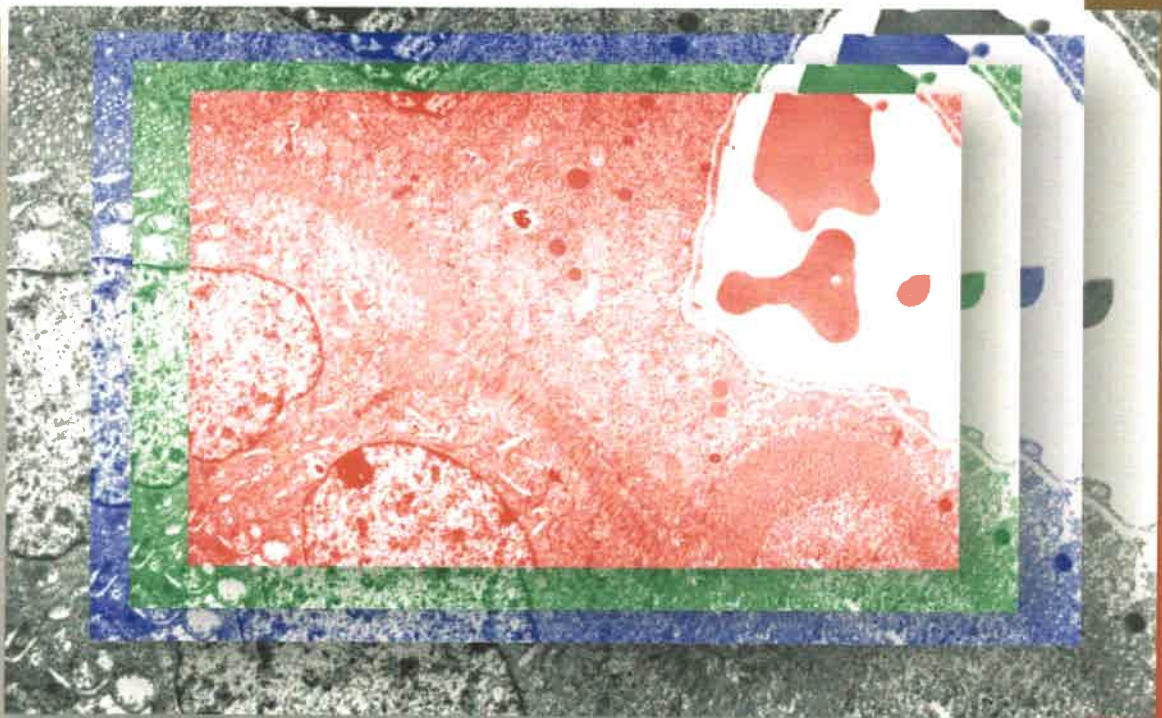




# ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y DE RESIDUOS GLICOSILADOS EN LA PLACENTA PORCINA



Microbióloga Daniela Zubeldia



Crear... Crear... Crecer  
Universidad Nacional de Río Cuarto

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Área de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, y se presenta como requerimiento para optar al grado de Magíster en Anatomía y Fisiología Veterinaria, Junio de 2007

**TESIS Maestría en Anatomía y Fisiología Veterinaria**

**“ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y DE RESIDUOS GLICOSILADOS EN LA PLACENTA PORCINA”**

**Tesista: Microbióloga Daniela Zubeldia**

**Director: Dra. Mirta Adriana Koncurat**

**Jurado:**

  
**Dr. Dante Paz**

  
**Dr. Claudio Barbeito**

  
**Dr. Javier Aguilar**

65384

MFN:
Clasif:
F.469

## **Agradecimientos**

*A la Universidad Nacional de Río Cuarto y en particular a la Facultad de Agronomía y Veterinaria por haberme brindado la posibilidad de realizar el presente estudio.*

*A los miembros del Jurado, Dr. Dante Paz, Dr. Claudio Barbeito y Dr. Javier Aguilar por sus valiosas contribuciones en la elaboración final de esta tesis.*

*A Cecilia Merkis y Andrea Cristofolini, mis compañeras del Área de Microscopía Electrónica por haberme acompañado en esta instancia.*

*A Bibiana Hechem y Nelcy Schleef Matus por su colaboración en la realización de los cortes histológicos.*

*A Rolando Quinteros por su colaboración en el análisis estadístico de datos.*

*A Mario Lazarte por su colaboración en la edición y compaginación de esta tesis.*

*En especial a Mirta Koncurat, la Directora de este trabajo de Tesis por su incondicional apoyo y estar siempre al lado mío.*

**Trabajo final de Posgrado:** Maestría en Anatomía y Fisiología Veterinaria

**Palabras Claves:** Porcinos, Reproducción, Placenta, Ultraestructura, Glicoconjugados

**Autor:** Zubeldia Daniela [dzubeldia@ayv.unrc.edu.ar](mailto:dzubeldia@ayv.unrc.edu.ar) Te: 0358 □ 4676165

**Director:** Koncurat Mirta Adriana

**Lugar de Trabajo:** Área de Microscopía Electrónica. Dpto. Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Beneficiarios:** El trabajo de tesis aporta elementos en el campo de la reproducción porcina por lo que se verán beneficiados los productores porcinos.

## RESUMEN

El cerdo es una especie política cuya carne es la principal fuente de proteínas de origen animal y en los últimos 30 años su ingesta ha crecido en una proporción de 1,9% por año. La industria del cerdo es confrontada por sustanciales pérdidas dadas por la mortalidad embrionaria temprana sin causa específica y que ocurren antes del día 30 de gestación. La placenta es un órgano transitorio que se organiza en la gestación y es el mediador nutricional, endocrino e inmunológico entre el feto y la madre, en cerdos se caracteriza por ser difusa, plegada, adecidua, no invasiva y epiteliocorial. La hipótesis del presente trabajo es que durante la gestación porcina se produce en la interfase feto-materna cambios en la ultraestructura celular y en la expresión de los glicoconjugados que intervienen en la interacción materno-fetal y determinan una gestación exitosa. El objetivo fue investigar el desarrollo de la placenta porcina en diferentes estadios gestacionales a través de la evaluación de cambios estructurales y ultraestructurales y realizar la determinación de los residuos glicosilados que se encuentran en dichos tejidos placentarios.

Se utilizaron cerdas mestizas, provenientes de criaderos y frigoríficos de la zona de Río Cuarto (33° 08' 23" S 64° 20' 44" O). Se procesaron 4 úteros vacíos y 25 tractos de diferentes períodos gestacionales. Los cuernos uterinos se abrieron en forma longitudinal y se recogieron muestras del tejido mesometrial y placentario fetal para procesamiento de microscopía óptica y electrónica. Se recogieron los embriones/fetos y se los midió, pesó y sexó. Se determinó la edad gestacional placentaria y se agrupó a los tractos muestreados en  $\pm 35$  (n = 6), 55 (n = 7), 70 (n = 4), 90 (n = 3) y 114 días de preñez (n = 5). Se analizó la relación entre las variables longitud y peso en función del tiempo de gestación, encontrándose que la variable longitud tiene comportamiento lineal y la variable peso comportamiento potencial a partir de los 55 días de gestación, ambas en función el tiempo gestacional. Por microscopía óptica y con tinción de PAS se observó una banda de marcación PAS positiva en la membrana basal del epitelio placentario materno, la cual podría representar una barrera molecular continua de separación del epitelio placentario materno del resto del tejido uterino. En el estudio de residuos glicosilados por lectinohistoquímica se observó que los glicoconjugados presentan patrones en los diferentes tejidos que constituyen la placenta porcina y que, por ser cerdas mestizas, dichos patrones son diferentes a los hallados en razas puras. En los epitelios trofoblástico y uterino, la expresión de los residuos alfa-D-man y alfa-D-gluc no terminales serían importantes en los procesos iniciales de interdigitación placentaria, mientras que el resto de los residuos evaluados cumplirían funciones en los procesos de interacción placentaria en los estadios en los que se produce un aumento significativo del área superficial de contacto entre ambos epitelios. Por microscopía electrónica se observó que la ultraestructura de las células placentarias en los períodos gestacionales estudiados se relaciona con los cambios fisiológicos que ocurren durante la gestación porcina. Además, en este trabajo se documenta un capilar fetal que se encuentra a una distancia de  $\pm 0,6 \mu\text{m}$  de la interfase feto materna y que esa distancia física se encuentra mejorada fisiológicamente por la presencia de un complejo de unión entre células trofoblásticas que la delimitan.

**Trabajo final de Posgrado:** Maestría en Anatomía y Fisiología Veterinaria.

**Key words:** Pig, Reproduction, Placenta, Ultrastructure, Glycoconjugates

**Autor:** Zubeldia Daniela. [dzubeldia@ayv.unrc.edu.ar](mailto:dzubeldia@ayv.unrc.edu.ar) Te: 0358 □ 4676165

**Director:** Koncurat Mirta Adriana

**Lugar de Trabajo:** Area de Microscopía Electrónica. Dpto. Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Beneficiarios:** El trabajo de tesis aporta elementos en el campo de la reproducción porcina por lo que se verán beneficiados los productores porcinos.

#### **ABSTRACT**

Pig is a species whose meat is the main source of animal protein and in the last 30 years its ingestion has grown in a proportion of 1.9% per year. The pig industry is confronted by substantial losses given by early embryonic mortality without specific causes that happens before day 30 of gestation. Sows have a diffuse, folded, non-invasive, adecidua and epitheliochorial placenta. This organ is organized in gestation and is the nutritional, endocrine and immunological mediator between the foetus and the mother. The hypothesis of the present work was that during pig gestation changes take place in the cellular ultrastructure of foetus-maternal interface and in the expression of the glycoconjugates, determining a successful gestation. The objective was to investigate the development of the pig placenta in different gestational periods through the evaluation of structural and ultrastructural changes and to make the determination of the glycosilated residues that are in these placental tissues. For this work animals from the area of Río Cuarto (33° 08' 23'' S 64° 20' 44'' O) were used. Placentas (n=25) were studied in different gestational periods by light and transmission electron microscopy. Placental gestational age was determined and the placentas were grouped in: ± 35 (n = 6), 55 (n = 7), 70 (n = 4), 90 (n = 3) and 114 days of pregnancy (n = 5). The relation between the length and weight variables was analysed based on the time of gestation, being that the length variable has linear results and the weight variable has a potential behaviour from day 55 of gestation, both in relation to gestational time. A band of positive PAS in the basal membrane of the epithelium the maternal placenta was observed by optical microscopy and PAS. This could represent a continuous molecular barrier of separation of epithelial maternal placenta from the rest of the uterine tissue. Glycosilated residues were detected by lectin histochemistry. It was observed that the glycoconjugates present patterns in the different placental tissues. These patterns are different from the ones found in pig pure breeds. In the trophoblastic and uterine epithelium, the expression of non-terminal  $\alpha$ -D-man and  $\alpha$ -D-gluc residues would be important in the initial processes of placentation, whereas the rest of the evaluated residues would act as in the stages in which a significant increase of the superficial area of contact between both epitheliums takes place. By electronic microscopy it was observed that the ultrastructure of the placenta cells in the gestational periods under study is related to the physiological changes that happen during pig gestation. In addition, a foetal capillary at a distance of  $\pm 0.6 \mu\text{m}$  of the maternal-foetal interface was found. The physical distance is improved physiologically by the presence of a complex union between trophoblastic cells that delimit it.

## INDICE GENERAL

SECCIÓN	PAGINA
<b>Índice de tablas</b>	<b>XII</b>
<b>Índice de gráficos</b>	<b>XIV</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>XV</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
Reproducción Porcina	<b>2</b>
La placenta porcina	<b>2</b>
Importancia de residuos glicosilados en la placentación porcina	<b>6</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>8</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>8</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>8</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>9</b>
1. Animales	<b>10</b>
1.1. Tractos reproductivos y placentas	<b>10</b>
1.1.1. Procesamiento del tracto reproductivo	<b>10</b>
1.2. Determinación de la edad gestacional placentaria.	<b>10</b>
2. Análisis de estructura y detección de glicoconjugados de la placenta	<b>11</b>
2.1. Técnica para estudio por microscopía óptica	<b>11</b>
2.2. Determinación de residuos glicosilados presentes en tejidos placentarios.	<b>11</b>
2.2.1. Técnica de P.A.S.	<b>12</b>
2.2.2. Determinación de residuos glicosilados por lectinohistoquímica	<b>12</b>
3. Análisis de la ultraestructura de la placenta	<b>14</b>
3.1. Procesamiento de los tejidos placentarios para la inclusión en resinas plásticas.	<b>14</b>
3.2. Realización y contrastación de cortes finos y ultrafinos	<b>16</b>
4. Análisis estadístico	<b>17</b>
<b>Resultados</b>	<b>19</b>
Tractos reproductivos	<b>20</b>
Estudio de glicoconjugados	<b>25</b>
Detección de Glicoconjugados mediante PAS	<b>25</b>
Determinación de residuos glicosilados mediante lectinas	<b>28</b>

<b>Estudio de la ultraestructura placentaria</b>	<b>44</b>
<b>Discusión</b>	<b>58</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>66</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>68</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>70</b>





## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	PÁGINA
<b>Tabla I</b>	Lectinas utilizadas en la técnica de lectinohistoquímica para la detección de residuos glicosilados.	<b>13</b>
<b>Tabla II</b>	Tractos reproductivos procesados con determinación de edad gestacional, número, sexo, longitud y peso promedio de los embriones recolectados.	<b>21</b>
<b>Tabla III</b>	Marcación de residuos $\alpha$ -D-manosil y $\alpha$ -D-glucosil terminales por medio de lectina Con A en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.	<b>30</b>
<b>Tabla IV</b>	Marcación de residuos $\alpha$ -D-manosil y $\alpha$ -D-glucosil terminales por medio de lectina Con A en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.	<b>30</b>
<b>Tabla V</b>	Marcación de residuos N acetyl D- galactosamina por medio de lectina DBA en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.	<b>32</b>
<b>Tabla VI</b>	Marcación de residuos N acetyl D- galactosamina por medio de lectina DBA en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.	<b>32</b>
<b>Tabla VII</b>	Marcación de residuos $\alpha$ -D-manosil y $\alpha$ -D-glucosil por medio de lectina PSA en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.	<b>34</b>
<b>Tabla VIII</b>	Marcación de residuos $\alpha$ -D-manosil y $\alpha$ -D-glucosil por medio de lectina PSA en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.	<b>34</b>
<b>Tabla IX</b>	Marcación de residuos $\beta$ D- galactosil terminales por medio de lectina RCA <sub>11</sub> en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.	<b>37</b>
<b>Tabla X</b>	Marcación de residuos $\beta$ D- galactosil terminales por medio de lectina RCA <sub>11</sub> en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.	<b>37</b>
<b>Tabla XI</b>	Marcación de residuos L-fucosa por medio de lectina UEA <sub>1</sub> en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios	<b>39</b>

	gestacionales.	
<b>Tabla XII</b>	Marcación de residuos L-fucosa por medio de lectina UEA <sub>1</sub> en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.	<b>39</b>
<b>Tabla XIII</b>	Marcación de residuos N- acetyl D- galactosamina por medio de lectina SBA en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.	<b>42</b>
<b>Tabla IVX</b>	Marcación de residuos N- acetyl D- galactosamina por medio de lectina SBA en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.	<b>42</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO	TITULO	PÁGINA
Gráfico I	Comportamiento lineal de la variable longitud céfalo-caudal con respecto al tiempo de gestación.	22
Gráfico II	Comportamiento de la variable peso embrionario/fetal en función de los días de gestación.	23
Gráfico III	Comportamiento de las variables peso embrionario/fetal y longitud céfalo-caudal a lo largo de la gestación.	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1	Fotografía de <i>conceptus</i> de 55 días de gestación.	20
Figura 2	Corte de tejido uterino de una cerda no gestante con tinción de PAS.	25
Figura 3	Interfase feto-materna de una placenta de 35 días de gestación con tinción de PAS.	26
Figura 4	Interfase de placenta de 35 días de gestación en zona interareolar.	27
Figura 5	Vellosidades trofoblásticas de una placenta a término.	28
Figura 6	Tejido uterino de cerda vacía marcado con lectina PSA.	33
Figura 7	Interfase de placenta hasta 35 días de gestación marcada con lectina PSA.	35
Figura 8	Placenta de 114 días de gestación marcada con lectina UEA <sub>1</sub> .	40
Figura 9	Interfase feto materna de una placenta de 70 días de gestación marcada con lectina SBA.	43
Figura 10	Microfotográfica de célula trofoblástica correspondiente a una placenta porcina de 55 días de gestación.	45
Figura 11	Microfotografía de trofoblasto areolar a los 55 días de gestación.	46
Figura 12	Células fetales de zona necrótica de una placenta de 55 días de gestación	47
Figura 13	Fotografía electrónica de una interfase feto-materna correspondiente a una placenta porcina de 70 días de gestación.	48
Figura 14	Ampliación de la Figura 13.	49
Figura 15	Microfotográfica de célula trofoblástica correspondiente a una placenta porcina a término.	50
Figura 16	Microfotografía de célula trofoblástica de placenta porcina a término en relación a un capilar intraepitelial.	51
Figura 17	Células coriónicas de zona necrótica de una placenta porcina a término.	52
Figura 18	Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término.	53

<b>Figura 19</b>	Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término.	54
<b>Figura 20</b>	Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término.	55
<b>Figura 21</b>	Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término.	55
<b>Figura 22</b>	Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término.	56
<b>Figura 23</b>	Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término.	57

# INTRODUCCION

## Reproducción Porcina

El cerdo es una especie política de distribución mundial, constituyendo la carne porcina la principal fuente de proteínas de origen animal. En los últimos 30 años su ingesta ha crecido en una proporción de 1,9% por año, habiéndose consumido en el año 2002 aproximadamente 14,96 Kg/ persona/ año (Roppa, 2003).

La industria del cerdo es confrontada por sustanciales pérdidas dadas por la mortalidad embrionaria temprana sin causa específica, ya sea infecciosa o tóxica, la que constituye entre un 30 a 40 % de las mismas, observándose que la mayoría de éstas ocurren antes del día 30 de gestación (Pope *et al.*, 1990; Pope, 1994), variando este porcentaje de acuerdo a los autores hasta un 50-52% en nuestra región (Bosch *et al.*, 2001).

La cerda presenta un ciclo estral cada  $\pm$  21 días (18-23 días), con una tasa de ovulación variable de entre 15 a 25 óvulos/ ciclo, produciendo una media de 2,57 camadas por año con una eficiencia reproductiva de 25,2 lechones por año y por hembra (PorkWorld, 2003).

La placenta desempeña un papel fundamental en el transcurso de la gestación, de ella no sólo depende la implantación y mantenimiento de la preñez, sino que, además, marca las posibilidades de sobrevivencia postnatal de los lechones (Van der Lende and Van Rens, 2003).

### La placenta porcina

La placenta es un órgano transitorio que se organiza en la gestación y es el mediador nutricional, endocrino e inmunológico entre el feto y la madre. Para constituirlo interaccionan tejidos maternos y fetales. En las diferentes especies de mamíferos, las placentas pueden variar su organización en la estructura macro y microscópica, en la naturaleza histológica de la interfase feto-materna y en las direcciones relativas de las circulaciones maternas y fetales (Kaufmann and Burton, 1994; MacDonald and Bosma, 1985).

En cerdos, la implantación se produce durante la segunda semana de gestación, cuando el *conceptus* (embrión/feto y sus membranas extraembrionarias asociadas) ha atravesado un periodo de elongación y diferenciación de células

trofoectodermales (Stroband and Van der Lende, 1990; Wilson and Ford, 2000; Johansson *et al.*, 2001).

Los tejidos de origen materno que constituyen la placenta provienen del endometrio de la cerda gestante, y se diferencian formando pliegues y ondulaciones conocidas como pliegues primarios (Dantzer *et al.*, 1981). Sobre ese epitelio ondulado se asienta el epitelio del saco coriónico, el trofoblasto, adaptándose a esas ondulaciones endometriales y constituyendo la zona de interacción. Como no existe invasión y destrucción de tejidos maternos la placenta porcina es no invasiva y epiteliocorial. Prácticamente toda la superficie del corioalantoides forma el componente fetal de la placenta, dando lugar a la placenta difusa.

Después de la adhesión de las microvellosidades trofoblásticas del *conceptus* a la pared uterina hacia el día 18 postfertilización, se produce un aumento en la producción de estrógenos por parte del *conceptus* que va desde el día 20 al 30 de preñez (Keys and King, 1990). Hay un incremento de la permeabilidad de las células placentarias al agua (Szego and Sloan, 1961) lo que da por resultado un rápido aumento del volumen de fluido corioalantoideo durante ese período. La expansión del volumen del *conceptus* permite a las membranas del corioalantoides establecer íntimos contactos entre la placenta y la pared uterina (Knight *et al.*, 1977; Goldstein *et al.*, 1980).

A medida que avanza la gestación las ondulaciones uterinas se ramifican formando pliegues primarios y secundarios, y las células de ambos epitelios que contactan forman microvellosidades, diferenciaciones estructurales que permiten aumentar la zona de interfase materno-fetal (Kaufmann and Burton, 1994). Del día 30 al 50 de la preñez el volumen de fluido alantoico declina debido a la pronunciada interdigitación que se produce entre los epitelios coriónicos y luminal uterino.

La demanda metabólica se incrementa por el rápido crecimiento fetal a partir del día 50 hasta el final de la gestación, lo que da por resultado un aumento del tamaño y del área de superficie de la placenta durante ese tiempo gestacional (Szego and Sloan, 1961; Goldstein *et al.*, 1980; Robertson *et al.*, 1985).

La demanda nutricional por parte del feto implica que la placenta esté constituida por una zona en donde se deben producir los nutrientes, el tejido endometrial. Todos los mamíferos contienen glándulas endometriales que sintetizan y secretan o transportan un complejo conjunto de proteínas y otras sustancias



esenciales para la sobrevivencia y desarrollo del *conceptus* denominadas histiotrofo (Gray *et al.*, 2001b). Desde Amoroso (1952) se sugiere que las secreciones de las glándulas uterinas serían las reguladoras primarias de la sobrevivencia del *conceptus*, interviniendo en las señales de reconocimiento materno-fetal y de los eventos asociados a la implantación y placentación (Carson *et al.*, 2000).

En cerdos, las glándulas endometriales sufren una extensa hiperplasia e hipertrofia durante la preñez; presumiblemente en respuesta a la demanda incrementada por el *conceptus* en desarrollo para obtener el histiotrofo uterino (Gray *et al.*, 2001a). Sobre el día 30 de gestación, las glándulas uterinas aparecen como estructuras tubulares simples con un lumen estrecho y células ciliadas y secretoras. A la mitad de la preñez, las glándulas están ampliamente dilatadas y presentan gran actividad secretora, continuando así hasta el parto. Luego del parto las glándulas uterinas sufren una rápida involución (Perry and Crombie, 1982; Gray *et al.*, 2001a; Gray *et al.*, 2001b).

A fin de captar los nutrientes, la placenta fetal desarrolla un gran sistema de vascularización. La vasculatura es uno de los más importantes y complejos órganos del cuerpo de los mamíferos. Es el primer órgano funcional que se forma durante el desarrollo embrionario, la intrincada red de células endoteliales y su soporte periendothelial es esencial para el transporte de oxígeno y nutrientes y para remover productos de desecho de los tejidos (Rossant and Howard, 2002).

El córion inicialmente es un tejido sin vascularización, a medida que avanza la gestación se originan los vasos sanguíneos fetales a partir del alantoides y por el íntimo contacto entre estos tejidos se forma la placenta corioalantoidea (Kaufmann and Burton, 1994).

Dado el tipo de placenta, en cerdos la barrera que separa la sangre fetal de la materna para el intercambio fisiológico está constituida por las siguientes capas tisulares: endotelio del capilar fetal, membrana basal, epitelio coriónico, lumen uterino, epitelio uterino, membrana basal y endotelio del capilar materno. Hacia la mitad de la gestación, la vascularización ha llegado a formar las ramificaciones de capilares que penetran entre las células trofoblásticas, observándose que esos capilares se encuentran a solo 2 micrómetros del epitelio materno, modificándose la barrera de difusión (Friess *et al.*, 1980).

Por su anatomía e histología, hacia el día 40 de gestación en esa placenta difusa pueden distinguirse tres regiones. Hacia los extremos del saco corioalantoideo se distingue una zona sin irrigación, formada por apéndices avasculares que no se

encuentran interaccionando con el tejido uterino. En relación con ellos, y marcada por una constricción anular, se encuentra la zona paraplacentaria que incluye a las membranas extraembrionarias. En la parte central del saco se encuentra la zona placentaria propiamente dicha que contiene al feto rodeado por la membrana corioalantoidea y se distingue por su alta irrigación, con los vasos corioalantoideos dispuestos en forma paralela al eje longitudinal del saco coriónico y desde donde se observa la salida el cordón umbilical acompañado por el amnios. En esta zona, es posible distinguir dos regiones diferentes en la interfase del epitelio uterino y el trofoblasto: las *regiones interareolares*, en donde los epitelios se encuentran estrechamente unidos, y las *regiones areolares* en donde se separan los dos epitelios generando el espacio interareolar. Estas características son compartidas por razas porcinas mestizas y puras (Santos *et al.*, 2006). En dicho espacio, el contenido de las glándulas uterinas es vertido y las células del trofoblasto se vuelven columnares; es a través de ellas que se produce la incorporación de los nutrientes para la nutrición histiotrófica de los tejidos fetales.

Dado que la permeabilidad de sustancias entre ambas corrientes sanguíneas está condicionada por la cantidad de capas que las separan, y por la cantidad de vasos sanguíneos que irrigan el corioalantoides y al endometrio, es importante analizar la dirección relativa de los flujos sanguíneos maternos y fetales.

En las cerdas se observa que los capilares maternos conllevan una dirección que es perpendicular a la dirección relativa de los capilares fetales. Este arreglo circulatorio de la placenta porcina se denomina corriente cruzada y se considera que es un sistema de difusión de sustancias intermedio en su eficiencia, lo cual implica que el crecimiento del saco coriónico, el aumento en la cantidad y calibre de los vasos y su disposición garantizarían sus principales funciones, como son el intercambio de sustancias y nutrientes entre la madre y los embriones, permitiendo así el desarrollo individual de cada embrión en los cuernos uterinos (Kaufmann and Burton, 1994)

Se produce un marcado incremento en el número de vasos sanguíneos, tanto fetales como endometriales, en la interfase feto-materna a partir del día 40 de gestación hasta el término. Ese incremento de vasos sanguíneos por unidad de área permitiría una mayor área de superficie para el intercambio de nutrientes y productos entre la cerda y sus crías (Reynolds and Redmer, 1995; Dantzer *et al.*, 2000).

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio sobre angiogénesis placentaria, encontramos que el número de pequeños vasos aumenta significativamente hacia el día 55 de preñez, mientras que los grandes vasos por

unidad de área aumentan hacia el día 70, predominando los vasos sanguíneos de mediano calibre al final de la gestación (Merkis y col., 2006).

Además, se observó desarrollo de vellosidades placentarias hasta los 55 días de gestación, una disminución temporal del área total y epitelial hacia el día 70, que se correspondería con una disminución del crecimiento placentario acompañando el aumento del peso fetal, y un aumento del área epitelial de vellosidades en placentas a término. A partir de los 70 días de gestación el aumento de área total de las vellosidades, hasta equipararse al área observada a los 55 días de preñez, sería para lograr el soporte del gran desarrollo fetal que acontece a partir de este período hasta el final de la preñez (Merkis y col., 2005).

Biensen *et al.*, 1999, sugieren que no hay aumento de tamaño de la placenta porcina a partir de los 90 días de gestación, sino solamente de la porción epitelial de las vellosidades, debido al desarrollo de vellosidades terciarias necesarias para la nutrición fetal.

Una de las variables que determina la preñez exitosa es la capacidad uterina, ya que condiciona el desarrollo placentario hasta el término (masa, vascularidad y área superficial). Pequeñas variaciones del peso al nacimiento están relacionadas con diferencias en la masa placentaria, lo cual es un importante factor de riesgo (Van der Lende *et al.*, 2001).

### **Importancia de residuos glicosilados en la placentación porcina**

Los mecanismos que permiten la relación célula-célula en los mamíferos están dados por la presencia de moléculas de adhesión, en especial moléculas glicosiladas. Los glicanos están implicados en la adhesión y reconocimiento célula-célula y célula-matriz, por lo cual su naturaleza en la barrera materno-fetal es de especial interés.

En la placenta de mamíferos la zona de contacto materno- fetal es un sitio con una respuesta inmunológica normal, de manera que para prevenir una respuesta inflamatoria aguda o crónica es evidente que de ambos lados se enmascara el contacto íntimo celular existente (Jones *et al.*, 1995; Atkinson *et al.*, 1993). La glicosilación del trofoblasto interactúa con el sistema inmune materno para lograr la tolerancia fetal y también contribuye a la adhesión e implantación estable de los embriones/fetos (Aplin, 1999).

Se ha sugerido que los patrones de glicosilación de la interfase en la placenta epiteliochorial porcina serían factores importantes para permitir una implantación exitosa y el mantenimiento de la preñez (Aplin, 1999; Jones *et al.*, 2004). Cada especie dispondría de un "glicotipo" particular (Jones *et al.*, 1997) que jugaría un papel central en el proceso de placentación como modulador de las interacciones entre los embriones y el endometrio uterino (Aplin, 2000).

El glicotipo materno, en especial el del glicocálix epitelial, es importante para la implantación y el establecimiento de la interfase materno fetal, ya que serían las moléculas responsables de mediar la capacidad invasiva del trofoblasto, tejido que en gestaciones ectópicas ha demostrado poseer actividad proliferativa e invasiva (Samuel, 1971; Samuel and Perry, 1972).

Dado que los conocimientos actuales en placentas porcinas indican que, existen patrones de diferenciación celular en el desarrollo de este órgano a lo largo de la gestación y que, esos patrones van acompañados de cambios tanto ultraestructurales como bioquímicos en la expresión de glicoconjugados, y que parte de los cambios serían específicos de cada especie suina considerada y que los mismos condicionarían el desarrollo de una preñez exitosa, es que se decidió realizar el estudio de dichos cambios en cerdas mestizas de nuestra región.

## **Hipótesis**

Durante la gestación porcina se produce en la interfase feto-materna cambios en la ultraestructura celular y en la expresión de los glicoconjugados que intervienen en la interacción materno-fetal y determinan una gestación exitosa.

## **Objetivo general**

Investigar el desarrollo de la placenta porcina en diferentes estadios gestacionales a través de la evaluación de cambios estructurales y ultraestructurales y realizar la determinación de los residuos glicosilados que se encuentran en dichos tejidos placentarios.

## **Objetivos específicos**

- Determinar el número, sexo, longitud y peso de los embriones/fetos recolectados de tractos reproductivos de cerdas mestizas de la zona de Río Cuarto, Córdoba.
- Realizar estudios de estructura y ultraestructura placentaria en diferentes estadios gestacionales: hasta 35 días, 55 días, 90 días de gestación y a término (114 días).
- Determinar la presencia de zonas ricas en glicoconjugados placentarios por tinción histológica diferencial.
- Caracterizar parcialmente los glicoconjugados presentes en los tejidos placentarios mediante lectinhistoquímica.

# **MATERIALES Y METODOS**

## 1. Animales

### 1.1. Tractos reproductivos y placentas

Se utilizaron cerdas mestizas, cruza de las razas con base Landrace, Duroc-Jersey y Hampshire, provenientes de criaderos y frigoríficos de la zona de Río Cuarto. Se procesaron 4 úteros vacíos y 25 placentas que correspondían a los siguientes periodos gestacionales:  $\pm$  35 (n = 6), 55 (n = 7), 70 (n = 4), 90 (n = 3) y 114 días de preñez (n = 5).

En todos los casos, el tracto reproductivo se removió inmediatamente después de la muerte del animal y se lavó con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco) a la que se adiciono 10.000U/ml de penicilina G sodica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomycin y 2.5  $\mu$ g/ml de fungizona (Gibco). Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el posterior procesamiento en el laboratorio.

#### 1.1.1. Procesamiento del tracto reproductivo

El tracto reproductivo de las cerdas se colocó sobre una mesada y se lavó con SSH modificada. Se realizó la palpación para detectar la ubicación de los embriones o fetos, los cuernos uterinos se abrieron en forma longitudinal, con una incisión por el borde anti mesometrial. Se observó el sitio de implantación y se recogieron muestras del tejido mesometrial y placentario fetal.

El tejido placentario fue destinado a estudios de estructura por microscopía óptica y de ultraestructura por microscopía electrónica. Las muestras se consideraron libres de patologías según el análisis anátomo-patológico y examinación *postmortem* realizada.

Luego de tomar las muestras se realizó la disección completa de los dos cuernos uterinos para recoger los embriones/fetos.

### 1.2. Determinación de la edad gestacional placentaria.

Se estimó la edad gestacional de las placentas de acuerdo a la longitud céfalo caudal de los embriones y/o fetos obtenidos de cada cerda gestante (Marrable, 1971).

## 2. Análisis de estructura y detección de glicoconjugados de la placenta

### 2.1. Técnica para estudio por microscopía óptica

Se fijaron las muestras de tejido placentario fetal y materno en formaldehído en solución acuosa al 10%, con el fin de preservar la morfología y organización celular. Se deshidrataron con baterías de alcoholes de graduación creciente (70, 90, 95 y 100 %), se aclararon con xileno y luego se incluyeron en parafina. De los tacos obtenidos se realizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente, que fueron montados en portaobjetos gelatinizados. Los cortes histológicos fueron destinados al estudio de la estructura placentaria y a la detección de glicoconjugados.

### 2.2. Determinación de residuos glicosilados presentes en tejidos placentarios.

Se realizó la determinación de residuos glicosilados por la técnica de PAS y por lectinhistoquímica.

Los cortes fueron desparafinados utilizando soluciones de xilol, en dos baños con xilol al 100 % durante 15 minutos cada uno, posteriormente se reemplazó dicho solvente con solución de alcohol:xilol en proporción 1:1, y se hidrató utilizando soluciones decrecientes de alcohol en agua: al 96%, 80% y 70% durante 5 min cada una. Se lavaron los cortes en tres baños de 5 min cada uno en agua destilada y posteriormente en buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,4.

#### 2.2.1.1. Preparación de Buffer fosfato 0,1 M pH 7,4

Solucion A:	$\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	35,61 g/ 1000 ml
Solucion B:	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27,60 g/1000 ml
Para obtener pH 7,4:	Solución A:	40,5 ml
	Solución B:	9,5 ml

Se prepararon las soluciones stock A y B por disolución de la droga sólida en agua y se realizó la mezcla de los volúmenes indicados para cada una de ellas. Se midió y ajustó el pH.



### 2.2.1. Técnica de P.A.S. (Reacción de Schiff ácido periódico)

#### 2.2.1.1. Preparación del reactivo de Schiff

pararosanilina o fucsina básica	1g
metabisulfito sódico	2g
CIH 0,15 N	100 ml

Se utilizaron frascos oscuros, se removi6 durante dos horas y se dej6 toda la noche. Luego se a~adi6 0,5 g de carb6n activado para aclarar la soluci6n. Se filtr6 dos veces.

Los pasos utilizados en esta t6cnica fueron los siguientes:

1. Se desparafinaron los cortes placentarios.
2. Se sumergieron en 6cido peri6dico al 1 % durante 10 minutos.
3. Se lavaron con agua corriente, 10 minutos y posteriormente se pasaron por agua destilada.
4. Se sumergieron en el reactivo de Schiff, 10 minutos en un recipiente con tapa.
5. Los portaobjetos se lavaron con abundante agua corriente y posteriormente se enjuagaron con agua destilada.
6. Se realiz6 contrastaci6n de los cortes con hematoxilina al 0,1% durante 1 min.

Con esta t6cnica se obtiene la visualizaci6n de los polisac6ridos, mucopolisac6ridos, mucoprote6nas, glicol6pidos, fosfol6pidos y quitina en color p6rpura: PAS positivo (+). El col6geno en rosa y los n6cleos de las c6lulas en azul.

### 2.2.2. Determinaci6n de residuos glicosilados por lectinohistoqu6mica

Se determin6 la presencia de residuos glicosilados sobre cortes de tejido placentario provenientes de placentas porcinas de diferentes per6odos gestacionales, utilizando las siguientes lectinas: *Concanavalina A* (Con A), *Dolichus biflorus* (DBA), *Pisum sativum* (PSA), *Ulex europaeus* (UEA<sub>I</sub>), *Ricinus Communis* (RCA<sub>II</sub>), *Glycine max* (SBA). Su origen y especificidad de uni6n a residuos glicosilados se detalla en la Tabla I.

LECTINA	ORIGEN	ESPECIFICIDAD DE UNION
Con A	<i>Concanavalina ensiformis</i>	$\alpha$ -D-manosil; $\alpha$ -D-glucosil terminales
DBA	<i>Dolichus biflorus</i>	N acetyl galactosamina terminal
PSA	<i>Pisum sativum</i>	$\alpha$ -D-manosil y $\alpha$ -D-glucosil
RCA <sub>II</sub>	<i>Ricinos Communis</i>	$\beta$ D- galactosil terminales
UEA <sub>I</sub>	<i>Ulex europaeus</i>	L – Fucosa
SBA	<i>Glycine max</i>	N acetyl D- galactosamina

**Tabla I:** Lectinas utilizadas en la técnica de lectinohistoquímica para la detección de residuos glicosilados.

Las lectinas se resuspendieron a una concentración de 1 mg/ml de agua destilada. Para su conservación se alicuotaron en tubos ependorf en volúmenes de 100  $\mu$ l y se colocaron a -20°C, envuelta en papel de aluminio para preservarlas de la luz.

Los cortes se escurrieron y se cubrieron con una solución de lectina en una dilución 1:100, cada portaobjeto se cubrió sin presionar con parafilm "M" (Laboratory film-American National™), para que no queden burbujas, con el fin de homogeneizar el pegado de las lectinas sobre el tejido. Se incubó en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Pasado el tiempo, se retiró la cámara húmeda de la heladera y se dejó a temperatura ambiente. Se lavó por separado cada lectina con tres baños consecutivos de PBS. Posteriormente, los cortes histológicos fueron incubados con el complejo Streptavidina-Peroxidasa (DAKO-Cytomation) durante 60 min a temperatura ambiente. Luego se lavó con PBS en tres baños consecutivos de 5 min cada uno durante 10 min y se procedió a revelar la marcación realizada con diaminobencidina (DAB), controlando la reacción bajo microscopio hasta la aparición de color pardo. Una vez obtenida la intensidad de revelado, para detener la reacción se sumergieron los preparados histológicos en baño de agua corriente. Posteriormente se contrastó los preparados histológicos con hematoxilina durante 5 seg, se los lavó y secó.

Los cortes de tejido placentario se observaron en un microscopio óptico Axiophot (Zeiss) y se obtuvieron fotografías digitales con una cámara Canon Power Shot G6 7,1 Mega Píxel (Japón) conectada al mismo.

### 3. Análisis de la ultraestructura de la placenta

#### 3.1. Procesamiento de los tejidos placentarios para la inclusión en resinas plásticas.

Inmediatamente luego de la muerte del animal, se tomaron pequeñas muestras de tejido fetal y materno, aproximadamente de 2mm x 2mm, evitando realizar movimientos en serrucho.

El primer paso que se realizó fue la fijación, que está destinada a detener los cambios autolíticos, preservar y estabilizar todos los componentes celulares antes de los tratamientos de deshidratación, inclusión y bombardeo de electrones que se llevaron a cabo posteriormente (Riemersma, 1970). Se procedió en un primer paso a la fijación con una solución de glutaraldehído al 2,5 % en buffer S-collidina (0,2 M; pH 7,4). La elección de este fijador se realizó en base a su propiedad de preservar las estructuras proteicas (Hayat, 1981). Se sumergió el tejido en la solución fijadora por 1 hora, tiempo tras cual se recortó el tejido a un tamaño aproximado de 1mm x 1mm para favorecer la penetración, posteriormente se colocó en la misma solución por 2 hs a 4°C.

El segundo paso de fijación se realizó con una solución de tetróxido de osmio al 1% durante 1 h a temperatura ambiente, esta sustancia actúa en la fijación de componentes celulares lipídicos, ácidos nucleicos y carbohidratos (Riemersma, 1970; Hayat, 1986).

A fin de proceder a la inclusión, los tejidos fueron deshidratados con soluciones crecientes de acetona: acetona al 50%, acetona 75%, acetona 90% y dos pasajes en acetona al 100%. Cada uno de los baños fue de 10 min.

Para la inclusión se utilizó la resina EMBED 812 (Electron Microscopy Science, EMS) ya que posee la característica de polimerizar uniformemente ante pequeños cambios de volúmenes de sus componentes y además es estable ante el bombardeo de electrones (Glauert, 1975). Para favorecer la penetración de la resina plástica en las muestras, estas se pre-incluyeron en la resina plástica diluida 1:1 en acetona durante toda la noche a temperatura ambiente. La inclusión propiamente dicha se realizó colocando las muestras con la resina pura a 56°C, durante 48 hs.



### 3.1.1. Preparación de buffer S- collidina 0,2 M pH 7,4

S- collidina	5,34 ml
ClH <sub>2</sub> N	9 ml (aproximadamente para pH 7,4)
Agua destilada	

Se mezclaron los volúmenes indicados de los componentes y se llevó a volumen de enrase a 100 ml con agua destilada en matraz aforado. El pH fue ajustado con la solución de HCl.

### 3.1.2. Preparación de la solución fijadora de glutaraldehido

Glutaraldehido al 25%	10 ml
Agua bidestilada	70 ml
Buffer S – collidina	20 ml

En esta solución de trabajo la concentración final de glutaraldehido es de 2,5% en buffer 0,2 M. Esta solución puede conservarse en heladera durante una semana o se puede conservar en el freezer en alícuotas.

### 3.1.3. Preparación de solución fijadora de tetróxido de osmio

OsO <sub>4</sub>	1 g
Agua tridestilada	50 ml

Se colocó el agua tridestilada en un frasco oscuro bajo campana. Se rompió la ampolla del OsO<sub>4</sub> en el envoltorio original y se la colocó en el frasco. Se dejó por lo menos una semana para esperar su disolución. Esta solución se conservó en heladera durante meses en un recipiente hermético para evitar los vapores.

### 3.1.4. Preparación de resina de Inclusión: resina EMBED 812

Mezcla A:	
EMBED 812	5 ml
Dodecenyl Succinic Anhydride (DSA)	8 ml

Mezcla B:	
EMBED 812	8 ml
Nadic Methyl Anhydride (NMA)	7 ml

Mezcla final:	Mezcla A:	13 ml
	Mezcla B:	15 ml
2,4,6-Tri(Dimethylaminomethyl)phenol (DMP-30):		15 gotas

Se prepararon las soluciones A y B con los volúmenes indicados de cada componente. Luego se realizó la mezcla de los componentes A y B y se la colocó en agitador magnético hasta la desaparición de burbujas. Se agregó el componente acelerador DMP-30 y se continuó con la agitación 10 min para la homogeneización.

### 3.2. Realización y contrastación de cortes finos y ultrafinos

Se eligió la zona de interés sobre los cortes finos (1  $\mu\text{m}$ ) realizados con un ultra micrótopo (Sorvall) y teñidos con azul de toluidina en una solución acuosa del 5%. Encontrada la zona del interés, se realizaron cortes ultrafinos por ultramicrotomía con cuchilla de diamante (Microstar) que fueron montados en grillas de cobre de 150 mesh (EMS).

Para el procedimiento de contrastación se utilizó primero una solución acuosa de acetato de uranilo (EMS) diluida 1:1 en acetona, exponiendo los cortes durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron los cortes con agua y se procedió a la contrastación con solución acuosa de citrato de plomo (EMS) durante 5 minutos y se lavó.

La observación se realizó con un microscopio electrónico de transmisión (MET) Elmiskop 101 (Siemens) y un microscopio JEM-1220 (Jeol, Japón).

#### 3.2.1. Preparación de solución colorante azul de toluidina

Borato de Na	0,5g
Azul de Toluidina	0,5g
H <sub>2</sub> O destilada	50 ml

Se disolvió el Borato de Na en agua. Posteriormente se agregó el colorante para su disolución.

### 3.2.2. Preparación de solución acuosa de acetato de uranilo

Acetato de uranilo 2- hidrato	2,5 g
H <sub>2</sub> O destilada	50 ml

Se colocó la droga en un vaso de precipitado junto con el agua y se cubrió con papel de aluminio. Se agitó con magneto durante 10 min o hasta la desaparición del precipitado. Se dejó decantar y se filtró.

### 3.3.3. Preparación de solución acuosa de citrato de plomo

(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Pb	1,33 g
Na(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	1,76 g
Agua destilada	50 ml
OHNa 1N	8 ml

Se disolvió el citrato de plomo en 30 ml de agua hervida y enfriada y se sonicó durante 10 minutos. Se agregó 8 ml de OHNa 1N. Se midió el enrase en matraz aforado a 50 ml con agua destilada hervida y enfriada. Para su conservación, se filtró con un filtro 0,22 µm, se fraccionó en alícuotas de 1 ml en tubos ependorf y se guardó a -20°C.

## 4. Análisis estadístico

En el análisis de los datos correspondientes al peso y longitud de los fetos en función del tiempo de gestación, se realizaron análisis matemáticos de las variables a fin de establecer la funcionalidad entre ellas y el tiempo de gestación, y entre ellas independientemente del tiempo.

Los resultados de las técnicas de marcación para glicoconjugados se expresaron en forma cualitativa, con una escala elegida en función de la intensidad de coloración detectada, determinando que:

(-):	negativo
(±):	Positivo con pobre intensidad de marcación
(+):	Marcación positiva
(++):	Positivo con abundante marcación
(+++):	Positivo con cuantiosa marcación

Los resultados relacionados a los cambios en la estructura y ultraestructura celular fueron de tipo descriptivo.

# RESULTADOS



## Tractos reproductivos

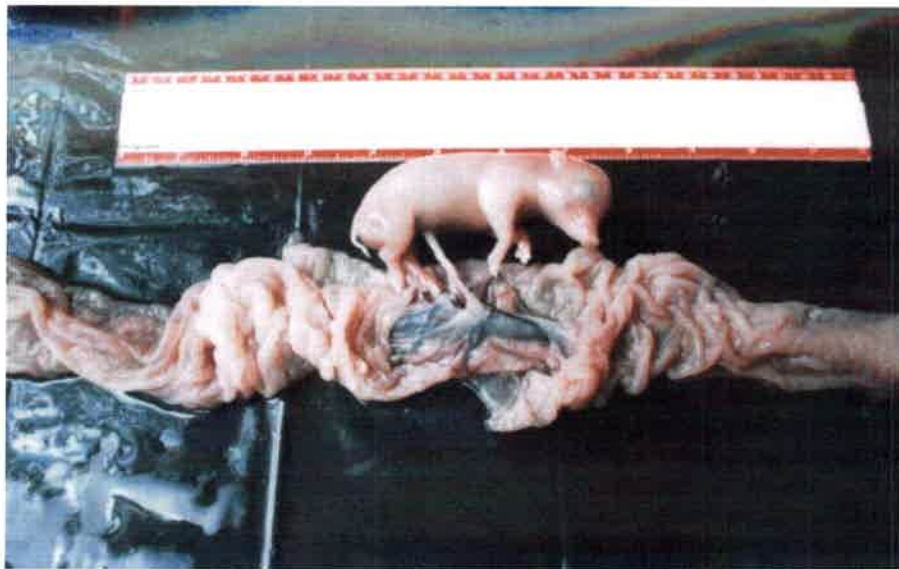
Se recolectaron 29 tractos reproductivos. Dichos tractos provinieron de cerdas no preñadas, gestantes de diferentes períodos gestacionales y a término recolectadas inmediatamente después de expulsada la placenta en el parto.

De los 29 tractos reproductivos:

- Cuatro correspondieron a úteros de cerdas no gestantes, elegidos para poder estudiar las características morfológicas de dicho tejido.
- El resto de los tractos reproductivos coleccionados (25) fueron placentas provenientes de cerdas gestantes en diferentes períodos gestacionales y a término.

Los tractos reproductivos fueron procesados con los diferentes métodos y técnicas descritos en el apartado Materiales y Métodos.

En la Fig. 1 se observa la relación tamaño del feto/tamaño placentario a los 55 días de preñez, luego de realizar la necropsia de la cerda y extraer el *conceptus* del tracto reproductivo. Se observa la apertura realizada en la vesícula amniótica con el feto desplazado, la disposición del cordón umbilical y la zona vascularizada del tejido placentario fetal.



**Fig. 1** Fotografía de conceptous de 55 días de gestación. La medida de referencia es una regla de 30 cm.

El resultado del procesamiento de los tractos reproductivos se observa en la Tabla II.

Tracto Reproductivo	Tiempo de gestación (días)	Nº Embriones/Fetos	Sexo Embriones/Fetos	Longitud (cm)	Peso (x g)
PI 01	20-30	12 *		1,46	0,30
PI 02	28	16*		2,35	1,07
PI 03	29	8*		2,58	1,23
PI 04	30	11*		3,50	3,70
PI 05	30	10*		2,60	2,40
PI 06	35	14*		4,20	5,10
PI 07	47	7	1 Machos/6 Hembras	7,90	28,60
PI 08	50	8	4 Machos/4 Hembras	9,30	31
PI 09	50	3	2 Machos/1 Hembra	8,90	34,60
PI 10	55	5	2 Machos/3 Hembras	9,98	48,22
PI 11	60	7	4 Machos/3 Hembras	9,50	56,95
PI 12	62	3	2 Machos/1 Hembra	15,20	165,40
PI 13	64	8	6 Machos/2 Hembras	12,13	95,30
PI 14	70	12	8 Machos/4 Hembras	15,50	174,60
PI 15	70	10	7 Machos/3 Hembras	16,06	204,43
PI 16	70	6	3 Machos/3 Hembras	16,63	185,50
PI 17	72	8	4 Machos/4 Hembras	13,50	120
PI 18	93	7	1 Machos/6 Hembras	24	580
PI 19	93	8	5 Machos/3 Hembras	26	690
PI 20	95	7	4 Machos/3 Hembras	25,10	623,80
PI 21	A término	7	4 Machos/3 Hembras	34	1000
PI 22	A término	6	3 Machos/3 Hembras	35	980
PI 23	A término	8	5 Machos/3 Hembras	33	960
PI 24	A término	8	4 Machos/4 Hembras	35	1080
PI 25	A término	6	2 Machos/4 Hembras	34	1010

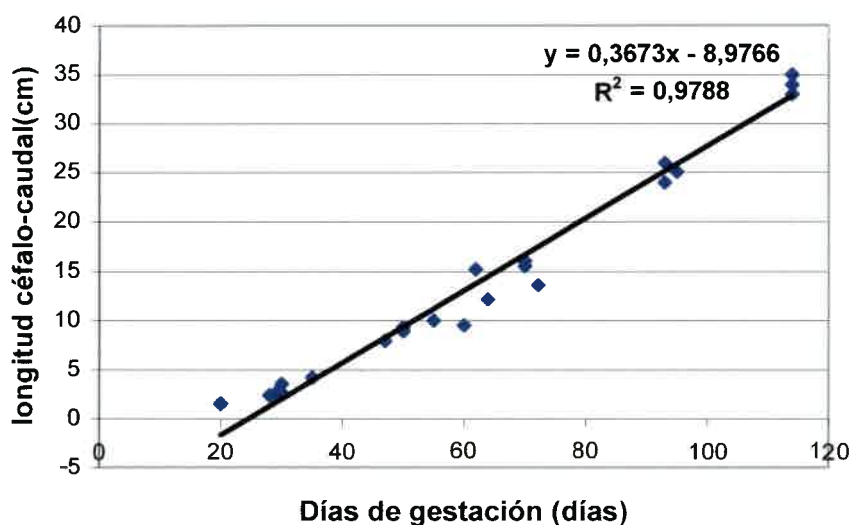
\* No se determinó el sexo.

**Tabla II.** Tractos reproductivos procesados con determinación de edad gestacional, número, sexo, longitud y peso promedio de los embriones recolectados.



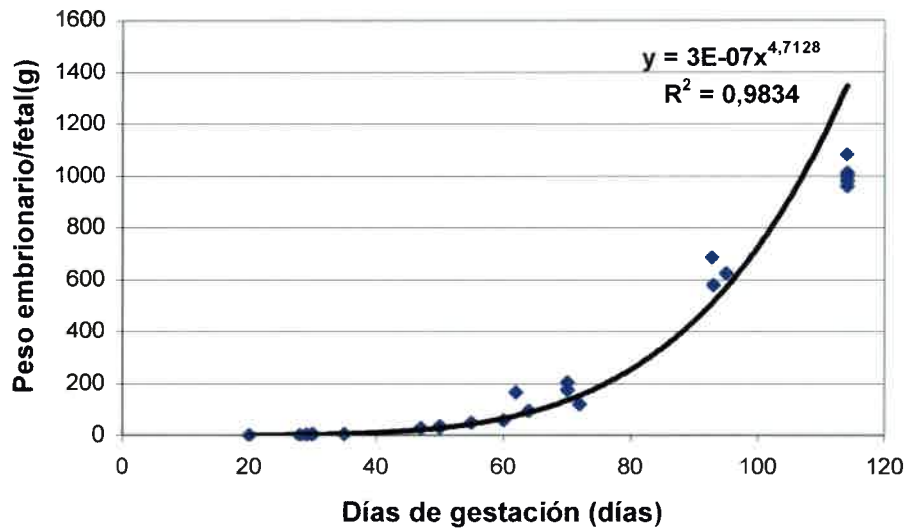
Se realizaron análisis matemáticos a fin de estudiar las variables peso y longitud de los embriones/fetos en función de los días de gestación.

En el Gráfico I, se observa el comportamiento de la variable longitud céfalo-caudal en función de los días de gestación. Se aprecia que el crecimiento del feto en longitud (cm) tiende a ser lineal durante el desarrollo de la gestación porcina ( $R^2=0,9788$ ), esto significa que aproximadamente el 98% de las variaciones longitud céfalo-caudal se explican a través de la variable tiempo (días de gestación).



**Gráfico I.** Comportamiento lineal de la variable longitud céfalo-caudal con respecto al tiempo de gestación.

En el Gráfico II, se observa el comportamiento de la variable peso en función de los días de gestación. Se puede apreciar que en los primeros tiempos de gestación el peso (g) tiene un comportamiento relativamente lineal, para luego adoptar, cercanos a los 55 días de gestación, una función de tipo potencial ( $R^2=0,9834$ ).

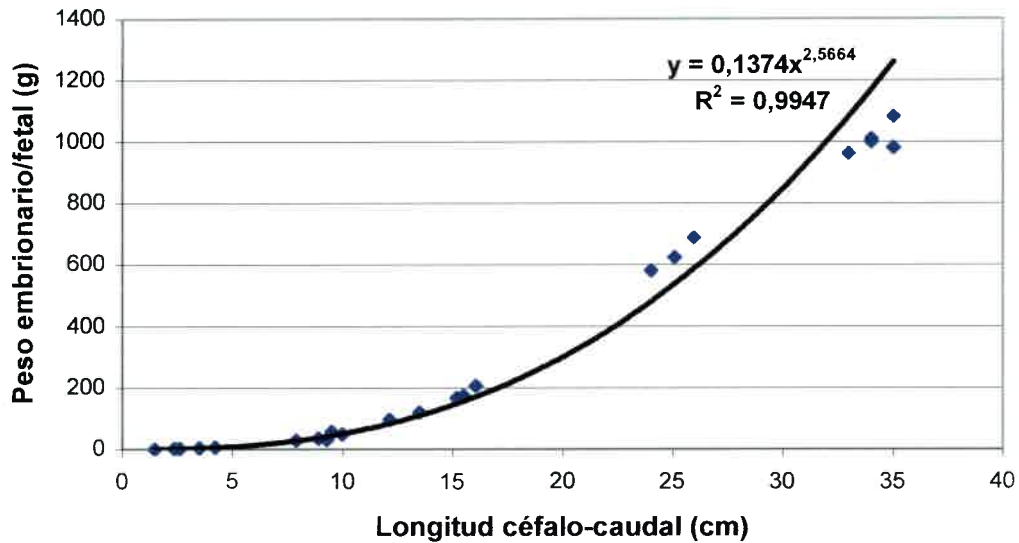


**Grafico II.** Comportamiento de la variable peso embrionario/fetal en función de los días de gestación en donde se observa el comportamiento potencial de la variable.

Cuando se observa el comportamiento de las variables peso del feto vs. longitud céfalo-caudal, con independencia del tiempo de gestación, se observa que en los primeros valores de longitud céfalo-caudal (hasta aproximadamente 10 cm) pequeñas variaciones en la longitud van acompañadas de cambios proporcionales en el peso, si se graficara esta etapa se obtiene que conservan una relación lineal ( $R^2 = 0.9019$ ).

En otras zonas, que se corresponden a valores de longitud céfalo-caudal mayores, pequeñas variaciones en la longitud van acompañadas con grandes variaciones de peso, pudiendo ser representadas con una función lineal ( $R^2 = 0.9945$ ).

Al aplicar las funciones matemáticas a las variables peso vs longitud a través de toda la gestación (Grafico III) se observa que el comportamiento de estas se representa a través de una función potencial ( $R^2 = 0.9947$ ).



**Grafico III.** Comportamiento de las variables peso embrionario/fetal y longitud céfalo-caudal a lo largo de la gestación.

En función de las variables obtenidas, los tractos reproductivos fueron divididos en los siguientes 5 grupos de acuerdo a rangos etarios considerados a fin de presentar los resultados:

- Útero vacío (n=4)
- 35 días de gestación: tractos reproductivos de 30 a 35 días de gestación (n=6)
- 55 días de gestación: tractos reproductivos de 47 a 64 días de gestación (n=7)
- 70 días de gestación: tractos reproductivos de 70 a 72 días de gestación (n=4)
- A término: tractos reproductivos de 114 de gestación (n=5)

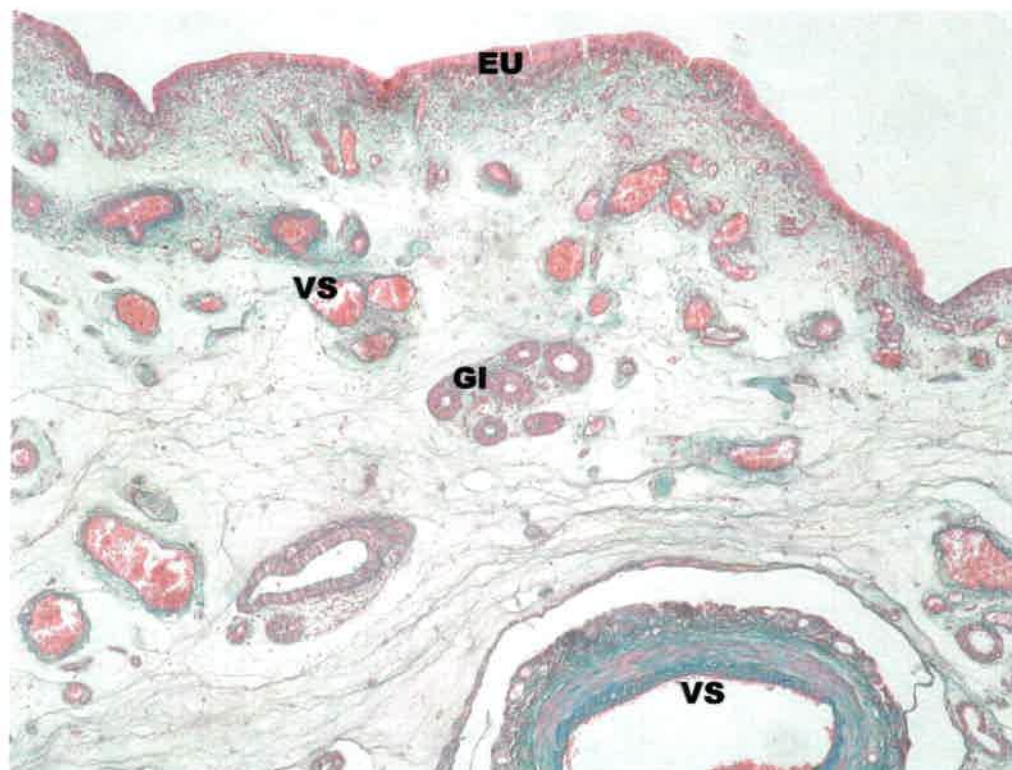
### Estudio de glicoconjugados

La estructura de las placentas obtenidas mostraba integridad de tejidos y ausencia de procesos patológicos, tal como se observa en las siguientes fotografías. El estudio de glicoconjugados en la placenta porcina se realizó con la técnica de PAS y lectinohistoquímica por medio de lectinas marcadas con peroxidasa

#### Detección de Glicoconjugados mediante PAS

En los cortes histológicos se obtuvo por la marcación PAS la visualización de polisacáridos, mucopolisacáridos, mucoproteínas, glicolípidos y fosfolípidos en color púrpura: PAS + (positivo). El colágeno en rosa y los núcleos de las células en azul: PAS - (negativo) contrastados con hematoxilina.

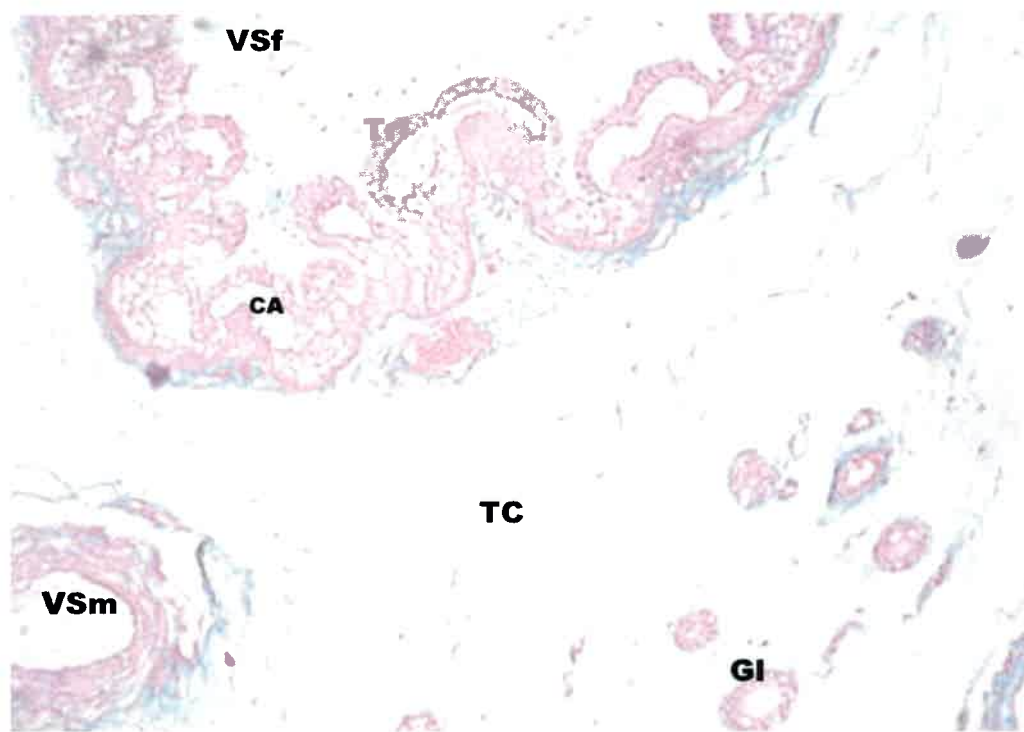
En la Fig. 2 de microscopía óptica, se observa el útero de una cerda no gestante con tinción de PAS. Puede apreciarse el epitelio hacia la luz del cuerno uterino, los epitelios glandulares y los glóbulos rojos del interior de los vasos sanguíneos con marcación PAS +.



**Fig. 2** Corte de tejido uterino de una cerda no gestante con tinción de PAS. (EU) epitelio luminal uterino; (VS) vasos sanguíneos y (GI) glándulas uterinas (X 100).

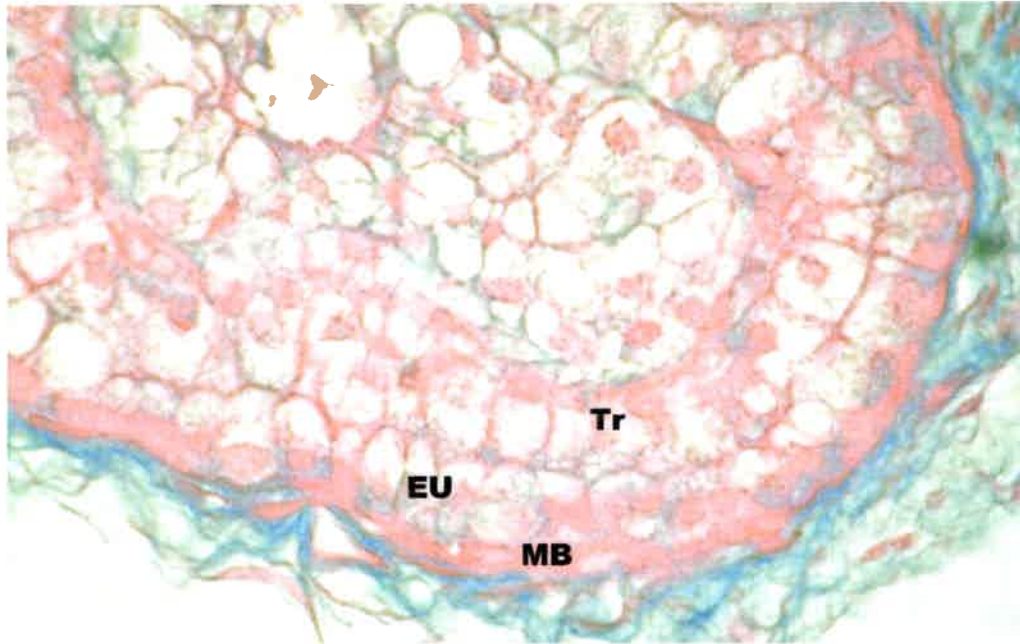
En la Fig. 3 se observa una placenta de 35 días de gestación en donde puede apreciarse la estructura de la interfase feto-materna con tinción de PAS. Se distingue zonas de contacto de la interfase (interareolar) y zonas en donde ambos epitelios se separan conformando la cavidad areolar. Las células del epitelio uterino y del trofoblasto presentan una tinción PAS + marcada en la zona que corresponde a la cavidad areolar.

Pudo observarse la positividad en glándulas uterinas y en vasos sanguíneos tanto maternos como fetales.



**Fig. 3** Interfase feto-materna de una placenta de 35 días de gestación con tinción de PAS. (EU) epitelio uterino; (Tr) trofoblasto; (CA) cavidad areolar; (GI) glándulas uterinas; (VSm) vasos sanguíneos maternos; (VSf) vasos sanguíneos fetales; (TC) tejido conectivo (X 200).

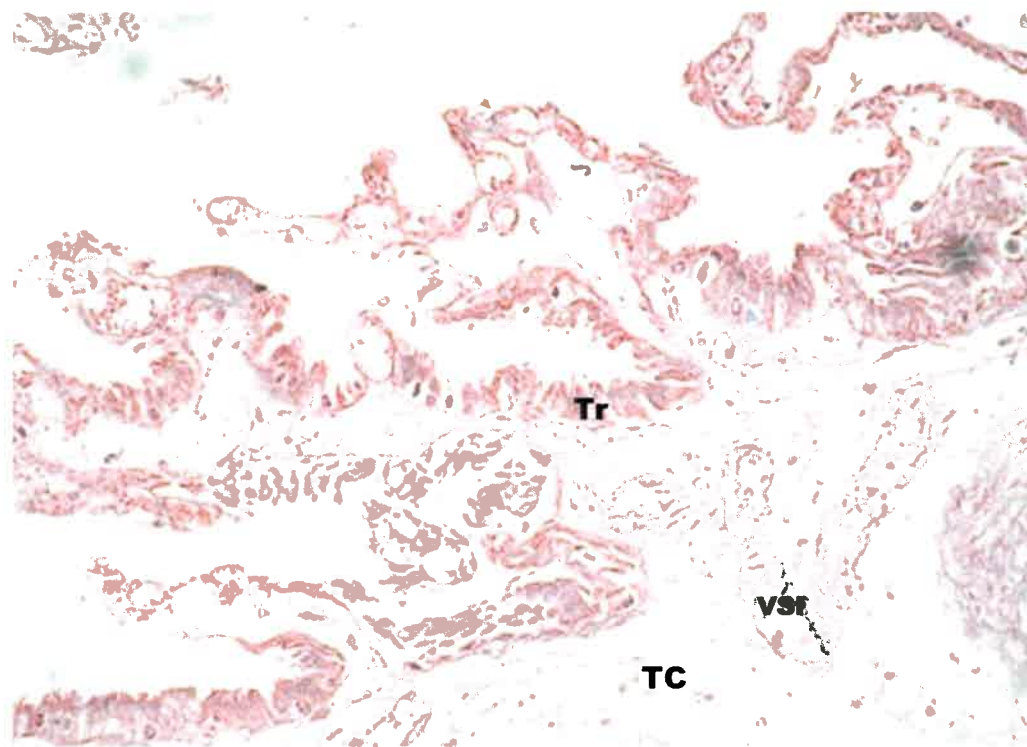
En la Fig. 4, en la zona interareolar, se distingue que los epitelios en las zonas donde están en contacto presentan parches de positividad a esta tinción. Por otra parte, se observa que el epitelio materno presenta con continuidad una banda PAS + a lo largo de la membrana basal.



**Fig. 4** Interfase de placenta de 35 días de gestación en zona interareolar. Se destaca la marcación PAS positiva en la membrana basal del epitelio uterino. (EU) epitelio uterino; (Tr) trofoblasto; (MB) membrana basal (X 1000).



La Fig. 5 corresponde a una placenta a término, en la cual puede observarse el epitelio trofoblástico, en parte, desgarrado por el desprendimiento durante el parto. La marcación PAS + en la zona apical de las células de las vellosidades y en la membrana basal, presenta una reacción menor que en otros periodos gestacionales, ya que la marcación se presenta en parches. Se distingue la disposición de una areola inserta en el tejido conectivo en adyacencia al epitelio trofoblástico.



**Fig. 5** Vellosidades trofoblásticas de una placenta a término. (Tr) trofoblasto; (A) areola; (VSf) vasos sanguíneos fetales; (TC) tejido conectivo (X 400).

De acuerdo a estos resultados, en donde se halló marcación positiva en tejidos que constituyen la placenta porcina dependiendo de los estadios gestacionales mediante la técnica de PAS, se continuó el estudio sobre residuos glicoconjugados mediante lectinas.

#### ***Determinación de residuos glicosilados mediante lectinas***

Se determinó la presencia de residuos glicosilados sobre cortes de tejido placentario provenientes de placentas porcinas de diferentes periodos gestacionales,

utilizando las siguientes lectinas: *Concanavalina A* (Con A), *Dolichus biflorus* (DBA), *Pisum sativum* (PSA), *Ulex europaeus* (UEA<sub>I</sub>), *Ricinus Communis* (RCA<sub>II</sub>), *Glycine max* (SBA).

En las Tablas III y IV se encuentran las marcaciones halladas para la lectina Con A en los tejidos placentarios de los diferentes estadios gestacionales estudiados.

En los tejidos correspondientes a útero vacío se analizó la marcación de esta lectina en epitelio uterino, tejido conectivo, glándulas y vasos sanguíneos adyacentes, observándose marcación positiva (+) continua, o (+) en parches en la membrana luminal de las células del epitelio y en las células endoteliales de los vasos adyacentes, siendo negativa la marcación en el tejido conectivo y las glándulas adyacentes.

En los tejidos placentarios maternos, Tabla III, correspondientes a los diferentes estadios gestacionales, se encontró marcación positiva en la membrana luminal y basal del epitelio de las vellosidades en todos los estadios evaluados (35, 55 y 70 días de gestación), como así también en el tejido conectivo.

En las glándulas se analizó la membrana celular que vuelca al lumen de la glándula, el citoplasma de la célula, la membrana basal y la secreción interna, siendo positivos en todos los casos, con diferente nivel de marcación, para todos los períodos excepto a los 70 días de gestación, donde no hubo marcación positiva en el citoplasma de las células del epitelio glandular.

En cuanto a los vasos sanguíneos se halló marcación positiva en el endotelio de capilares (+/++) y en los glóbulos rojos (+++), no observándose marcación en la membrana basal.

En los tejidos placentarios fetales, Tabla IV, se observó una fuerte marcación positiva en la membrana luminal del trofoblasto que contacta conformando la interfase en todos los períodos.

Diferente es la marcación que se observó en el citoplasma en donde fue negativa a los 55 días y en la lámina basal, la cual resultó únicamente positiva en los tejidos a término.

Con respecto a los vasos sanguíneos, se observó una marcación positiva en los vasos de todos los calibres en todos los períodos gestacionales, con excepción de los capilares intraepiteliales que en las placentas correspondientes a los 70 días de gestación presentaron endotelio negativo.

Días de gestación	Placenta Materna										
	Epitelio			Conectivo	Glándulas uterinas				Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal		Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal	Secreción	Endotelio capilares	Glóbulos rojos	Arterias/Venas
35 días	++ / ++ en parches	-	++	+	+	+	+++	++	+	+++	-
55 días	++/++ en parches	-	++	+	+	+	+++	++	+	+++	-
70 días	++	-	++	++	++	-	+	++	++	+++	++

Tabla III: Marcación de residuos glicosilados alfa D- manosil y alfa D- glucosil terminales por medio de lectina Con A en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.

Días de gestación	Placenta Fetal					
	Trofoblasto			Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Células	Lámina basal	Endotelio capilares	Glóbulos rojos	Arterias /Venas
35 días	+++	+	-	++	+++	++
55 días	+++	-	-	++	+++	++
70 días	+++	+	-	-	+++	+++
114 días	++	++	++	+	+++	++

Tabla IV: Marcación de residuos glicosilados alfa D- manosil y alfa D- glucosil terminales por medio de lectina Con A en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.



En las Tablas V y VI, se detallan las marcaciones halladas para la lectina DBA en los tejidos placentarios de los diferentes estadios gestacionales estudiados.

En las muestras de útero vacío se observó marcación en la membrana luminal y basal de las células epiteliales (++) , presentando tejido conectivo negativo. En las glándulas endometriales se observó marcación positiva (+) en la superficie luminal y en la secreción serosa que se encuentra en el interior.

En los tejidos placentarios de origen materno, las membranas plasmáticas lumbales de las células epiteliales denotaron una abundante y fuerte marcación en todos los periodos evaluados, mientras que el citoplasma celular y la lámina basal del epitelio se mostró negativa ante ésta marcación (Tabla V).

En las glándulas adyacentes, se observó marcación positiva (++) en la membrana luminal del epitelio y en la membrana basal en todos los períodos gestacionales evaluados, mientras que el citoplasma fue negativo en todos los casos.

En los tejidos fetales, Tabla VI, las membranas de las células trofoblásticas que contactan con el epitelio uterino fueron positivas siendo mayor la marcación en las correspondientes a placentas de hasta 35 y 55 días (+++) con respecto a la de 70 y 114 días (++) de preñez. En los citoplasmas se halló marcación positiva en las placentas de hasta 35 y 55 días, siendo negativas para los restantes períodos. La lámina basal, solo presentó marcación (+) en las placentas a término. En todos los casos estudiados, los endotelios de capilares fueron positivos.

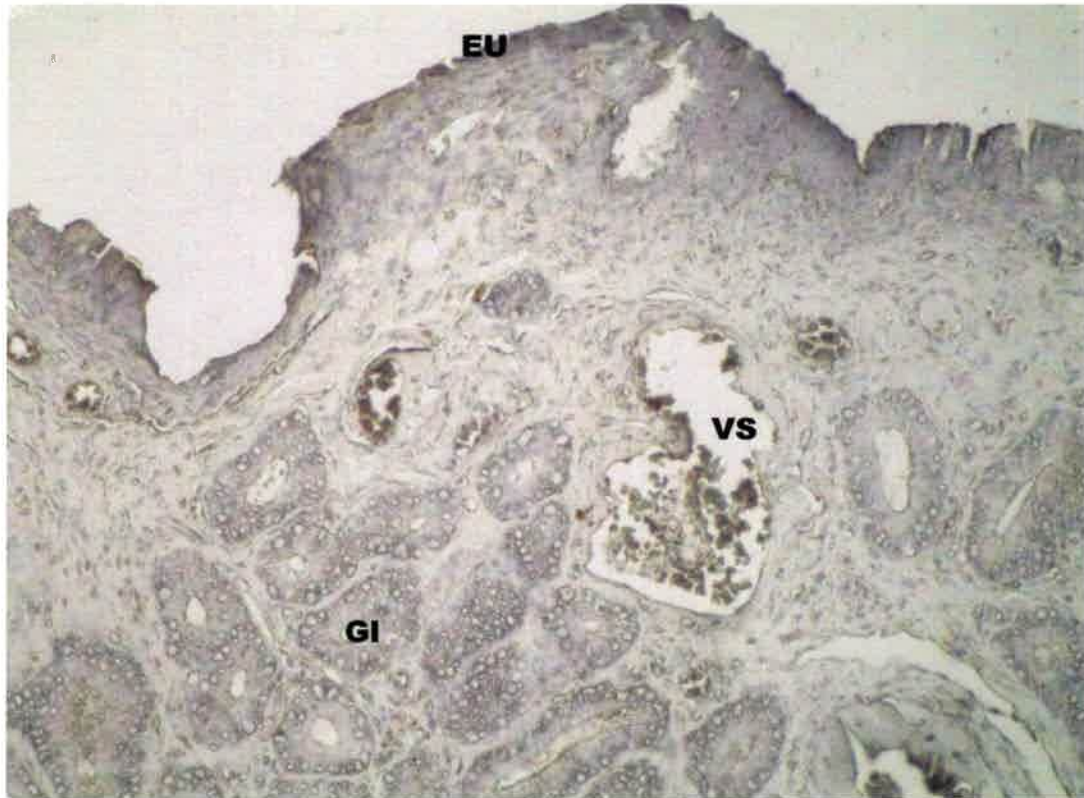
Días de gestación	Placenta Materna										
	Epitelio			Conectivo	Glándulas uterinas				Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal		Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal	Secreción	Endotelio capilares	Glóbulos rojos	Arterias/Venas
35 días	++ en parches	-	-	+	++ en parches	-	++ en parches	-	++	++	A + V -
55 días	++ en parches	-	-	+	++ en parches	-	++ en parches	-	++	++	A + V -
70 días	+++	-	-	-	++	-	++	-	++	++	-

**Tabla V:** Marcación de residuos N acetyl D- galactosamina terminal por medio de lectina DBA en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.

Días de gestación	Placenta Fetal					
	Trofoblasto			Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Células	Lámina basal	Endotelio capilares	Glóbulos rojos	Arterias /Venas
35 días	+++	++	-	++	+++	
55 días	+++	++	-	++	+++	
70 días	++	-	-	++	+++	
114 días	++	-	+	++	++	-

**Tabla VI:** Marcación de residuos N acetyl D- galactosamina por medio de lectina DBA en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.

En la lectinohistoquímica realizada para la lectina PSA, se observó que en los tejidos uterinos (Fig. 6) solo se evidenció marcación positiva en la membrana luminal del epitelio, además de en los glóbulos rojos.



**Fig. 6** Tejido uterino de cerda vacía marcado con lectina PSA. (EU) Epitelio luminal uterino con marcación positiva, (VS) vasos sanguíneos; (GI) glándulas uterinas (X 200).

En las Tablas VII y VIII se encuentran las marcaciones halladas para la lectina PSA en los tejidos placentarios de los diferentes estadios gestacionales estudiados.

En la tabla VII se observa que solo se halló marcación positiva (++/+++) en tejidos placentarios de origen materno de hasta 35 días de gestación en la membrana luminal, citoplasma del epitelio de la vellosidad y tejidos glandulares, mientras que la lámina basal del epitelio uterino fue ( $\pm$ ) y el tejido conectivo fue negativo (-).

Días de gestación	Placenta Materna										
	Epitelio			Conectivo	Glándulas uterinas				Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal		Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal	Secreción	Endotelio capilares	Glóbulos rojos	Arterias/Venas
35 días	++	++	+/-	-	+++	+++	+++	+/-	++	+++	-
55 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
70 días	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-

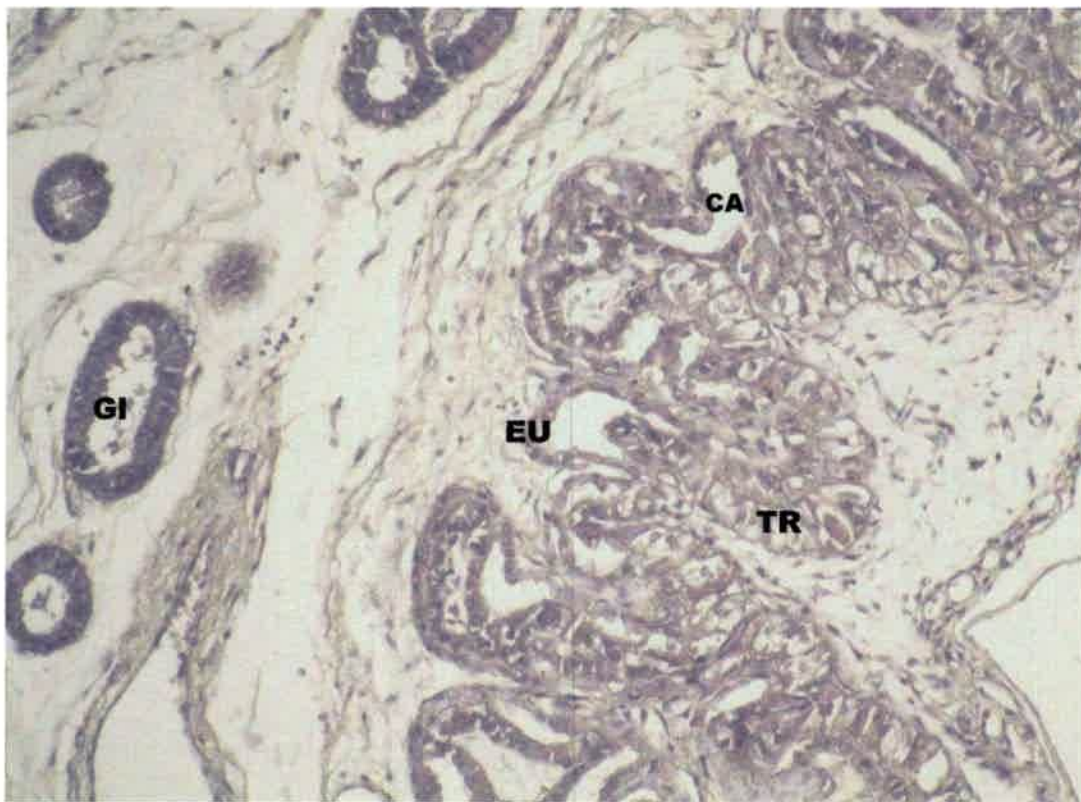
Tabla VII: Marcación de residuos alfa D glucosil y alfa D manosil por medio de lectina PSA en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.

Días de gestación	Placenta Fetal					
	Trofoblasto			Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Células	Lámina basal	Endotelio de capilares	Glóbulos rojos	Arterias / Venas
35 días	++	+	++	-	+++	-
55 días	-	-	-	-	+++	-
70 días	-	-	-	-	+++	-
114 días	-	-	-	-	+++	-

Tabla VIII: Marcación de residuos alfa D glucosil y alfa D manosil por medio de lectina PSA en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.

Para placentas de 55 y 70 días de gestación en todos los casos, la marcación fue negativa para todos los tejidos, con excepción de los glóbulos rojos.

En tejidos fetales sólo en el período de hasta 35 días se observa marcación positiva en la membrana luminal, células y membrana basal del trofoblasto. Para el resto de los períodos gestacionales evaluados, se observa una marcación negativa en todos los tejidos, evidenciando una gran diferencia con respecto a las lectinas anteriormente mencionadas. Solo se obtuvo marcación positiva (+++) en los glóbulos rojos hallados en los vasos sanguíneos de diferente calibre.



**Fig. 7** Interfase de placenta hasta 35 días de gestación marcada con lectina PSA. (EU) epitelio uterino; (Tr) trofoblasto; (CA) cavidad areolar; (GI) glándulas uterinas (X 400).



En las Tablas IX y X, se detallan las marcaciones halladas para la lectina RCA<sub>II</sub> en los tejidos placentarios de los diferentes estadios gestacionales estudiados.

En los tejidos placentarios maternos, Tabla IX, se observó que en el epitelio tanto de la membrana luminal como el citoplasma de las células presentaban marcación positiva (++) en todos los períodos estudiados, con la característica de los citoplasmas de las células epiteliales a los 70 días de gestación donde se observa la marcación desplazada hacia la zona apical de la célula.

La lamina basal se observó negativa y el tejido conectivo positivo (++/+) en todos los períodos evaluados.

Las estructuras glandulares presentaron variabilidad de marcación en los diferentes períodos. En placentas de hasta 35 días de gestación se observó que la membrana luminal y el citoplasma eran negativos, mientras que la membrana basal y la secreción eran positivas (++/+ respectivamente). A los 55 días toda la estructura glandular presentó negatividad y en placentas de 70 días solo la membrana luminal como la basal fueron positivas.

En todos los casos, se observó marcación positiva (++/+++) en endotelios de vasos sanguíneos de diferente calibre y glóbulos rojos.

En los tejidos fetales, Tabla X, el trofoblasto presentó marcación variable, siendo positiva en placentas de hasta 35 días de gestación en todas las estructuras. En placentas de 70 días de gestación es positiva la membrana luminal y el ápice celular (++/++ en parches respectivamente).

En placentas a término, solo se observa marcación positiva en parches en las membranas luminales de las células trofoblásticas. Los endotelios de los capilares y los glóbulos rojos se observaron positivos en todos los períodos evaluados, mientras que el tejido conectivo presentó negatividad con excepción de las placentas a término que se observaron positivas (++) .

Días de gestación	Placenta Materna										
	Epitelio			Conectivo	Glándulas uterinas				Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal		Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal	Secreción	Endotelio de capilares	Glóbulos rojos	Arterias/Venas
35 días	++	++	-	++	-	-	++	+	++	+++	++
55 días	+++	++	-	++	-	-	-	-	++	+++	++
70 días	++	++(Solo apical)	-	+	++	-	++	-	++	+++	+++

Tabla IX: Marcación de residuos  $\beta$  D galactosil terminales por medio de lectina RCA<sub>II</sub> en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.

Días de gestación	Placenta Fetal					
	Trofoblasto			Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Células	Lámina basal	Endotelio de capilares	Glóbulos rojos	Arterias / Venas
35 días	+++	++	++	+++	+++	+++
55 días	ND	ND	ND	ND	ND	ND
70 días	++	++ (Solo apical)	-	++	+++	+++
114 días	+ (En parches)	-	-	+	++	++

Tabla X: Marcación de residuos  $\beta$  D galactosil terminales por medio de lectina RCA<sub>I</sub> en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.

En las Tablas XI y XII, se detallan las marcaciones halladas para la lectina UEA, en los tejidos placentarios de los diferentes estadios gestacionales estudiados.

En los tejidos de origen materno, Tabla XI, se observó una marcación positiva para todos los períodos en la membrana luminal y en el citoplasma de las células epiteliales, mientras que la membrana basal se observó positiva en placentas de 70 días de gestación (+++). El tejido conectivo presentó positividad (+/++) para todos los períodos estudiados.

En los tejidos fetales, Tabla XII, se observó en todos los períodos evaluados marcación positiva en la membrana luminal de las células trofoblásticas y negativa en la membrana basal, mientras que el citoplasma se presentó positivo solo en placentas de hasta 35 días de gestación.

En los vasos sanguíneos adyacentes se observó negatividad en todas las células, con excepción del endotelio de arterias y venas al final de la gestación.

Se observó una particularidad de marcación en el tejido conectivo de placentas de 114 días de gestación. En el estroma del córion, el conectivo se presentó con una marcación positiva (++), y a partir de la zona en donde comienza a organizarse estructuralmente la ramificación de la vellosidad (la base de la vellosidad hasta el ápice de la misma) el tejido conectivo que sostiene al trofoblasto y capilares se torna negativo (Fig. 8).

Días de gestación	Placenta Materna										
	Epitelio			Conectivo	Glándulas uterinas				Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal		Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal	Secreción	Endotelio de capilares	Glóbulos rojos	Arterias/Venas
35 días	++	++	-	+	++	++ (Solo apical)	-	++	+	-	+
55 días	++	++	-	++							
70 días	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	-	-	-

Tabla XI: Marcación de residuos L- fucosa por medio de lectina UEA<sub>1</sub> en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.

Días de gestación	Placenta Fetal					
	Trofoblasto			Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Células	Lámina basal	Endotelio de capilares	Glóbulos rojos	Arterias / Venas
35 días	+++	+	-	-	-	-
55 días	ND	ND	ND	ND	ND	ND
70 días	++ (En parches)	-	-	-	-	-
114 días	+++	-	-	-	+++	++

Tabla XII: Marcación de residuos L- fucosa por medio de lectina UEA<sub>1</sub> en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.





**Fig. 8** Placenta de 114 días de gestación marcada con lectina UEA<sub>1</sub>. Se observa una marcación diferencial entre el tejido conectivo del estroma del córion con respecto al estroma de la vellosidad. (Tr) trofoblasto; (VSf) vasos sanguíneos fetales; (Ec) estroma del córion; (Ev) estroma de la vellosidad (X 400).

En las Tablas XIII y XIV, se detallan las marcaciones halladas para la lectina SBA en los tejidos placentarios de los diferentes estadios gestacionales estudiados.

En todos los estadios evaluados, en el epitelio de los tejidos placentarios maternos, la membrana luminal y el citoplasma celular se observaron marcadamente positivos (+++), mientras que la membrana basal se observó negativa y el tejido conectivo positivo (++) . Los tejidos glandulares presentaron positividad de marcación en todas las estructuras con excepción del citoplasma celular y la lámina basal de las placentas de 35 días de gestación. Algo similar ocurrió con los vasos sanguíneos adyacentes, en donde se observó positividad de endotelios (+/++) en todos los períodos con excepción de las arterias y venas que presentaron negatividad en las placentas de hasta 35 días de gestación.

En los tejidos fetales, las células trofoblásticas presentaron positividad de marcación (+/+++) en la membrana basal, el citoplasma celular y la lámina basal, con excepción de la lámina basal de las placentas de 70 días de gestación que se observaron negativas. El endotelio de los capilares se observó positivo en placentas de 70 y 114 días, tanto en los capilares intraepiteliales como en los vasos de diferente calibre.

En la Fig. 9 se muestra la estructura areolar positiva a la marcación con la lectina SBA a los 70 días de gestación, en donde se observa la negatividad de marcación en el tejido conectivo que conforma el estroma de las vellosidades.

Días de gestación	Placenta Materna										
	Epitelio			Conectivo	Glándulas uterinas				Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal		Memb. luminal	Citoplasma	Lámina basal	Secreción	Endotelio de capilares	Glóbulos rojos	Arterias/Venas
35 días	+++	++	-	++	+	-	-	++	+	+	-
55 días	+++	+++	-	++	++	+	++	++	+	++	++
70 días	+++	++	-	++	+++	++	++	+	++	++	ND

Tabla XIII: Marcación de residuos N- acetyl D galactosamina por medio de lectina SBA en tejidos placentarios maternos en diferentes estadios gestacionales.

Días de gestación	Placenta Fetal					
	Trofoblasto			Vasos sanguíneos adyacentes		
	Memb. luminal	Células	Lámina basal	Endotelio de capilares	Glóbulos rojos	Arterias /Venas
35 días	++	++	++	-	+	-
55 días	ND	ND	ND	ND	ND	ND
70 días	++	+	-	++	++	ND
114 días	+++	+++	+++	++	+++	++

Tabla XIV: Marcación de residuos N- acetyl D galactosamina por medio de lectina SBA en tejidos placentarios fetales en diferentes estadios gestacionales.



**Fig. 9** Interfase feto materna de una placenta de 70 días de gestación marcada con lectina SBA. (EU) epitelio uterino; (Tr) trofoblasto; (CA) cavidad areolar; (A) areolas (X 400).



## Estudio de la ultraestructura placentaria

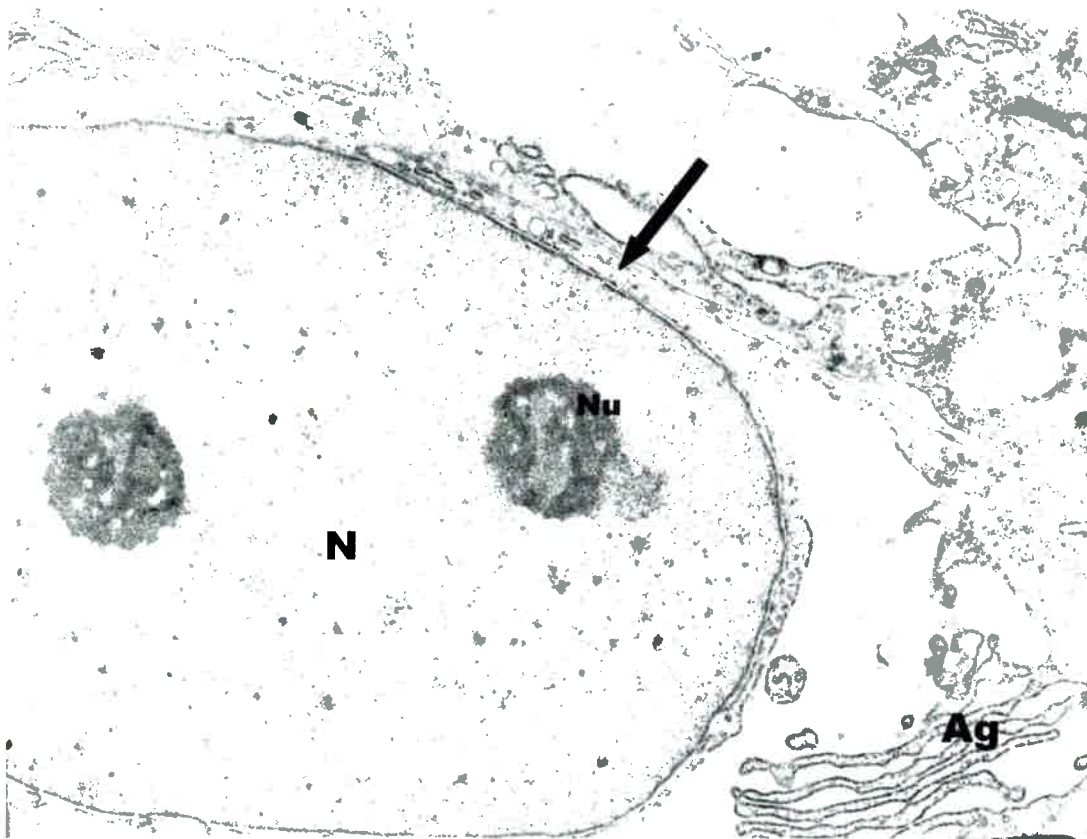
En la interfase feto materna interareolar correspondiente a una placenta de 28 días de gestación, se observa a las células del epitelio materno y fetal que se oponen para conformar la interfase, caracterizada por una interdigitación de microvellosidades que ya en este período gestacional puede apreciarse en forma íntegra. En el epitelio materno se observan gránulos electrodensos en la región apical de la célula y se destacan las uniones cerradas entre células epiteliales vecinas, resultados que concuerdan con estudios realizados por Koncurat y col. (2001).

En las células epiteliales de origen fetal pueden distinguirse los complejos de unión intercelulares, como así también el escaso número de organelas citoplasmáticas, con excepción de las mitocondrias que se encuentran en gran cantidad.

En placentas correspondientes al período gestacional que ronda los 50-60 días, se obtuvieron muestras del tejido placentario interfásico y de la zona necrótica de la placenta de origen fetal. Las Fig. 10 y 11 corresponden a placentas de dicho período gestacional obtenido de la zona de intercambio materno fetal y la Fig. 12 de la zona necrótica.

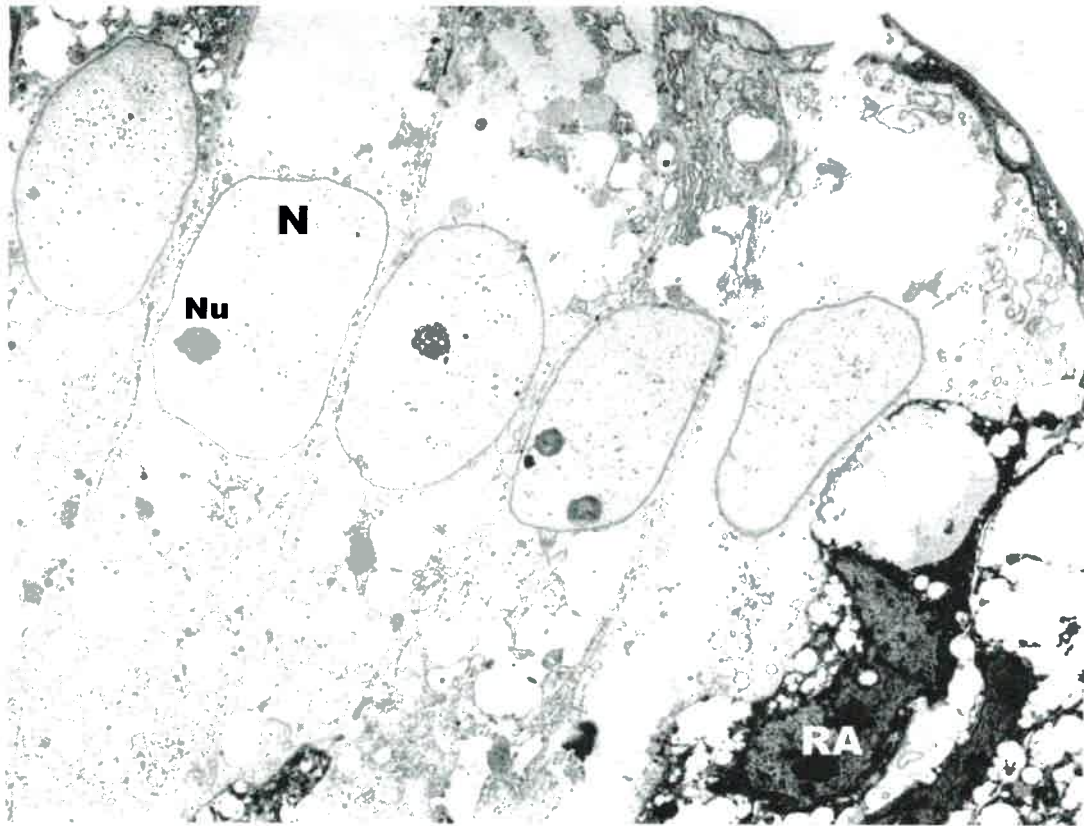
La célula de origen fetal de la Fig. 10, presenta un núcleo en donde se evidencia la integridad de la membrana nuclear con la disposición de sus poros, ADN dispuesto como eucromatina y se destaca la presencia de dos nucleolos.

La alta actividad nuclear se corresponde con un citoplasma que evidencia el aparato de Golgi bien desarrollado (se detalla la presencia de túbulos cis y trans), retículo endoplásmico liso, rugoso y mitocondrias.



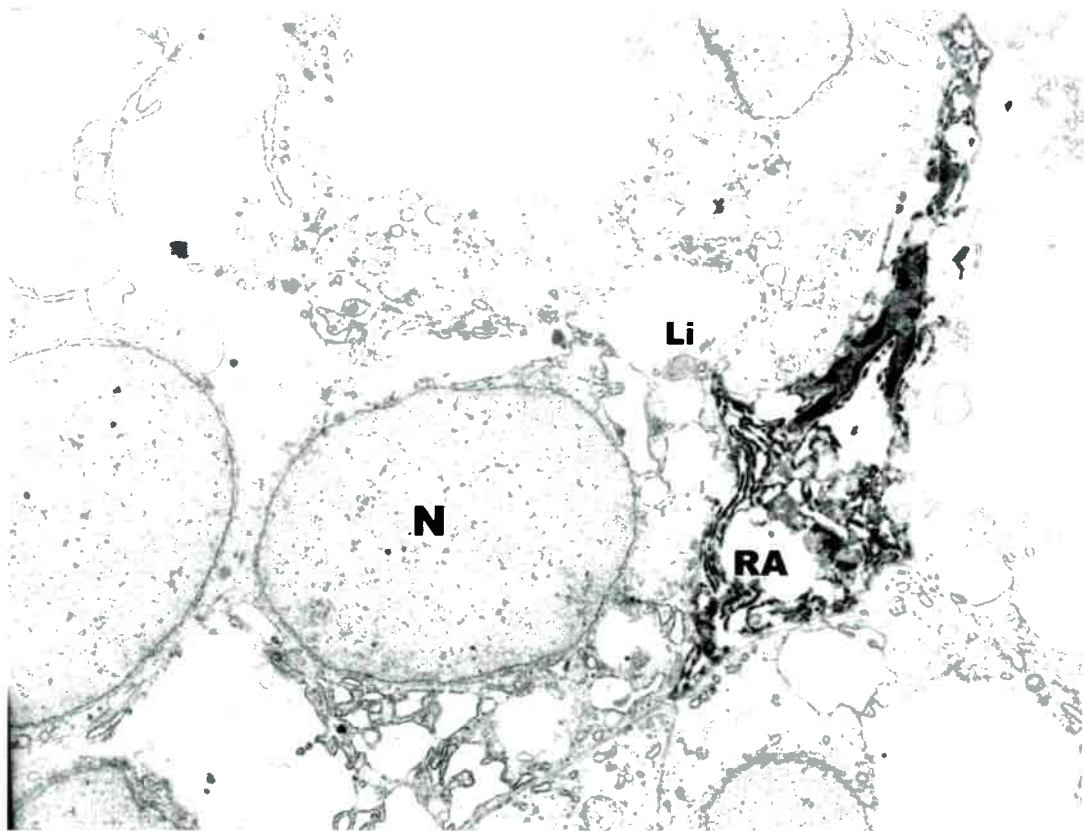
**Fig. 10** Microfotografía de célula trofoblástica de 55 días de gestación. (N) núcleo; ( ← ) poro nuclear; (Nu) nucléolo; (AG) aparato de Golgi (X 11.000).

En la microfotografía de la Fig. 11, se muestra la disposición del trofoblasto de la zona areolar, donde se observan la zona de epitelio cilíndrico con alta actividad biosintética demostrada por la presencia en los núcleos de eucromatina y grandes nucleolos, y la abundancia de organelas intracitoplasmáticas. A la derecha de la imagen se aprecian restos apoptóticos por lo que se demuestra que el epitelio placentario fetal es una zona de remodelación celular.



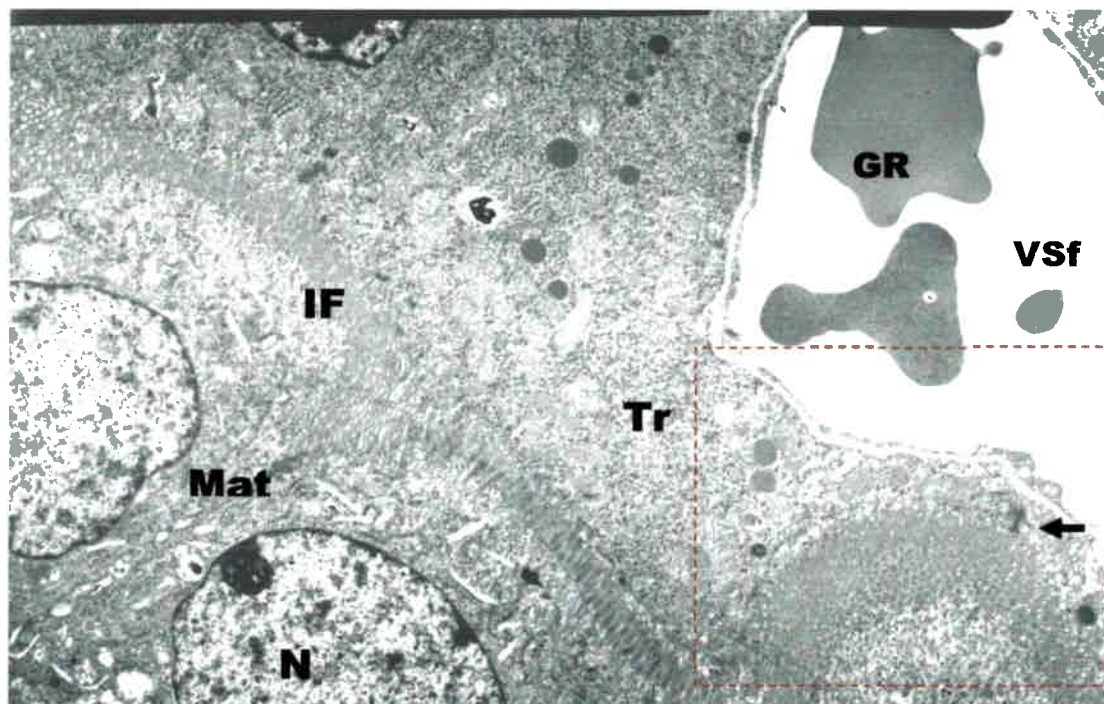
**Fig. 11** Microfotografía de trofoblasto areolar a los 55 días de gestación. (N) núcleo; (Nu) nucléolo; (RA) restos apoptóticos (X 4.000)

La Fig. 12 corresponde también a placenta del período gestacional de 55 días, pero en este caso la muestra fue obtenida de la zona necrótica de la placenta. Se observa que hay zonas de desorganización celular, con engrosamiento de las membranas y presencia de endosomas y lisosomas, con espacios intercelulares dilatados y restos apoptóticos.

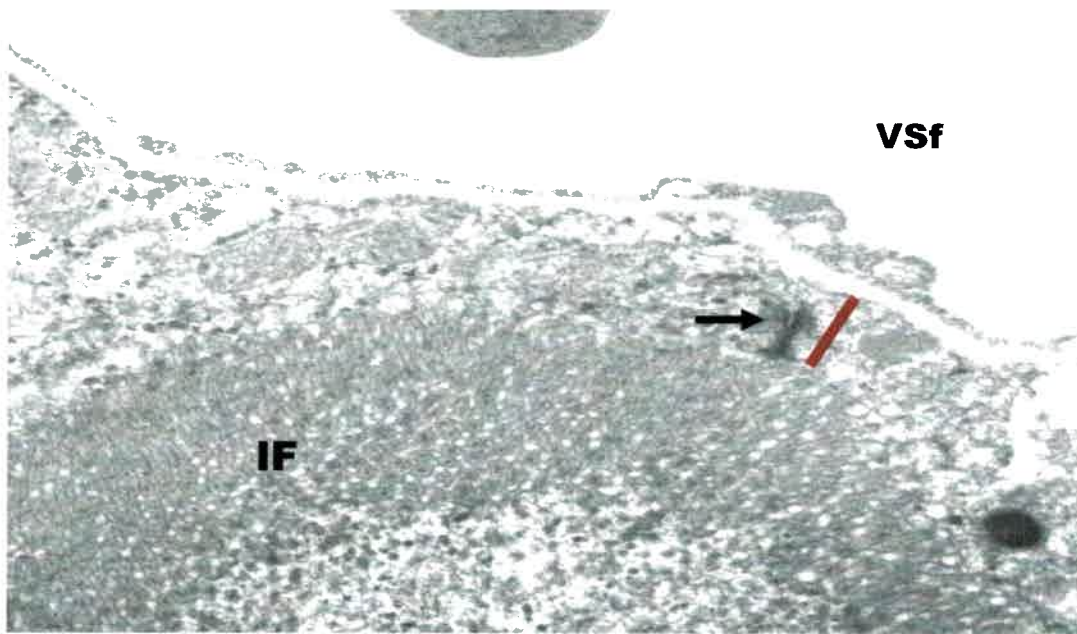


**Fig. 12** Células fetales de la zona necrótica de placenta de 55 días de gestación. (N) núcleo; (Li) lisosomas, (RA) restos apoptóticos (X 7.500).

La Fig. 13 corresponde a una placenta de 70 días en la zona de interfase placentaria, donde se puede observar cortes longitudinales y transversales de las microvellosidades que interdigitan. En este período gestacional la zona de intercambio se encuentra aumentada por microvellosidades ramificadas. En la zona fetal se observa que las células poseen gránulos electrodensos intracitoplasmáticos abundantes y mitocondrias. Se destaca el capilar intraepitelial con la integridad del endotelio y la cercanía de este a la zona de interdigitación. Se puede documentar que la distancia mínima entre la interfase y el endotelio es de  $\pm 0,6 \mu\text{m}$  y que ese espacio se encuentra entre los citoplasmas de dos células trofoblásticas relacionadas por un complejo de unión. Esta zona se destaca en la figura con un recuadro, el cual fue ampliado en la Fig. 14 para observar en detalle la disposición de las microvellosidades interfásicas en relación al endotelio.



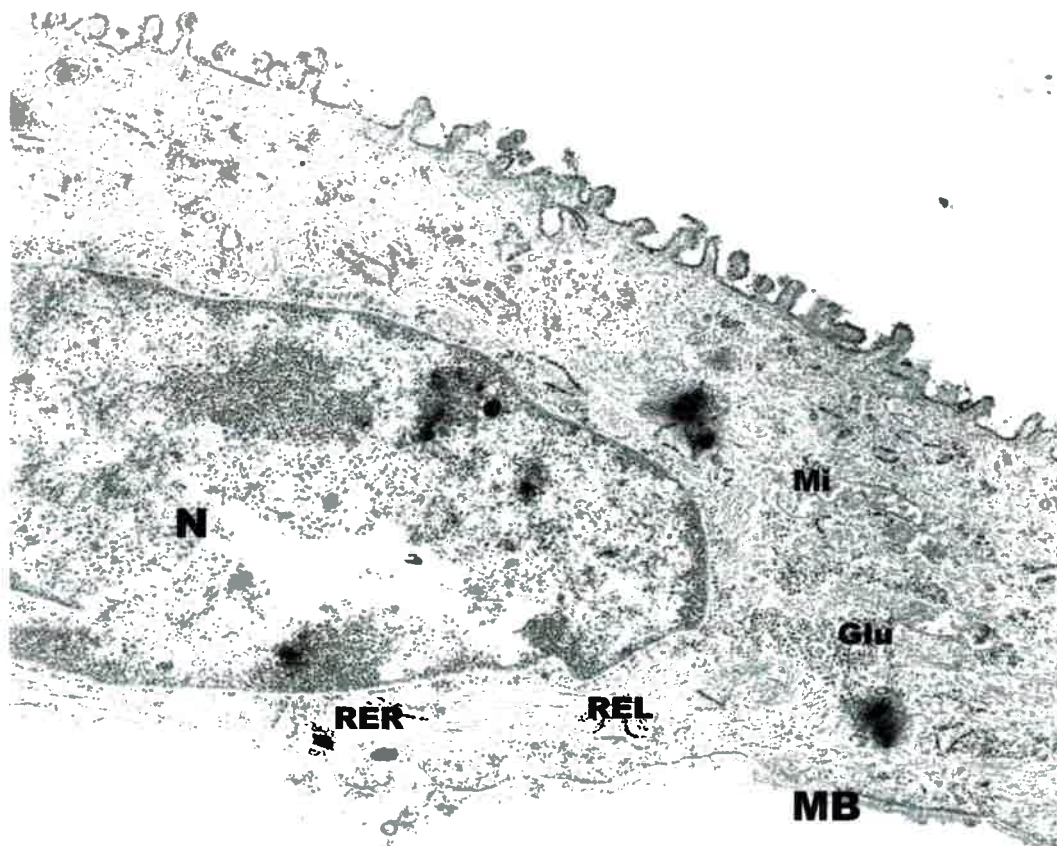
**Fig. 13** Fotografía electrónica de una interfase feto-materna correspondiente a una placenta porcina de 70 días de gestación. (IF) interfase; (Mat) epitelio materno; (Tr) trofoblasto; (GR) glóbulos rojos; (VSf) vaso sanguíneo fetal; (N) núcleo, ( ← ) unión oclusiva (X 9.000).



**Fig. 14** Ampliación de Figura la 13. Corresponde a una placenta porcina de 70 días de gestación en donde se resalta con una banda roja ( — ) la distancia entre el capilar de origen fetal y la interdigitación de las vellosidades de la interfase feto materna. (IF) interfase; (VSf) vaso sanguíneo fetal; (→ ) unión oclusiva (X 21.500).

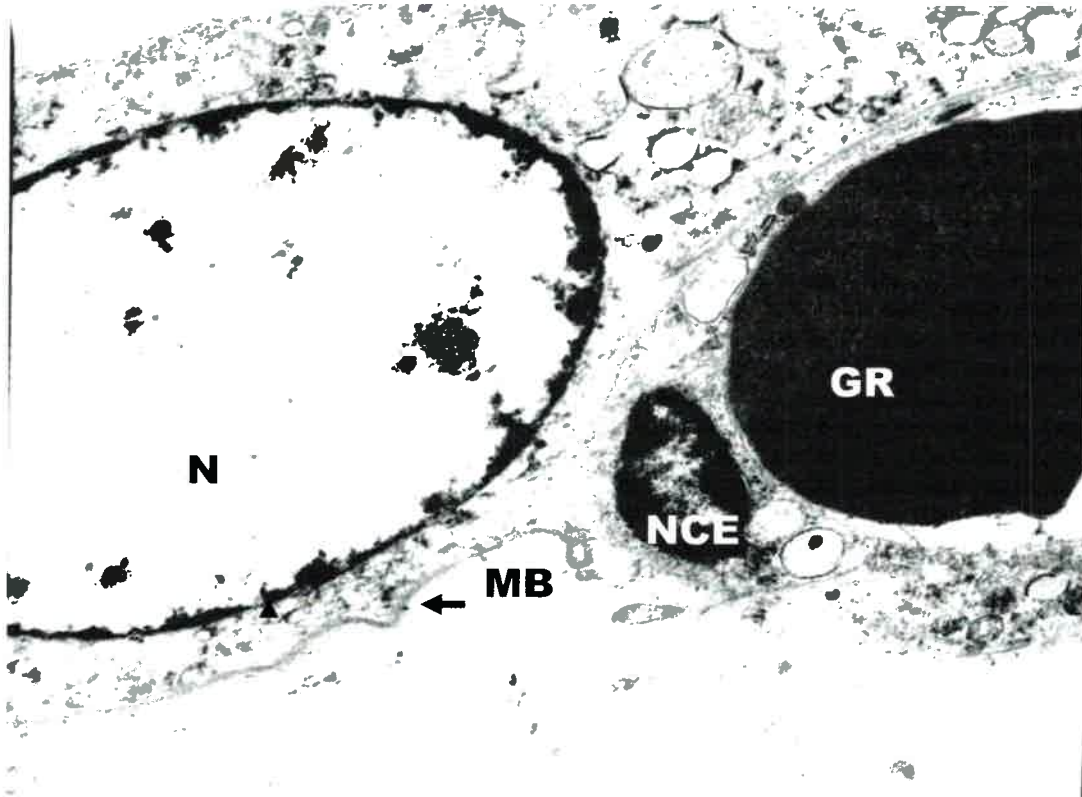
Las figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23 corresponden a imágenes obtenidas de placentas de 114 días de gestación expulsadas durante partos normales, donde se podrá observar una gran variedad en la morfología celular.

En la Fig. 15 se muestra la disposición del tejido placentario fetal. Puede observarse, en continuidad con la membrana nuclear, el retículo endoplásmico rugoso continuado con el retículo endoplásmico liso. Se observa citoplasma finamente granular por la presencia de glucógeno y abundantes mitocondrias. Se destaca la membrana basal del epitelio y la continuidad con el tejido conectivo.



**Fig. 15** Microfotográfica de célula trofoblástica correspondiente a una placenta porcina a término. (N) núcleo; (RER) retículo endoplásmico rugoso, (REL) retículo endoplásmico liso, (Glu) glucógeno, (MB) membrana basal, (Mi) mitocondrias (X 16.200).

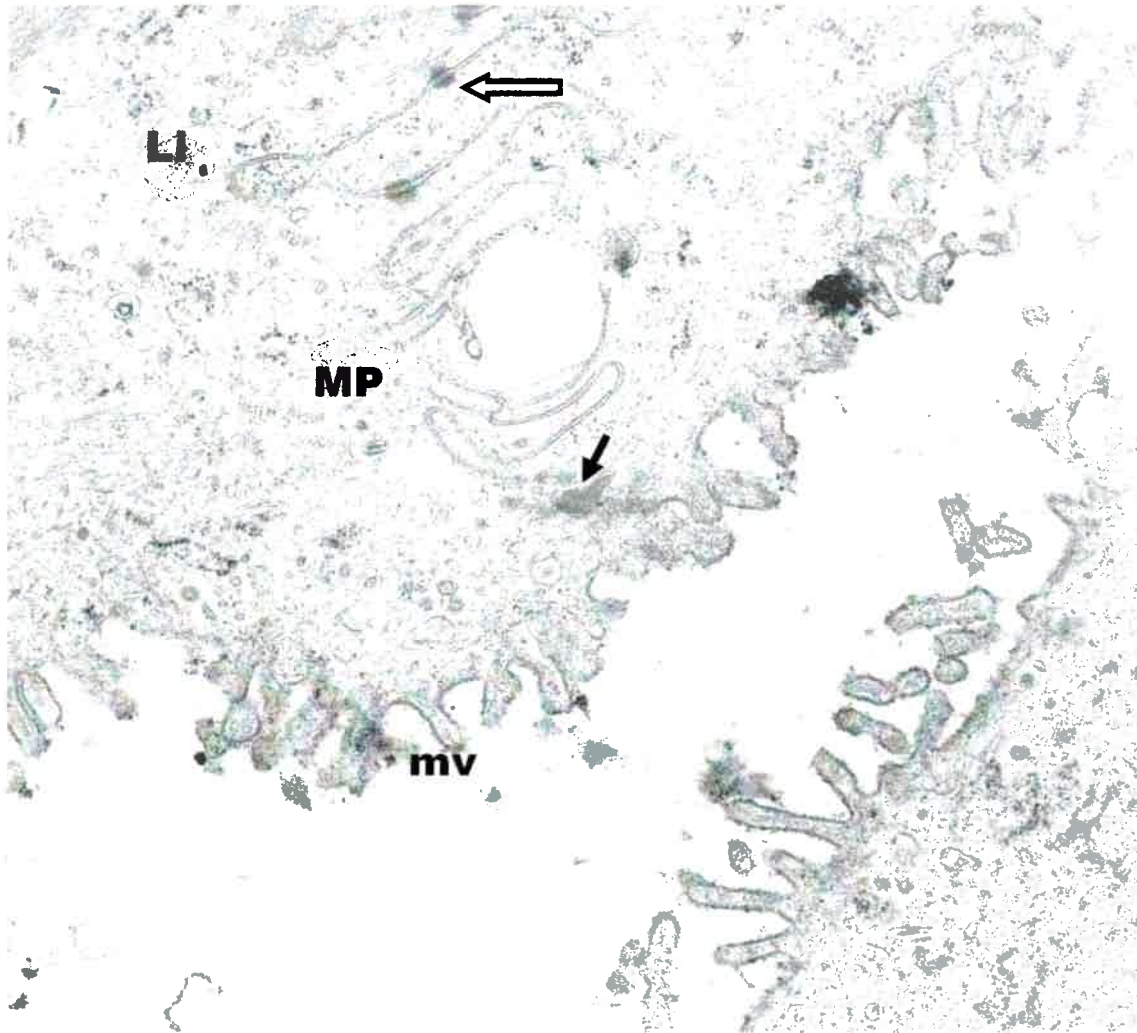
En la Fig. 16 se destaca la disposición de una célula placentaria fetal en relación al capilar intraepitelial, observándose la continuidad de la membrana basal epitelial como parte de las capas que deben atravesar los nutrientes en este tipo placentario. Se observa la presencia de uniones de tipo hemidesmosomas entre la membrana basal y el tejido conectivo, mientras que en la zona de relación con el capilar intraepitelial se encuentran ausentes.



**Fig. 16** Microfotografía de célula trofoblástica de placenta porcina a término en relación a un capilar intraepitelial. (N) núcleo; (NCE) núcleo de la célula endotelial; (GR) glóbulo rojo; (MB) membrana basal, (←) unión hemidesmosoma (X 15.500).



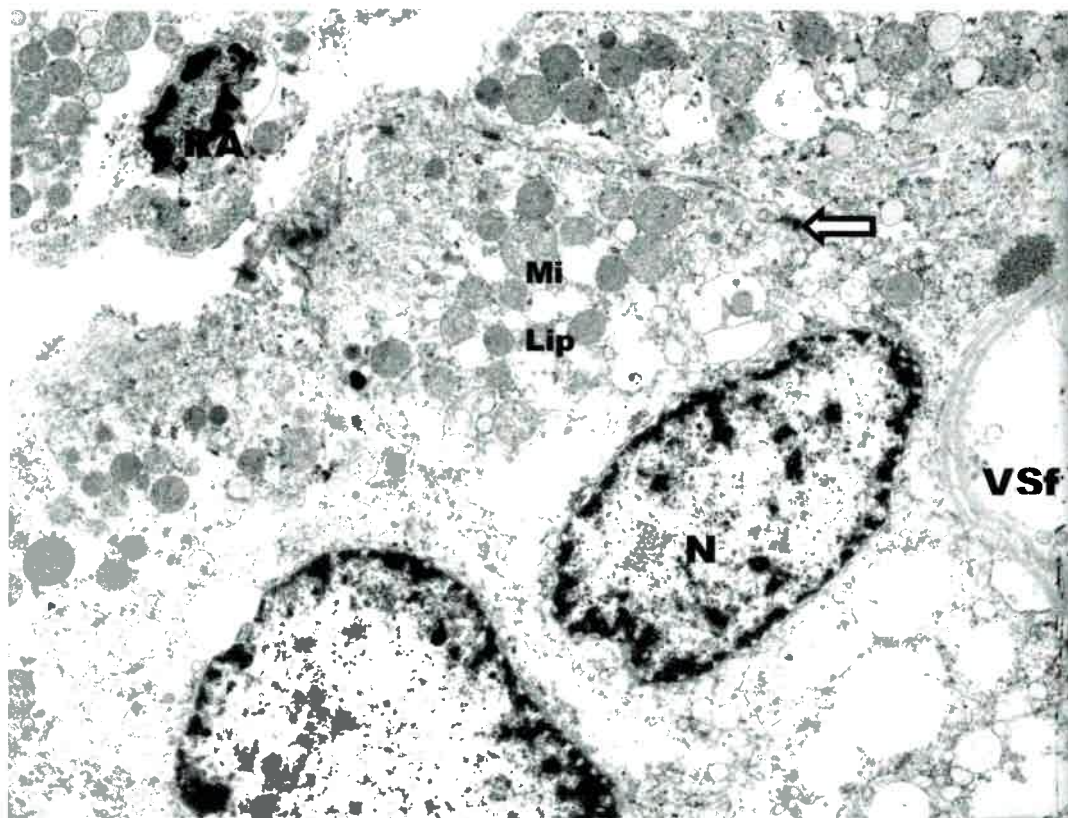
En la Fig. 17 puede observarse las membranas citoplasmáticas de dos células adyacentes con uniones de tipo desmosómicas y complejos de unión. Nuevamente puede describirse la presencia de abundantes vesículas endocíticas y lisosomas, así como también el escaso desarrollo de las vellosidades.




**Fig. 17** Células coriónicas de zona necrótica de una placenta porcina a término. (MP) membrana plasmática; (Li) lisosomas; (←) unión oclusiva; (↔) desmosoma; (mv) microvellosidades (X 24.700).

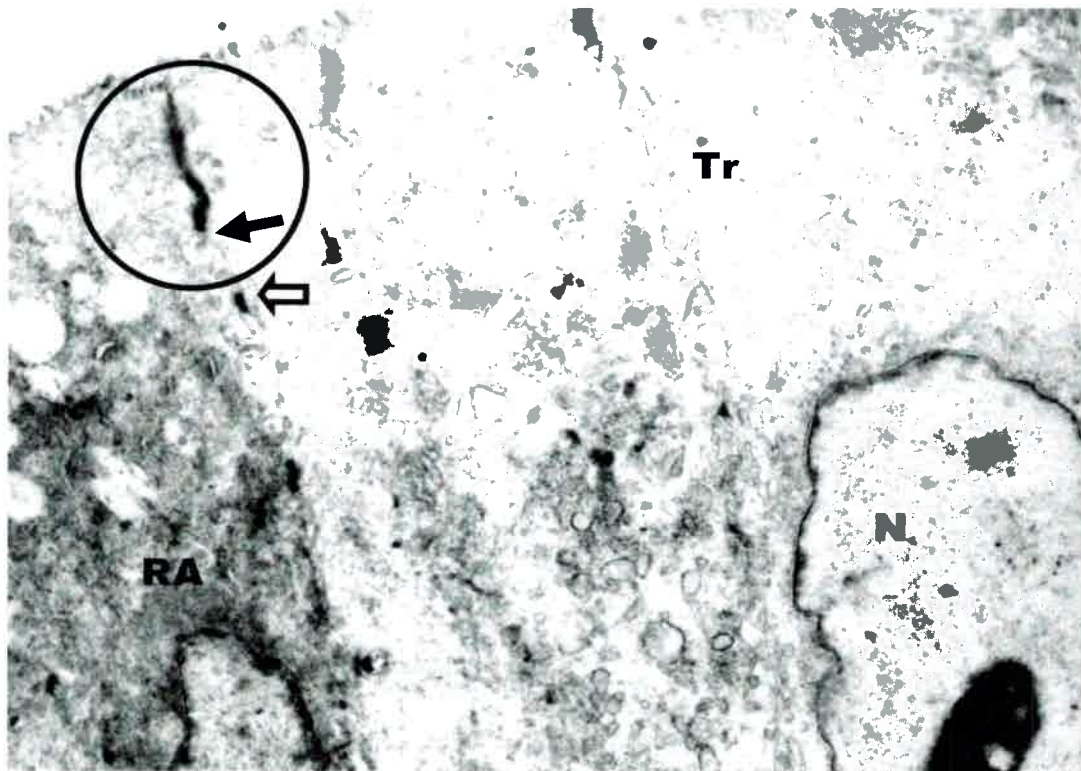
En la Fig. 18 puede observarse la estructura de células trofoblásticas funcionales a término. Nótese que estas placentas se han recogido al momento de la parición, luego del desprendimiento del saco coriónico del epitelio uterino, por lo cual ya no se observan en las células las microvellosidades desarrolladas sino solo restos de ellas. También quedan demarcados como espacios no electrodensos las dilataciones de la interfase materna fetal ocupada antes por las vellosidades.

Puede observarse la ausencia de organelas como el aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y liso. El citoplasma celular muestra abundantes gotas lipídicas, observadas como espacios sin contrastación y sin membrana celular, asociadas espacialmente con elevada cantidad de mitocondrias, probablemente debido a la elevada síntesis de estrógenos. Además, se observan restos apoptóticos.



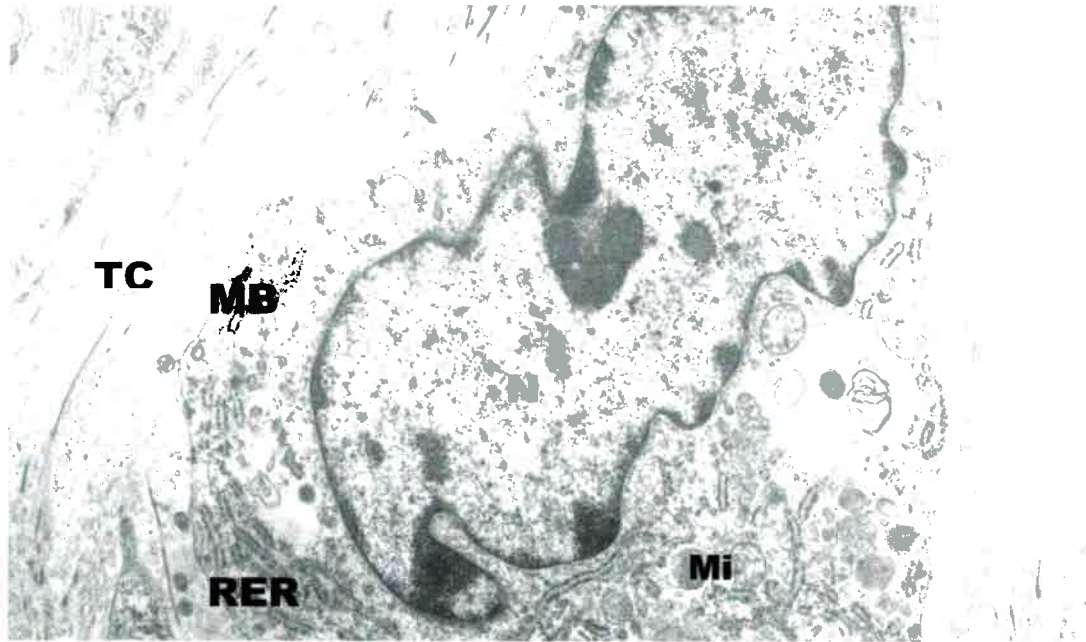
**Fig. 18** Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término. (N) núcleo; (Mi) mitocondrias; (Lip) gotas lipídicas; ( ) desmosomas; (RA) restos apoptóticos; (VSf) vaso sanguíneo fetal (X 9.000)

Nótese que en esta etapa las células trofoblásticas presentan además de las uniones desmosómicas descritas, complejos de unión de tipo uniones oclusivas, como se evidencia en la Fig. 19. Además se destaca la presencia de material electrodens entre el lumen y la unión oclusiva que correspondería a la denominada "laguna" de nutrición histiotrofa.

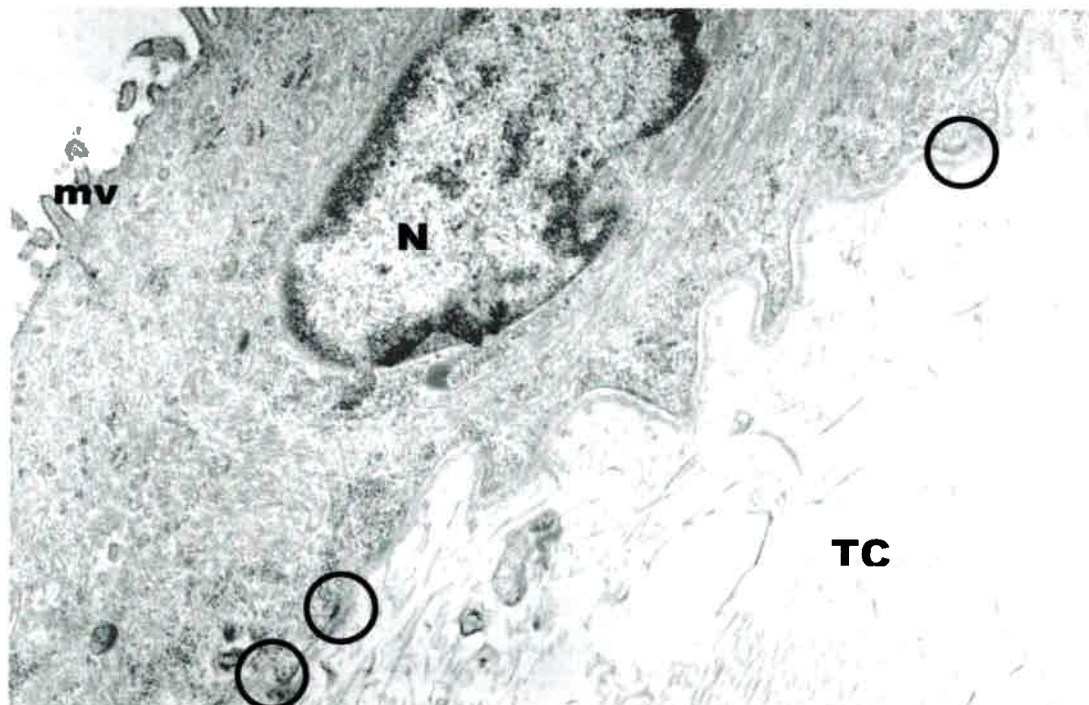


**Fig. 19** Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término. (Tr) trofoblasto; (N) núcleo; (Nu) nucléolo; (↔) desmosoma; (←) unión oclusiva; (○) laguna de nutrición histiotrofa; (RA) restos apoptóticos (X 6.400).

En las Fig. 20 y 21 puede observarse células trofoblásticas cuyo núcleo posee cromatina granular, también se destacan la presencia de organelas como retículo endoplásmico liso, rugoso y abundantes mitocondrias. Además, en la Fig. 21, se observan depósitos electrodensos en la membrana luminal de los restos de vellosidades correspondientes al glucocáliz y en la membrana basal complejos de unión tipo hemidesmosomas.

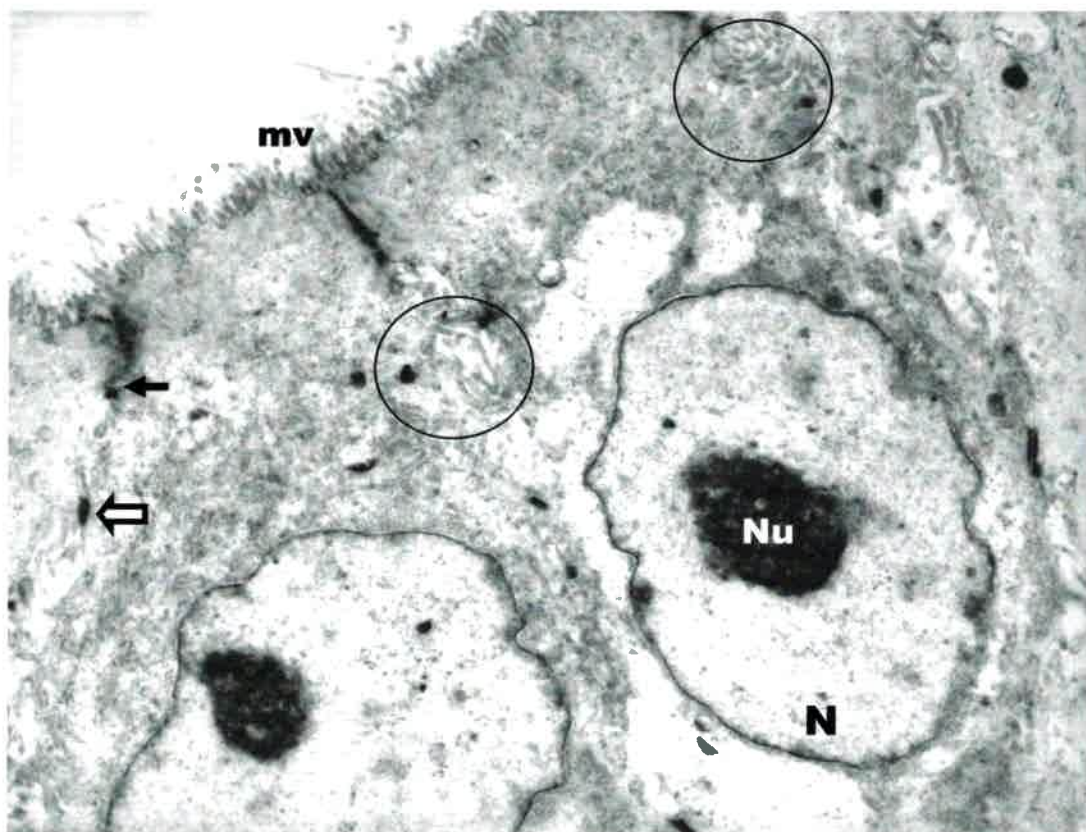


**Fig. 20** Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término. (N) núcleo; (RER) retículo endoplásmico rugoso; (Mi) mitocondrias; (TC) tejido conectivo (MB) membrana basal (X 14.400).



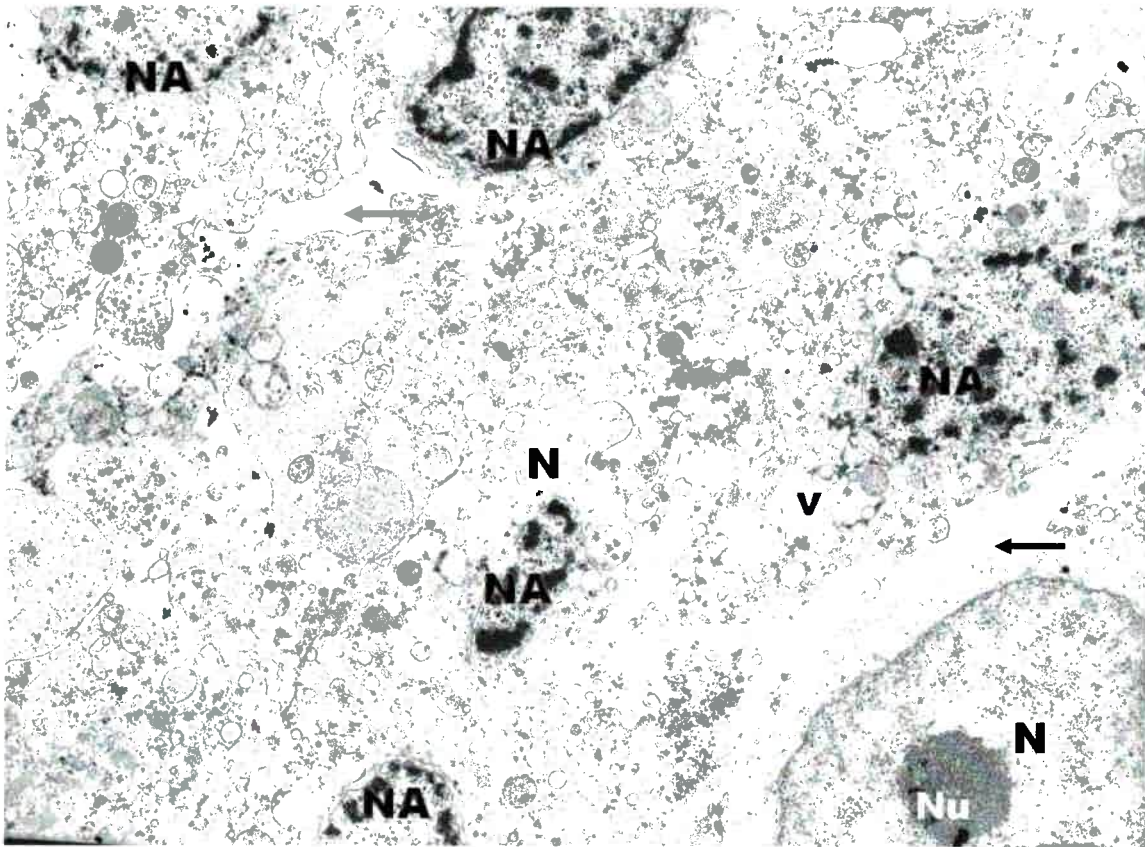
**Fig. 21** Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término. (mv) microvellosidades; (N) núcleo; (○) uniones hemidesmosomas; (TC) tejido conectivo (X 19.000).

Otras organizaciones celulares pueden describirse en la Fig. 22, en donde se aprecia núcleos con euromatina y nucléolo evidente. Estas células activas se encuentran unidas entre sí por complejos de unión tipo oclusivas. Se puede observar por debajo de dichas uniones estructuras membranosas que representan numerosos pliegues de membranas laterales sobre sí mismas, lo cual permitiría aumentar el área de contacto entre células vecinas colaborando en el mantenimiento de la estructura del órgano.



**Fig. 22** Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término. (N) núcleo; ( ← ) unión oclusiva; ( ⇨ ) desmosomas ( ○ ) estructuras membranosas; (Nu) nucléolo; (mv) microvellosidades (X 7.500).

En otras zonas de estas mismas placentas a término se pudo observar zonas en donde las células muestran claros signos de apoptosis. En la Fig. 23 se evidencian núcleos con cromatina en forma de cuentas de rosario, pérdida de contacto intercelular, citoplasma vacuolar y numerosas gotas lipídicas en este caso sin asociación física con mitocondrias. No se halló evidencia de putrefacción en el examen anátomo patológico realizado al momento de recolección de la muestra. Probablemente los cambios tisulares ultraestructurales sean producidos por el desprendimiento de la porción placentaria fetal del epitelio uterino durante el parto.



**Fig. 23** Fotografía electrónica de trofoblasto de una placenta porcina a término. (N) núcleo; (NA) núcleos apoptóticos ( ← ) pérdida de contacto intercelular; (v) vacuola; (Nu) nucléolo (X 9.000).

## DISCUSION

## DISCUSION

Debido a las funciones que desempeña la placenta, la diferenciación de este órgano transitorio es crucial para el desarrollo fetal, estando relacionado su crecimiento con la capacidad en el traslado de nutrientes (Wu *et al.*, 2006). Se conoce que el desarrollo placentario porcino, desde la implantación hasta el término, ocurre mediante un crecimiento de masa, marcada diferenciación celular y angiogénesis.

En los tractos reproductivos de cerdas mestizas utilizados durante este estudio se pudo observar que, en preñeces de hasta 35 días de gestación, el desarrollo del feto en longitud y en peso aumentan gradual y linealmente con respecto al tiempo de gestación y que ésta situación se sostenía hasta el período que rondaba los 55 días de gestación.

La implantación del *conceptus* porcino se lleva a cabo en la denominada ventana de implantación, comprendida entre los 10 a 17 días post fertilización. Durante este período sufre una rápida y marcada elongación el trofoblasto a fin de delimitar el espacio uterino que ocupará durante la gestación (Wilson *et al.*, 2000). Hasta los 30 días de gestación el embrión aumenta pobremente en masa dado que las membranas trofoblásticas placentarias fetales se encuentran realizando el proceso de aposición y adherencia al epitelio uterino en el fenómeno denominado de reconocimiento materno fetal. Este análisis concuerda con los aportes de Kaufmann and Burton (1994), quien marca que en las primeras etapas de desarrollo embrionario en las diferentes especies de mamíferos predomina la diferenciación de los tejidos y no el crecimiento de la masa fetal. La importancia del tema es tal que según Ashworth *et al.*, (2001), el proceso de implantación y desarrollo placentario hasta los 29 días de gestación sería determinante para el peso de los fetos a término.

Rondando los 50 a 55 días de gestación se detectó que pequeños cambios de longitud fetal van acompañados de grandes variaciones de peso (ver Gráfico III). Ese aumento en masa del feto puede correlacionarse con estudios realizados por Merkis y col., (2005) que indican que a esa fecha ya se ha producido un incremento pronunciado en el número de vasos de pequeños calibres tanto en la placenta uterina como en la fetal. Además, según datos aportados por Wootton *et al.*, (1977) existiría una relación positiva entre la vascularización y el peso fetal.

Si bien existen datos de que el desarrollo placentario en cerdas se completaría a los 60 - 70 días de gestación (Wilson and Ford, 2001), Merkis y col., (2006) encuentran que a partir de esa fecha, en cerdas mestizas de nuestra región, hay desarrollo marcado de vasos de mayor calibre conjuntamente con un aumento de las





arborizaciones de las interdigitaciones placentarias, lo que redundaría en una mayor eficiencia del transporte de nutrientes, y a consecuencia de ello el feto podría aumentar su masa en forma potencial como se observa en los resultados.

Por otro lado, los resultados hallados concuerdan con los estudios realizados por Knight *et al.*, (1977), los que indican que el peso fetal aumenta 30 g/ día entre los 90 a 100 de gestación y 80 g/ día entre los 100 a 114 días de gestación, y se evidencian en la curva de tipo potencial del peso con respecto al tiempo de gestación hallada en este estudio (ver Gráfico III).

Muchos de los procesos biológicos fundamentales desencadenados por la interacción célula - célula dependen de la interacción de moléculas de glicoconjugados, glicoproteínas y glicolípidos presentes en ambas membranas celulares, y estudios realizados en la placentación porcina indican que estas interacciones influyen en el desarrollo temprano del *conceptus* y participan en la inhibición de la respuesta inmune materna (Szafranska *et al.*, 2004).

En los resultados aportados por la técnica de PAS pudo observarse que el útero vacío de la cerda es positivo a esta tinción tanto en el epitelio como en las glándulas.

Un vez establecido el contacto entre los epitelios maternos y fetales, y desencadenada la diferenciación placentaria, la disposición de las moléculas de glicoconjugados varía, siendo notoria su disposición en parches en las zonas de íntimo contacto de los epitelios materno-fetal, mientras que en las zonas areolares ambos epitelios se mantienen positivos a lo largo de la gestación con esta técnica. La banda de marcación positiva observada en la membrana basal del epitelio placentario materno podría representar una barrera molecular continua de separación del epitelio placentario materno del resto del tejido uterino. Dicha barrera podría ser una de las formas de evadir la respuesta inflamatoria instalada en el útero para no interferir en la interfase propiamente dicha (Roberts *et al.*, 1996; Engelhardt *et al.*, 2002a y 2002b) y contribuir al enmascaramiento de antígenos (Jones *et al.*, 1995 y Aplin, 1999) para facilitar la tolerancia fetal. Estos resultados concuerdan con los aportes realizados por Aplin (1999) que indican que los glicoconjugados se expresan durante toda la gestación y desempeñan un rol crucial en la implantación, diferenciación y mantenimiento de la preñez.

Dados los resultados obtenidos con la técnica PAS en la marcación de gliconjugados, se profundizó su estudio mediante la determinación específica de la presencia de ciertos residuos glicosilados a través del uso de lectinas.

Jones *et al.*, (1997), postulan que existen patrones de glicosilación específicos para cada especie mamífera y que disturbios en la interacción molecular causan alta mortalidad embrionaria. Al realizar el estudio de las seis lectinas detalladas, se comprobó que en las placentas de las cerdas mestizas evaluadas hubo variación de marcación para cada una de las lectinas en las diferentes estructuras tisulares, tanto de la placenta fetal como de la materna, y que esas variaciones también se manifestaban para cada una de las lectinas en los diferentes estadios gestacionales.

Se pudo observar que existen residuos que solo se manifiestan en los procesos de placentación correspondientes a estadios tempranos de preñez. Es así que la expresión de residuos alfa-D-man y alfa-D-gluc no terminal solo son expresados por los epitelio fetal, materno y estructuras glandulares de placentas que corresponden al período de hasta los 35 días de gestación. Estos resultados difieren de los obtenidos por Jones (1995) en placentas provenientes de cerdas de la raza Danish Landrace, que si bien no realiza la marcación de residuos terminales con la lectina Con A, cuando evalúa la presencia de residuos no terminales de alfa-D-man y alfa-D-gluc encuentra una marcación positiva en los epitelios materno y fetal en todos los estadios gestacionales.

En los residuos de L-fucosa se observa marcación solo en las membranas luminales tanto maternas como fetales, dato que difieren a los presentados por Jones (1995) en donde la expresión sobre el trofoblasto es negativa y solo se observa expresión positiva en epitelio materno de cerdas desde los 40 días de gestación hasta el término.

En la expresión de residuos N Acetyl galactosamina terminal y no terminal, alfa-D-man y alfa-D-gluc terminales se puede observar que la marcación es positiva en las membranas luminales del trofoblasto fetal y epitelio materno en toda la gestación, datos que coinciden con los trabajos desarrollados por Jones *et al.*, (2000) en placentas epiteliocoriales de camélidos y equinos a término.

En los epitelios trofoblástico y uterino, la expresión de los residuos alfa-D-man y alfa-D-gluc no terminales serían importantes en los procesos iniciales de

interdigitación placentaria, mientras que el resto de los residuos evaluados cumplirían funciones en los procesos de interacción placentaria en los estadios en los que se produce un aumento significativo del área superficial de contacto entre ambos epitelios.

No es coincidente para todos los residuos evaluados que las expresiones en epitelios, membrana basal y endotelios sea correspondida con una marcación positiva en las estructuras glandulares uterinas, tanto celulares como en la secreción interna.

Así, para los residuos N Acetyl galactosamina terminales y no terminales que presentan marcación positiva en los epitelios de la interfase, se observa que la marcación de la secreción glandular es negativa; mientras que en el resto de los residuos evaluados la secreción glandular coincide con el marcaje hallado en los epitelios. Este fenómeno puede estar relacionado a que algunos residuos glicosilados cumplen su rol en la interacción célula-célula, mientras que otros, además de esa función, son componentes de moléculas glicosiladas relacionadas con la nutrición histiotrófica.

Por otra parte, se observó en los endotelios de los vasos maternos y fetales diferencias en las expresiones entre residuos y en diferentes estadios gestacionales. De los residuos glicosilados evaluados,  $\alpha$ -D-man,  $\alpha$ -D-gluc y L-fucosa no se manifiestan en la membrana luminal del endotelio de los vasos, tanto de menor como de mayor calibre. En los trabajos de Jones *et al.*, (1995) en cerdas de raza Danish y de Santos *et al.*, (2006) en pecaríes, utilizan lectinas para comparar marcajes de residuos glicosilados en epitelios maternos y fetales, pero no obtienen resultados de los patrones de expresión en los epitelios de los vasos de diferente calibre. En la revisión bibliográfica realizada solo se ha hallado la expresión de residuos de carbohidratos sobre capilares fetales en placentas a término en un trabajo de Jones *et al.*, (1997), también realizado en cerdas puras Danish landrace, donde los resultados con respecto a los residuos fucosados son coincidentes con los obtenidos en este trabajo. Además, encuentran positividad para los residuos  $\alpha$ -D-man y  $\alpha$ -D-gluc no terminales a diferencia de lo hallado en este trabajo.

Con respecto a la positividad hallada en la membrana basal del epitelio materno con la técnica de PAS, se puede agregar que, de los residuos glicosilados

evaluados mediante lectinas, solo  $\alpha$ -D-man y  $\alpha$ -D-gluc terminales y no terminales contribuyen con esa marcación positiva durante toda la gestación.

No ha sido descrito en la placenta porcina el patrón de expresión de residuos glicosilados en el tejido conectivo. En este trabajo los residuos evaluados presentan positividad de expresión en todos los estromas de las placentas uterinas en casi todos los periodos gestacionales, aunque su nivel de expresión varía. La excepción es la negatividad expresada en el tejido conectivo materno para los residuos  $\alpha$ -D-man y  $\alpha$ -D-gluc en todos los períodos gestacionales. En el tejido conectivo del córion fetal es notoria, en la expresión de glicoconjugados fucosados, la disposición de positividad en el estroma que sustenta el tejido coriónico y la negatividad presentada en el estroma de las vellosidades que sustenta al trofoblasto y a los capilares intraepiteliales de placentas a término (ver Fig. 8), pudiendo este fenómeno estar relacionado con la señalización molecular en el momento del parto.

Jones *et al.* (1995), en placentas provenientes de cerdas Danish Landrace, correlaciona la variabilidad de la expresión de residuos glicosilados con estudios de ultraestructura celular placentaria.

En todos los períodos gestacionales las interdigitaciones están demarcadas por depósitos electrodensos correspondientes a la deposición del tetróxido de osmio y citrato de plomo sobre el glicocalix celular. Dado el tipo de placenta epiteliocorial, la distancia descrita entre los capilares maternos y fetales es amplia, lo cual dificulta la difusión de sustancias y gases, en especial el oxígeno. Podría esta disposición morfológica correlacionarse con los datos hallados sobre el crecimiento en este trabajo, en donde el crecimiento embrionario en masa es menor en este período gestacional.

En placentas que rondan los 70 días de gestación, período en el cual el crecimiento en masa del embrión es potencial según nuestros hallazgos, ésta situación se modifica totalmente, tanto en dimensiones de la interfase como en la distancia de los vasos intraepiteliales a la interfase propiamente dicha. La interfase en este período se observa como una banda sustancialmente más ancha y con mayor densidad de interdigitaciones. Además, la zona de interfase feto materna se halla a una distancia

mucho menor de los vasos intraepiteliales fetales que los descritos en placentas más jóvenes.

En trabajos realizados por Friess *et al.*, (1980) se detalla que la distancia de los capilares fetales a la interfase feto materna es de  $\pm 2 \mu\text{m}$  y en los trabajos de Santos *et al.*, (2006) detallan que la barrera placentaria posee  $3 \mu\text{m}$  de grosor en cerdos de la especie *Tayassu tajacu*. En este trabajo se documenta un capilar fetal que se encuentra a una distancia de  $\pm 0,6 \mu\text{m}$  de la interfase feto materna y que, además, esa distancia física se encuentra mejorada fisiológicamente por la presencia de un complejo de unión entre células trofoblásticas que delimitan gran parte de esa distancia (Ver Fig 13 y 14).

En placentas de 55 días de gestación puede observarse que los núcleos de las células trofoblásticas fetales poseen alta actividad biosintética dado la presencia de eucromatina, nucleolos evidentes y una carioteca con un número alto de poros nucleares. Estos resultados concuerdan con los conocimientos generales de biología celular que expresan que cuanto más activa sea la transcripción nuclear, mayor será el número de poros presentes en la envoltura nuclear (Cross and Mercer, 1993). Las características nucleares se corresponden con las características citoplasmáticas encontradas, como la presencia de organelas, tales como aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso. Estas características celulares son descritas por varios autores (Dantzer, 1981; Wooding, 2003; Santos *et al.*, 2006; Enders *et al.*, 2006), e indicarían alta actividad mitótica correspondiente a un trofoblasto en activo crecimiento a fin de realizar frondosas interdigitaciones. En las diferentes células trofoblásticas observadas pueden describirse gránulos de glucógeno intracitoplasmáticos, forma de almacenamiento energético necesario para la biosíntesis celular. Además, en esta zona de células trofoblásticas de alta actividad biosintética, se hallan células con núcleos apoptóticos que se encuentran esporádicamente entre las células columnares trofoblásticas, posiblemente para permitir la remodelación celular placentaria que posibilite el crecimiento fetal.

Estos patrones celulares se modifican en las células de la zona necrótica placentaria a los 55 días de gestación, en donde se observa que los núcleos adquieren una posición central y ocupan gran parte del citoplasma celular, que en algunos casos pierde su organización. Entre las células puede apreciarse uniones de tipo desmosómicas preponderantemente. Pueden observarse espacios intercelulares amplios con restos de citoplasmas y núcleos apoptóticos.

En placentas porcinas a término, en coincidencia con Dantzer (1984), se halló abundantes lisosomas en las células trofoblásticas; y en los citoplasmas del epitelio trofoblástico gotas lipídicas asociadas espacialmente a mitocondrias con morfología redondeada (ver Fig. 18). Esta característica fue descrita en placentas epiteliocoriales de camélidos por Wooding (2003), quien las detalla como gotas lipídicas asociadas a retículo endoplásmico y a mitocondrias relacionadas con la síntesis de hormonas esteroideas y es coincidente con los trabajos de Cross (1993), quien también describe la morfología mitocondrial redondeada asociada a células productoras de hormonas esteroideas. Estos datos se corresponden, además, con estudios bioquímicos realizados en nuestro laboratorio, en el cual medios condicionados de placentas porcinas de este período gestacional producen mayores cantidades de hormonas esteroideas comparado a niveles sistémicos dosados en suero (Vivas y col., 1998).

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- Los residuos de glicoconjugados estudiados presentan patrones en los diferentes tejidos que constituyen la placenta porcina en los distintos estadios gestacionales estudiados, y por ser cerdas mestizas los patrones descritos son diferentes a los hallados en razas puras.
- La banda de marcación PAS positiva observada en la membrana basal del epitelio placentario materno podría representar una barrera molecular continua de separación del epitelio placentario materno del resto del tejido uterino. Dicha barrera podría ser una de las formas de evadir la respuesta inflamatoria instalada en el útero.
- La estructura y ultraestructura de las células placentarias estudiadas en los diferentes periodos gestacionales se puede relacionar con los cambios fisiológicos que ocurren durante la gestación porcina, ya que explican los fenómenos asociados a la diferenciación placentaria que repercuten en el desarrollo embrionario y fetal.
- Se destaca en cerdas mestizas que la distancia entre vasos sanguíneos fetales y la interfase feto materna de 70 días de preñez es de 0,6  $\mu\text{m}$ , la cual es sustancialmente menor a la publicada hasta la fecha en cerdas puras.



# PERSPECTIVAS

## PERSPECTIVAS

Conocer los mecanismos íntimos de la placentación porcina permitirá mejorar el rendimiento de la producción y la salud animal de esta especie.

- Investigaciones interdisciplinarias concerniendo las áreas de fisiología reproductiva, nutrición y biología vascular podrán desempeñar un importante papel en la generación de nuevas tecnologías y herramientas para el correcto manejo de cerdas preñadas.
- El estudio de la angiogénesis, teniendo en cuenta la organización vascular, la localización de los factores angiogénicos y la diferenciación de las células endoteliales permitirá comprender la vascularización de la placenta.
- Indagar la remodelación celular placentaria durante la gestación porcina aportará conocimientos claves que permitan comprender las diferentes funciones que desempeña este órgano.



## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- Amoroso EC. (1952) Placentation. In: Parkes AS (ed) Marshall's Physiology of Reproduction, vol 2, 3<sup>rd</sup> ed. London: Longmans Gren, 127-311.
- Aplin J. (1999) MUC-1 glycosilation in endometrium: possible roles of the apical glycocalix at implantation. *Hum Reprod*, **14** (Suppl 2): 17-25.
- Aplin J. (2000) Maternal influences on placental development. *Semin Cell Dev Biol*, **11**: 115-125.
- Ashworth CJ, Finch SM, Page KR, Nwagwu MO, Mac Ardle HJ (2001) Causes and consequences of fetal growth retardation in pigs. *Reprod Suppl*, **58**: 233-246.
- Atkinson YH, Gogolin-Ewens KJ, Hounsell F, Davies MJ, Brandonm MR, Seamark RF. (1993) Characterization of placentation – specific binucleate cell glycoproteins possessing a novel carbohydrate. *J. Biol Chem*, **268** (35): 26679-26685.
- Biensen NJ, Wilson ME, Ford SP. (1999) The impacts of uterine environment and fetal genotype on conceptus size and placental vascularity during late gestation in pigs. *J Anim Sci*, **77**: 954-959.
- Bosch RA, Alanis GA, Allende RA, Blanch MS, Bosch P, Callejas S. (2001) En: Actualización en temas de reproducción animal. Compilador, Bosch RA. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, 150-152.
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. (2000) Embryo implantation. *Dev Biol*, **223**: 217-237.
- Cross PC and Mercer KL. Cell and tissue ultraestructura. A functional perspective (1993) Ed. Freeman and Company. USA. ISBN: 0 -7167 -7033 -4.
- Dantzer V, Björkman N and Hasselager E (1981). An electron microscopic study of histiotrophe en the interareolar part of the porcine placenta. *Placenta*, **2**: 19-28.
- Dantzer V, Leach L, Leiser R. (2000) Angiogenesis and placental vasculature. A workshop report. *Placenta*, **21** (Suppl A): S69-70.
- Dantzer V, Winther H (2001) Histological and immunohistochemical events during placentation in pigs. *Reprod Suppl*, **58**: 209-222.
- Dantzer V. (1984) An extensive lysosomal system in the maternal epithelium of the porcine placenta. *Placenta*, **5**: 117-130.
- Enders AC, Carter AM (2006) Comparative placentation: some interesting modifications for histotrophic nutrition – A review. *Placenta*, **27** (Suppl A): S30-33.
- Engelhardt H, Croy BA, King GJ. (2002a) Conceptus influences the distribution of uterine leukocytes during early porcine pregnancy. *Biol Reprod*, **66**: 1875-1880.

- Engelhardt H, Croy BA, King GJ. (2002b) Evaluation of natural killer cell recruitment to embryonic attachment sites during early porcine pregnancy. *Biol Reprod*, **66**: 1185-1192.
- Friess AE, Sinowatz F, Skolek-Winnisch R, Trautner W. (1980) The placenta of the pig. *Anat Embryol*, **158**: 179-191.
- Glauert AM (1975). In: *Practical methods in electron microscopy*. American Elsevier Publishing Co. Inc New York.
- Goldstein MH, Bazer FW, Barron DH. (1980) Characterization of changes in volume, osmolarity and electrolyte composition of porcine fetal fluids during gestation. *Biol Reprod*, **22**: 1168-1180.
- Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. (2001a) Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod*, **65**: 1311-1323.
- Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, Spencer TE. (2001b) Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol Reprod*, **64**: 1608-1613.
- Hayat MA. (1981) *Fixation for electron microscopy*. Academic Press Inc. London.
- Hayat MA. (1986) *Basic techniques for transmission electron microscopy*. Academic Press Inc. London.
- Johansson S, Dencker L, Dantzer (2001) Immunohistochemical localization of retinoid binding proteins at the materno-fetal interface of the porcine epitheliochorial placenta. *Biol Reprod*, **64**: 60-68.
- Jones CJP, Dantzer V, Leiser R, Krebs C and Stoddart RW. (1997) Localisation of glycans in the placenta: a comparative study of epitheliochorial, endotheliochorial, and haemomonochorial placentation. *Microscopy Research and Technique*, **38**: 100-114.
- Jones CJP, Dantzer V, Stoddart R. (1995) Changes in glycan distribution within the porcine interhaemal barrier during gestation. *Cell Tissue Research*, **279**: 551-564.
- Jones CJP, Santos TC, Abd-Elnaeim M, Dantzer V, Miglino MA. (2004) Placental glycosylation in Peccary species and its relation to that of swine and dromedary. *Placenta*, **25**: 649-657.
- Jones CJP, Wooding FBP, Abd-Elnaeim, Leiser R, Dantzer V and Stoddart RW. (2000) Glycosylation in the near-term epitheliochorial placenta of the horse, donkey and camel: comparative study of onterbreeding and non-interbreeding species. *J Reprod and Fert*, **118**: 397-405
- Kaufmann P, Burton G. (1994) *The Physiology of Reproduction*. -Chapter 8, Second Edition (ed) Knobil and Neill, Raven Press, Ltd, N.Y.
- Keys JL, King GJ. (1990) Microscopic examination of porcine conceptus-maternal interface between days 10 and 19 of pregnancy. *Am J Anat*, **188**: 221-238.

- Kliman HJ. (1993) The placenta revealed. *Am J Pathol*, **143**(2): 332-336.
- Knight JW, Bazer FW, Thatcher WW, Franke DE, Wallace HD. (1977) Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: interactions among hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth. *J Anim Sci*, **44**: 620-637.
- Koncurat MA, Maglione C, de Vargas V. (2001) Ultraestructura placentaria porcina en diferentes períodos gestacionales. *Rev Cs Veterinarias*, **3**: 88-94.
- MacDonald AA, Bosma AA. (1985) Notes on placentation in the suina. *Placenta*, **6**: 83-92.
- Marrable AW. (1971) In: *The embryonic pig: a chronological account*. Ed. Exter, Pitman Medical, London.
- Merkis C, Cristofolini A, Franchino M, Moschetti E, Koncurat M. (2005) Relación entre área total y epitelial de vellosidades placentarias porcinas en diferentes estadios gestacionales. *InVet*, **7**(1): 47-54.
- Merkis C, Cristofolini A, Franchino M, Sanchis E, Moschetti E, Koncurat M. (2006) Angiogénesis placentaria durante la gestación porcina. *RedVet*, **7**(4): 1-4. [www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040406.html](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040406.html).
- Perry JS, Crombie PR. (1982) Ultrastructure of the uterine glands of the pig. *J Anat*, **134**: 339-350.
- Pope WF, Xie S, Broermann DM, Nephew, KP. (1990) Causes y consequences of early embryonic diversity in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*, **40**: 251-260.
- Pope WF. (1994) Embryonic mortality in swine. In: *Embryonic mortality in domestic species*. Ed. Zavy MT and Geisert RD. Boca Raton, FL; CRC Press, Inc., 53-77.
- PorkWorld (2003) Especial Reprodução, **15**: 56-62.
- Reynolds LP, Redmer DA. (1995) Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci*, **73**: 1839-1851.
- Riemersma JC (1970) Chemical effects of fixation on biological specimens, in: *Some biological techniques in electron microscopy*. Academic Press, New York and London).
- Roberts RM, Xie S and Mathialagan N (1996) Maternal recognition and pregnancy. *Biol reprod*, **54**: 294-302.
- Robertson HA, Dwyer RJ, King GL. (1985) Oestrogens in fetal and maternal fluids throughout pregnancy in the pig and comparisons with the ewe and cow. *J Endocrinol*, **106**: 355-360.
- Roppa L. (2003) Os custos de produção nos principais produtores mundiais de carne suína. *PorkWorld*, **15**: 20-25.
- Rossant J, Howard L. (2002) Signaling pathways in vascular development. Review. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**: 541-73.

- Samuel CA and Perry JS. (1972) The ultraestructura of pig trophoblast transplanted to and ectopic site in the uterine wall. *J Anat*, **113**: 139-149.
- Samuel CA. (1971) The development of pig trophoblast in ectopic sites. *J. Reprod Fertil*, **27**: 494-499.
- Santos TC, Dantzer V, Jones CPJ, Oliveira MF and Miglino MA (2006) Macroscopic and microscopic aspects of collared peccary and white-lipped peccary placenta. *Placenta*, **27**: 244-257.
- Stroband HWJ and Van der Lende T. (1990) Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *J Reprod and fertil. Suppl*, **40**: 261-277.
- Szafranska B, Majewska M and Panasiewicz G. (2004) N- Glycodiversity of the pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) produced in vitro by trophoblast and trophectoderm explants during implantation, placentation and advanced pregnancy in the pig. *Reprod Biol*, **4**(1): 67-89.
- Szego CM, Sloan SH. (1961) The influence of histamine and serotonin in producing early uterine growth in the rat. *Gen Comp Endocrinol*, **1**: 295-302.
- Van Der Lende T, Knol EF and Leenhouders JI (2001) Prenatal development as a predisposing factor for perinatal losses in pig. *Reproduction Supplement*, **58**: 247-261.
- Van der Lende T, Van Rens BT. (2003) Critical periods for fetal mortality in gilts identified by analysing the length distribution of mummified fetuses and frequency of non-fresh stillborn piglets. *Anim Reprod Sci*, **75**:141-150.
- Vivas A, Koncurat M y Greco C. (2000) Concentraciones de hormonas en extractos placentarios porcinos en diferentes estadios gestacionales. ALPA, D:ALPA.reproduccion 31.html. ISBN: 1022-1301.
- Wilson M.E., Ford S.P. (2001) Comparative aspects of placental efficiency. *Reprod Suppl*, **58**: 223-232.
- Wilson ME, Sonstegard TS, Smith TP, Fahrenkrug SC and Ford SP. (2000) Differential gene expression during elongation in the preimplantation pig embryo. *Genesis*, **26**: 9-14.
- Wooding FBP, Ozturk M, Skidmore JA, Allen WR. (2003) Developmental changes in localization of steroid synthesis enzymes in camelid placenta. *Reproduction*, **126**: 239-247.
- Wootton R, McFadyen IR, Cooper JE. (1977) Measurement of placental blood flow in the pig and its relation to placental and fetal weight. *Biol Neonate*, **31**(5-6): 333-339.
- Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. (2006) Board-Invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J Anim Sci*, **84**: 2316-2337.

U.N.R.C.  
Biblioteca Central



63384

63384