución de la capa muscular. Se ha planteado una hipótesis frente a esto, ya que Adamson, L., et al (2002) y en otro estudio Charalambous, F., et al (2012) en modelo murino identificaron que en periodos de gestación temprano se observaron cambios a nivel de las arterias uterinas en zonas donde no se encontraban físicamente las células trofoblásticas incorporadas en

los vasos, proponiendo que estos cambios vasculares en periodos tempranos y en zonas de la placenta más distantes a las CGT eran provocados por una secreción paracrina(82,87) lo cual ha sido confirmado en estudios de Salomon, C., et al (2014)(91).

Si bien, el aumento de invasión trofoblástica y subsecuente aumento de remodelación arterial uterina espiralada observada en las placentas de embriones $RECK^{+/-}$, pudiese ser explicada por un aumento en la actividad de MMPs, nuestro resultados no permiten validarlo, sin embargo, se propone esta relación debido a que el proceso de invasión requiere de la degradación de la matriz extracelular del útero por las células trofoblásticas, refiriendo que en el contexto de implantación el activador del plasminógeno uroquinasa, MMP-2, MMP-9 son las proteasas que más destacan(92). A su vez este proceso es regulado por inhibidores de proteasas, como por ejemplo, la proteína RECK que es un inhibidor de las proteasas mencionadas(93). Por lo que la disminución de la carga genética de RECK podría estar favoreciendo la activación de las proteasas que participan en los procesos de invasión del trofoblasto y favoreciendo el remodelamiento. Otro factor que podría estar respondiendo a nuestros resultados es que se ha descrito que RECK inhibe la migración de células endoteliales(94) y la migración de células musculares lisas que rodean los vasos(95,96), esto se relaciona con lo observado en la disminución significativa de la capa muscular desde día 10 dg en el grupo $RECK^{+/-}$ que es parte de la remodelación vascular, donde las células musculares lisas de las arterias migran, sufren apoptosis y son reemplazadas por material fibrinoide(91). Por lo que RECK podría estar regulando la migración de estas células durante la placentación.

A pesar de que la principal función de RECK es de inhibidor de la actividad de MMP-2, -9 y -14, también se ha descrito una función reguladora de la activación de la vía NOTCH(97), pudiendo actuar como inhibidor al impedir el procesamiento de los receptores o ligandos, a través de la inhibición de las a-desintegrina metaloproteasa-10 (ADAM-10)(97,98). Esta vía de señalización de NOTCH es conocida por regular procesos de invasión y diferenciación celular en trofoblatos, en particular relacionado con el establecimiento de los trofoblastos que migran desde el tejido fetal a la decidua desde

los precursores(99–101). RECK además interactúa con GPR124 y WNT, el receptor de WNT7a, formando un complejo necesario para la activación de la vía WNT no canónica. La literatura sugiere un papel fundamental de la señalización de Wnt en la función trofoblástica fisiológica y patológica(99,102–104). Es posible que RECK pueda participar regulando el remodelamiento de la MEC, la invasión y a su vez regulando la respuesta de los trofoblasto a estas señales solubles como Wnt o que requieran del contacto célula-célula como la via de Notch, determinado su capacidad de adquirir el fenotipo invasivo.

Complementario a los resultados anteriores, la presencia y distribución de RECK explican en parte su rol en la placenta. A nivel del miometrio, RECK se encontró en las arterias uterinas durante los 3 periodos de gestación (días 10, 12 y 14 dg), esto es coherente con su función como regulador negativo de la invasión y remodelación vascular(94–96), lo que se vincula directamente con antecedentes que indican que en esa zona no hay invasión del trofoblasto ni remodelación de las arterias uterinas en placentas de ratón(43). A nivel de las células gigantes, no se encontró marca evidente en el periodo 10 dg, y fue evidente desde el periodo 12 dg, esto se puede explicar debido a que se ha descrito que las CGT primarias invaden principalmente en periodos tempranos de la gestación previo a día 12 dg(27,38). Por otro lado, se observó una marca en día 14 dg en decidua específicamente en las arterias uterinas espiraladas que presentaban células trofoblásticas gigantes, lo que se puede responder por lo mencionado anteriormente en relación a la regulación de lo mencionado con la vía de Notch y Wnt(99–101,104).

También se observó la presencia de RECK en el laberinto, que es una estructura la cual se ha descrito que presenta una extensa angiogénesis prolongada hasta el final del desarrollo placentario(105), en este sentido como ya se mencionó anteriormente, RECK, es una proteína que favorece la angiogénesis y su ausencia impide la formación de plexos vasculares(62) llevándonos a pensar que su presencia y rol es crítico en el desarrollo del laberinto. Por lo que estos resultados y antecedentes nos llevan a considerar de que RECK es una proteína reguladora, que tiene un rol y un impacto tanto en tejido materno, como fetal. Por último, como ya se mencionó, RECK, está principalmente anclado en la membrana, sin embargo, algo que llamó la atención fue la intensa marca de RECK con

patrón citoplasmático, fenómeno que queda por estudiar.

En este estudio nos enfrentamos a algunas limitaciones, ya que uno de los objetivos fue evaluar las placentas $RECK^{-/-}$ en el proceso de invasión y remodelamiento de las arterias uterinas, proceso que ocurre de manera más evidente en el día 12 dg en nuestro modelo, sin embargo, en este modelo murino dichos embriones mueren al día 10.5 dg lo que imposibilitó evaluar en su totalidad los procesos de invasión y remodelación en ausencia de RECK a nivel de células fetales. Además, las placentas provenientes de embriones $RECK^{-/-}$ en el periodo 10 dg no respondieron como esperábamos, ya que nuestra propuesta era encontrar un aumento significativo de invasión y cambios morfológicos aumentados que se relacionaran con la remodelación a nivel de las arterias uterinas espiraladas, estos cambios no se evidenciaron en nuestros resultados, lo que se explicó posteriormente por la presencia de la proteína RECK en la decidua (tejido materno) en el día 10 dg, que no fue tan evidente en los otros 2 grupos ($RECK^{+/+}$ y $RECK^{+/-}$) durante el mismo periodo, este fenómeno que fue observado como respuesta del tejido materno, queda por estudiar.

Cabe destacar, que este estudio es uno de los primeros en describir la presencia de RECK asociado a estructuras de la placenta en días 10, 12 y 14 dg, periodos cruciales en el desarrollo placentario. También es uno de los primeros en evaluar el rol de RECK en invasión y remodelamiento de las arterias uterinas espiraladas durante el desarrollo embrionario en un modelo *in vivo* que conlleva a una mayor complejidad, lo que nos permitió entender en parte, el contexto y rol de RECK en el ambiente uterino, ya que hasta la fecha principalmente se tienen antecedentes en ensayos *in vitro* y su rol en el embrión. Por otro lado, tener más antecedentes del rol de RECK en invasión y remodelamiento de las arterias uterinas espiraladas, nos permite asociarlo con patologías , ya que en este caso una disminución de la carga genética de RECK favoreció el proceso de invasión y remodelamiento de las arterias uterinas espiraladas, lo que nos lleva a plantear que un aumento de RECK en etapas tempranas podría generar consecuencias opuestas en los procesos mencionados, similar a lo que se describe en patologías del embarazo como la preeclampsia(106)

Otras interrogantes que surgen a partir de los resultados pero que no son parte del objetivo de estudio, es el rol de RECK a nivel de la decidua o tejido materno y cómo esta proteína podría estar regulando los procesos de implantación y placentación. Otro punto observado, es que en pareja de ratones $RECK^{+/-}$ la cantidad de sitios de implantación en general fue reducida al comparar con antecedentes que indican que las camadas alcanzan entre 10 a 12 crías(4), siendo que nosotros obtuvimos en promedio una camada de 6 sitios de implantación, alcanzando un máximo de 10 y un mínimo de 3 sitios de implantación en día 10 dg, un máximo de 8 y un mínimo de 6 en día 12 dg y un máximo de 2 y un mínimo de 1 en día 14 dg, lo que también sería interesante de analizar, ya que podría estar ligado con el rol de RECK previo a la implantación.

Finalmente como proyecciones de estudio se propone aumentar el número de placentas provenientes a día 14 dg, de esta manera poder evaluar si estas diferencias encontradas en el periodo 12 dg se prolongan o son compensadas al comparar con las placentas $RECK^{+/+}$, ya que se ha descrito que embriones $RECK^{+/-}$ son viables y no presentan diferencias fenotípicas notorias al comparar con el control(61). Proponemos además utilizar un modelo murino con células trofoblásticas *knockout* para RECK, sin modificaciones en el embrión, a través de herramientas como recombinación Cre-Lox y de esta manera prolongar la placenta $RECK^{-/-}$ a periodos como 12 dg(74).

CONCLUSIONES

1. Animales *Reck*$^{+/-}$ presentan una invasión del trofoblasto en zonas más profundas del tejido materno en periodos tempranos de la gestación.

2. Animales *Reck*$^{+/-}$ presentan cambios morfológicos relacionados con la remodelación de las arterias uterinas espiraladas de zonas más profundas del tejido materno en periodos tempranos de la gestación.

3. RECK se encuentra ubicado en distintas estructuras del tejido materno y de células fetales que son parte de la placenta con una distribución diferencial según el periodo de gestación.

4. Estos resultados descriptivos aportan con nuevos antecedentes de Reck en el desarrollo de la placenta y su relación con la invasión y remodelación de las arterias uterinas espiraladas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albers RE, Waker CA, Keoni C, Kaufman MR, Bottomley MA, Min S, et al. Gestational Differences in Murine Placenta: Glycolytic Metabolism and Pregnancy Parameters. Theriogenology. 2018;107:115–26.
2. Simmons DG, Cross JC. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. Dev Biol. 2005;284(1):12–24.
3. Böing M, Brand-Saberi B, Napirei M. Murine transcription factor Math6 is a regulator of placenta development. Sci Rep. 2018;8(1):1–14.
4. Natale B v., Natale DRC. Placentation in the Mouse. Second edi. Vol. 2, Encyclopedia of Reproduction. Elsevier; 2017. 440–447 p.
5. Silva JF, Serakides R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. Cell Adh Migr. 2016;10(1–2):88–110.
6. Yoshida K, Jayyosi C, Lee N, Mahendroo M, Myers KM. Mechanics of cervical remodelling: Insights from rodent models of pregnancy. Interface Focus. 2019 Oct 6;9(5).
7. Croy A, Yamada A, DeMayo F, Adamson SL. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy. Amsterdan: Elsevier; 2014.
8. Avni R, Raz T, Biton IE, Kalchenko V, Garbow JR. Unique in utero identification of fetuses in multi-fetal mouse pregnancies by placental bi-directional arterial spin labeling (BD-ASL) MRI. Magn Reson Med. 2012;68(2):560–70.
9. Carretero A, Ruberte J, Navarro M. Female genital organs. In: Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging. 1st ed. Elsevier Ltd.; 2017. p. 227–51.
10. Caligioni C. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice Claudia. Curr Protoc Neurosci. 2010;(September):1–11.
11. Byers SL, Wiles M v., Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. PLoS One. 2012;7(4):2–6.
12. James B Finlay, Xueli Liu, Richard W Ermel, Trinka W Adamson. Maternal Weight Gain as a Predictor of Litter Size in Swiss Webster, C57BL/6J, and BALB/cJ mice.
13. Kong N, Xu X, Zhang Y, Wang Y, Hao X, Zhao Y, et al. Natriuretic peptide type C induces sperm attraction for fertilization in mouse. Sci Rep. 2017;7:1–12.
14. Yoshinaga K. A sequence of events in the uterus prior to implantation in the mouse. J Assist Reprod Genet. 2013;30:1017–22.
15. Kelleher AM, Milano-Foster J, Behura SK, Spencer TE. Uterine glands coordinate on-time embryo implantation and impact endometrial decidualization for pregnancy success. Nat Commun. 2018;9(1):1–12.
16. El-Hashasha AHK, Warburtona D, Kimberb SJ. Genes and signals regulating murine trophoblast cell development. Mech Dev. 2010;127(1–2):1–20.
17. Lim HJ, Wang H, Lim HJ, Wang H. Uterine disorders and pregnancy complications : insights from mouse models. J Clin Invest. 2010;120(4):1004–15.

18. Solberg H, Rinkenberger J, Danø K, Werb Z, Lund LR. A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. Development. 2003;130(18):4439–3350.
19. Elmore SA, Cochran RZ, Bolon B, Lubeck B, Mahler B, Sabio D, et al. Histology Atlas of the Developing Mouse Placenta. Toxicol Pathol. 2022 Jan 1;50(1):60–117.
20. Pringle KG, Roberts CT. New Light on Early Post-Implantation Pregnancy in the Mouse: Roles for Insulin-Like Growth Factor-II (IGF-II)? Placenta. 2007;28(4):286–97.
21. Jiang X, Wang Y, Xiao Z, Yan L, Guo S, Wang Y, et al. A differentiation roadmap of murine placentation at single-cell resolution. Cell Discov [Internet]. 2023 Mar 17;9(1):30. Available from: https://www.nature.com/articles/s41421-022-00513-z
22. Zhang J, Qiao Q, Xu H, Zhou R, Liu X. Human cell polyploidization: The good and the evil. Vol. 81, Seminars in Cancer Biology. Academic Press; 2022. p. 54–63.
23. Dupressoir A, Cile Vernochet C, Bawa O, Harper F, Rard Pierron G, Opolon P, et al. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene [Internet]. 2009. Available from: www.pnas.org/cgi/content/full/
24. Tunster SJ, Jensen AB, John RM. Imprinted genes in mouse placental development and the regulation of fetal energy stores. Reproduction. 2013;145(5):R117–37.
25. Woods L, Perez-Garcia V, Hemberger M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9(September):1–18.
26. Hasan MZ, Ikawati M, Tocharus J, Kawaichi M, Oka C. Abnormal development of placenta in HtrA1-deficient mice. Dev Biol. 2015;397(1):89–102.
27. Tunster SJ, Watson ED, Fowden AL, Burton GJ. Placental glycogen stores and fetal growth: insights from genetic mouse models. Reproduction. 2020;159:R213–35.
28. Chen J, Khalil R. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;148:87–165.
29. Majali-Martinez A, Hiden U, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Lang U, Desoye G, Dieber-Rotheneder M. Placental membrane-type metalloproteinases (MT-MMPs): Key players in pregnancy. Cell Adh Migr. 2016;10(1–2):136–46.
30. Tessier DR, Yockell-Lelièvre J, Gruslin A. Uterine Spiral Artery Remodeling: The Role of Uterine Natural Killer Cells and Extravillous Trophoblasts in Normal and High-Risk Human Pregnancies. American Journal of Reproductive Immunology. 2014;74(1):1–11.
31. Ashton S, Whitley G, Dash P, Wareing M, Crocker I, Baker P, et al. Uterine Spiral Artery Remodeling Involves Endothelial Apoptosis Induced by Extravillous Trophoblasts Through Fas/FasL Interactions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(1):102–8.
32. Sosa SEY, Flores-Pliego A, Espejel-Nuñez A, Medina-Bastidas D, Vadillo-Ortega F, Zaga-Clavellina V, et al. New insights into the role of matrix metalloproteinases in preeclampsia. Int J Mol Sci. 2017;18(7):1–10.

33. Chen J, Ren Z, Khalil R. Decreased Homodimerization and Increased TIMP-1 Complexation of Uteroplacental and Uterine Arterial Matrix Metalloproteinase-9 during Hypertension-in-Pregnancy. Biochem Pharmacol. 2017;15(138):81–95.
34. Kumar S, Gordon GH, Abbott DH, Mishra JS. Androgens in maternal vascular and placental function: implications for preeclampsia pathogenesis. Reproduction. 2018;156:155–67.
35. Watson ED, Cross JC. Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta. Physiology. 2005;20(3):180–93.
36. Rossant J, Cross JC. PLACENTAL DEVELOPMENT: LESSONS FROM MOUSE MUTANTS. Nat Rev Genet. 2001;2:538–48.
37. Burke SD, Barrette VF, Gravel J, Carter ALI, Hatta K, Zhang J, et al. Uterine NK Cells, Spiral Artery Modification and the Regulation of Blood Pressure During Mouse Pregnancy. American Journal of Reproductive Immunology. 2010;63(6):472–81.
38. Malassiné A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. Hum Reprod Update. 2003;9(6):531–9.
39. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, et al. Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. Dev Biol. 2002;250(2):358–73.
40. Kieckbusch J, Gaynor LM, Colucci F. Assessment of Maternal Vascular Remodeling During Pregnancy in the Mouse Uterus. Journal of Visualized Experiments. 2015;(106):1–7.
41. Ward JM, Elmore SA, Foley JF. Pathology methods for the evaluation of embryonic and perinatal developmental defects and lethality in genetically engineered mice. Vet Pathol. 2012;49(1):71–84.
42. Hu X, Li J, Zhang Q, Zheng L, Wang G, Zhang X, et al. Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Subunit p110δ Is Essential for Trophoblast Cell Differentiation and Placental Development in Mouse. Sci Rep. 2016;6(October 2015):1–12.
43. Faas MM, de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. Placenta. 2017;56:44–52.
44. Coronato S, Laguens G, di Girolamo V. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. Medicina (Argentina). 2012;72(6):495–502.
45. Gasperowicz M, Otto F. The Notch Signalling Pathway in the Development of the Mouse Placenta. Placenta. 2008;29(8):651–9.
46. Whitley GSJ, Cartwright JE. Cellular and Molecular Regulation of Spiral Artery Remodelling: Lessons from the Cardiovascular Field. Placenta. 2010;31(6):465–74.
47. Zhang J, Adams MA, Croy BA. Alterations in maternal and fetal heart functions accompany failed spiral arterial remodeling in pregnant mice. Am J Obstet Gynecol. 2011;205(5):485.e1-485.e16.
48. Robson A, Lash GE, Innes BA, Zhang JY, Robson SC, Bulmer JN. Uterine spiral artery muscle dedifferentiation. Human Reproduction. 2019 Aug 1;34(8):1428–38.

49. Ponnampalam A, Vincent Z, Mitchell M. Regulation of MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in human placenta. J Inflamm Res. 2015;8:193–200.
50. Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. Mol Cell Endocrinol. 2002;187(1–2):207–12.
51. Deng Q, Chen Y, Yin N, Shan N, Luo X, Tong C, et al. N-acetylglucosaminyltransferase v inhibits the invasion of trophoblast cells by attenuating MMP2/9 activity in early human pregnancy. Placenta. 2015 Nov 1;36(11):1291–9.
52. Li W, Mata KM, Mazzuca MQ, Khalil RA. Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy. Biochem Pharmacol. 2014 Jun 1;89(3):370–85.
53. Plaks V, Rinkenberger J, Dai J, Flannery M, Sund M, Kanasaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jul 2;110(27):11109–14.
54. Yu Y, Wang L, Liu T, Guan H. MicroRNA-204 suppresses trophoblast-like cell invasion by targeting matrix metalloproteinase-9. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jun 14;463(3):285–91.
55. Jing M, Chen X, Qiu H, He W, Zhou Y, Li D, et al. Insights into the immunomodulatory regulation of matrix metalloproteinase at the maternal-fetal interface during early pregnancy and pregnancy-related diseases. Vol. 13, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2023.
56. Lin C, He H, Cui N, Ren Z, Zhu M, Khalil RA. Decreased Uterine Vascularization and Uterine Arterial Expansive Remodeling with Reduced Matriz Metalloproteinase-2 and -9 in Hypertensive Pregnancy. 2020.
57. Miki T, Takegami Y, Okawa K, Muraguchi T, Noda M, Takahashi C. The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. Journal of Biological Chemistry. 2007;282(16):12341–52.
58. Noda M, Takahashi C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. Vol. 98, Cancer Science. 2007. p. 1659–65.
59. Alexius-Lindgren M, Andersson E, Lindstedt I, Engström W. The RECK gene and biological malignancy-its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases. Anticancer Res. 2014;34(8):3867–74.
60. Levin G, Coelho TM, Nóbrega NG, Trombetta-lima M, Sogayar MC, Claudia A, et al. Spatio-temporal expression profile of matrix metalloproteinase (Mmp) modulators Reck and Sparc during the rat ovarian dynamics. Reproductive Biology and Endocrinology. 2018;1(116):1–11.
61. Chandana EP, Maeda Y, Ueda A, Kiyonari H, Oshima N, Yamamoto M, et al. Involvement of the Reck tumor suppressor protein in maternal and embryonic vascular remodeling in mice. BMC Dev Biol. 2010;10(84).

62. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. Cell. 2001;107(6):789–800.
63. Baker A, Edwards D, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci. 2002;115:3719–27.
64. Hong KJ, Wu DC, Cheng KH, Chen LT, Hung WC. RECK Inhibits Stemness Gene Expression and Tumorigenicity of Gastric Cancer Cells by Suppressing ADAM-Mediated Notch1 Activation. J Cell Physiol. 2013;229(2):191–201.
65. Welm B, Mott J, Werb Z. Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. Current Biology. 2002;12(6):R209--11.
66. Park S, Lee C, Sabharwal P, Zhang M, Freel Meyers CL, Sockanathan S. GDE2 promotes neurogenesis by glycosylphosphatidylinositol-anchor cleavage of RECK. Science (1979). 2013 Jan 18;339(6117):324–8.
67. Nakamura M, Li Y, Choi BR, Matas-Rico E, Troncoso J, Takahashi C, et al. GDE2-RECK controls ADAM10 α-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein. Sci Transl Med. 2021 Mar 17;13(585).
68. Echizenya M, Kondo S, Takahashi R, Oh J, Kawashima S, Kitayama H, et al. The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors. Oncogene. 2005;24(38):5850–7.
69. Gutiérrez J, Aedo A, Mora J, Maldonado J, Salsoso R, Toledo F, et al. Preeclampsia associates with RECK-dependent decrease in human trophoblasts migration and invasion. Placenta. 2017;59:19–29.
70. Aguilera N, Salas-Pérez F, Ortíz M, Álvarez D, Echiburú B, Maliqueo M. Rodent models in placental research. Implications for fetal origins of adult disease. Anim Reprod. 2022;19(1).
71. Perez-Garcia V, Fineberg E, Wilson R, Murray A, Mazzeo CI, Tudor C, et al. Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants. Nature. 2018;555(7697):463–8.
72. Fernández P. Determination of the sample size. Cad Aten Primaria. 1996;3:138–14.
73. Hu D, Cross JC. Ablation of Tpbpa-positive trophoblast precursors leads to defects in maternal spiral artery remodeling in the mouse placenta. Dev Biol. 2011;358(1):231–9.
74. De Almeida GM, Yamamoto M, Morioka Y, Ogawa S, Matsuzaki T, Noda M. Critical roles for murine Reck in the regulation of vascular patterning and stabilization. Sci Rep. 2015 Dec 11;5.
75. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. Proteomics. 2010;10(9):1886–90.
76. O'Connor BB, Pope BD, Peters MM, Ris-Stalpers C, Parker KK. The role of extracellular matrix in normal and pathological pregnancy: Future applications of microphysiological systems in reproductive medicine. Vol. 245, Experimental Biology and Medicine. SAGE Publications Inc.; 2020. p. 1163–74.

77. Panja S, Paria BC. Development of the Mouse Placenta. In: Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 205–21.
78. Rätsep MT, Felker AM, Kay VR, Tolusso L, Hofmann AP, Croy BA. Uterine natural killer cells: Supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. Reproduction. 2015 Feb 1;149(2):R91–102.
79. Hatta K, van den Heuvel MJ, Croy BA. NK Cells Detect Changes in Adaptive Immunity within Mouse Decidua from Gestation Day Eight. Placenta. 2009 Jun;30(6):501–6.
80. Yamaleyeva LM, Pulgar VM, Lindsey SH, Yamane L, Varagic J, Mcgee C, et al. Uterine artery dysfunction in pregnant ACE2 knockout mice is associated with placental hypoxia and reduced umbilical blood flow velocity. Am J Physiol Endocrinol Metab [Internet]. 2015;309:84–94. Available from: http://www.ajpendo.org
81. Otun HA, Lash GE, Schiessl B, Ball E, Searle RF, Robson SC, et al. Quantification of spiral artery remodelling using an Adobe Photoshop-based technique. 2019;
82. Charalambous F, Elia A, Georgiades P. Decidual spiral artery remodeling during early post-implantation period in mice: Investigation of associations with decidual uNK cells and invasive trophoblast. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 13;417(2):847–52.
83. Rennie MY, Whiteley KJ, Adamson SL, Sled JG. Quantification of gestational changes in the uteroplacental vascular tree reveals vessel specific hemodynamic roles during pregnancy in mice. Biol Reprod. 2016 Aug 1;95(2).
84. Furuya M, Ishida J, Aoki I, Fukamizu A. Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension. Vasc Health Risk Manag. 2008;4(6):1301–13.
85. Meyer N, Woidacki K, Knöfler M, Meinhardt G, Nowak D, Velicky P, et al. Chymase-producing cells of the innate immune system are required for decidual vascular remodeling and fetal growth. Sci Rep. 2017 Mar 22;7.
86. Osol G, Mandala M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. Vol. 24, Physiology. 2009. p. 58–71.
87. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, et al. Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. Dev Biol. 2002 Oct;250(2):358–73.
88. Kaufmann P, Huppertz B, Frank HG. The fibrinoids of the human placenta: Origin, composition and functional relevance. Vol. 178, Annals of Anatomy. Elsevier GmbH; 1996. p. 485–501.
89. Frank HG, Kertschanska " S, Crescimanno C, Castellucci " M, Langh I, Desoyeh G, et al. Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. Acta Anat. 1994;150:55–68.
90. Sato Y. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling. Vol. 503, Molecular and Cellular Endocrinology. Elsevier Ireland Ltd; 2020.

91. Salomon C, Sarah Y, Scholz-Romero K, Kobayashi M, Vaswani K, Kvaskoff D, et al. Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. Front Pharmacol. 2014;5 JUL.
92. Zhang S, Mesalam A, Joo MD, Lee KL, Hwang JY, Xu L, et al. Matrix metalloproteinases improves trophoblast invasion and pregnancy potential in mice. Theriogenology. 2020 Jul 15;151:144–50.
93. Vancheri C, Morini E, Prandi FR, Alkhoury E, Celotto R, Romeo F, et al. Two reck splice variants (Long and short) are differentially expressed in patients with stable and unstable coronary artery disease: A pilot study. Genes (Basel). 2021 Jun 1;12(6).
94. Oh J, Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM, et al. Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 2 Inhibits Endothelial Cell Migration through Increased Expression of RECK. Vol. 64, CANCER RESEARCH. 2004.
95. Russell JJ, Grisanti LA, Brown SM, Bailey CA, Bender SB, Chandrasekar B. Reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs and cardiovascular diseases: The RECKlessness of adverse remodeling. Vol. 83, Cellular Signalling. Elsevier Inc.; 2021.
96. Mummidi S, Das NA, Carpenter AJ, Yoshida T, Yariswamy M, Mostany R, et al. RECK suppresses interleukin-17/TRAF3IP2-mediated MMP-13 activation and human aortic smooth muscle cell migration and proliferation. J Cell Physiol. 2019 Dec 1;234(12):22242–59.
97. Muraguchi T, Takegami Y, Ohtsuka T, Kitajima S, Chandana EPS, Omura A, et al. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. Nat Neurosci. 2007 Jul 8;10(7):838–45.
98. Toonen JA, Ronchetti A, Sidjanin DJ. A disintegrin and metalloproteinase10 (ADAM10) regulates notch signaling during early retinal development. PLoS One. 2016 May 1;11(5).
99. Dietrich B, Haider S, Meinhardt G, Pollheimer J, Knöfler M. WNT and NOTCH signaling in human trophoblast development and differentiation. Vol. 79, Cellular and Molecular Life Sciences. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022.
100. Haider S, Meinhardt G, Saleh L, Fiala C, Pollheimer J, Knöfler M. Notch1 controls development of the extravillous trophoblast lineage in the human placenta. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Nov 29;113(48):E7710–9.
101. Hunkapiller NM, Gasperowicz M, Kapidzic M, Plaks V, Maltepe E, Kitajewski J, et al. A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia. Development. 2011 Jul 15;138(14):2987–98.
102. Knöfler M, Pollheimer J. Human placental trophoblast invasion and differentiation: A particular focus on Wnt signaling. Vol. 4, Frontiers in Genetics. 2013.
103. Akram KM, Kulkarni NS, Brook A, Wyles MD, Anumba DOC. Transcriptomic analysis of the human placenta reveals trophoblast dysfunction and augmented Wnt signalling associated with spontaneous preterm birth. Front Cell Dev Biol. 2022 Oct 24;10.

104. Zhang Z, Wang X, Zhang L, Shi Y, Wang J, Yan H. Wnt/β-catenin signaling pathway in trophoblasts and abnormal activation in preeclampsia (Review). Vol. 16, Molecular Medicine Reports. Spandidos Publications; 2017. p. 1007–13.
105. Xu B, Chen X, Ding Y, Chen C, Liu T, Zhang H. Abnormal angiogenesis of placenta in progranulin-deficient mice. Mol Med Rep. 2020 Oct 1;22(4):3482–92.
106. Qu H, Khalil RA. Vascular Mechanisms and Molecular Targets in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2020;

ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE COLA DE RATÓN.

Preparación de reactivos:

Buffer de lisis	250ml
100 mM Tris-HCl pH 8	12.5 ml Tris-HCl 2 M pH 8
5 mM EDTA pH 8	2,5 ml EDTA 0,5 M pH 8
0.2 % SDS	5.0 ml SDS 10 %
200 mM NaCl	50.0 ml NaCl 1M
100 µg/ml Proteinasa K	1250 µl Proteinasa K 20mg/ml

1. Se prepara un stock con el Tris, EDTA, SDS y NaCl y se guarda a T° ambiente.
2. Al momento de lisar las colas se agrega la proteinasa K (5 µl del stock de 20mg/ml para 1 ml de buffer de lisis). También se puede guardar tubos alicuotados de buffer de lisis con Proteinasa K almacenados a –20°C.
3. Realizar corte de cola de ratón de 1mm aproximadamente de largo.
4. En caso de no ser procesadas el mismo día se deben guardar a -20ºC en tubos eppendorf de 1,5ml.

   En caso de ser procesadas el mismo día se les debe agregar 500ul de buffer de lisis a cada una.
5. Las colas con el buffer de lisis se incuban a 55°C por al menos 3 horas en el hibridador o toda la noche.
6. Una vez finalizada la incubación centrigufar los tubos a 13000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.
7. Rescata el sobrenadante y agregar un volumen de isopropanol, agitar suavemente por inversión hasta la formación del precipitado.
8. Centrifugar por 5 min a 13000 rpm a RT.
9. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 700 ul de isopropanol 70%. Centrifugar por 5 min a 13000 rpm a RT.
10. Secar el pellet y resuspender en 100 ul de H2O, calentar por 30 min a 50°C.

ANEXO 2. PROTOCOLO DE PCR.

PREPARACIÓN DE MIX DE PCR:

REACTIVOS	CANTIDAD POR 1 REACCIÓN
BUFFER 5X	5 ul
dNTP 10nM	0,5 ul
Primer Forward 10nM	1 ul
Primer Reverse 10nM	1ul
MgCl	1,5 ul
Taq Polimerasa	0,2 ul
H2O mQ	14,9 ul
ADN [10ug]	1ul

PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL:

STEP	TEMPERATURA	TIEMPO
1	95ºC	3min
2	95ºC	30 segundos
3	PRIMER WT: 61ºC PRIMER KO: 62ºC	1 min
4	72ºC	1 min
Nº DE CICLOS		38X
6	72ºC	7min
7	4ºC	∞

ANEXO 3. PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DE PLACENTAS

1. FIJACIÓN:

- Paraformaldehído 4% en buffer fosfato salino: por 48 hrs a 4ºC.

2. DESHIDRATACIÓN EN ALOHOLES ASCENDENTES:

- Sumergir los tejidos en las siguientes soluciones en recipiente sellado y en agitación a temperatura ambiente.
- Alcohol 70º por 30 min.
- Alcohol 95º (I) por 30 min.
- Alcohol 95º (II) por 30 min.
- Alcohol 100º (I) por 30 min.
- Alcohol 100º (II) por 30 min.
- Alcohol 100º (III) por 30 min.

3. ACLARAR:

- Xilol (I) por 30 min.
- Xilol (II) por 30 min.
- Xilol (III) por 30 min.

4. IMPREGNACIÓN EN PARAFINA A 64ºC:

- Parafina (I) por 30 min.
- Parafina (II) por 30 min.
- Parafina (II) por 30 min.

5. INCLUSIÓN DEL MOLDE DE PARAFINA.

ANEXO 4. TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA

1. Desparafinación:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

2. Rehidratación:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol 95% (5 min)
- Alcohol 70% (5 min)
- Agua destilada (5min)

3. Coloración Hematoxilina de Harris (30 segundos)

- Viraje en agua corriente (10min)

4. Alcohol de 95º (5min)

5. Eosina alcohólica (4 segundos)

6. Deshidratación:

- Alcohol 100% I (5min)
- Alcohol 100% II (5min)
- Alcohol/Xilol (5min)

7. Aclaramiento:

Xilol I (5 min)
Xilol II (5 min)

8. Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 5. TÉCNICA DE PAS

1. Desparafinación:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

2. Rehidratación:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol 95% (5 min)
- Alcohol 70% (5 min)
- Agua destilada (5min)

3. Sumergir los cortes en ácido peryódico 0,5% por 10 minutos a temperatura ambiente.

4. 3 lavados en agua destilada, 5 minutos cada uno.

5. Sumergir los cortes en reactivo de Schiff por 30 minutos a temperatura ambiente.

6. Lavar en agua corriente por 5 minutos.

7. 3 lavados en agua destilada, 5 minutos cada uno.

8. Coloración Hematoxilina de Harris (30 segundos)

- Viraje en agua corriente (10min)

10. Deshidratación:

- Alcohol 100% I (5min)
- Alcohol 100% II (5min)
- Alcohol/Xilol (5min)

11. Aclaramiento:

Xilol I (5 min)

Xilol II (5 min)

12. Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 6: PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-ALPHA SMA.

1. Desparafinación:
- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

2. Rehidratación:
- Alcohol 100% I (10 min)
- Alcohol 100% II (10 min)
- Alcohol 95% (10 min)
- Alcohol 70% (10 min)

3. Lavado en agua destilada durante 10 min.

4. Recuperación antigénica en buffer citrato a 95º C durante 20 min. (dejar calentando el buffer previamente por 25 minutos).
   Dejar enfriar manteniendo las placas en el buffer, durante 15 min.
   Lavado en agua destilada, 10 min.

5. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

6. Bloqueo de peroxidasa endógena con H2O2 (30%) al 3% en PBS. Utilizar agitador orbital a temperatura ambiente, durante 30 min.

7. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

8. Bloqueo de sitios inespecíficos:
- Aplicar Cas – block durante 30 min a temperatura ambiente.
- Incubación con suero normal (cabra) durante 30 min a temperatura ambiente.

9. Incubación del anticuerpo primario:

Anti –alpha SMA diluido en 1:500 en PBS/Tween20 durante la noche a 4º C.

10. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

11. Incubación del anticuerpo secundario:

    Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, diluido 1:500 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.

12. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

13. Revelado cromogénico con NovaRed – Kit, durante 1min, de acuerdo a la siguiente proporción de sus componentes:

Agua destilada	1	2	3	H_2O_2
2,5 mL	75 µL	50 µL	50 µL	50 µL
1,25 mL	38 µL	25 µL	25 µL	25 µL
625 µL	19 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
313 µL	9,5 µL	6,25 µL	6,25 µL	6,25 µL

14. Lavar en agua destilada durante 5 min.

15. Contraste nuclear:
16. Teñir brevemente con hematoxilina.
17. Virar hematoxilina en agua corriente durante 8 min.

18. Deshidratación:

    Alcohol 95% (dipping)

    Alcohol 100% I (dipping)

    Alcohol 100% II (dipping)

    Alcohol/Xilol (dipping)

19. Aclaramiento:
    Xilol I (5 min)
    Xilol II (5 min)

20. Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 7. PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-RECK

1. Desparafinación:
   Xilol I (10 min)
   Xilol II (10 min)
   Xilol III (10 min)

2. Rehidratación:
   Alcohol 100% I (10 min)
   Alcohol 100% II (10 min)
   Alcohol 95% (10 min)
   Alcohol 70% (10 min)

3. Lavado en agua destilada durante 10 min.

4. Recuperación antigénica en buffer citrato a 95º C durante 20 min. (dejar calentando el buffer previamente por 25 minutos).
   Dejar enfriar manteniendo las placas en el buffer, durante 15 min.
   Lavado en agua destilada, 10 min.

5. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

6. Bloqueo de peroxidasa endógena con H2O2 (30%) al 3% en PBS. Utilizar agitador orbital a temperatura ambiente, durante 30 min.

7. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

8. Bloqueo de sitios inespecíficos:
   Aplicar Cas – block durante 30 min a temperatura ambiente.
   Incubación con suero normal (cabra) durante 30 min a temperatura ambiente.

9. Incubación del anticuerpo primario:
   Anti –RECK diluido en 1:600 en PBS/Tween20 durante la noche a 4º C.

10. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

11. Incubación del anticuerpo secundario:
    Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, diluido 1:500 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.

12. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

13. Revelado cromogénico con NovaRed – Kit, durante 2min 30 segundos, de acuerdo a la siguiente proporción de sus componentes:

Agua destilada	1	2	3	H_2O_2
2,5 mL	75 µL	50 µL	50 µL	50 µL
1,25 mL	38 µL	25 µL	25 µL	25 µL
625 µL	19 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
313 µL	9,5 µL	6,25 µL	6,25 µL	6,25 µL

14. Lavar en agua destilada durante 5 min.

15. Contraste nuclear:
16. Teñir brevemente con hematoxilina.
17. Virar hematoxilina en agua corriente durante 8 min.

18. Deshidratación:
    Alcohol 95% (dipping)
    Alcohol 100% I (dipping)
    Alcohol 100% II (dipping)
    Alcohol/Xilol (dipping)

19. Aclaramiento:
    Xilol I (5 min)
    Xilol II (5 min)
20. Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 8. PROTOCOLO BLOTTO INMUNO 10X

- Tris: 0,61g
- NaCl: 0,59 g
- CaCl2: 0,5 mM
- MgCL2(6XH2O): 50 mM

Mezclar los reactivos y disolver en 80ml de PBS 1X.
Ajustar pH a 7,7.
Aforar a 100ml

Para utilizar Blotto inmuno 1X:

A 900 ml de agua destilada, agregar 100 ml de blotto inmuno 10X.

ANEXO 9. PROTOCOLO INMUNOFLUORESCENCIA PAN-CKS

1. Desparafinación:
   Xilol I (10 min)
   Xilol II (10 min)
   Xilol III (10 min)

2. Rehidratación:
   Alcohol 100% I (10 min)
   Alcohol 100% II (10 min)
   Alcohol 95% (10 min)
   Alcohol 70% (10 min)

3. Lavado en agua destilada durante 10 min.

4. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

5. Recuperación antigénica en buffer citrato a 95º C durante 20 min. (dejar calentando el buffer previamente por 25 minutos).
   Dejar enfriar manteniendo las placas en el buffer, durante 15 min.
   Lavado en agua destilada, 10 min.

6. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

7. Bloqueo de sitios inespecíficos:
   BSA 5% en blotto inmuno durante 30 minutos a temperatura ambiente
   Incubación con suero normal (cabra) durante 30 min a temperatura ambiente.

8. Aplicación de M.O.M en concentración 1:50 en blotto inmuno durante toda la noche a 4ºC.

9. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

10. Incubación del anticuerpo primario:
Anti –Pan-Cks RTU durante la noche a 4º C.

11. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

12. Incubación del anticuerpo secundario:
Anti-IgG de ratón, hecho en cabra, conjugado con Alexa FLuorTM 488, diluido 1:500 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.

13. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

14. Aplicación de Sudán Black por 1 minuto.

15. Lavado en agua destilada por 10 minutos.

16. Montaje con medio hidrofílico Fluoromount con Dapi.

ANEXO 10. PROTOCOLO INMUNOFLUORESCENCIA VWf

1. Desparafinación:
   Xilol I (10 min)
   Xilol II (10 min)
   Xilol III (10 min)

2. Rehidratación:
   Alcohol 100% I (10 min)
   Alcohol 100% II (10 min)
   Alcohol 95% (10 min)
   Alcohol 70% (10 min)

3. Lavado en agua destilada durante 10 min.

4. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

5. Recuperación antigénica en buffer citrato a 95º C durante 20 min. (dejar calentando el buffer previamente por 25 minutos).
   Dejar enfriar manteniendo las placas en el buffer, durante 15 min.
   Lavado en agua destilada, 10 min.

6. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

7. Bloqueo de sitios inespecíficos:
   BSA 5% en blotto inmuno durante 30 minutos a temperatura ambiente
   Incubación con suero normal (cabra) durante 30 min a temperatura ambiente.

8. Incubación del anticuerpo primario:
   Anti –VWf 1:250 durante la noche a 4º C.

9. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

10. Incubación del anticuerpo secundario:
Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con Alexa FLuorTM 568, diluido 1:500 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.

11. 3 cambios en PBS, 5 min cada uno

12. Aplicación de Sudán Black por 1 minuto.

13. Lavado en agua destilada por 10 minutos.

14. Montaje con medio hidrofílico Fluoromount con Dapi.

ANEXO 11. ACTA DE APROBACIÓN BIOÉTICO.

Universidad de Valparaíso
CHILE
Vicerrectoría de Investigación e Innovación.

CIBICA
Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA
BEA121-18

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 28 de Junio de 2018, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto BEA121-18 titulado "ROLE OF RECK IN PREECLAMPSIA DEVELOPMENT: AS A KEY REGULATOR OF CYTOTROPHOBLAST INVASIVENESS AND SPIRAL ARTERIES REMODELING", del investigador responsable Jaime Gutierrez Perez.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN".

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN" y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo experimental.

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

Pablo Muñoz Carvajal
Presidente
Comité Institucional de Bioética para Investigación la Investigación con Animales de Experimentación (CIBICA)

Valparaíso 29 de Junio de 2018

ANEXO 12. ACTA DE SEGUIMIENTO BIOÉTICO.

Universidad de Valparaíso
CHILE
División Académica
Dirección de Investigación

CICUAL-UV
Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso

ACTA DE SEGUIMIENTO BIOÉTICO
BEA121-2018

I. El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL-UV), en su sesión del 20 de enero de 2022, declara haber realizado el seguimiento del proyecto titulado "Role of reck in preeclampsia development: as a key regulator of cytotrophoblast invasiveness and spiral arteries remodeling" del investigador responsable en la Universidad de Valparaíso, Dr. Sebastián San Martín .

II. Durante el seguimiento, el CICUAL-UV revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN", así como los siguientes antecedentes basados en la PAUTA DE SEGUIMIENTO ÉTICO PARA ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:

- Identificación de personal responsable de los procedimientos experimentales.
- Presencia y uso de elementos de protección personal para manipulación de animales.
- Constatación del número de animales utilizados versus los planificados, a través de un libro de registro destinado para éste uso.
- Aplicación de técnicas de refinamiento descritos por el investigador responsable.
- Comprobación de la ausencia de animales de experimentación en los laboratorios por tiempos mayores al procedimiento específico.

III. De acuerdo a lo anterior, el Comité corroboró el cumplimiento de lo descrito en la Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN", así como los antecedentes evaluados durante la visita en terreno con los profesionales responsables del proyecto.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el cumplimiento de los protocolos y procedimientos bioéticos que fueron aprobados por el Comité de Bioética respectivo.

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
COMITE INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

Edda Meléndez Pinto
Presidenta CICUAL-UV

ANEXO 13. CONTROL NEGATIVO DE INMUNOHISTOQUÍMICA ANTICUERPO SECUNDARIO IGG DE CABRA ANTI-CONEJO CONJUGADO CON HRP.

A continuación se presenta control negativo de inmunohistoquímica para los anticuerpos donde se utilizó el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo conjugado con HRP (1:500) y contraste nuclear. Para estos casos se reemplazó el anticuerpo primario por PBS. No se observó marca en el tejido. (Ver Fig. 41).

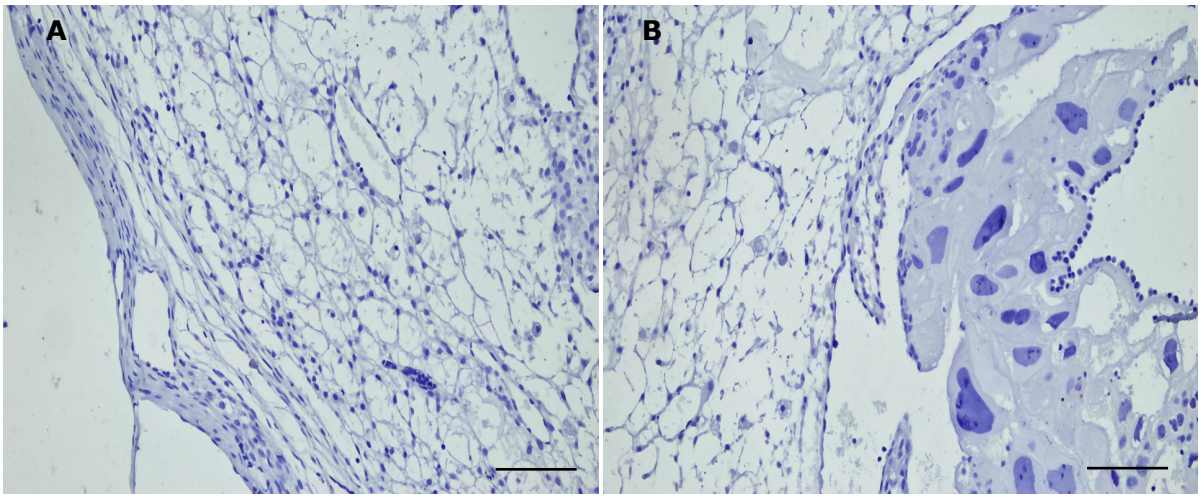


Figura 41. Control negativo en placenta de día 14 dg. A: zona de miometrio y triángulo mesometrial. B: zona decidua y células gigantes. Barra escala: 50um

ANEXO 14. CONTROL NEGATIVO DE INMUNOFLUORESCENCIA ANTICUERPO SECUNDARIO IGG DE CABRA ANTI-CONEJO CONJUGADO ALEXA FLUOR™ 568 E IGG DE CABRA ANTI-MOUSE CONJUGADO ALEXA FLUOR™ 488 .

A continuación se presenta control negativo de inmunofluorescencia para los anticuerpos donde se utilizó el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor^{tm} 568 (1:500) y anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor^{tm} 488 (1:500). Para estos casos se reemplazó el anticuerpo primario por PBS. Se realizó contraste nuclear con Dapi. No se observó marca en el tejido, exceptuando la autofluorescencia de glóbulos rojos. (Ver Fig. 42).

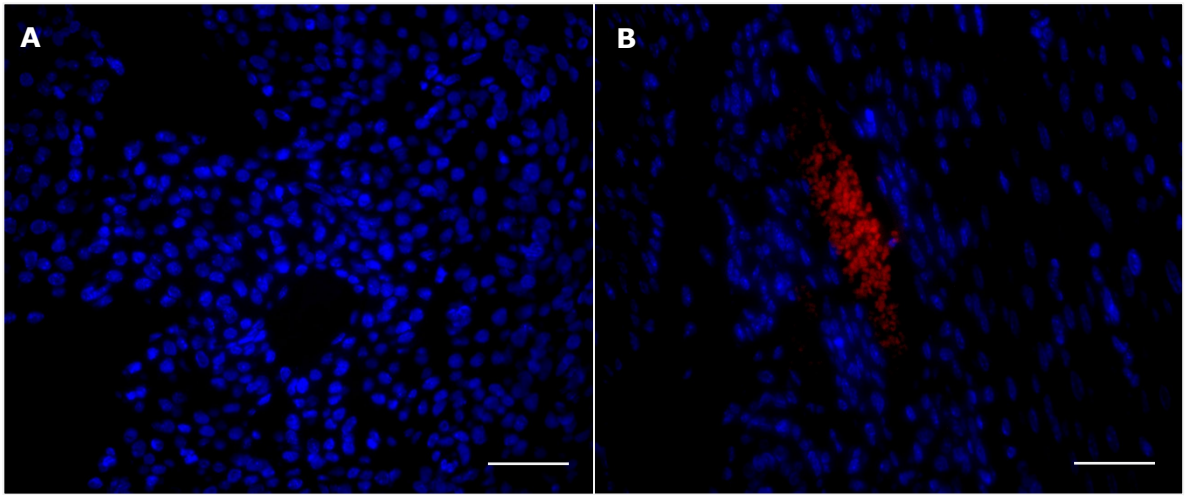


Figura 42. Control negativo en placenta de día 14 dg. A: control para anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor^{tm} 488 (1:500) fluorescencia verde. B: control para anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor^{tm} 568 (1:500) fluorescencia roja. Barra escala: 50um