

SANCHIS, EVA GABRIEL
Estudio de la neovas



2013 72688

72688

MFN.
Classif:
T. 840



CREER... CREAR... CRECER

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

El presente trabajo fue desarrollado en el Área de Microscopía Electrónica, dependiente del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto y se presenta como requerimiento para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas. Junio de 2013.

Doctorado en Ciencias Biológicas

“ESTUDIO DE LA NEOVASCULARIZACIÓN DURANTE
LA PLACENTACIÓN PORCINA”

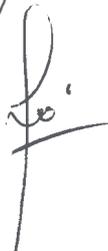
Doctorando: Mic. Eva Gabriela Sanchis



Directora: Dra. Cecilia Inés Merkis



Co-Directora: Dra. Mirta Adriana Koncurat



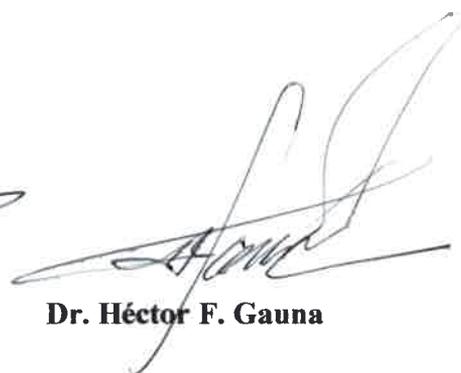
Jurado de Tesis:



Dr. Rodolfo E. Avila



Dr. Claudio G. Barbeito



Dr. Héctor F. Gauna

A mi amor

A mami y Juanico

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Río Cuarto que me brindó la posibilidad de continuar mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Nación (CONICET) y al Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba por apoyar mi carrera de posgrado.

A los miembros del Jurado de Tesis, Dr. Rodolfo Avila, Dr. Claudio Barbeito y Dr. Héctor Gauna, por haber contribuido a lo largo de estos años con sus correcciones, sugerencias y conocimiento, a lograr mejores resultados del trabajo planteado.

A mi Directora, la Dra. Cecilia Merkis, por haber depositado su tiempo y dedicación en mi formación profesional desde la tesina de grado. Por luchar día a día por la superación del grupo y la concreción de las metas, por pensar en colectivo, entendiendo que los grandes logros surgen del trabajo en equipo. Por apostar a un buen clima laboral, que permite sinergizar esfuerzos, a partir de los cuales se obtienen más y mejores resultados.

A mi Co-Directora, la Dra. Mirta Koncurat, por haber acompañado mi formación de grado y posgrado. Por el tiempo y confianza dedicados a este proyecto.

A Andrea, con quien compartimos la jornada laboral, los mates, los almuerzos, la rutina siempre amena, emprendiendo juntas nuevos desafíos.

A mi gran amor, mi compañero, mi par, mi amigo... Mi amado esposo Santiago, quien ha ido transitando este camino del doctorado desde el inicio, siempre a mi lado, siempre con una sonrisa y con palabras de apoyo, de contención, trayendo paz y alegría a mi vida, a nuestro hogar... Gracias enormes, mi amor!

A mami y Juanico, la más bella familia que alguna vez pude soñar... La tenacidad de una mujer increíble, fuerte, luchadora y los valores intachables de un hombre honesto, sincero, compañero, defensor a ultranza de sus afectos... Un hermano con un par de oídos gigantes y un corazón más grande aún que siempre me demostró que podía confiar en él. Gracias mami por armar esta familia, somos lo que somos gracias a vos. Y gracias papi, a pesar de tu ausencia siempre me acompaña tu ejemplo de trabajo y responsabilidad, y sé que vivirías este logro con gran alegría.

A Nelcy Schleef y Analía Chanique, cuyos conocimientos técnicos y profesionalismo fueron de gran ayuda para la concreción de este trabajo. Gracias por la excelente predisposición que siempre han demostrado.

A Analía, nuevamente, y a Silvina, depositarias del agradecimiento a todos aquellos que transitan o han transitado por el Área de Microscopía Electrónica prestando su colaboración, su energía y su apoyo a los trabajos individuales y grupales, dejando huellas que trascienden lo laboral. A todos ellos, mil gracias...

Tesis de Posgrado: Doctorado en Ciencias Biológicas

Título: “Estudio de la neovascularización durante la placentación porcina”

Autora: Mic. Eva Gabriela Sanchis, gsanchis@ayv.unrc.edu.ar

Directora: Dra. Cecilia Inés Merkis

Co-Directora: Dra. Mirta Adriana Koncurat

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

Resumen

A nivel mundial, la producción de carne porcina es la más importante, representando el 40% del total de las carnes rojas. Sin embargo, la actividad porcina se halla amenazada por importantes pérdidas embrionarias, que devienen en valiosas pérdidas económicas, que en nuestra región agrícola-ganadera alcanzan un 50-52%. La formación y desarrollo del lecho vascular placentario resulta fundamental para garantizar el éxito de la gestación y la sobrevivencia postnatal de los lechones. Por lo tanto, conocer los aspectos involucrados en la vascularización placentaria porcina permitirá elaborar estrategias tendientes a mejorar la productividad en esta especie pecuaria de alto valor económico en nuestra región. El objetivo fue evaluar la vascularización placentaria porcina y el rol que desempeñan las moléculas de matriz extracelular, OPN, Fg y colágeno, así como el factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF, y sus receptores (Flt-1 y Flk-1), juntamente con los procesos de proliferación celular y apoptosis. Para el estudio se emplearon tejidos placentarios de cerdas mestizas de 30 (n=5), 40 (n=5), 60 (n=5), 80 (n=5), 90 (n=5) y 114 (a término, n=5) días de gestación, sobre los que se evaluó la estructura tisular por microscopía óptica y MOAR, la localización de colágeno por Picosirius red y microscopía de luz polarizada, y de OPN, Fg, VEGF y receptores y del marcador de proliferación celular, Ki67, por inmunohistoquímica. Además, se evaluó la remodelación vascular por apoptosis, a través del ensayo TUNEL. La determinación de fibras colágenas en todos los períodos analizados constituye una evidencia de su importancia como componente esencial de la matriz extracelular placentaria porcina, actuando como sostén del sistema vascular y glandular-areolar. La distribución témporo-espacial de OPN en las vellosidades placentarias al día 30 de gestación, sugiere un rol preponderante a estadios tempranos de la preñez porcina, siendo un producto de secreción de las glándulas endometriales únicamente hasta el día 30. La presencia de VEGF y una matriz extracelular rica en fibrinógeno favorecería el proceso angiogénico y la formación de una red vascular acorde al estado fisiológico de la cerda gestante. En la preñez temprana y a término VEGF actuaría principalmente vía el receptor Flt-1, mientras que al día 60 ejercería su acción fundamentalmente a través de Flk-1. En placentas a término, la apoptosis observada a nivel de trofoblasto estaría participando en los mecanismos desencadenantes del parto y en la separación de los componentes maternos y fetales. La proliferación celular en vasos sanguíneos al día 80 de preñez indica una elevada actividad mitótica de las células endoteliales y vasculares, coincidente con los máximos valores de área vascular y su posterior disminución. Este es el primer trabajo en estudiar de forma integral la vascularización placentaria porcina y su vinculación con las moléculas de matriz y los procesos de apoptosis y proliferación.

Tesis de Posgrado: Doctorado en Ciencias Biológicas

Título: “Estudio de la neovascularización durante la placentación porcina”

Autora: Mic. Eva Gabriela Sanchis, gsanchis@ayv.unrc.edu.ar

Directora: Dra. Cecilia Inés Merkis

Co-Directora: Dra. Mirta Adriana Koncurat

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

Abstract

Pork is the most important meat production in the world, representing the 40% of total meat. Nevertheless, porcine activity is threatened by important embryo mortalities that cause elevated economic losses. In our geographical area, center of Argentina, the percentage of embryo loss without specific cause is by 50-52%. Formation and development of placental vascular bed is necessary to guarantee the success of gestation, as well as of the postnatal survival of piglets. Therefore, the knowledge of the aspects involved in porcine placental vascularization will allow in future elaborate strategies for improving the productivity in this species of high economic value for our region. The aim was to evaluate the porcine placental vascularization and the role undertaken by the molecules of placental extracellular matrix, OPN, Fg and collagen, as well as by VEGF and their receptors (Flt-1 and Flk-1), together with the processes of apoptosis and cell proliferation. Crossbred placental tissues from 30 (n=5), 40 (n=5), 60 (n=5), 80 (n=5), 90 (n=5) and 114 (at term, n=5) days of gestation were used. Tissue structure was studied by light microscopy and HRLM, collagen fibers by Picrosirius red and polarizing microscopy, and OPN, Fg, VEGF and their receptors, as well as the cell proliferation marker, Ki67, by immunohistochemistry. Moreover, vascular remodeling was evaluated by apoptosis, through TUNEL assay. The presence of collagen in every gestational period studied indicates its relevance as a component of placental extracellular matrix and its role in the support of the vascular and gland-areolar systems. Temporospatial distribution of OPN in placental villi at day 30 of gestation suggests an important role in early pregnancy, being a product of secretion of endometrial glands only until day 30. The presence of VEGF and a fibrinogen rich matrix would favor the angiogenic process and the formation of a vascular net suitable to the physiological state of the gestating gilt. In early and in at term pregnancy, VEGF would act via Flt-1, however at day 60 its function would be mediated by means of Flk-1. In at term placentas, the apoptosis detected in trophoblast would be involved in the mechanisms triggering the delivery and in the separation of the maternal and fetal components. The cell proliferation detected in blood vessels at day 80 indicates an elevated mitotic activity of endothelial and vascular cells. This is in relation with the maximum values of vascular area found at day 80 and its subsequent decrease. This is the first work to address an integrated study of the porcine placental vascularization and its link with the extracellular matrix molecules and the apoptosis and cell proliferation processes.

ÍNDICE

Abreviaturas	I
Indice de figuras	IV
Indice de tablas	VII
INTRODUCCIÓN	1
Aspectos generales de los porcinos	1
Producción porcina	1
Reproducción porcina	4
Pérdida embrionaria	5
Placenta porcina	6
Proteínas de matriz extracelular	10
Matriz extracelular	10
Colágeno	11
Osteopontina	13
Fibrinógeno	15
Vascularización	17
Anatomía vascular placentaria	17
Angiogénesis y matriz extracelular	19
Angiogénesis placentaria	21
Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)	22
Receptores angiogénicos: VEGF-R1, VEGF-R2	24
Apoptosis	25
El proceso apoptótico	25
Apoptosis placentaria	27
Proliferación celular	28
Proliferación celular placentaria	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
Hipótesis	30
Objetivo General	30
Objetivos Específicos	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. Animales	32
1.1. Cerdas	32

1.2. Obtención de tractos reproductivos	32
1.3. Obtención de placentas	32
1.3.1. Determinación de la edad gestacional de los embriones/fetos	33
2. Preparación de cortes histológicos para microscopía óptica	33
2.1. Técnica de histología convencional para microscopía óptica	33
2.1.1. Tratamiento para tejidos incluidos en parafina	33
3. Preparación de cortes histológicos para microscopía óptica de alta resolución (MOAR)	34
3.1. Técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión	34
4. Análisis de la estructura placentaria	36
4.1. Tinción de hematoxilina eosina	36
4.2. Tinción tricrómica de Masson	37
4.3. Tinción tricrómica de Gallego	39
4.4. Deshidratación y montaje	41
4.5. Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR)	42
5. Técnica de Picrosirius red	42
5.1. Determinación de colágeno	42
5.2. Preparación de las distintas soluciones	42
6. Método de recuperación antigénica	44
6.1. Método de irradiación con microondas	44
6.2. Preparación de portaobjetos gelatinizados	44
6.3. Preparación de buffer citrato 10mM pH 6,0	45
7. Técnicas inmunohistoquímicas	45
7.1. Determinación de OPN, Fg, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 y Ki67	45
7.2. Análisis de datos	46
8. Determinación del área vascular placentaria	47
9. Ensayo TUNEL	48
9.1. Detección de apoptosis “ <i>in situ</i> ”	48
9.2. Análisis de datos	49
9.3. Correlación entre apoptosis y proliferación	49
RESULTADOS	50
1. Tractos reproductivos	50
2. Estudio de la estructura placentaria	52

2.1. Estudio macroscópico	52
2.2. Estudio microscópico	54
2.3. Estudio por microscopía óptica de alta resolución (MOAR)	58
3. Análisis de proteínas de matriz extracelular	63
3.1. Determinación de colágeno por Picrosirius red	63
3.2. Determinación de osteopontina por inmunohistoquímica	67
3.3. Determinación de fibrinógeno por inmunohistoquímica	72
4. Estudio de la vascularización	75
4.1. Determinación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) por técnica inmunohistoquímica	75
4.2. Determinación de los receptores del factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF-R1 y VEGF-R2, por inmunohistoquímica	80
4.2.1. Determinación de VEGF-R1	80
4.2.2. Determinación de VEGF-R2	83
4.3. Análisis del área vascular placentaria	87
5. Determinación de la apoptosis “<i>in situ</i>”	94
6. Estudio de la proliferación celular	104
7. Correlación entre apoptosis y proliferación celular	114
DISCUSIÓN	117
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	134

ABREVIATURAS

A	Areola
AAPP	Asociación Argentina de Productores Porcinos
ADN	Acido desoxirribonucleico
Ang-1	Angiopoyetina 1
Ang-2	Angiopoyetina 2
ANOVA	Análisis de varianza
CAc	Células activas
CD	Célula en división
CE	Célula endotelial
CTr	Célula trofoblástica
CUD	Cuerno uterino derecho
CUI	Cuerno uterino izquierdo
CV	Coefficiente de variación
DAB	Diaminobencidina
E	Endometrio
Em	Embriones
ECM	Matríz extracelular
EEs	Error estándar
EG	Epitelio glandular
Fb	Fibroblasto
Fg	Fibrinógeno
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGF-2	Factor de crecimiento fibroblástico-2
Fig.	Figura
Flk-1	Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular
Flt-1	Receptor 1 del factor de crecimiento del endotelio vascular
G	Gramos
GC	Gránulos citoplasmáticos
GI	Glándula endometrial
H	Histiotrofo
H₀	Hipótesis nula
H₁	Hipótesis alternativa

HC	Heterocromatina
HS	High score
hs	Horas
IAp	Índice apoptótico
IFM	Interfase feto-materna
INTA EEA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Estación Experimental Agropecuaria
kDa	Kilodalton
KDR	Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular
Ki67	Marcador de proliferación celular
L	Lúmen uterino
LA	Líquido amniótico
M	Molar
Mb	Membrana basal
MCA	Membrana corioalantoidea
Mf	Mesénquima fetal
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MOAR	Microscopía óptica de alta resolución
N	Normal
NA	Núcleo apoptótico
ND	No determinado
NEA	Noreste argentino
N°	Número
NOA	Noroeste argentino
O	Ovarios
ONCCA	Oficina Nacional de Control Comercial Agropecuario
OPN	Osteopontina
PBS	Solución salina tamponada
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PGF2α	Prostaglandina F2 α

PI	Placenta
PIGF	Factor de crecimiento placentario
RGD	Secuencia arginina-glicina-ácido aspártico
SA	Saco amniótico
Sd	Desvío estándar
SMCs	Células musculares lisas
SSH	Solución salina de Hank's
TNF-R1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral alfa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tr	Epitelio trofoblástico
TrE	Células trofoblásticas en empalizada
TUNEL	TdT- mediated dUTP nick end labeling
Ut	Epitelio uterino
UtE	Células uterinas en empalizada
V	Vellosidad placentaria
VBM	Membrana basal vascular
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGF-R1	Receptor 1 del factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGF-R2	Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular
Vf	Vasos fetales
Vm	Vasos maternos
VPF	Factor de permeabilidad vascular
vsf	Vaso sanguíneo fetal
vsm	Vaso sanguíneo materno
ZA	Zona areolar
ZIA	Zona interareolar

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	2
Figura N° 2	3
Figura N° 3	6
Figura N° 4	8
Figura N° 5	8
Figura N° 6	10
Figura N° 7	11
Figura N° 8	13
Figura N° 9	15
Figura N° 10	17
Figura N° 11	18
Figura N° 12	19
Figura N° 13	21
Figura N° 14	24
Figura N° 15	27
Figura N° 16	52
Figura N° 17	53
Figura N° 18	53
Figura N° 19	54
Figura N° 20	55
Figura N° 21	56
Figura N° 22	57
Figura N° 23	58
Figura N° 24	59
Figura N° 25	60
Figura N° 26	61
Figura N° 27	62
Figura N° 28	63
Figura N° 29	66
Figura N° 30	67
Figura N° 31	70

Figura N° 32	71
Figura N° 33	72
Figura N° 34	74
Figura N° 35	75
Figura N° 36	77
Figura N° 37	78
Figura N° 38	79
Figura N° 39	80
Figura N° 40	82
Figura N° 41	83
Figura N° 42	85
Figura N° 43	86
Figura N° 44	87
Figura N° 45	88
Figura N° 46	89
Figura N° 47	90
Figura N° 48	91
Figura N° 49	92
Figura N° 50	93
Figura N° 51	96
Figura N° 52	97
Figura N° 53	98
Figura N° 54	99
Figura N° 55	100
Figura N° 56	101
Figura N° 57	102
Figura N° 58	103
Figura N° 59	104
Figura N° 60	106
Figura N° 61	107
Figura N° 62	108
Figura N° 63	109
Figura N° 64	110

Figura N° 65	111
Figura N° 66	112
Figura N° 67	113
Figura N° 68	114
Figura N° 69	115
Figura N° 70	116

INDICE DE TABLAS

Tabla I	51
Tabla II	64
Tabla III	68
Tabla IV	73
Tabla V	76
Tabla VI	81
Tabla VII	84
Tabla VIII	94

..... *INTRODUCCIÓN*

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales de los porcinos

Producción porcina

En términos relativos, a nivel mundial, la producción de carne porcina es la más importante (Recalde y Barraud, 2002), representando el 40% del total de las carnes rojas (Fuentes Cintra y col, 2006). En el mundo la carne porcina constituye la carne con mayor volumen de producción (alrededor de cien millones de toneladas/año), seguida de la carne aviar (72 millones) y de la carne vacuna (60 millones) (Consejo Federal de Inversiones, 2010). En nuestro país la producción de carne porcina se encuentra muy por debajo de la de las carnes bovina y aviar (Oficina Nacional de Control Comercial Agropecuario, ONCCA, 2011). Sin embargo, entre 2003 y 2010, el consumo *per cápita* en Argentina pasó de 5,33 a 8,12 kg anuales, mostrando un incremento superior al 50% (Ghida Daza, 2010), tal como se observa en la Figura N° 1. Incluso, según información brindada por la Asociación Argentina de Productores Porcinos (AAPP), el año pasado el consumo *per cápita* fue de 10,2 kg (Nuevo Diario, 2012). A nivel mundial la carne porcina crece a una tasa de 2,4% anual y conserva desde hace años su posición de ser la proteína más consumida del planeta con 93 millones de toneladas (Fenoglio, 2007). Esto se halla sustentado en el valor nutritivo de la carne de cerdo, que la señala como uno de los alimentos más completos para satisfacer las necesidades del hombre. Incluso, se sabe que su consumo podría contribuir en gran medida a mejorar la calidad de vida humana desde el punto de vista de los rendimientos físicos e intelectuales. Esto se debe a que la carne de cerdo presenta un importante aporte proteico, con proteínas de elevada digestibilidad y adecuada proporción de aminoácidos, de acuerdo con las exigencias nutricionales de la dieta (Rodríguez Jerez, 2005). Entre ellos se encuentran aminoácidos esenciales, algunos de los cuales no son sintetizados por el organismo humano, según lo informa la AAPP en el Sitio Porcino de Producción Animal (2006). La misma fuente revela que se trata de una carne muy magra, con ácidos grasos monoinsaturados con características cardioprotectoras, muy rica en potasio (350 a 480 mg/100 g) y pobre en sodio (70 a 90 mg/10 g) por lo que se convierte en un alimento altamente recomendable para quienes padecen hipertensión arterial. Aporta además hierro hémico, que es el más

fácilmente absorbido por nuestro organismo, y una amplia gama de vitaminas (Asociación Argentina de Productores de Porcinos, 2010).

Según estudios realizados por la Oficina Nacional de Control Comercial Agropecuario (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2011) a mediados del año pasado la producción argentina anual de carne de cerdo se estimaba en 169.848 toneladas, cifra superior en un 4,07% respecto al mismo período del año 2010. Más del 95% de dicha producción depende de la región Centro de nuestro país, que comprende las provincias de Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe, La Pampa y Entre Ríos, tal como se observa en la Figura N° 2 (Informe Mensual de Carnes, 2011). Por otra parte, el consumo de carne porcina en el período mencionado se establecía en 8,36 kg/hab/año, observándose un aumento de 4,99%, al compararlo con el consumo del período enero/julio del año 2010. Este crecimiento del sector pecuario porcino resulta más notorio tras analizar lo informado a través de Nuevo Diario (2012): mientras que en 2003 se faenaron 2,1 millones de animales y se produjeron unas 170.000 toneladas de cerdo, en 2011 se faenaron más de 4 millones de cabezas y se cerró el año con una producción de 325.000 toneladas. La misma fuente revela que para 2012 se proyectaba faenar entre 4,7 y 4,8 millones de porcinos y llegar a las 380.000 toneladas.

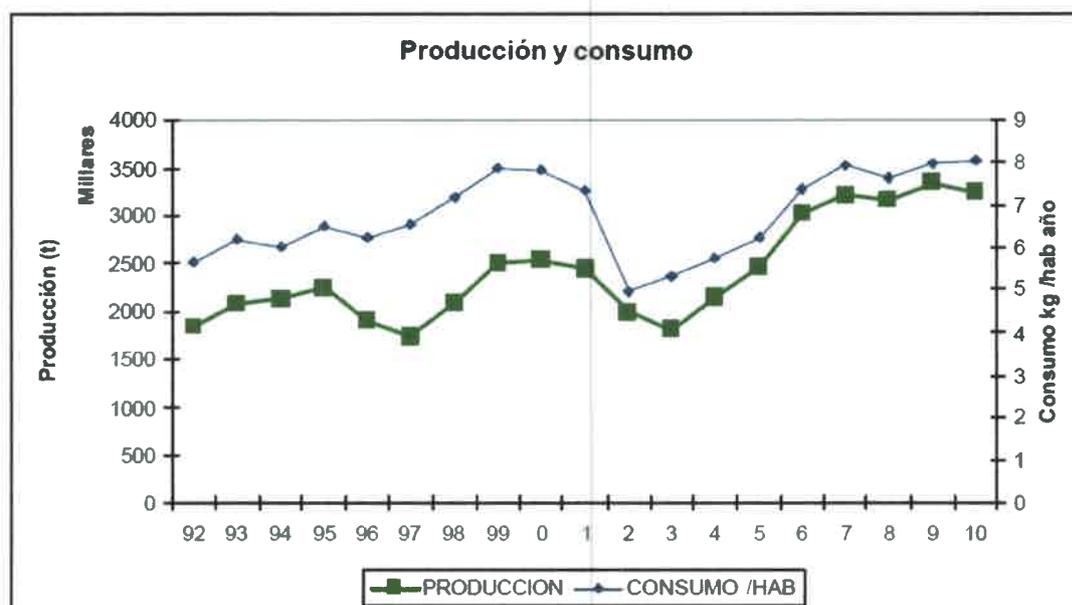


Figura N° 1: Evolución del mercado porcino en las últimas décadas, a través de dos indicadores: la producción y el consumo por habitante. Tomado de Ghida Daza, 2010.

Regionalización de la Faena							
	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
CENTRO	222.091	257.492	271.465	284.111	284.675	273.308	282.347
Buenos Aires	140.538	169.718	184.826	188.303	193.819	178.313	192.847
Córdoba	28.248	30.032	29.145	32.419	32.681	30.620	
Entre Ríos	4.970	5.846	5.737	6.006	5.668	5.832	5.112
La Pampa	300	297	170	250	292	168	280
Santa Fe	48.035	51.599	51.587	57.133	52.215	58.375	
NEA	2.373	3.468	3.144	3.513	3.523	3.130	4.507
Chaco	332	539	511	623	613	451	440
Corrientes	1	1	2	5	4	3	
Formosa	0	0	0	0	0	0	0
Misiones	2.040	2.928	2.631	2.885	2.906	2.676	4.048
NOA	3.074	3.677	3.657	3.825	3.650	3.461	4.765
Salta	2.174	2.707	2.559	2.514	2.513	2.355	3.196
Santiago del Estero	25	100	117	186	20	52	
Tucumán	575	479	653	717	762	631	
Jujuy	300	391	328	408	355	423	
Catamarca	0	0	0	0	0	0	0
OESTE	3.889	5.758	5.177	6.127	5.125	4.217	4.634
San Juan	143	133	166	201	193	264	
La Rioja	16	18	18	18	19	0	
Mendoza	3.430	4.892	4.522	5.199	4.164	3.420	
San Luis	300	715	471	709	749	533	
PATAGONIA	1.435	1.708	1.388	1.530	1.122	1.651	1.916
Chubut	96	152	138	69	87	129	44
Neuquén	1.010	1.202	979	1.255	809	1.294	1.561
Río Negro	307	296	224	206	226	228	
Santa Cruz	22	58	47	0	0	0	
Tierra del Fuego	0	0	0	0	0	0	
Total	232.862	272.103	284.831	299.106	298.095	285.767	298.169

Figura N° 2: Distribución geográfica de la faena porcina en Argentina. Tomado de Informe Mensual de Carnes, 2011. NEA: Noreste argentino; NOA: Noroeste argentino.

El desarrollo del sector productivo de carne porcina no ha terminado aún de posicionarse en la canasta alimentaria de los argentinos (ONCCA, 2011). El foro alimentario del plan estratégico industrial 2020 acordó llegar a ese año con un consumo de carne porcina de 13 kg por habitante por año y producir 822.000 toneladas de carne porcina, de las que 255.000 serán destinadas a la exportación (Nuevo Diario, 2012). La ONCCA resalta que es importante poder promocionar la producción y el consumo de carne porcina, dado que la actividad cuenta con numerosas ventajas para llevarse a cabo en el país, como por ejemplo, la disponibilidad de maíz y soja (que conforman la base de la alimentación y el principal costo de producción), el clima favorable y la ausencia de amenazas sanitarias (ONCCA, 2011). Por otro lado, el ganado porcino presenta diversas características zootécnicas (elevado ritmo productivo, corto intervalo

generacional) y genéticas (caracteres de interés económico medianamente heredables y fácilmente medibles en ambos sexos), que hacen posible un progreso productivo y genético muy superior al de otras especies ganaderas (Font, 1999).

Si bien el sector porcino es pequeño, las condiciones naturales y sanitarias óptimas para crecer, le permitirían satisfacer las demandas de mercados exigentes. La Argentina cuenta con un stock de 4.500.000 cabezas de ganado porcino y se producen alrededor de 270.000 toneladas al año. Las perspectivas de la producción son alentadoras ya que el precio del cerdo continuó mejorando a partir de la devaluación, y el precio de los cereales y oleaginosas se ha estabilizado en una relación favorable. Según lo informado por Nuevo Diario (2012), el objetivo de la producción porcina es lograr el autoabastecimiento de país, incluso promocionando el consumo de carne porcina que en Argentina es extremadamente bajo.

Reproducción porcina

La cerda es una especie poliéstrica anual, con un ciclo estral que dura en promedio 21 días, oscilando el mismo entre 19 y 23 días. En el mencionado ciclo, el celo o etapa de receptividad sexual, presenta una duración aproximada de 2 o 3 días (Pond and Houpt, 1981).

Esta especie se caracteriza además por ser múltipara, dando camadas de 8 a 10 lechones para cerdas de primer parto y de 10 a 16 lechones en cerdas adultas, tras una gestación que dura en promedio 114 días (Cíntora, 2006). Estas diferencias se deben en parte, a que en estos animales la capacidad fisiológica para reproducirse, es decir la pubertad, aparece entre los 4 y 5 meses de edad, momento en el cual no están suficientemente preparados para afrontar una concepción prematura, al no haber aún alcanzado las hembras un desarrollo anatómico completo (INTA EEA Pergamino, 2003). Por otra parte, la tasa ovulatoria tiene una marcada influencia, viéndose la misma afectada por el número de partos previos. Tal es así, que la tasa de ovulación presenta un considerable aumento hasta el cuarto parto, alcanzando una meseta en el sexto parto (Parsi y col, 2007).

De lo anteriormente expuesto se desprende que la vida reproductiva de las futuras madres debe iniciarse a partir de los 7 u 8 meses de edad y con un peso vivo de alrededor de 130-135 kg, ya que las hembras preñadas a temprana edad disminuyen

sensiblemente su capacidad reproductiva al presentar camadas poco numerosas y de bajo peso al nacer (INTA EEA Pergamino, 2003).

Por último y siendo la productividad una característica económica importante, es de relevancia destacar que la rentabilidad de una explotación se ve directamente afectada por la fertilidad y la prolificidad, constituyendo éstos los parámetros reproductivos más importantes. Tanto es así que son considerados factores primarios de producción. Dichos parámetros se encuentran directamente relacionados, de forma tal que buenas tasas de fertilidad vienen acompañadas generalmente de alta prolificidad (Pallás Alonso, 2008).

Pérdida embrionaria

En la producción porcina, el manejo reproductivo es fundamental para alcanzar índices óptimos de eficiencia productiva (Parsi y col, 2007). Una de las variables más importantes en la industria del cerdo que afecta el número de camada por cerda/año y por ende la producción, es la alta tasa de muerte embrionaria.

La mortalidad embrionaria implica la reducción o pérdida de embriones durante su desarrollo en el claustro materno. En el ganado porcino la mayor parte de las pérdidas acontecen durante períodos críticos en el desarrollo del producto de la gestación, tales como: a) antes del momento de implantación y coincidiendo con los fenómenos fisiológicos de diferenciación del blastocisto, su eclosión de la zona pelúcida y su migración por los cuerpos uterinos antes de fijarse en el tejido uterino, y b) durante los 40 a 50 días de gestación, en este caso debido principalmente a la superpoblación de los cuernos uterinos (Pallás Alonso, 2008).

En cerdos, la mortalidad embrionaria temprana sin causa específica está situada entre un 30 y un 40%, observándose que la mayoría de las pérdidas ocurren antes del día 30 de gestación (Fig. N° 3; Pope, 1994; Santomá y Pontes, 2011). Por otro lado, recientes evidencias han demostrado que una pérdida de *conceptus* apreciable ocurre durante periodos tardíos de gestación y, a pesar de que ésta no representa el mayor componente de pérdida total, es significativa y tiene impacto negativo sobre la eficiencia reproductiva (Fig. N° 3; Wilson, 2002; Santomá y Pontes, 2011). En nuestra región agrícola-ganadera, el porcentaje de mortalidad embrionaria alcanza hasta un 50-52% (Bosch y col, 2001).

Estas pérdidas se deben principalmente a fallas en las señales del embrión dirigidas a la madre con fines de establecer inmunotolerancia, fenómeno imprescindible para la supervivencia del embrión (Hedge, 1991).

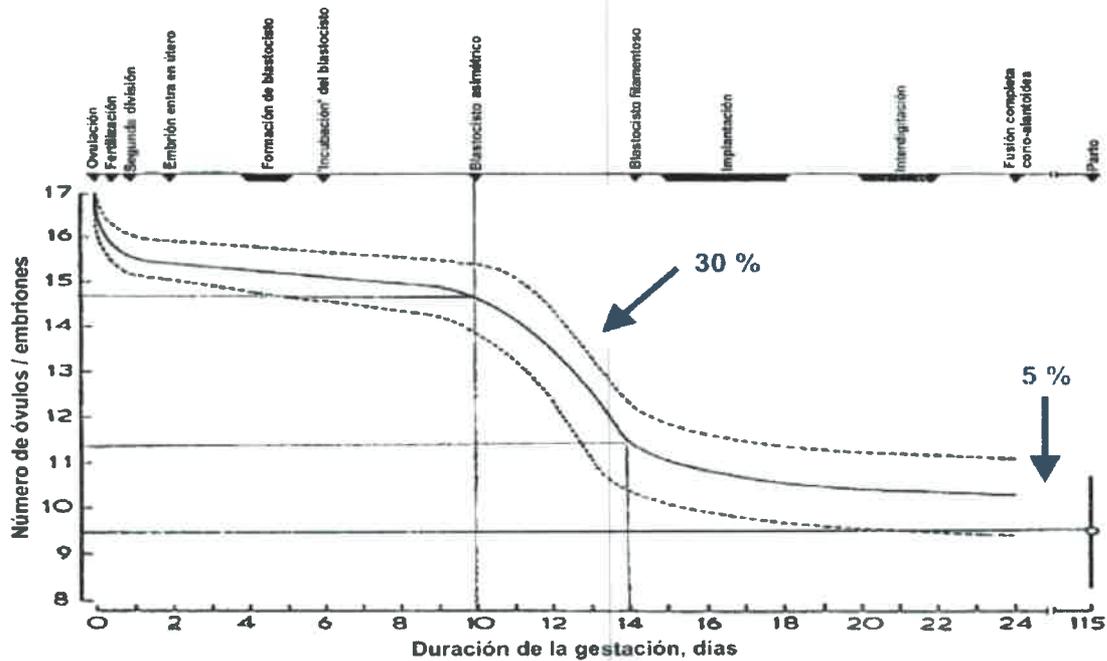


Figura N° 3: Evolución de la mortalidad prenatal en porcinos. Tomado de Santomá y Pontes, 2011.

Placenta porcina

La preñez en porcinos dura aproximadamente 114 días (Háfiez y Háfiez, 2000). Durante este período, la placenta juega un rol fundamental, siendo responsable de la implantación y el mantenimiento de la preñez, así como de la supervivencia postnatal de los lechones (Friess *et al.*, 1980; Van der Lende and Van Rens, 2003). Además, la placenta como órgano transitorio de la gestación, cumple dos funciones principales: por un lado maximizar la adquisición de oxígeno y nutrientes desde la madre, pero al mismo tiempo minimizar el rechazo inmunológico por el sistema inmune materno (Wooding and Burton, 2008).

Entre los días 11 y 12 de gestación el blastocisto porcino secreta estrógeno, induciendo el cambio en la secreción endometrial de PGF2 α de ser dirigida hacia el interior de los capilares uterinos a ser liberada en el lumen uterino. Esto constituye la señal de “reconocimiento materno-fetal de la preñez” que previene la luteólisis del

cuerpo lúteo por la prostaglandina, manteniéndose así la secreción de progesterona esencial para una preñez exitosa (Spencer *et al.*, 2004). La implantación del blastocisto, que ocurre aproximadamente al día 18 post-coito, ocurre a continuación de su adhesión al epitelio uterino, proceso que acontece entre los días 13 y 14 de gestación. A partir de este momento existe una reforma de las microvellosidades maternas y fetales que se interdigitan, aumentando el área de intercambio materno-fetal unas 10-12 veces en relación a la aposición plana (Baur, 1977, Merkis y col, 2005). Se sabe incluso que la apoptosis participa activamente en la reforma de las vellosidades, así como en la remodelación tisular del resto de las estructuras placentarias maternas y fetales (Merkis *et al.*, 2007; Cristofolini y col, 2008; Cristofolini *et al.*, 2009; Cristofolini, 2010). La etapa de gestación temprana, está caracterizada por un rápido desarrollo del útero y los embriones (Perry and Rowlands, 1962) resultando en una placenta difusa (Fig. N° 4), plegada, adecidua, no invasiva y epiteliochorial (Fig. N° 5) (Amoroso, 1952; Dantzer, 1985; Leiser and Kaufmann, 1994). El epitelio uterino y el trofoectodermo entran en contacto, las microvellosidades maternas y fetales se interdigitan y el desarrollo placentario involucra esencialmente un vasto aumento del área de contacto sin pérdida de ninguna capa entre los flujos sanguíneos maternos y fetales (Amoroso, 1952), constituyéndose una barrera interhernal formada por seis capas de tejidos.

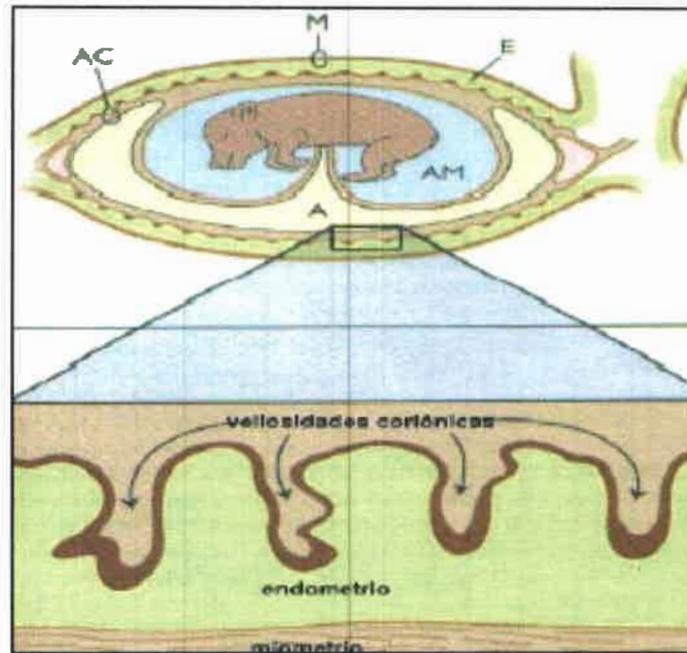


Figura N° 4: Esquema de la placentación difusa, basada en la clasificación morfológica e histológica, donde el contacto entre envolturas fetales y endometrio uterino se realiza a través de microvellosidades. A: alantoides; AC: alantocórion; AM: cavidad amniótica; E: endometrio; M: miometrio. Tomado de Gallegos y Mellisho, 2006.

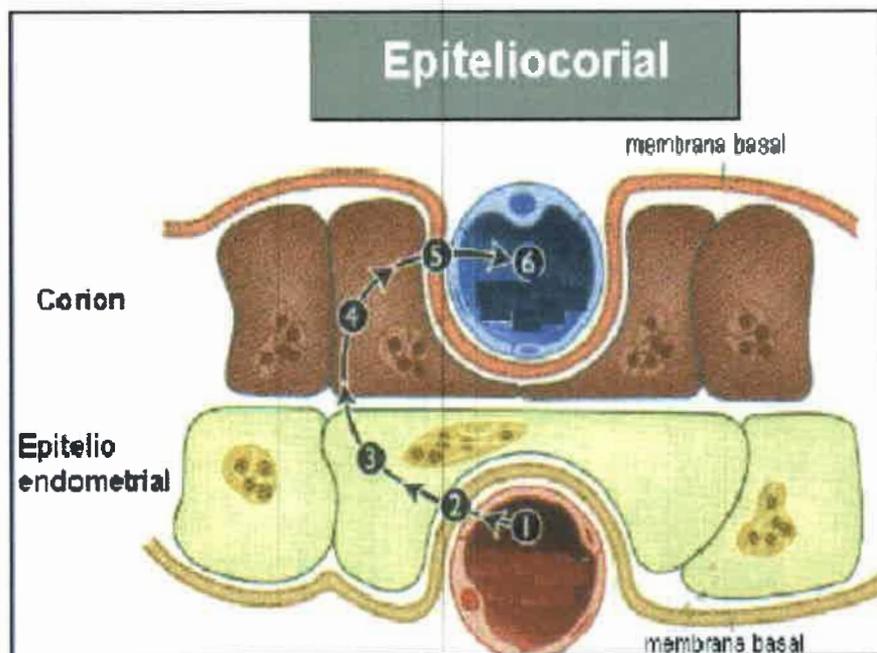


Figura N° 5: Esquema de la placentación epiteliocorial, constituida por seis capas histológicas, donde el epitelio uterino intacto se pone en contacto con el córion intacto. Tomado de Gallegos y Mellisho, 2006.

Numerosas glándulas endometriales se encuentran durante la gestación en el estroma uterino, las cuales secretan activamente a lo largo de la preñez (Bazer and First, 1983). La absorción del contenido glandular, denominado histiotrofo, por parte del embrión se realiza a través de células especializadas fagocíticas que constituyen las aréolas. Las mismas se forman por expansión fetal alrededor de las bocas glandulares y se distinguen histológicamente a partir del día 15 post-coito (Leiser and Dantzer, 1994). El histiotrofo aporta nutrientes al *conceptus*, hecho esencial en los cerdos, ya que presentan una mayor separación entre los flujos sanguíneos materno y fetal con respecto a especies con placentación invasiva. Además, juega un rol preponderante en la producción de señales de reconocimiento de la preñez, inmunoprotección, unión, implantación y placentación.

A medida que la gestación avanza, las subunidades glandular-areolar se distinguen macroscópicamente de las regiones interareolares, que es por donde ocurre el intercambio gaseoso y la absorción de sustancias hemotrofas por parte del trofoblasto (Fig. N° 6; Johansson *et al.*, 2001). De esta manera, la sustancia que nutre a la descendencia y que se denomina embriotrofo, procede tanto de la sangre materna -el hemotrofo- como de las secreciones glandulares uterinas y fragmentos celulares - histiotrofo- (Björkman and Dantzer, 1987).

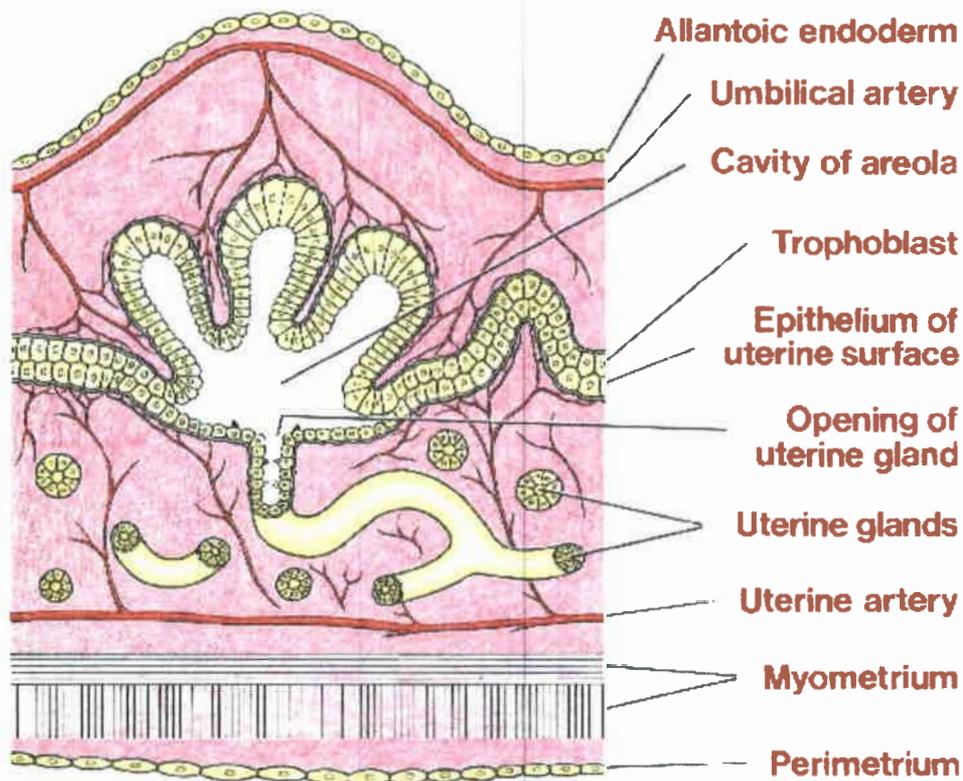


Figura N° 6: Esquema de una sección de la placenta y pared uterina de la cerda mostrando una aréola (no se muestran las venas). (**Umbilical artery:** arteria umbilical; **Cavity of areola;** cavidad de la aréola; **Trophoblast:** trofoblasto; **Opening of uterine gland:** apertura de la glándula uterina; **Uterine glands:** glándulas uterinas; **Uterine artery:** arteria uterina; **Myometrium:** miometrio; **Perimetrium:** perimetrio). Tomado de <http://science.howstuffworks.com/environmental/life/human-biology/apoptosis.htm>

Proteínas de matriz extracelular

Matriz extracelular

La matriz extracelular (ECM) es sintetizada y secretada por las células embrionarias desde los estadios más iniciales del desarrollo, aunque varía su composición y organización (Rozario and De Simone, 2010). Es multi-funcional y puede influenciar múltiples procesos bioquímicos y mecánicos, simultáneamente, como los que se resumen en la Figura N° 7 (Rozario and De Simone, 2010).

El desarrollo placentario, requerido para llevar adecuadamente a término la gestación en cualquier especie mamífera, está íntimamente asociado con la proliferación

de células placentarias y la producción de matriz extracelular (Arai and Nishiyama, 2007; Demir-Weusten *et al.*, 2007). El lecho vascular placentario se asienta sobre la ECM. Como tal, ésta se halla constituida por diversas moléculas, entre las cuales encontramos al sistema colágeno, la osteopontina y el fibrinógeno (Rozario and De Simone, 2010).

Funciones de ECM



Figura N° 7: Resumen de las funciones de la matriz extracelular en el desarrollo. Se ilustran diferentes estados funcionales de la ECM y sus contextos biológicos. Las cinco categorías no son mutuamente excluyentes. Adaptado de Rozario and De Simone, 2010.

Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano, siendo producida principalmente por fibroblastos (Fleck and Simman, 2010). El sistema colágeno se halla conformado por proteínas fibrilares con diferentes localizaciones en el tejido materno-embrionario (Silvera Arenas y Barrios de Zurbarán, 2002). Constituye la principal proteína de la matriz extracelular placentaria y conforma aproximadamente el 20% de

los tejidos placentarios. Representa una familia de más de 17 tipos diferentes de proteínas extracelulares y los tipos I, III, IV, V, VI y VII han sido encontrados en la unidad útero-placentaria. En el caso particular de los colágenos tipo I y III, se los ha asociado con las propiedades y comportamiento biomecánico de las matrices extracelulares de las membranas fetales de mamíferos (Sharpe *et al.*, 1990).

La unidad esencial del colágeno, denominada tropocolágeno, está constituida por tres cadenas de polipéptidos que aparecen entrelazadas formando una triple hélice. Estas macromoléculas de tropocolágeno son muy pequeñas y se agrupan entre sí constituyendo estructuras denominadas fibrillas de colágeno, las cuales se unen lado a lado conformando fibras más voluminosas, visibles al microscopio óptico, tal como se muestra en el esquema de la Figura N° 8. Estas a su vez tienden a agruparse en conjuntos más grandes llamados haces colágenos (Brodsky and Eikenberry, 1982). Cada molécula tiene, por lo general, uno o más sitios de unión que se unen a otros componentes de la matriz u otras células, permitiendo la formación de una vasta red de comunicación. Estas fibras juegan un rol vital en el mantenimiento de la integridad estructural y en la determinación de la función tisular (Rich and Whittaker, 2005).

Es de interés destacar que las tasas de biosíntesis de colágeno son significativamente elevadas en el útero en determinadas etapas. Es así como el colágeno ha sido involucrado en el desarrollo placentario de diversas especies animales, formando parte del tejido conectivo de las vellosidades placentarias y el principal componente de la matriz extracelular placentaria (Benirschke y Kaufmann, 2000; Vizza *et al.*, 2001; Vizza *et al.*, 2005; Sati *et al.*, 2008; Cristofolini *et al.*, 2009; Merkis *et al.*, 2009; Sanchis *et al.*, 2011; Sanchis y col, 2012b). También, se lo ha relacionado en la involución uterina que sobreviene al postparto en cerdas (Belstra *et al.*, 2005) y ratas (Manase *et al.*, 2006).

Existiendo más de 20 tipos específicos de colágeno, su estudio involucraría la determinación a través de técnicas inmunohistoquímicas, resultando complejo y oneroso. La tinción de Picrosirius red (PSR) ha probado ser una técnica de tinción histológica de creciente utilidad y popularidad debido a la simplicidad del procedimiento y sus resultados consistentes (Acta Histoquémica, 2011). Examinado con microscopía de campo claro el colágeno se observa rojo y el músculo amarillo tras la tinción de PSR (Debessa *et al.*, 2001). Si las secciones así teñidas son observadas usando ópticas de polarización con ejes polares cruzados, las fibras colágenas muestran birrefringencia (Junqueira *et al.*, 1979). Los colores birrefringentes de polarización

parecen ser una medida del grosor de las fibras colágenas, la densidad de su empaquetamiento y disposición espacial (Dayan *et al.*, 1989).

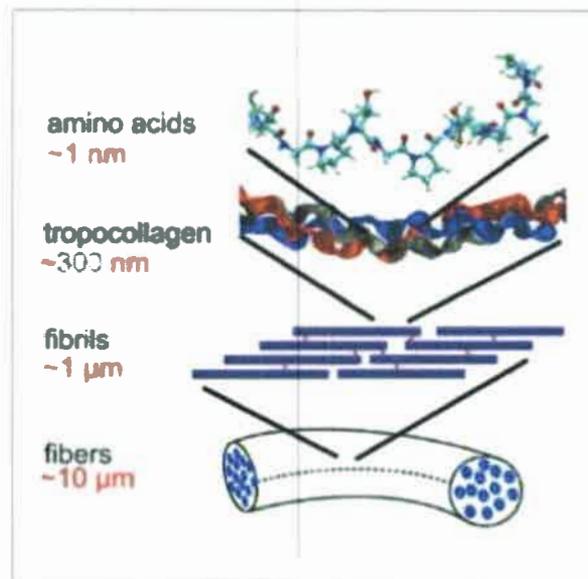


Figura N° 8: Vista esquemática de la organización jerárquica del colágeno. (**Amino acids ~1 nm:** aminoácidos de aproximadamente 1 nm; **tropocollagen ~300 nm:** tropocolágeno de aproximadamente 300 nm; **fibrils ~1 μm:** fibrillas de aproximadamente 1 um; **fibers ~10 μm:** fibras de aproximadamente 10 um). Tomado de Buehler, 2006.

Osteopontina

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína ácida de 70 kDa altamente fosforilada, en especial en sus residuos de serina (Butler *et al.*, 1996). Como se aprecia en la Figura N° 9, la unión a sus receptores específicos depende de la presencia en su citoesqueleto de la secuencia aminoacídica Ar-Gly-Asp (RGD) (Bayless *et al.*, 1998), que se une principalmente al heterodímero de integrina $\alpha_v\beta_3$. El tratamiento de OPN con proteasas da origen a dos fragmentos de diferente peso molecular y función, siendo responsable el fragmento de 24 kDa de la unión a antígenos y el de 45 kDa de la supresión no específica de los linfocitos T-helper (Weber and Cantor, 1996).

La OPN está directamente regulada por la progesterona y puede unirse a CD44 y varias integrinas, entre ellas $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, que resultan importantes durante la implantación en diversas especies (Aplin and Kimber, 2004; Kimmins *et al.*, 2004; Rashev *et al.*, 2005; Sanchis *et al.*, 2009; Williamson y Koncurat, 2009).

Se trata de una proteína versátil con múltiples funciones, que participa en diversos procesos fisiológicos y moleculares, tales como estimulación de la adhesión célula-célula, aumento de la comunicación célula-matriz extracelular, promoción de la migración de células inmunes y tumorales, así como también en la disminución de la muerte celular. A este respecto, su rol lo lleva a cabo a través de la disminución de las especies reactivas de oxígeno, así como de la producción de óxido nítrico por parte de los tejidos dañados (Denhardt and Guo, 1993). La OPN se ha visto también involucrada en la adhesión de células vasculares y en la quimioatracción de células musculares lisas (Liaw *et al.*, 1994).

Participa también como constituyente de la arquitectura de la matriz extracelular placentaria, expresándose de manera abundante en el ambiente materno-fetal durante la preñez de numerosas especies animales (Garlow *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003b, 2003c; Joyce *et al.*, 2005). Particularmente en la cerda, la OPN constituye un elemento mayoritario del microambiente uterino-placentario (Sanchis *et al.*, 2009; Sanchis *et al.*, 2010). Allí la OPN participa tanto como producto de células inmunes placentarias y uterinas, como componente del histiotrofo requerido para la adhesión y transducción de señales en la interfase materno-fetal a lo largo de la gestación (Apparao *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003a).

Por un lado, la expresión de OPN por parte de las células inmunes en el interior del útero, promueve una respuesta inmune de tipo 1 que le confiere protección contra posibles infecciones durante el acoplamiento (Garlow *et al.*, 2002).

Por otro lado, es de amplio conocimiento que entre los tejidos íntimamente aposicionados en la región de la interfase porcina existe intercambio de información para mantener un balance adecuado que asegure una preñez exitosa. Es en dicha región donde la OPN cumple un rol preponderante, expresándose en la superficie materna de esta interfase y, en la mayoría de los casos, también con altos niveles en la superficie del trofoblasto que contacta con los tejidos maternos (Johnson *et al.*, 2003a). Su unión a integrinas expresadas en el epitelio luminal uterino y trofoblástico induciría reorganización citoplasmática y adhesiones focales entre el epitelio luminal uterino porcino y células trofoblásticas *in vivo*, que permite la adhesión esencial del *conceptus* y la formación de una verdadera placenta epiteliocorial (Garlow *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005; Sanchis *et al.*, 2009).

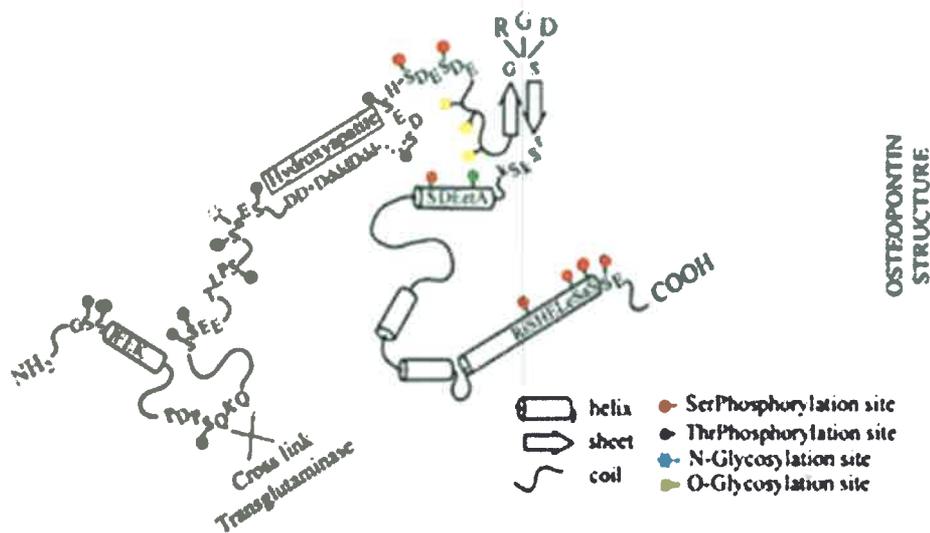


Figura N° 9: Esquema de la estructura de osteopontina. (**Osteopontin structure:** estructura de la osteopontina; **SerPhosphorylation site:** sitio de fosforilación en residuos de serina; **ThrPhosphorylation site:** sitio de fosforilación en residuos de treonina; **N-Glycosylation site:** sitio de N-glicosilación; **O-Glycosylation site:** sitio de O-glicosilación; **Cross link transglutaminase:** transglutaminasa que ataca los enlaces cruzados; **Hydroxyapatite:** hidroxiapatita; **Helix:** hélice; **Sheet:** lámina; **coil:** enrollamiento). Tomado de Denhardt *et al.*, 2001.

Fibrinógeno

El fibrinógeno (Fg) es una glicoproteína soluble heterodimérica y simétrica de 340 kDa, consistente en tres pares de cadenas polipeptídicas diferentes (A α /B β / $\gamma\gamma$) unidas por enlaces disulfuro, como se muestra en la Figura N° 10 (Iwaki *et al.*, 2002). Presenta dominios centrales y terminales globulares y, entre ellos, sectores fibrilares helicoidales. La presencia en sus extremos de cargas fuertemente negativas permiten la solubilidad del compuesto y también repelen a otras moléculas, previniendo la agregación.

El fibrinógeno está presente en el plasma sanguíneo y es precursor de la fibrina, molécula generada durante la respuesta hemostática (Mosesson *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha informado que su capacidad de formar de agregados con las plaquetas constituye una función mecánicamente diferente a la de prevenir la hemorragia fatal hacia la mitad de la gestación en ratones (Palumbo *et al.*, 2004).

Se une a diferentes sustancias, entre ellas factores de crecimiento, estimulantes potenciales de la proliferación de células endoteliales. Entre sus ligandos se encuentran

fibronectina, albúmina, factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) e interleuquina-1. Cumple además con funciones tales como la agregación plaquetaria en la hemostasis a través de la formación de puentes con integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ activada, presente en la superficie de las plaquetas, y funciones adhesivas e inflamatorias debido a interacciones específicas con otras células (Weisel, 2005). Más allá de su importante rol en la hemostasis, el Fg está involucrado en varios procesos fisiológicos y patofisiológicos, tales como la infección, la curación de heridas y la progresión de ciertos tipos de tumores. Posee, además, un rol crítico en el mantenimiento de la preñez (Lockwood *et al.*, 1991; Sutcliffe *et al.*, 1982; Iwaki and Castellino, 2005). En este sentido, se sabe que eventos tales como la ovulación, la fertilización y la implantación del cigoto fertilizado en las paredes del útero pueden suceder en ausencia de fibrinógeno, pero que tales embarazos culminan en un aborto espontáneo (Iwaki and Castellino, 2005). En ratones, se ha demostrado que en ausencia de fibrinógeno existe una separación de la unidad feto-placentaria de la pared uterina causando la pérdida completa de la integridad placentaria y una hemorragia fatal como resultado del defecto en la coagulación (Iwaki *et al.*, 2002; Palumbo *et al.*, 2004).

En placentas humanas Kaufmann *et al.* (1996) informaron la detección de dos tipos de material fibrinoide, consistentes en depósitos extracelulares que pueden hallarse en todos los estadios de preñez, en condiciones normales o patológicas. Los mismos difieren en estructura, composición y función. El material fibrinoide tipo fibrina está principalmente compuesto de fibrina, junto con otros componentes de la coagulación sanguínea; es principalmente un producto de la coagulación materna, importante en la adaptación a las condiciones sanguíneas óptimas y en el control del crecimiento de las vellosidades. El material fibrinoide tipo matriz regula la invasión del trofoblasto a través de interacciones específicas con integrinas de la superficie celular (Kaufmann *et al.*, 1996).

En 1983, Meschia, basado en el concepto de que el aumento crónico de flujo sanguíneo hacia cualquier tejido depende del crecimiento vascular, postuló que “el amplio aumento de flujo sanguíneo hacia el útero durante la preñez... resulta primeramente a partir de la formación y desarrollo del lecho vascular placentario” (Reynolds *et al.*, 2006). En este proceso, conocido como angiogénesis, el fibrinógeno presenta un rol activo, dada su capacidad de unión a factores de crecimiento involucrados en la proliferación de células endoteliales, tal como VEGF y FGF (Sahni and Francis, 2000). Más aún, en cerdos, se ha identificado una matriz extracelular rica

en fibrina que favorece la migración endotelial, y por ende la angiogénesis, al inicio de la preñez (Winther *et al.*, 1999; Cristofolini y col, 2008).

Se ha sugerido una interrelación entre VEGF y fibrina/fibrinógeno, dada la necesidad de estos últimos de sostener la proliferación y migración de las células endoteliales y angiogénesis y la estimulación potente de respuestas angiogénicas similares por VEGF (Sahni and Francis, 2000).

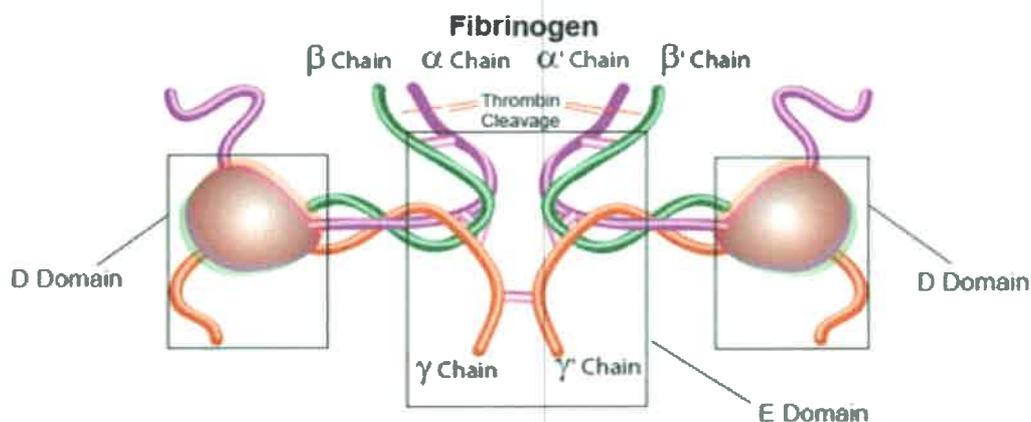


Figura N° 10: Esquema de fibrinógeno, mostrando los sitios de clivaje por trombina. (Thrombin cleavage: clivaje por trombina; α chain: cadena α ; α' chain: cadena α' ; β chain: cadena β ; β' chain: cadena β' ; γ chain: cadena γ ; γ' chain: cadena γ' ; D domain: dominio D; E domain: dominio E). Tomado de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/fibrinogen-and-fibrin.html>.

Vascularización

Anatomía vascular placentaria

La placenta es un órgano altamente vascularizado (Burton *et al.*, 2009), que ayuda a mantener el bienestar fetal mediando el transporte entre las circulaciones materna y fetal (Mayhew, 2002). El transporte placentario intervacular es la principal ruta de intercambio materno-fetal. La vasculatura placentaria se desarrolla con el avance de la gestación a medida que los nutrientes fetales y los requerimientos sanguíneos de gas aumentan y al tiempo que el flujo sanguíneo placentario total y el área de las vellosidades coriónicas se incrementan con el aumento en masa fetal (Baur, 1977; Merkis y col, 2005; Háfiez *et al.*, 2010). En la placenta porcina, la vascularización puede

diferir significativamente entre razas, citando como ejemplo las cerdas Meishan que producen placentas más pequeñas pero más vascularizadas que las Yorkshire, siendo por tanto capaces de generar camadas más grandes a partir de un útero de tamaño similar (Biensen *et al.*, 1998; Vonnahme and Ford, 2004).

El principio fisiológico básico de la placenta corioalantoidea es el intercambio entre la sangre materna y fetal. Dentro de esta clasificación, en la placenta epiteliorial de la cerda, los dos sistemas circulatorios permanecen morfológicamente separados por 6 capas de tejidos, a saber: el componente fetal formado por tejido coriónico vascularizado por vasos alantoideos (constituído por endotelio, mesénquima y trofoblasto) y el componente materno donde persisten las tres capas (epitelio superficial uterino, tejido conectivo y endotelio), tal como se muestra en la Figura N° 11. Cuando estas capas se interponen entre la corriente sanguínea fetal y materna forman la membrana placentaria o interhemal, que es la asociación de una barrera altamente selectiva y una vía de transporte e intercambio feto-materno (Björkman and Dantzer, 1987). En la barrera interhemal, dados similares gradientes de concentración, gases y solutos difunden con una velocidad de transferencia que depende directa e inversamente de la distancia a recorrer en la difusión y del área de la superficie de intercambio (Wooding and Burton, 2008).

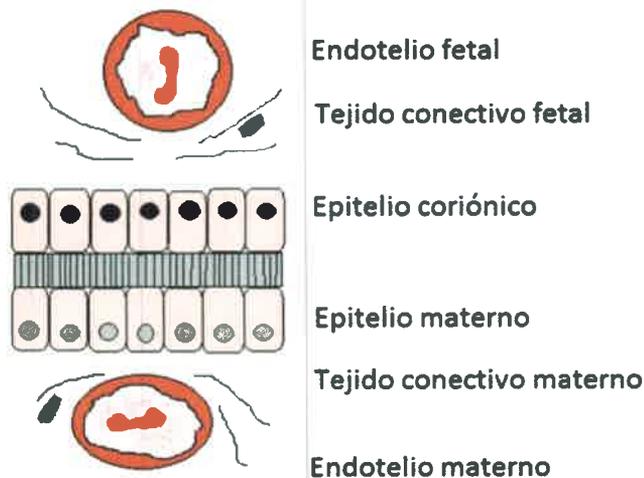


Figura N° 11: Esquema de la placenta epiteliorial de la cerda. Adaptado de <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/structure.html>

Angiogénesis y matriz extracelular

La angiogénesis consiste en el desarrollo de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes. Se trata de un proceso finamente regulado, que acontece tanto en tejidos normales como anormales, en el que intervienen numerosas células y moléculas, como las que se observan en la Figura N° 12.

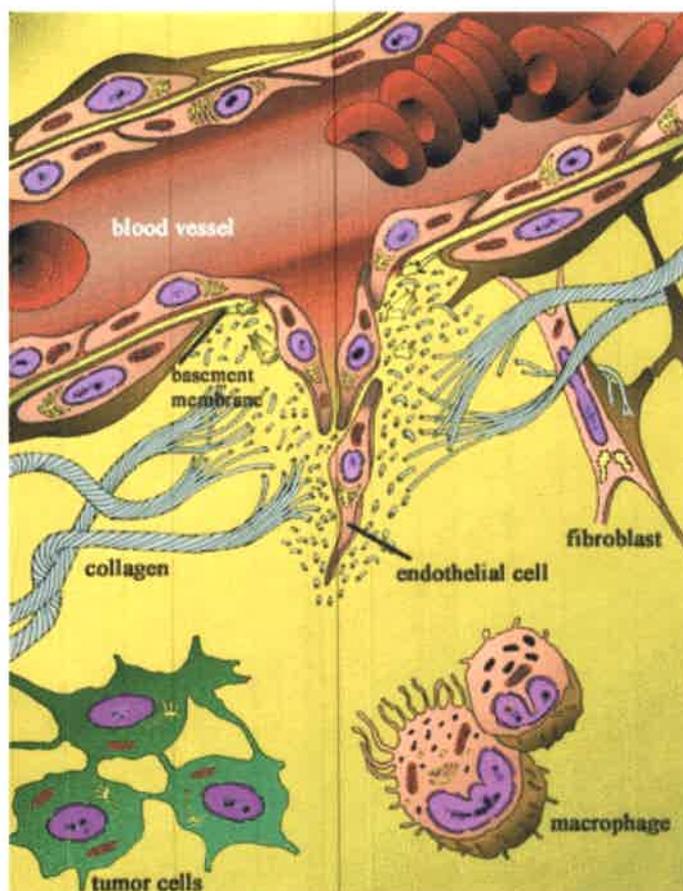


Figura N° 12: Células y moléculas involucradas en la angiogénesis. (blood vessel: vaso sanguíneo; basement membrane: membrana basal; collagen: colágeno; endotelial cell: célula endotelial; fibroblast: fibroblasto; tumor cells: célula tumoral; macrophage: macrófago) Tomado de <http://flipper.diff.org/app/pathways/info/1965>

El proceso se inicia con la degradación focalizada en la membrana basal de los capilares, creando un defecto a partir del cual las células endoteliales migran formando un brote y proliferan hasta crear un nuevo lumen y posterior maduración de los vasos (Klagsbrun and D'Amore, 1991; Koblizek *et al.*, 1998).

La membrana basal vascular (VBM) es una delgada membrana compuesta de una ECM altamente especializada, que existe en la interfase endotelio/mesénquima y consiste principalmente de un armazón de laminina y colágeno tipo IV que, aunque independientes, interactúan entre sí (Clamp and Jayson, 2005).

Mientras se hallan en contacto con una VBM madura, las células endoteliales permanecen en estado quiescente, lo que indica que las señales provenientes de esta estructura inhiben la proliferación y facilitan la adhesión célula-célula. En presencia de factores de crecimiento, tales como VEGF y FGF-2, hay producción de enzimas, en particular metaloproteinasas de matriz (MMPs) y heparanasa a partir de células endoteliales y estromales activadas (Fig. N° 13). Al degradar la VBM, remueven una barrera física a la migración de las células endoteliales, liberando estas enzimas moléculas de VEGF y FGF-2 previamente secuestradas por la ECM, estimulando el proceso angiogénico y exponiendo epitopes críticos de las proteínas VBM a las células endoteliales. Estos epitopes pueden tener efectos pro- o anti-angiogénicos (Clamp and Jayson, 2005).

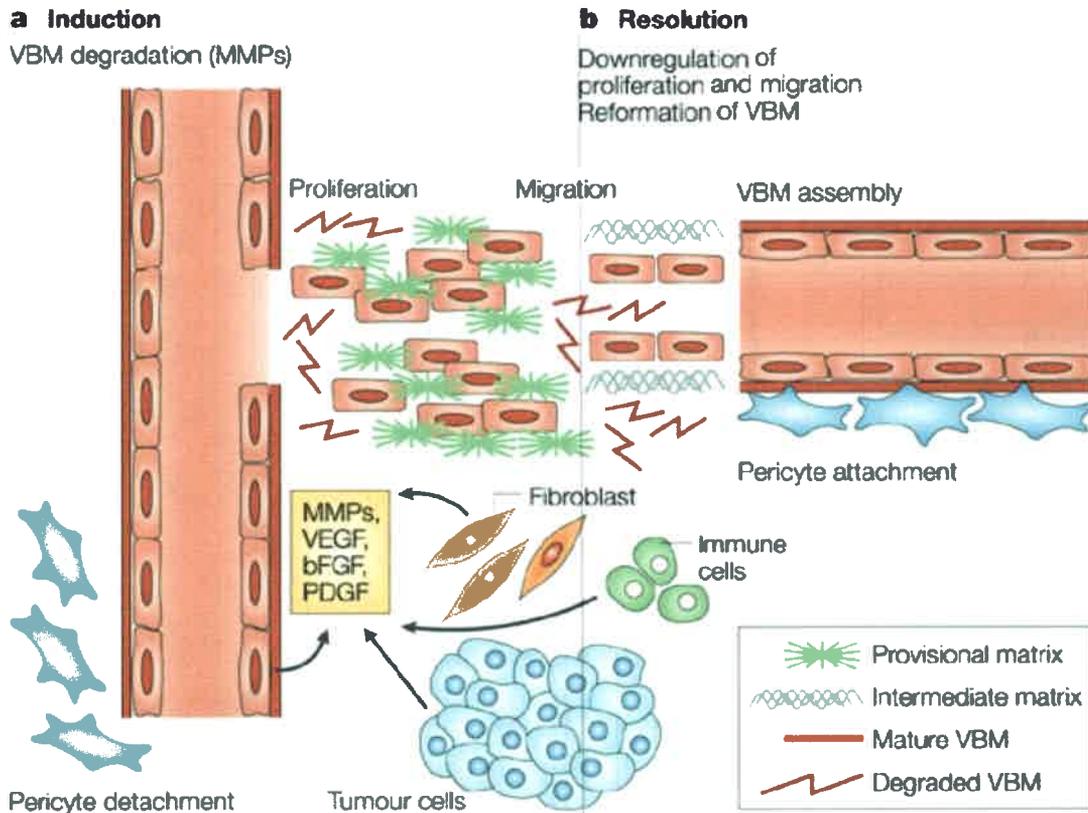


Figura N° 13: Participación de la membrana basal vascular (VBM) en la angiogénesis.

a) Inducción: degradación de la membrana basal vascular a través de metaloproteinasas (MMPs); **b) Resolución:** regulación de la proliferación y la migración. Reformación de la VBM; (**Proliferation:** proliferación; **Migration:** migración; **VBM assembly:** ensamblaje de la VBM; **Percyte attachment:** adhesión de pericitos; **Fibroblast:** fibroblasto; **Immune cells:** células inmunes; **Tumor cells:** células tumorales; **Percyte detachment:** desprendimiento de pericitos; **Provisional matrix:** matriz provisoria; **Intermediate matrix:** matriz intermedia; **Mature VBM:** VBM madura; **Degraded VBM:** VBM degradada)

Tomado de <http://flipper.diff.org/app/pathways/info/1965>

Angiogénesis placentaria

Durante la preñez, para satisfacer las demandas metabólicas de los *concepti*, el flujo sanguíneo hacia el útero aumenta, resultando el mismo a partir de la formación y desarrollo del lecho vascular placentario (Goldstein *et al.*, 1980; Meschia, 1983; Reynolds and Redmer, 2001). El incremento en el flujo sanguíneo parece ser el mecanismo primario para aumentar el intercambio trasplacentario durante la gestación (Reynolds *et al.*, 2005b), dado que permite acortar las distancias a recorrer por gases y

solutos durante la difusión (Cristofolini y col, 2012; Sanchis y col, 2012). En cabras y ovejas, especies que desarrollan primariamente una placentación epiteliocorial como la de la cerda (Wooding and Burton, 2008; Merkis *et al.*, 2009), la importancia del desarrollo vascular para la función placentaria radica, fundamentalmente, en que afecta el crecimiento fetal y la sobrevivida post-natal (Greenwood *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2005a). Similares conclusiones se han obtenido tras diversos estudios en gestaciones humanas (Breier *et al.*, 2001; Oken and Gillman, 2003).

Si bien la red vascular en el adulto es preferentemente estable, su adaptación, expansión y remodelación ocurre de manera notoria bajo estímulos fisiológicos definidos, tal es el caso de la placenta durante la gestación (Charnock-Jones *et al.*, 2004). En el desarrollo vascular placentario intervienen numerosos factores angiogénicos y no angiogénicos. Entre los factores angiogénicos podemos citar a los miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), tales como VEGF y factor de crecimiento placentario (PlGF), como así también otras moléculas, como las angiopoyetinas 1 y 2 (Ang-1 y Ang-2) y el factor de crecimiento fibroblástico, todos los cuales llevan a cabo su acción a través de la unión a receptores específicos (Dunk *et al.*, 2000; Zachary and Glick, 2001; Tjwa *et al.*, 2003; Presta *et al.*, 2005; Lukasz *et al.*, 2008; Roskoski, 2008, Tomanek *et al.*, 2008). Muchos de estos factores han sido involucrados en la formación de la vasculatura fetoplacentaria en diversas especies mamíferas (Ahmed *et al.*, 2000; Goldman-Wohl *et al.*, 2000; Vonnahme *et al.*, 2001; Wulff *et al.*, 2002; Zygmunt *et al.*, 2003; Vonnahme and Ford, 2004; Welter *et al.*, 2004; Pfarrer *et al.*, 2005; Wollenhaupt *et al.*, 2005; Pfarrer *et al.*, 2006; Babischkin *et al.*, 2007; Seval *et al.*, 2008; Valdés and Corthorn, 2011).

Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)

Entre los promotores primarios de la angiogénesis, se encuentra el factor de crecimiento endotelial vascular. El VEGF es una glicoproteína homodimérica de aproximadamente 45 kDa, con características de potente agente mitógeno, morfógeno y quimioatrayente de células endoteliales, el cual es estimulado por hipoxia, citoquinas y diversas hormonas (Neufeld *et al.*, 1994). Posee además una significativa acción estimulante de la permeabilidad microvascular, incluso más potente que la de la histamina. Esta característica ha llevado también a denominarlo factor de permeabilidad vascular (VPF, Keck *et al.*, 1989). Se localiza en las membranas fetales, donde

participaría en la regulación del fluido amniótico (Cheung, 1997). Este rol sobre la permeabilidad sería significativo en la placenta, dado que la liberación de las sustancias desde los capilares hacia cualquier lado de la interfase materno-fetal tendría un efecto directo sobre el transporte a través de la mencionada interfase (Charnock-Jones *et al.*, 2001).

La acción de VEGF es ejercida a través de la unión a receptores específicos tirosina quinasa, denominados VEGF-R1 (o Flt-1) y VEGF-R2 (también llamado KDR o Flk-1), cuyas acciones se resumen en la Figura N° 14 (Kaczmarek *et al.*, 2009, Moliva *et al.*, 2011). En la cerda, tanto VEGF como sus receptores están presentes en células epiteliales coriónicas y adyacentes al útero así como en vasos sanguíneos desde la gestación temprana a la tardía (Vonnahme and Ford, 2004; Sanchis y col, 2012a).

Estudios previos demostraron que en la placenta porcina la densidad vascular (o el número de vasos placentarios por unidad de área) aumenta marcada y progresivamente luego del día 50 de gestación (Vonnahme *et al.*, 2001; Merkis y col, 2006) y está positivamente correlacionado con la eficiencia placentaria, así como con el incremento en la expresión placentaria del factor de crecimiento endotelial vascular Vonnahme *et al.* (2001). Esto es debido a las necesidades crecientes de nutrientes y gases respiratorios por parte del feto. El aumento de masa fetal con el transcurso de la gestación representa para el oxígeno un obstáculo en la difusión. Como resultado se generan zonas con bajas concentraciones de oxígeno que estimulan en los tejidos la producción de VEGF y, por consiguiente, la generación mediante angiogénesis de nuevos vasos sanguíneos placentarios (Vonnahme and Ford, 2003), dado la fuerte acción estimulante de la hipoxia sobre la producción de VEGF (Goldberg and Schneider, 1994; Cheung, 1997). Consistente con el significativo desarrollo de vasos sanguíneos en la placenta durante la preñez, la expresión de VEGF y sus receptores aumenta con el avance de la edad gestacional (Levy *et al.*, 1998), aunque estos últimos no al mismo nivel que VEGF (Tuder *et al.*, 1995).

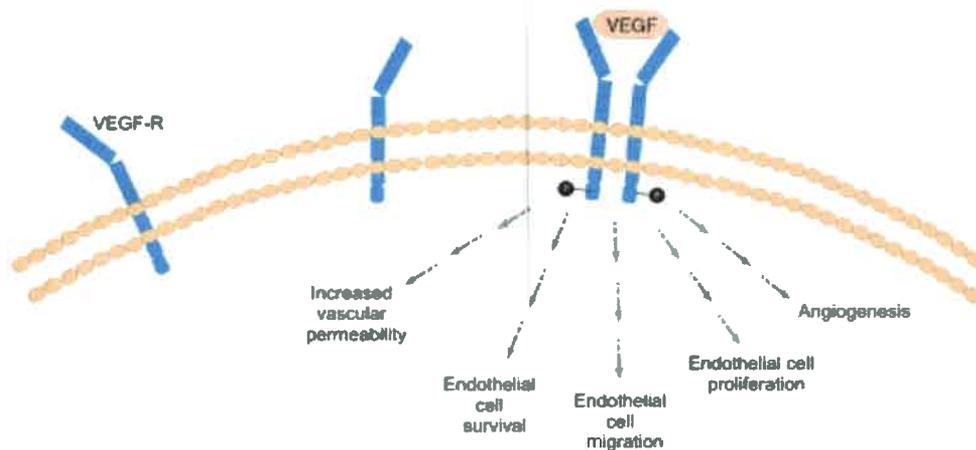


Figura N° 14: Acciones de VEGF a partir de la unión a un receptor tirosin-quinasa. (Increased vascular permeability: aumento de la permeabilidad vascular; Endotelial cell survival; supervivencia de las células endoteliales; Endothelial cell migration: migración de las células endoteliales; Endothelial cell proliferation: proliferación de las células endoteliales; Angiogenesis: angiogénesis). Tomado de Otrrock *et al.*, 2007.

Receptores angiogénicos: VEGF-R1, VEGF-R2

Los factores angiogénicos mejor caracterizados pertenecen a la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular, la cual incluye, entre otros al VEGF propiamente dicho y al factor de crecimiento placentario (Tjwa *et al.*, 2003; Roskoski, 2008).

La formación y desarrollo del lecho vascular placentario, principal vía de intercambio de nutrientes y desechos, se denomina angiogénesis y consiste en el desarrollo de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes. En el mencionado proceso, la presencia de los receptores angiogénicos específicos del factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF-R1 (Flt-1) y VEGF-R2 (Flk-1/KDR), resulta fundamental para la acción de su ligando.

Inicialmente, se sugirió que VEGF-R1 era un receptor “señuelo”, capaz de reducir el número de moléculas de VEGF circulantes disponibles para unir VEGF-R2; sin embargo, estudios posteriores revelaron que la unión de VEGF a VEGF-R1 puede resultar, al menos, en la inducción de una señal mitogénica, en el reclutamiento de células endoteliales progenitoras o en la liberación de factores de crecimiento específicos de tejido (Kaczmarek *et al.*, 2009). Aunque VEGF une VEGF-R2 con una afinidad menor de la que une VEGF-R1, VEGF-R2 es considerado el principal mediador de los efectos angiogénicos y mitogénicos de VEGF, así como del aumento de

la permeabilidad vascular (Ferrara *et al.*, 2003). Experimentos en ratones *knock-out* han resaltado la importancia de VEGF-R2 para la especificidad y diferenciación temprana de precursores hemangioblásticos a capilares feto-placentarios y de VEGF-R1 para el subsecuente rearrreglo de células endoteliales tempranas para formar tubos endoteliales (Demir *et al.*, 2004).

Durante la preñez, el flujo sanguíneo hacia el útero se incrementa dramáticamente para alcanzar las crecientes demandas de los fetos en desarrollo (Grummer *et al.*, 2009). Como en todas las placentas de mamíferos, el extensivo desarrollo de las redes capilares fetales y maternas ocurre en forma paralela al desarrollo celular de la interfase feto-materna con el fin de maximizar el alcance y eficiencia del intercambio hemotrófico (Abd-Elnaeim *et al.*, 2006). Más aún, en la placenta epiteliocorial de la cerda, para aumentar la superficie de intercambio entre los componentes fetales y maternos, el aumento en masa fetal va acompañado de un incremento en el área de las vellosidades coriónicas (Merkis y col, 2005).

Si bien originalmente ambos receptores tirosin-quinasa fueron considerados específicos de células endoteliales, en la placenta tanto las células endoteliales como no endoteliales expresan ambos receptores de VEGF (Ahmed *et al.*, 2000). VEGF y sus dos moléculas receptoras principales se han hallado en el endometrio, decidua y trofoblasto de los primates humanos (Charnock-Jones *et al.*, 1994) y no humanos (Wulff *et al.*, 2002), en la placenta sinepiteliocorial de las ovejas (Cheung *et al.*, 1995), así como en la placenta epiteliocorial de la yegua (Allen *et al.*, 2007) y de la cerda (Charnock-Jones *et al.*, 2001). Particularmente en la cerda, tanto VEGF como sus receptores están presentes en las células epiteliales coriónicas y adyacentes al útero, así como en los vasos sanguíneos desde la gestación temprana a la tardía (Vonnahme and Ford, 2004). La presencia de Flt-1 y KDR ha sido puesta de manifiesto en el endotelio de las vellosidades placentarias y del trofoblasto humano (Ahmed *et al.*, 2000).

Apoptosis

El proceso apoptótico

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada controlada a nivel génico. Juega un rol importante en el desarrollo embrionario, el mantenimiento de la homeostasis tisular y la eliminación de células con severos daños en el ADN, así como

en la morfogénesis, la renovación tisular y la regulación del sistema inmune, permitiendo la eliminación de las células indeseables por parte del organismo (Angosto, 2003). Se trata de un proceso biológico fundamental que sucede bajo una gran variedad de situaciones fisiológicas y patológicas que, conjuntamente con la mitosis, controla el número de células de un tejido dado (Heazell *et al.*, 2006; Heazell and Crocker, 2008). De tal manera, alteraciones en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis pueden directa o indirectamente llevar al retardo del crecimiento fetal o a la pérdida de la preñez (Kelten *et al.*, 2010).

Morfológicamente, la apoptosis se caracteriza por descenso del volumen celular, fragmentación nuclear, modificación del citoesqueleto, condensación de la cromatina y degradación del ADN en fragmentos nucleosomales (Fig. N° 15). Como resultado, se forman cuerpos apoptóticos que rápidamente son fagocitados por macrófagos sin respuesta inflamatoria (Angosto, 2003; Levy and Nelson, 2000).

El proceso apoptótico puede desencadenarse a través de dos vías de señalización: la vía extrínseca o de los receptores de membrana y la vía intrínseca o mitocondrial. El primero es mediado por interacciones entre los receptores de membrana y sus ligandos, tales como Fas ligando o TNF- α . El segundo mecanismo se desencadena a partir de estímulos exógenos, tales como hipoxia, radiación y drogas quimioterápicas, donde la señal de muerte es transmitida a través de la mitocondria (Greijer and van der Wall, 2004; Merkis *et al.*, 2010).

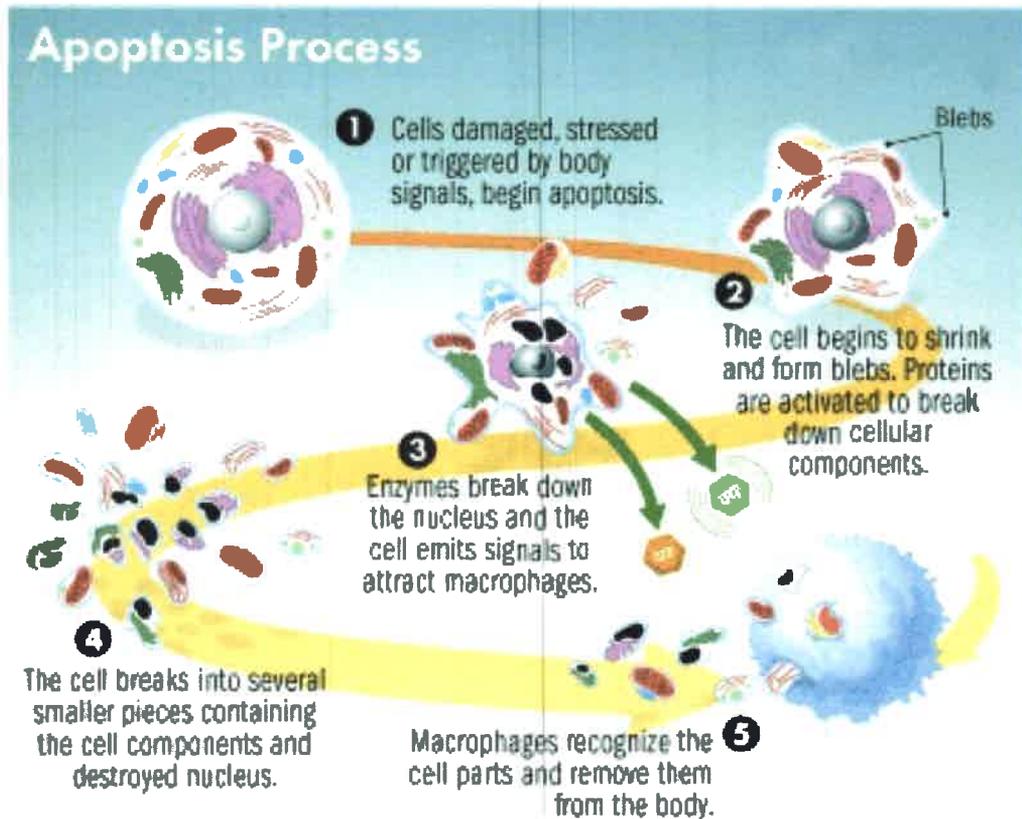


Figura N° 15: Proceso apoptótico. 1) Las células dañadas, estresadas o detonadas por señales corporales, comienzan la apoptosis; 2) La célula comienza a encogerse y forma vesículas. Las proteínas son activadas para separar los componentes celulares; 3) Las enzimas descomponen el núcleo y la célula emite señales para atraer a los macrófagos; 4) La célula se divide en numerosas piezas pequeñas conteniendo los fragmentos celulares y el núcleo destruido; 5) Los macrófagos reconocen las partículas celulares y los remueven del cuerpo (Blebs: vesículas). Tomado de <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/apoptosis.htm>.

Apoptosis placentaria

Se ha señalado que la muerte celular programada desempeña un papel relevante en el desarrollo embrionario y placentario en la mayoría de los mamíferos (Levy and Nelson, 2000; Matwee *et al.*, 2000; Ranger *et al.*, 2001; Boos *et al.*, 2003; Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Huppertz *et al.*, 2006; Reti *et al.*, 2007), así como en la regulación de la homeostasis tisular y vascular (Dimmeler and Zeiher, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Troyanovsky *et al.*, 2001; Tertemiz *et al.*, 2005; Okano *et al.*, 2007). Núcleos

apoptóticos han sido identificados en todos los tipos de células placentarias (Austgulen *et al.*, 2002). Más aún, estudios en placentas humanas han descrito a la apoptosis como un fenómeno fisiológico normal durante la gestación, que juega un rol importante en el desarrollo y la remodelación placentaria, sobre todo en el tercer trimestre (Thiet *et al.*, 2000; Angosto, 2003; Barrio y col, 2003). En porcinos, estudios previos realizados por nuestro equipo de investigación han intentado caracterizar el proceso apoptótico durante la placentación (Cristofolini *et al.*, 2007; Cristofolini y col, 2008; Cristofolini *et al.*, 2009, Cristofolini, 2010; Cristofolini y col, 2010; Cristofolini *et al.*, 2011, Cristofolini *et al.*, 2012; Cristofolini y col, 2012; Merkis *et al.*, 2007; Merkis *et al.*, 2010). Como resultado, se ha establecido que durante la preñez en porcinos la remodelación celular placentaria es mediada por la vía extrínseca, a través del receptor de membrana FAS y otros miembros de la superfamilia TNF-R1 y que dicho proceso sería responsable de favorecer el parto en cerdas de gestación a término (Merkis *et al.*, 2010). Sin embargo resta dilucidar su implicancia en la remodelación que sufren los vasos sanguíneos placentarios con el avance de la gestación.

Proliferación celular

Proliferación celular placentaria

El mantenimiento de la integridad estructural y funcional del tejido placentario involucra un recambio celular altamente regulado que depende de un delicado balance entre proliferación, diferenciación y pérdida celular (Benirschke and Kaufmann, 2000). El desarrollo placentario depende de la progresión del ciclo celular, el cual involucra la participación de las proteínas PCNA y Ki67 (Unek *et al.*, 2012). Aunque más específico que PCNA como marcador de proliferación, Ki67 posee reconocidas limitaciones y su función exacta es hasta ahora desconocida (Xue *et al.*, 2003).

La proteína Ki67 fue originalmente definida como el prototipo del anticuerpo monoclonal Ki67, generado por inmunización de ratones con núcleos de la línea celular L428 del linfoma de Hodgkin. Su nombre deriva de la ciudad de origen (Kiel) y el número del clon original en la placa de 96 pocillos (Scholzen and Gerdes, 2000).

El antígeno Ki67 es una proteína nuclear y nucleolar estrechamente ligada a la proliferación de las células somáticas (Endl and Gerdes, 2000). Está presente en el núcleo de las células en las fases G₁, S y G₂ del ciclo celular, así como en la mitosis.

Las células quiescentes o en arresto en la fase G₀ no expresan el antígeno Ki67; consecuentemente dicha proteína es un marcador excelente para determinar la fracción de crecimiento de una población celular (Scholzen and Gerdes, 2000).

Diversos estudios han empleado Ki67 como marcador de proliferación celular en procesos patológicos (Olvera *et al.*, 2001; Kelten *et al.*, 2010) y fisiológicos (Olvera *et al.*, 2001; Korgun *et al.*, 2006) en placentas de diversas especies. Sin embargo, según la bibliografía consultada, nada se ha informado sobre la proliferación celular en la progresión normal de la gestación en porcinos. Dado que la placenta juega un rol fundamental en el crecimiento fetal y que las fallas en el crecimiento y desarrollo placentario durante la gestación están directamente asociadas con un crecimiento fetal restringido, resulta importante comprender los mecanismos del desarrollo placentario ligados a la proliferación celular (Unek *et al.*, 2012).

..... *HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*

Hipótesis de Trabajo

En la neovascularización placentaria porcina intervendrían moléculas de matriz extracelular, tales como osteopontina, fibrinógeno y colágeno, cuya distribución temporo-espacial permitirían establecer un lecho de sostén para el desarrollo vascular. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y sus receptores específicos, VEGF-R1 y VEGF-R2 participarían en el establecimiento de una red vascular apropiada para satisfacer las crecientes demandas metabólicas de los *concepti* en desarrollo. Asimismo, el análisis del número, área y distribución de los vasos sanguíneos como así también de los parámetros morfométricos que los caracterizan y el grado de dependencia del período gestacional coadyuvarían a la comprensión del mencionado evento fisiológico. El estudio de la apoptosis a través del ensayo TUNEL y de la proliferación celular por medio del antígeno Ki67, permitirá comprender cómo estos procesos, al parecer opuestos, se relacionan para lograr la remodelación de los tejidos placentarios maternos y embrionarios, así como de la red vascular placentaria para acompañar con éxito la gestación.

Objetivo General

Estudiar la neovascularización presente en muestras de tejido placentario porcino provenientes de 30, 60, 80, 90 y 114 días de preñez, a fin de comprender la remodelación vascular placentaria que ocurre durante la gestación porcina, indispensable para el éxito de la preñez.

Objetivos Específicos

Describir la morfología celular por microscopía óptica en cortes provenientes de placentas de 30, 60, 80, 90 días de gestación y a término (114 días), con diferentes tinciones histológicas.

Detectar la presencia de fibras colágenas de diferente grosor a través de la técnica de Picrosirius red en las muestras de 30, 60, 80, 90 días de gestación y a término (114 días).

Estudiar por inmunohistoquímica la localización de osteopontina y fibrinógeno en los diferentes estadios de preñez seleccionados.

Determinar la presencia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) a través de técnicas inmunohistoquímicas en las placentas seleccionadas.

Determinar la presencia de los receptores de VEGF, VEGF-R1 (Flt-1) y VEGF-R2 (Flk-1 o KDR), a través de técnicas inmunohistoquímicas en las placentas seleccionadas.

Establecer el área ocupada por los vasos sanguíneos en muestras placentarias de 30, 40, 60, 80, 90 días de gestación y a término (114 días) para evaluar la dependencia del área vascular con respecto al período gestacional.

Determinar la proliferación celular a través de la expresión del antígeno Ki67 en las muestras placentarias seleccionadas a través de ensayo inmunohistoquímico.

Determinar la remodelación celular por apoptosis a través de la visualización de la fragmentación del ADN mediante el ensayo TUNEL en los diferentes períodos gestacionales.

..... *MATERIALES Y MÉTODOS*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

1.1. Cerdas

Se trabajó con muestras placentarias obtenidas de cerdas mestizas gestantes, provenientes de frigoríficos y criaderos de la zona de Río Cuarto, Argentina (33,11° S, 64,3° O).

En todos los casos, se trató de animales destinados a faena y considerados libres de enfermedad, de acuerdo al examen clínico y *postmortem* realizado.

1.2. Obtención de tractos reproductivos

Se procesaron 30 tractos reproductivos de diferentes períodos gestacionales. Inmediatamente después de obtenidos, se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco, USA) conteniendo 10.000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina y 2.5 µg/ml de fungizona y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

1.3. Obtención de placentas

Se realizó una palpación de los tractos reproductivos obtenidos para detectar la ubicación de los embriones o fetos; los cuernos uterinos fueron cuidadosamente abiertos en forma longitudinal con una incisión por el borde anti-mesometrial, para observar el sitio de implantación y recoger muestras del tejido mesometrial y placentario fetal. Dado el tipo de placenta, no invasiva, se pudo separar fácilmente el constituyente placentario materno del fetal.

Se extrajeron los embriones/fetos de ambos cuernos y se procedió al conteo, pesaje, medición y sexado de los mismos.

Parte del tejido placentario se preservó para el análisis de estructura por medio de microscopía óptica y microscopía óptica de alta resolución, y para la medición de vasos sanguíneos a través del uso de tinción tricrómica de Masson y Gallego. Mientras que el resto del tejido se preservó para la determinación de osteopontina, fibrinógeno,

factor de crecimiento vascular endotelial y receptores a través de ensayos de inmunohistoquímica, para la determinación de apoptosis a través del ensayo TUNEL y para la detección de colágeno por medio de la técnica de Picosirius red.

1.3.1. Determinación de la edad gestacional de los embriones/fetos

Se determinó la edad gestacional de los embriones o fetos extraídos de cada cerda gestante en función de la longitud céfalo-caudal de los mismos (Marrable, 1971). De acuerdo a ello, se obtuvieron placentas de 30, 40, 60, 80, 90 y 114 días de preñez.

2. Preparación de cortes histológicos para microscopía óptica

2.1. Técnica histológica convencional para microscopía óptica

Se tomaron porciones de tejido placentario de 6 mm³ aproximadamente y se fijaron con formol salino tamponado. Posteriormente, se deshidrataron con una batería de alcoholes de graduación creciente, para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos de aproximadamente 4 µm y parte de los mismos se empleó para tinción de hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson y tricrómica de Gallego. Los cortes restantes se preservaron para la realización de técnicas inmunohistoquímicas para el estudio de la presencia de osteopontina, fibrinógeno, factor de crecimiento vascular endotelial y receptores, para la determinación de apoptosis a través de TUNEL y para la determinación de colágeno por Picosirius red.

2.1.1. Tratamiento para tejidos incluidos en parafina

Se realizaron cortes seriados de ±4 µm con un micrótopo (Microm, Alemania) y se montaron de a 3-4 cortes sobre cada portaobjeto. Previo al montaje, los cortes fueron pasados por un recipiente con agua destilada a 45°C durante 10 minutos, para evitar plegamientos. Los portaobjetos con los cortes se colocaron sobre una plancha termostática a 40°C durante 15 h y se guardaron toda la noche a 37°C en estufa, para lograr el secado completo de los mismos. Posteriormente, los tejidos se desparafinaron y rehidrataron mediante el siguiente protocolo:

- 2 pasajes en xilol 100 % de 10 min c/u.
- 2 pasajes en alcohol 100 % de 5 min c/u.
- 1 pasaje en alcohol 90% de 5 min.
- 1 pasaje en alcohol 80 % de 5 min.
- 1 pasaje en alcohol 70% de 5 min.
- 2 pasajes en agua destilada de 10 min c/u.
- 2 pasajes en solución salina tamponada (PBS) de 10 min c/u.

Preparación de PBS de Sörensen 0,1 M pH 7,4:

Solución A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	35,61 g/ 1.000 ml
Solución B: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27,60 g/ 1.000 ml
Para obtención de pH 7,4: Solución A:	40,5 ml
Solución B:	9,5 ml

Se mezclaron las Soluciones A y B, se controló el pH y luego se enrasó con agua destilada hasta volumen final de 100 ml.

3. Preparación de cortes histológicos para microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

3.1. Técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión

Para el estudio de la estructura placentaria por microscopía óptica de alta resolución, las muestras de tejido placentario se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en solución tampón fosfato de Sörensen (0,1 M, pH 7,4) durante 3 h a 4°C. Luego se lavaron dos veces con solución tampón fosfato. Se refijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron dos veces en solución tampón fosfato y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona. Se procedió luego a la preinclusión en resina epoxi EMBED 812 1:1 en acetona 100% durante toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente a una inclusión en EMBED 812 a 60°C, durante 24 horas. A través de un ultramicrotomo manual (Sorvall MT-1A, DuPont, USA), utilizando cuchillas de vidrio, se obtuvieron cortes semifinos ($\pm 0,25 \mu\text{m}$).

Para la realización de la técnica de microscopía electrónica de transmisión se prepararon las siguientes soluciones:

A)- Glutaraldehído 2,5 % / Buffer pH 7,2 -7,4

Glutaraldehído al 25%	10 ml
PBS Sörensen 0,2 M pH 7,2 – pH 7,4	20 ml
Agua bidestilada	70 ml

Se preparó la solución fijadora, se alicuotó y se conservó a - 20°C hasta su utilización.

B)- Resina Embed 812 Kit – Electron Microscopy Science cat# 14120

Preparación de resina para preinclusión

Solución A:

Embed 812	5 ml
DDSA	8 ml

Solución B:

Embed 812	8 ml
NMA	7 ml

Para la preparación de la resina de preinclusión, se mezclaron las soluciones A y B, se homogeneizaron y diluyeron 1:1 con acetona absoluta, y se empleó en el momento. La preinclusión se realizó a temperatura ambiente durante 24 hs.

Preparación de resina para inclusión

Solución A:

Embed 812	5 ml
DDSA	8 ml

Solución B:

Embed 812	8 ml
NMA	7 ml

Solución de inclusión:

Solución A + B	28 ml
DMP-30	16 gotas

Para la preparación de la resina de inclusión, se mezclaron las soluciones A y B, se homogeneizaron y se agregó el catalizador de la reacción de polimerización DMP-30. Se homogeneizó, se dejó reposar unos minutos para la eliminación de burbujas de aire y se realizó la inclusión a 60°C durante 24 hs.

C)- Solución fijadora de tetróxido de osmio (OsO₄) al 1%

Solución stock OsO₄ al 2%:

Tetróxido de osmio	1 g
Agua bidestilada	50 ml

Se colocó la ampolla con los cristales de tetróxido de osmio dentro de un frasco oscuro bajo campana de extracción. Se rompió con una varilla de vidrio la ampolla dentro del mismo frasco y se le agregó el agua bidestilada, dejando reposar al menos una semana, para que la solución se disolviera. Se conservó a 4°C en recipiente correctamente cerrado para evitar la eliminación de vapores.

Solución de trabajo OsO₄ al 1%:

Al momento de realizar la refijación, la solución madre de OsO₄ al 2 % se diluyó 1:1 con buffer fosfato de Sörensen 0,1 M.

4. Análisis de la estructura placentaria

4.1. Tinción de hematoxilina eosina

Para la realización de la técnica se prepararon las siguientes soluciones:

A)- Hematoxilina

Solución stock:

- 10% de hematoxilina en 95% de etanol absoluto
- 4% de alumbre de sodio

-0,1% de Na IO₃

Solución de trabajo:

-1 ml de solución stock de hematoxilina

-40 ml de alumbre de sodio

-4,5 ml de Na IO₃

-100 ml de agua destilada

B) Eosina

Solución stock:

-1 g de eosina

-99 ml de etanol 70%

Solución de trabajo:

-1 ml de solución stock

-15 ml de agua destilada

El protocolo de la técnica consta de los siguientes pasos:

- 1- Colorear con hematoxilina 1,5 min.
- 2- Lavar con agua corriente.
- 3- Colorear con eosina 1 min.
- 4- Lavar con agua corriente.
- 5- Deshidratar y montar.
- 6- Observar al microscopio óptico.

Con esta técnica, la cromatina nuclear y otros compuestos basófilos se tiñen de azul, mientras que citoplasma, colágeno y otros compuestos acidófilos se observan rosados.

4.2. Tinción tricrómica de Masson

Para la realización de la técnica se procedió a la preparación de las siguientes soluciones:

Soluciones stock:

A)- Hematoxilina de Groat (se realizó la preparación en frío)

1°)- Ácido sulfúrico	0,8 ml
Alumbre férrico	1 g
Agua destilada	50 ml
2°)- Hematoxilina	0,5 g
Alcohol 95°	50 ml

Una vez disueltos los reactivos, se mezclaron las dos soluciones; se dejaron reposar 1 hora y se filtraron.

B)- Fucsina ácida de Ponceau

Fucsina ácida	0,1 g
Cristal Ponceau	0,2 g
Agua destilada	300 ml

Después de disolver los reactivos se agregó 0,6 ml de ácido acético.

C)- Naranja G- molíbdico

Naranja G	2 g
Agua destilada	100 ml
Ácido fosfomolíbdico	3 g

D)- Verde luz acético

Verde luz	0,1 g
Agua destilada	100 ml

Se disolvieron y luego se añadieron 2 ml de ácido acético 1%.

E)- Solución de ácido acético 1 %

Ácido acético glacial	1 ml
Agua destilada	99 ml

El protocolo de la técnica incluyó:

- 1- Teñir con hematoxilina de Groat, 2-5 min.

- 2- Lavar 5 min con agua corriente.
- 3- Teñir con la mezcla fucsina de Ponceau, 5 min.
- 4- Lavar rápido con agua acética.
- 5- Teñir con naranja G-molíbdeno, 5 min.
- 6- Lavar rápido con agua acética.
- 7- Teñir con verde luz acético, 5 min.
- 8- Lavar rápidamente con agua acética.
- 9- Deshidratar los cortes de tejido y montar los portaobjetos.

Con esta técnica se observan los núcleos teñidos de negro, los citoplasmas de gris y los nucleolos de rosa. Las secreciones pueden quedar teñidas de rojo o verde, las fibras musculares en rojo y las fibras colágenas en verde (Bartholomew *et al.*, 1981).

4.3. Tinción tricrómica de Gallego

Se prepararon las siguientes soluciones para la realización de la tinción:

A) Solución de cloruro férrico 29,1 %

Cloruro férrico	29,1 g
Agua destilada	100 ml

B) Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A:

Hematoxilina	1 g
Alcohol 95 %	100 ml

Solución B:

Agua destilada	95 ml
Ácido clorhídrico	1 ml
Cloruro férrico, solución al 29,1 %	4 ml

Solución de trabajo:

Se obtuvo mezclando partes iguales de las soluciones A y B recién preparadas.

C) Mordiente

Agua destilada	200 ml
Ácido nítrico concentrado	1,5 ml
Formaldehído 38-40 %	1 ml
Cloruro férrico 29,1 %	1,5 ml

D) Solución de ácido acético 0,1 %

Ácido acético glacial	0,1 ml
Agua destilada	100 ml

E) Solución de carbol-fucsina

Solución A:

Fucsina básica	4 g
Fenol	8 ml
Alcohol 95 %	20 ml
Agua destilada	100 ml

Solución B:

Ácido acético glacial	0,2 ml
Agua destilada	100 ml

Solución de trabajo:

Solución A	3 a 4 ml
Solución B	50 ml

F) Solución azul de anilina-ácido pícrico

Azul de anilina	0,1 g
Solución acuosa saturada de ácido pícrico (aprox. 1,3 g/100 ml)	100 ml

El protocolo de la técnica, luego de desparafinar los cortes, incluye:

- 1- Teñir con solución de trabajo recién preparada de hematoxilina férrica de Weigert durante 6 min.
- 2- Lavar con agua

- 3- Colocar en mordiente (solución C) por 30 segundos
- 4- Enjuagar con agua
- 5- Teñir con solución de trabajo recién preparada de carbol-fucsina por 5 min.
- 6- Enjuagar con agua
- 7- Colocar nuevamente en mordiente por 2 min.
- 8- Enjuagar con agua
- 9- Teñir con solución de azul de anilina- ácido pícrico por 1 min.
- 10- Enjuagar en solución de ácido acético 0,1 %.
- 11- Deshidratar los cortes de tejido y montar los portaobjetos.

Con esta técnica las estructuras se tiñen de la siguiente manera:

Colágeno y retículo, azul profundo. Tejido muscular, de verdoso a anaranjado amarillento. Tejido cartilaginoso, de púrpura a violeta. Tejido mucoso, azul violeta. Citoplasma, verde oliva a marrón. Fibras elásticas, de púrpura a rojo (Bartholomew *et al.*, 1981).

En todos los casos, se adquirieron las imágenes con una cámara Canon Powershot G6 7.1 megapixels (Canon, Japón) adosado a un microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania).

4.4. Deshidratación y montaje

Para las técnicas de tinción realizadas sobre cortes incluidos en parafina, la deshidratación y el montaje de los portaobjetos se llevó a cabo de la siguiente manera:

- 1 pasaje en alcohol 70 %, 5 min.
- 1 pasaje en alcohol 80 %, 5 min.
- 1 pasaje en alcohol de 90 %, 5 min.
- 2 pasajes en alcohol de 100 %, 5 min c/u.
- 2 pasajes de xilol 100 %, 5 min c/u.
- Montaje con medio Entellan® MERCK y colocación de cubreobjetos.
- Observación en microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania).

4.5. Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

Para la realización de la técnica de MOAR se preparó la siguiente solución colorante:

Azul de toluidina

Borato de sodio	0,5 gr
Azul de toluidina	0,5 gr
Agua destilada	50 ml

Filtrar.

Los cortes semifinos obtenidos según la técnica convencional de microscopía electrónica de transmisión fueron colocados sobre portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina sobre una platina termostatzada, para permitir la entrada del colorante al tejido incluido en la resina.

5. Técnica de Picrosirius red

5.1. Determinación de colágeno

En primer lugar, se colocaron los tejidos durante 30 min en hematoxilina de Weigert, a fin de teñir los núcleos. Posteriormente, se realizó un lavado con agua corriente durante 10 min. Se agregó la solución de Picrosirius red dejándolos durante 1 hora. A continuación, se realizaron dos lavados con agua ácida. Se secó bien. Se deshidrataron los cortes en tres lavados con etanol al 100%. Por último, se lavaron en xilol y se montaron con Entellan (Merck, Alemania) para ser observados en microscopio óptico de luz polarizada. La adquisición de imágenes se hizo mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón).

5.2. Preparación de las distintas soluciones:

A) Solución saturada de ácido pícrico:

Acido pícrico	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se agitó con temperatura hasta disolución completa. Se filtró de ser necesario. Se guardó en frasco color caramelo.

B) Solución Picrosirius red

Sirius red	0,5 g
Solución saturada de ácido pícrico	500 ml

C) Solución de cloruro férrico

$\text{Cl}_3\text{Fe}_6\text{H}_2\text{O}$	11,6 g
Agua destilada	980 ml
HCl concentrado	10 ml

D) Solución de hematoxilina de Weigert

Solución de hematoxilina (al 10 % en etanol 95%)	1 ml
Solución de cloruro férrico	3 ml
Agua destilada	50 ml

E) Solución de agua ácida

Acido acético (glacial)	5 ml
Agua destilada	1000 ml

Mediante esta técnica las fibras colágenas se colorearon en verde, amarillo, naranja o rojo, en orden de grosor creciente, observándose las fibras finas de color verde, las de mediano grosor en amarillo y las gruesas en naranja/rojo.

Los resultados se expresaron en forma semicuantitativa, determinando para cada color:

- (-): negativo
- (+): débil
- (++) : abundante
- (+++) : cuantioso.

6. Método de recuperación antigénica

6.1. Método de irradiación con microondas

La puesta a punto del método se realizó sobre cortes histológicos de útero porcino, obtenidos según la *Técnica histológica convencional para microscopía óptica*, descrita en el punto 3.1. de *Materiales y Métodos*.

Posteriormente, los cortes de tejido placentario de 30, 60, 80 y 90 días fueron montados en portaobjetos tratados con gelatina. Luego, fueron desparafinados e hidratados. Se lavaron con PBS. Se colocaron en jarras de Coplin de plástico, sin tapar y llenas con buffer citrato 10mM, pH 6,0. Se utilizó un horno microondas giratorio (Coventry-20R, Corea), situándose las jarras en el centro. Se colocaron siempre de a tres coplins, con 5 portaobjetos cada uno. De ser necesario, se agregaron jarras y/o portaobjetos limpios. Los portaobjetos se irradiaron durante 10 min a 78% de potencia (aproximadamente 600-700 W), reponiendo con buffer citrato el líquido evaporado cada 2 min. Se dejaron enfriar durante 20 min en el buffer citrato. Se lavaron con PBS y se continuó con la técnica de inmunohistoquímica.

6.2. Preparación de portaobjetos gelatinizados

Gelatina

Agua destilada	300 ml
Gelatina bacteriológica	1,5 g
Sulfato crómico potásico	0,15 g

Se disolvió la gelatina en agua destilada, se calentó sobre placa termostatzada sin agitación ($\pm 100^{\circ}\text{C}$), hasta disolución completa. Luego, se agregó el sulfato crómico potásico y se homogeneizó. Se sumergieron varias veces los portaobjetos en la gelatina y luego se secaron verticalmente en estufa a $60-70^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche.

Los portaobjetos se guardaron en cajas histológicas cerradas a temperatura ambiente hasta su utilización.

6.3. Preparación de buffer citrato 10mM pH 6,0

Acido cítrico monohidrato ($H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$) 2,1 gr
Agua destilada1000 ml
Ajustar el pH a 6,0 con NaOH 2N.

7. Técnicas inmunohistoquímicas

7.1. Determinación de OPN, Fg, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 y Ki67

Para la realización de estas técnicas se utilizaron cortes histológicos de 30, 60, 80, 90 y 114 días de preñez, obtenidos según el párrafo 3.1 *Técnica histológica convencional para microscopía óptica*, posteriormente desparafinados y rehidratados. En el caso de la determinación del antígeno Ki67, luego de la rehidratación se realizó una recuperación antigénica tal como se describe en el punto 6.1. *Método de irradiación con microondas*.

Para la determinación de OPN, Fg, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 y antígeno Ki67 se realizaron técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) (Ramos-Vara, 2005).

La técnica se realizó a temperatura ambiente, luego de desparafinar y rehidratar los cortes histológicos. Los portaobjetos conteniendo los cortes de tejido placentario fueron tratados previamente con 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno por 5 min y lavados con solución salina tamponada (PBS pH 7,2). Luego fueron incubados con el primer anticuerpo (anti-OPN, anti-Fg, anti-VEGF, anti-VEGF-R1 o anti-VEGF-R2, -según el caso-) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente fueron lavados con PBS (2 lavados de 10 min cada uno) e incubados durante 20 min con un pool de segundos anticuerpos biotinilados (anticuerpos anti-IgG de ratón, anti-IgG de cabra y anti-IgG de conejo). Fueron lavados con PBS (2 lavados de 10 min cada uno) y tratados con el complejo streptavidina-peroxidasa por 20 min. Luego del período de incubación, fueron lavados con PBS (2 lavados de 10 min cada uno) y tratados con la solución cromógena, diaminobencidina (DAB) durante 15 min o hasta aparición de color marrón. Posteriormente, fueron contrastados con hematoxilina de Mayer por 50 seg, lavados con solución de hidróxido de amonio al 0,08 % por 30 seg, deshidratados en batería de alcoholes de graduación creciente y montados con Entellan (Merck,

Alemania), para ser observados en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de las imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico.

7.2. Análisis de datos

Los resultados obtenidos en las técnicas inmunohistoquímicas para OPN, Fg, VEGF y sus receptores fueron expresados en forma semicuantitativa, en función de una escala elegida por la intensidad de marcación detectada en la técnica, determinando que:

- (-): negativo
- (+): débil
- (++): abundante
- (+++): cuantioso.

Por otra parte, se determinó la distribución de la intensidad de marcación de las moléculas, a través del valor High Score (Selam *et al.*, 2001).

Se definió High Score como:

$$\text{HS: } \sum P_i (i + 1)$$

donde: i : intensidad de marcación

P_i : porcentaje de células para cada intensidad de marcación

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el software InfoStat (Di Rienzo y col, 2009), para evaluar la dependencia de las moléculas analizadas con respecto al estadio gestacional, usando un diseño completamente al azar. El modelo estadístico empleado fue el siguiente: $Y_{ij} = \mu + D_i + e_{ij}$, donde Y_{ij} es la variable en estudio, HS (OPN, Fg, VEGF, VEGF-R1 o VEGF-R2); μ es la media general, D_i es el efecto fijo del día de gestación y e_{ij} es el error asociado a cada animal del estudio. En aquellos casos en que se detectaron diferencias entre los días de gestación, las medias fueron comparadas por la menor diferencia significativa a un $p \leq 0.05$.

Para el estudio de proliferación celular, se determinó el porcentaje de marcación con Ki67 (% Ki67). Se analizaron diez (10) campos por estructura placentaria (tejido conectivo, tejido epitelial, vasos sanguíneos y glándulas endometriales) y por período gestacional, determinándose en cada campo el porcentaje de células marcadas para Ki67 sobre el total de células evaluadas. Los componentes materno y fetal de las estructuras placentarias, se analizaron conjuntamente y por separado. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente a través del software InfoStat (Di Rienzo y col, 2009), para detectar efecto del estadio gestacional sobre el % Ki67, a partir de un modelo completo aleatorizado. El modelo estadístico empleado fue el siguiente: $Y_{ij} = \mu + D_i + e_{ij}$, donde Y_{ij} es la variable en estudio, %Ki67; μ es la media general, D_i es el efecto fijo del día de gestación y e_{ij} es el error asociado a cada animal del estudio. En aquellos casos en que se detectaron diferencias entre los días de gestación, las medias fueron comparadas por la menor diferencia significativa a un $p \leq 0.05$.

$$\% \text{ Ki67} = (\text{células marcadas} / \text{células totales}) \cdot 100$$

8. Determinación del área vascular placentaria

Para la determinación del área de vasos sanguíneos en las muestras placentarias obtenidas, se utilizaron cortes histológicos de 30, 40, 60, 80, 90 y 114 días de preñez tratados de acuerdo a los protocolos de tricrómica de Masson y tricrómica de Gallego, detalladas en la sección 4.3. y 4.4. de *Materiales y Métodos*, respectivamente. Se tomaron imágenes con la cámara Canon Powershot G6 7.1 megapixels (Canon, Japón) adosada al microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron luego procesadas con el software AxioVision AxioVs40 V 4.6.3.0., a fin de obtener el área individual de cada uno de los vasos.

Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 100x. El área individual de cada vaso sanguíneo fue medida utilizando una tableta gráfica Pensketch (Genius, Taiwán) de 9 por 12 pulgadas.

Se midió el área de alrededor de mil vasos sanguíneos por cada uno de los períodos seleccionados y los datos fueron analizados estadísticamente con la Prueba de Homogeneidad de Chi Cuadrado utilizando el programa estadístico Plataforma R (R Development Core Team, 2007), con el objetivo de analizar la independencia del área de los vasos en los diferentes períodos de gestación.

9. Ensayo TUNEL

9.1. Detección de apoptosis "in situ"

Para la detección *in situ* de apoptosis en muestras placentarias porcinas a través del ensayo TUNEL (TdT-mediated-dUtp Nick End Labeling) se utilizó el equipo comercial ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis (Chemicon International, USA). La puesta a punto de la técnica se realizó sobre muestras de tejido placentario de 30, 60, 80, 90 y 114 días de gestación, obtenidos según el punto 3.1 *Técnica histológica convencional para microscopía óptica*. Los cortes histológicos fueron desparafinados mediante pasajes por xilol y posteriormente rehidratados con batería de alcoholes de graduación decreciente, agua destilada y PBS pH 7,2. Luego se incubaron con proteinasa K (20 µg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con agua deionizada (2 min cada uno). Posteriormente se trataron con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 5 min y se lavaron 2 veces con PBS o agua deionizada (5 min cada uno). Luego se agregó sobre los cortes histológicos el buffer de equilibrio durante 15 min; se eliminó el exceso y los preparados se incubaron con la enzima ADN-transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT) a 37°C durante 1 h, en cámara húmeda. Se detuvo la reacción con el agregado de solución stop por 10 min y posteriormente se lavaron durante 3 min con PBS. Luego fueron incubados con el conjugado anti-digoxigenin-peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron 4 veces con PBS (2 min cada uno) e incubaron con la solución cromógena DAB durante 10 min. A continuación, se contrastaron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron con batería de alcoholes de concentración creciente y se montaron en Entellan (Merck, Alemania). Los cortes fueron observados con un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) y la adquisición de las imágenes se realizó con una cámara digital Canon Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio y el procesamiento de las mismas a través del software AxioVision AxioVs40 V 4.6.3.0 (Carl Zeiss, Alemania).

A través del ensayo TUNEL se determinó la presencia de células apoptóticas con ADN fragmentado (núcleos amarrados) y de células viables (núcleos contrastados en azul), presentes en las muestras placentarias de los períodos gestacionales seleccionados.

9.2. Análisis de datos

Se determinó el índice apoptótico (IAp) que relaciona el número de células con ADN fragmentado con respecto al número de células totales. Se evaluaron diez (10) campos por estructura tisular placentaria y por período gestacional. Los datos obtenidos fueron sujetos a un análisis estadístico usando el software InfoStat (Di Rienzo y col, 2009) de acuerdo a un diseño completamente al azar, con el fin de detectar efecto del período gestacional sobre el índice apoptótico. El modelo estadístico empleado fue el siguiente: $Y_{ij} = \mu + D_i + e_{ij}$, donde Y_{ij} es la variable en estudio, IAp; μ es la media general, D_i es el efecto fijo del día de gestación y e_{ij} es el error asociado a cada animal del estudio. En aquellos casos en que se detectaron diferencias entre los días de gestación, las medias fueron comparadas por la menor diferencia significativa a un $p \leq 0.05$.

La fórmula del IAp se define de la siguiente manera:

$$\text{IAp} = (\text{células con ADN fragmentado} / \text{células totales}) \cdot 100$$

9.3. Correlación entre apoptosis y proliferación

Se realizó un análisis de correlación para estudiar la asociación lineal entre las variables IAp y Ki67, de apoptosis y proliferación celular, respectivamente.

El análisis estadístico se llevó a cabo por período y estructura, teniendo en cuenta para ello los datos obtenidos a partir del procesamiento por TUNEL y por inmunohistoquímica de Ki67 de tejidos placentarios de 30, 60, 80 y 90 días de gestación.

..... *RESULTADOS*

RESULTADOS

1. Tractos reproductivos

Los tractos reproductivos empleados fueron obtenidos de cerdas gestantes en distinto estadio de preñez y procesados según lo descrito en la sección *Materiales y Métodos 1.2.* inmediatamente luego de la expulsión durante el parto.

Los datos expuestos en la Tabla 1 permitieron la construcción de un gráfico (Figura N° 16) a partir del cual es posible extrapolar los valores de longitud céfalo-caudal de los embriones/fetos recolectados, para la obtención de la edad gestacional correspondiente.

Tabla I: Relación entre longitud céfalo-caudal y edad gestacional de los embriones/fetos porcinos (Marrable, 1971).

Placentas	Tiempo de gestación (días)	Nº embriones/fetos	Sexo	Longitud céfalo-caudal promedio (mm)
PI 01	30	8	ND	25,8
PI 02	30	16	ND	23,5
PI 03	30	12	ND	29,7
PI 04	30	5	ND	33
PI 05	30	8	4 machos 4 hembras	42,1
PI 06	40	7	3 machos 4 hembras	62
PI 07	40	9	4 machos 5 hembras	65,2
PI 08	40	7	ND	63,4
PI 09	40	8	ND	63
PI 10	60	5	2 machos 3 hembras	99,8
PI 11	60	7	6 machos 1 hembra	95,0
PI 12	60	7	6 machos 1 hembra	92,1
PI 13	60	10	7 machos 3 hembras	135
PI 14	60	9	4 machos 5 hembras	106
PI 15	60	8	3 machos 5 hembras	114,2
PI 16	60	7	5 macho 2 hembras	95,0
PI 17	80	8	4 machos 4 hembras	220,3
PI 18	80	10	6 machos 4 hembras	210
PI 19	80	8	3 machos 5 hembras	205,8
PI 20	80	9	3 machos 6 hembras	223,2
PI 21	90	11	ND	245,0
PI 22	90	8	8 machos 3 hembras	250,1
PI 23	90	8	3 machos 5 hembras	239,9
PI 24	90	10	5 machos 5 hembras	245,5
PI 25	90	9	6 machos 3 hembras	242,0
PI 26	A término	ND	ND	ND
PI 27	A término	11	8 machos 3 hembras	350
PI 28	A término	8	ND	350
PI 29	A término	10	ND	350
PI 30	A término	9	3 machos 6 hembras	299

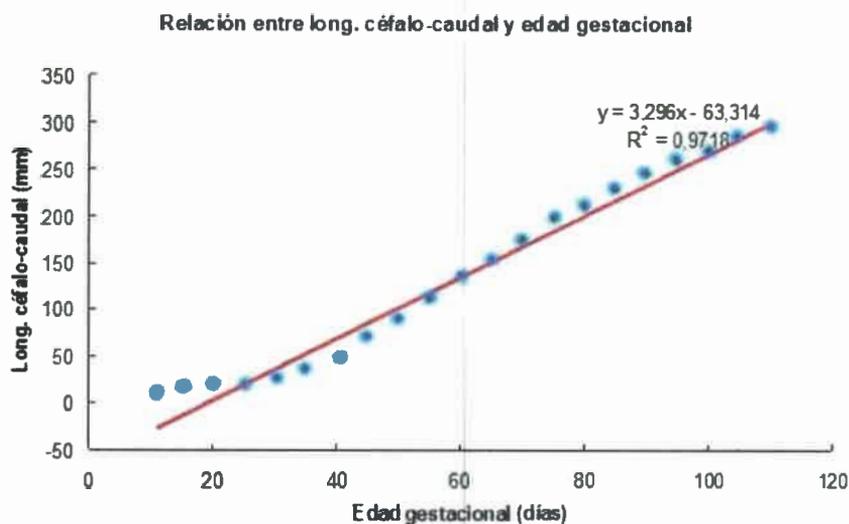


Figura N° 16: Longitud céfalo-caudal de embriones/fetos de cerdos en función de la edad gestacional de los mismos.

De esta curva se desprende la función que relaciona los datos correspondientes a ambas variables estudiadas: edad gestacional (días) y longitud céfalo-caudal de los embriones/fetos (mm).

Función: $y = 3,296x - 63,314$

La proximidad a 1 del índice de correlación lineal, R^2 , de la recta de regresión, indica la fuerte correlación entre ambas variables, lo cual se evidencia gráficamente al observar la cercanía de la nube de puntos a la recta. Al tratarse de un valor positivo, es posible afirmar que a medida que aumenta una de las variables, la otra también aumenta (Berrocal Sánchez, 2001).

2. Estudio de la estructura placentaria

2.1. Estudio macroscópico

La Figura N° 17 corresponde a un tracto reproductivo de 30 días de preñez. En el mismo se observan los ovarios y cuernos uterinos conteniendo 5 embriones, 3 de los cuales se hallan anclados al cuerno uterino derecho y 2 al izquierdo.

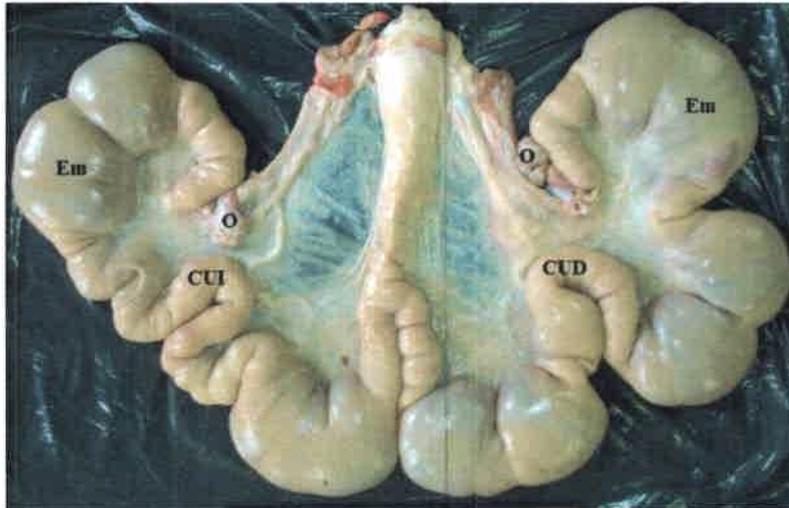


Figura N° 17: Tracto reproductivo de una cerda de 30 días de gestación. Se observan los embriones (**Em**), ovarios (**O**) y cuernos uterinos derecho (**CUD**) e izquierdo (**CUI**).

En la Figura N° 18 se aprecia un *conceptus* porcino de 29,7 mm de longitud céfalo-caudal, coincidente con una gestación de alrededor de 30 días. El mismo se encuentra contenido en el saco amniótico, en contacto directo con el líquido amniótico y rodeado por la membrana corioalantoidea. A este punto, la densa red vascular que proporciona nutrición hemotrofa al feto queda demostrada por la presencia de numerosos vasos sanguíneos que se desarrollan desde y hacia el interior del saco amniótico.

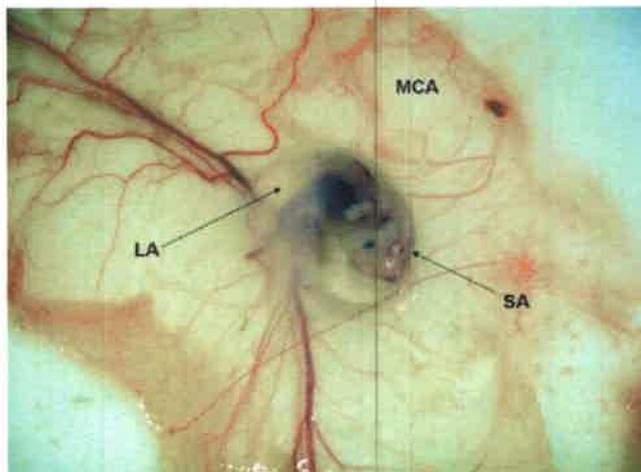


Figura N° 18: *Conceptus* de 30 días de gestación. **MCA:** membrana corioalantoidea; **SA:** saco amniótico; **LA:** líquido amniótico.

2.2. Estudio microscópico

A través del empleo de tinciones como hematoxilina-eosina y tricómicas de Masson y Gallego fue posible analizar las características estructurales de tejidos placentarios porcinos de diferentes estadios gestacionales.

El protocolo seguido es el que se detalla en el punto 4 de *Materiales y Métodos*.

En la Figura N° 19a se presenta un tejido placentario porcino de aproximadamente 30 días de preñez teñido con hematoxilina-eosina. Se aprecian abundantes vasos sanguíneos de diverso calibre, algunos muy próximos al epitelio uterino, en íntimo contacto con la membrana basal. El endometrio se muestra tapizado de numerosas glándulas uterinas activas, con un epitelio cúbico, luz prominente y abundante secreción histiotrófica. Estas características de las glándulas endometriales, se aprecia mejor a mayor aumento (Fig. N° 19b).

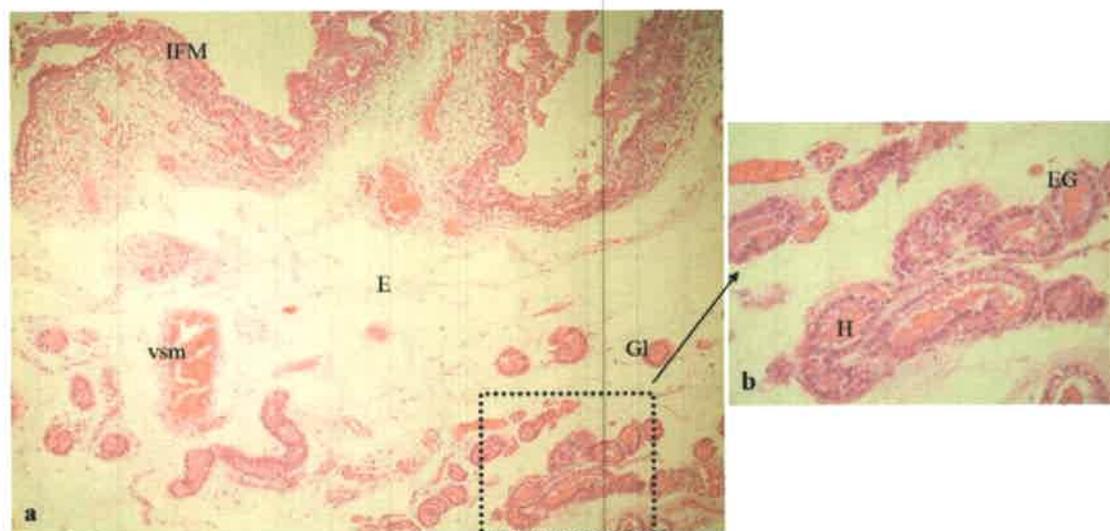


Figura N° 19: Imágenes de tejido placentario porcino de 30 días de gestación teñido con hematoxilina eosina. **a)** (100x); **b)** Ampliación de a) (400x). **IFM:** interfase feto-materna; **E:** endometrio; **vsm:** vaso sanguíneo materno; **Gl:** glándula endometrial; **EG:** epitelio glandular; **H:** histiotrofo.

En la Figura N° 20a se distinguen las zonas areolar e interareolar de un tejido placentario de gestación temprana, donde la nutrición del feto es principalmente histiotrofa y hemotrofa, respectivamente. La Figura N° 20b constituye una ampliación de una aréola, donde el histiotrofo liberado por el epitelio uterino es captado por el

trofoblasto. En la Figura N° 20c se observa la interfase útero-placentaria claramente constituída por los epitelios uterino y trofoblástico.

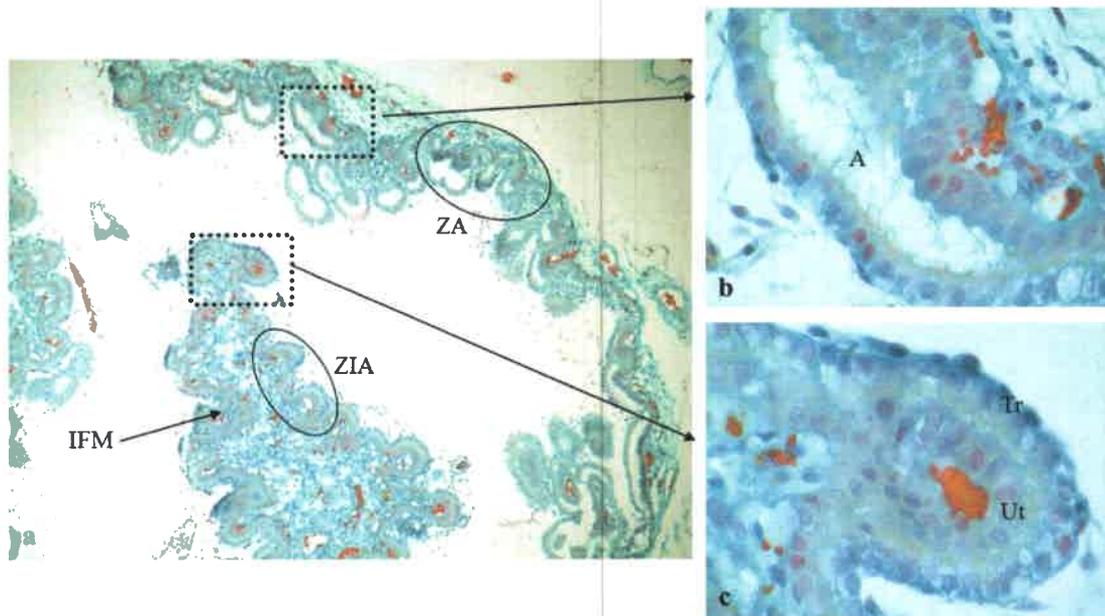


Figura N° 20: Imágenes de tejidos placentarios porcinos de 30 días de preñez teñidos con tinción tricrómica de Masson. **a)** (100x); **b)** Ampliación de zona areolar de a). (400x); **c)** Ampliación de zona interareolar de a). (400x). **IFM:** interfase feto-materna; **ZIA:** zona interareolar; **ZA:** zona areolar; **A:** areola; **Ut:** epitelio uterino; **Tr:** trofoblasto.

A continuación se muestran imágenes de tejidos placentarios porcinos de los cinco períodos gestacionales analizados (Fig. N° 21). Las tinciones, hematoxilina-eosina y tricrómicas de Masson y de Gallego, permitieron analizar las características estructurales de tejidos placentarios porcinos.

En las imágenes, se aprecia el incremento en la ramificación de las vellosidades uterinas y coriónicas con el avance de la gestación. Además, se destaca la presencia de numerosos vasos sanguíneos principalmente en proximidades del epitelio uterino y del trofoblasto, donde se hacen más pequeños, para favorecer el intercambio de nutrientes y desechos entre madre y embriones/fetos.

En períodos de gestación avanzada y a término, como son los de 80, 90 y 114 días, las vellosidades placentarias se caracterizan por presentar alto grado de arborización. En estos estadios se observan vellosidades terciarias o a término.

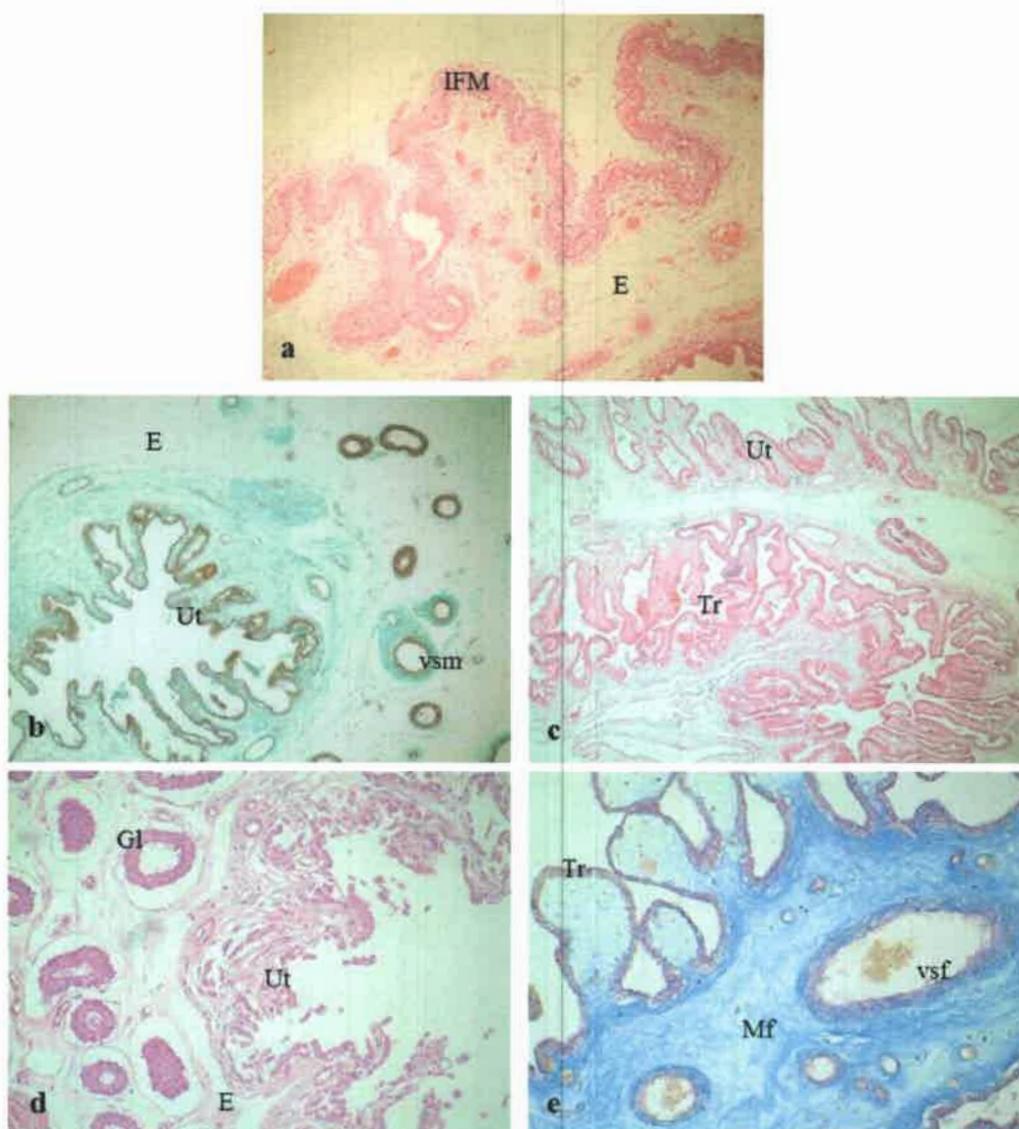


Figura N° 21: Imágenes de tejidos placentarios porcinos. **a)** Tejido de 30 días de preñez teñido con hematoxilina eosina (100x); **b)** Tejido de 60 días de preñez tratado con tinción tricrómica de Masson (100x); **c)** Tejido de 80 días de preñez tratado con hematoxilina eosina (100x). **d)** Tejido de 90 días de preñez tratado con hematoxilina eosina **E:** endometrio (200x); **e)** Tejido de 114 días de preñez tratado con tinción tricrómica de Gallego (200x). **E:** endometrio; **Mf:** mesénquima fetal; **Ut:** epitelio uterino; **Tr:** trofoblasto; **Gl:** glándula endometrial; **vsm:** vaso sanguíneo materno; **vsf:** vaso sanguíneo fetal.

A continuación, la Figura N° 22 muestra una microfotografía de un corte de tejido placentario porcino de preñez temprana, teñido con tricrómica de Masson, donde se observan numerosos vasos sanguíneos tapizando el endometrio, situándose la mayoría

en la región contigua a la interfase. De igual modo, se visualizan pequeños vasos en el tejido conectivo laxo que constituye el mesénquima fetal, en íntimo contacto con la membrana basal que subyace al trofoblasto.

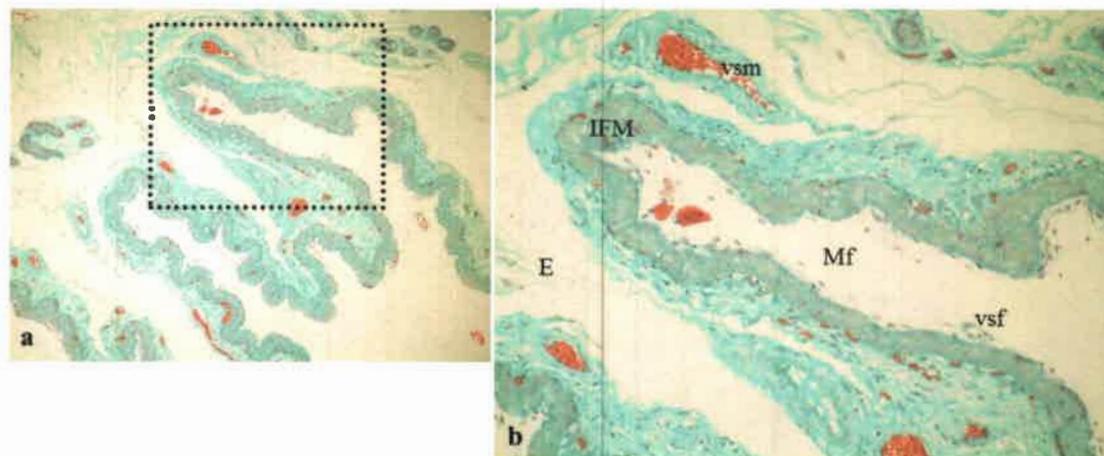


Figura N° 22: Imágenes de tejido placentario porcino de 30 días de preñez teñido con tinción tricrómica de Masson. **a)** (100x); **b)** Ampliación de a) (200x); **IFM:** interfase feto-materna; **E:** endometrio; **Mf:** mesénquima fetal; **vsm:** vaso sanguíneo materno; **vsf:** vaso sanguíneo fetal.

En las Figuras N° 23a-e, las tinciones tricrómicas de Masson y de Gallego ponen en evidencia la presencia de fibras colágenas, teñidas de verde y azul-turquesa, respectivamente. Las mismas se observan formando parte de la matriz extracelular placentaria porcina, tanto en el estroma uterino (Fig. N° 23a,b,d), como en el mesénquima fetal (Fig. N° 23c,e). En las Figuras N° 23a y 23e se destaca la presencia de las fibras alrededor de los vasos sanguíneos maternos y fetales, respectivamente; algo similar se observa en la Figura N° 23d con las glándulas endometriales.

El contenido en dichas fibras fue luego confirmado a través de la técnica de Picrosirius red, específica para colágeno.

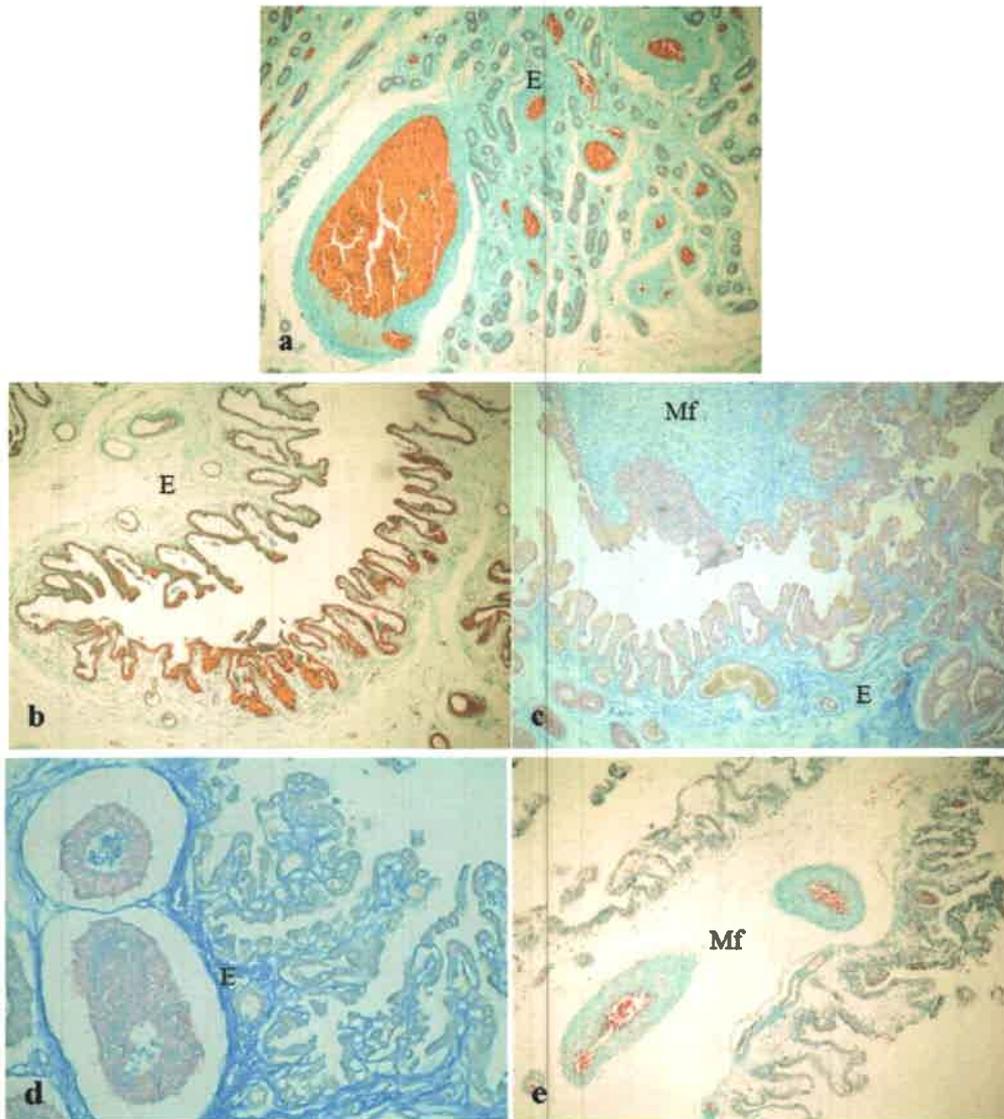


Figura N° 23: Imágenes de tejidos placentarios porcinos teñidos con tinciones tricrómicas. **a)** Tejido de 30 días de preñez teñido con tricrómica de Masson (100x); **b)** Tejido de 60 días de preñez teñido con tricrómica de Masson (100x); **c)** Tejido de 80 días de preñez teñido con tricrómica de Gallego (100x). **d)** Tejido de 90 días de preñez teñido con tricrómica de Gallego (400x); **e)** Tejido de 114 días de preñez teñido con tricrómica de Masson (100x). **E:** endometrio. **Mf:** mesénquima fetal;

2.3. Estudio por microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

El empleo de cortes semifinos para el estudio de la estructura placentaria por microscopía óptica de alta resolución, permitió la visualización con mayor detalle de

diversas estructuras celulares placentarias. Esto permitió, además, observar características morfológicas típicas de las células con fragmentación del ADN.

La técnica de MOAR pone en evidencia la estrecha distancia que separa los epitelios uterinos y trofoblásticos de los vasos sanguíneos subepiteliales. Los mismos son responsables de un activo intercambio materno-fetal, resultando en una barrera interhemal altamente selectiva.

En la Figura N° 24a se observa una interfase feto-placentaria de 30 días de preñez, conformada por las células del epitelio uterino y trofoblástico. Además se destaca la presencia de gránulos citoplasmáticos, dispuestos principalmente sobre la cara apical de las células epiteliales uterinas. En la Figura N° 24b se aprecia el lúmen uterino que separa los componentes maternos y fetales de la interfase feto-materna, región donde se ubican diversas moléculas de adhesión que sirven de puente entre ambos epitelios. También es posible visualizar una célula trofoblástica en probable proceso de división.

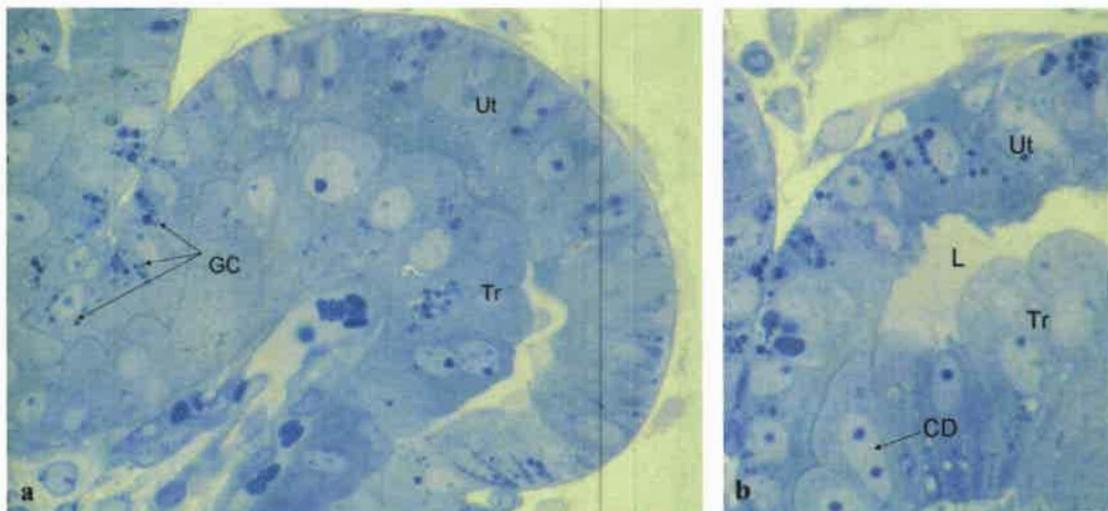


Figura N° 24: Imagen de un corte semifino de tejido placentario porcino de 30 días de preñez, tratado con la técnica de MOAR. **a)** Se observa la interfase útero-placentaria; **b)** Se observa la interfase útero-placentaria y una célula trofoblástica en división. (1000x). Ut: epitelio uterino; Tr: epitelio trofoblástico; L: lúmen uterino; GC: gránulos citoplasmáticos; CD: célula en división.

La imagen mostrada en la Figura N° 25, de un corte placentario porcino de 60 días de gestación, demuestra el íntimo contacto entre los vasos sanguíneos y el epitelio uterino, hallándose separados del mismo prácticamente por la membrana basal. En este

caso, el mencionado epitelio se encuentra conformado por células uterinas columnares en empalizada que dan origen a las vellosidades.

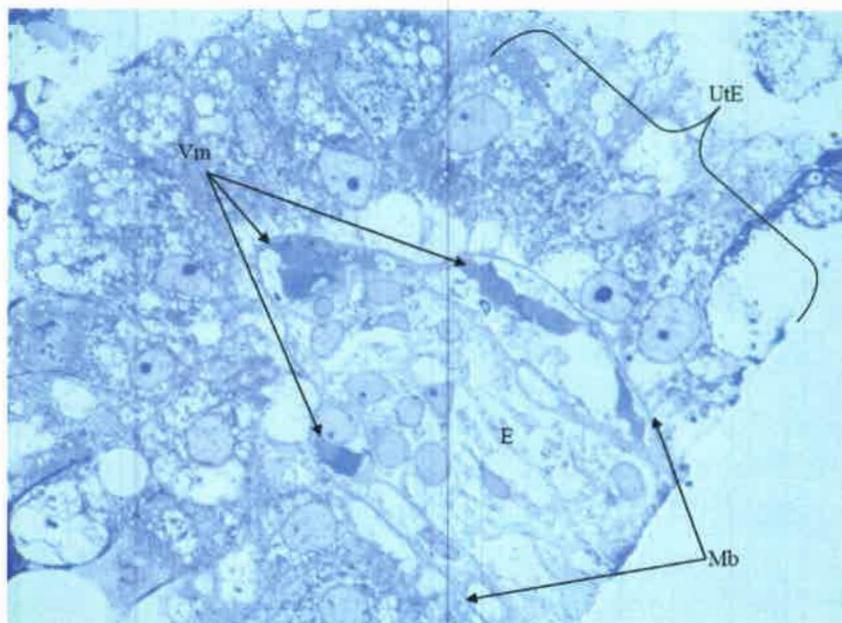


Figura N° 25: Imagen de un corte semifino de tejido placentario porcino de 60 días de preñez, tratado con la técnica de MOAR (1000x). **E:** endometrio; **UtE:** células uterinas en empalizada; **Mb:** membrana basal; **Vm:** vasos sanguíneos maternos.

A continuación se muestran dos imágenes de tejido placentario porcino de 80 días de gestación. En ellas se observan vasos sanguíneos subepiteliales, en íntimo contacto con el epitelio uterino, y células con fragmentación del ADN formando parte del endometrio (Fig. N° 26a) y del endotelio de vasos sanguíneos maternos (Fig. N° 26b). Las mismas se caracterizan por presentar menor tamaño, con núcleos picnóticos y heterocromatina condensada.

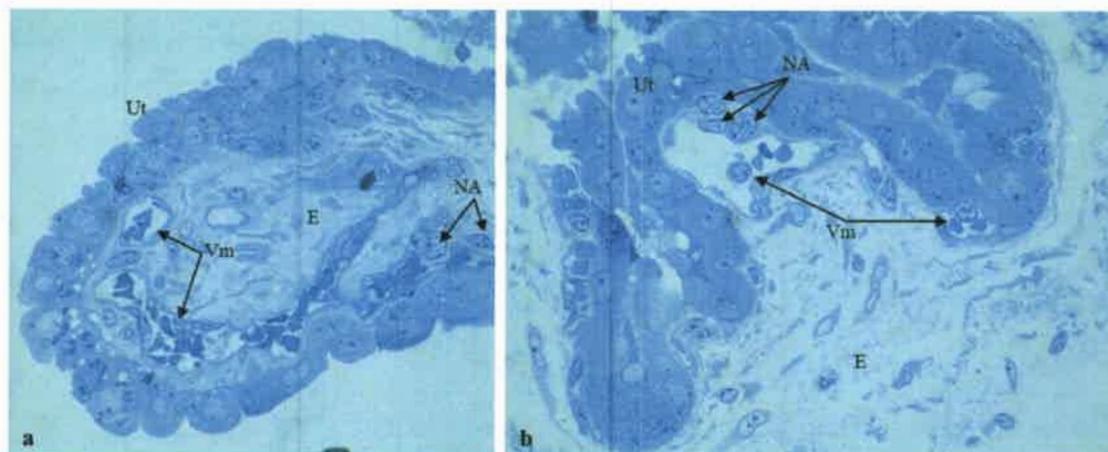


Figura N° 26: Imagen de cortes semifinos de tejido placentario porcino de 80 días de preñez, tratado con la técnica de MOAR (1000x). **a)** Se observan vasos sanguíneos próximos al epitelio uterino con células con ADN fragmentado; **b)** Se observan células endoteliales y endometriales en apoptosis. **Ut:** epitelio uterino; **E:** endometrio; **Vm:** vasos sanguíneos maternos; **NA:** núcleos apoptóticos.

Signos de remodelación tisular por apoptosis fueron observados en las glándulas endometriales de todos los estadios analizados, notándose mayor número de células con características morfológicas y tintoriales coincidentes con apoptosis en los períodos de gestación temprana y en estadios avanzados de preñez, de 80 y 90 días.

En la Figura N° 27 se observa una glándula endometrial activa al día 90 de preñez con presencia de contenido histiotrófico en la luz glandular. En su epitelio, se visualiza una célula en un estadio inicial del proceso apoptótico. La misma se caracteriza por presentar condensación de la heterocromatina nuclear y menor tamaño celular que sus vecinas adyacentes.

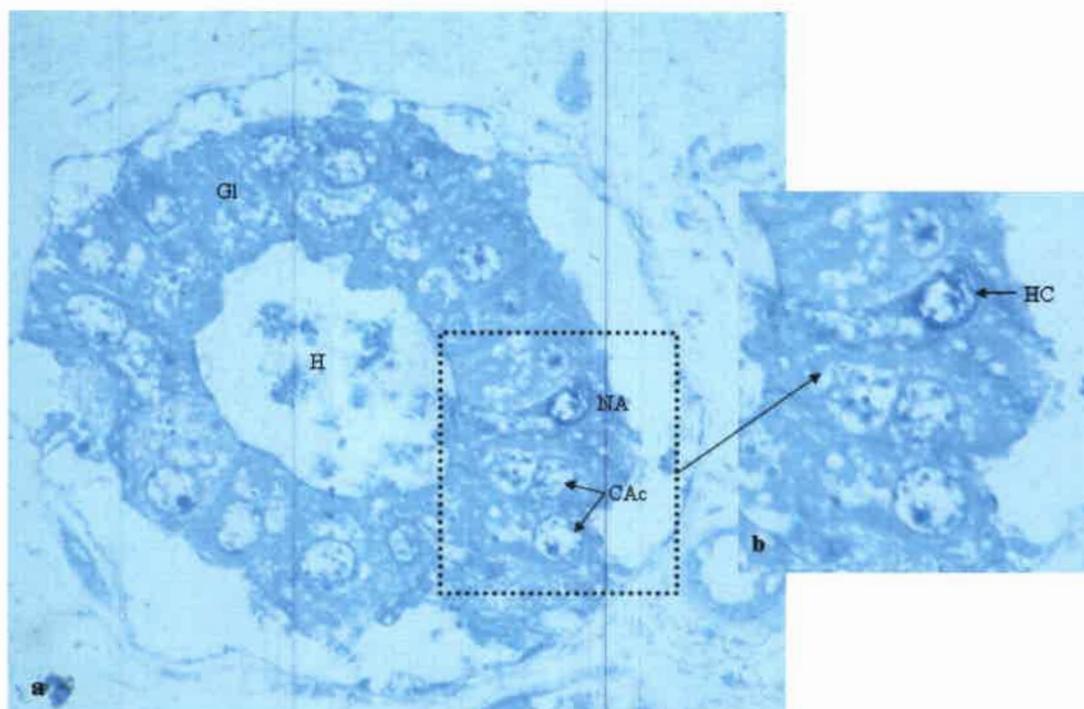


Figura N° 27: Imagen de cortes semifinos de tejido placentario porcino de 90 días de preñez, tratado con la técnica de MOAR (1000x). **a)** Se observa una glándula endometrial activa con una célula en apoptosis; **b)** Se observa con mayor detalle una célula con condensación de la cromatina. **GI:** glándula endometrial; **H:** histiotrofo; **CAC:** células activas; **NA:** núcleo apoptótico; **HC:** heterocromatina.

Como se mencionara anteriormente, en pos de acortar la distancia existente entre los flujos sanguíneos maternos y fetales, con el avance de la gestación los vasos sanguíneos aumentan en número y se disponen muy próximos a los epitelios. En las fotografías siguientes de una muestra placentaria porcina de gestación a término (Figuras N° 28a-c) se observan vasos sanguíneos con sus células endoteliales en cercanías del trofoblasto. En los mismos es posible visualizar el contenido con glóbulos rojos.

Por otro lado, en la remodelación de los tejidos, la apoptosis juega un rol fundamental. Esto queda evidenciado en la Figura N° 28a en la que se destaca la presencia de una célula trofoblástica en notorio estado avanzado de apoptosis, mostrando un núcleo desplazado con cromatina condensada.

En la imagen de la Figura N° 28c se observa la presencia de fibroblastos, constituyentes del tejido conectivo mesenquimático y células trofoblásticas en empalizada formando parte de una vellosidad placentaria.

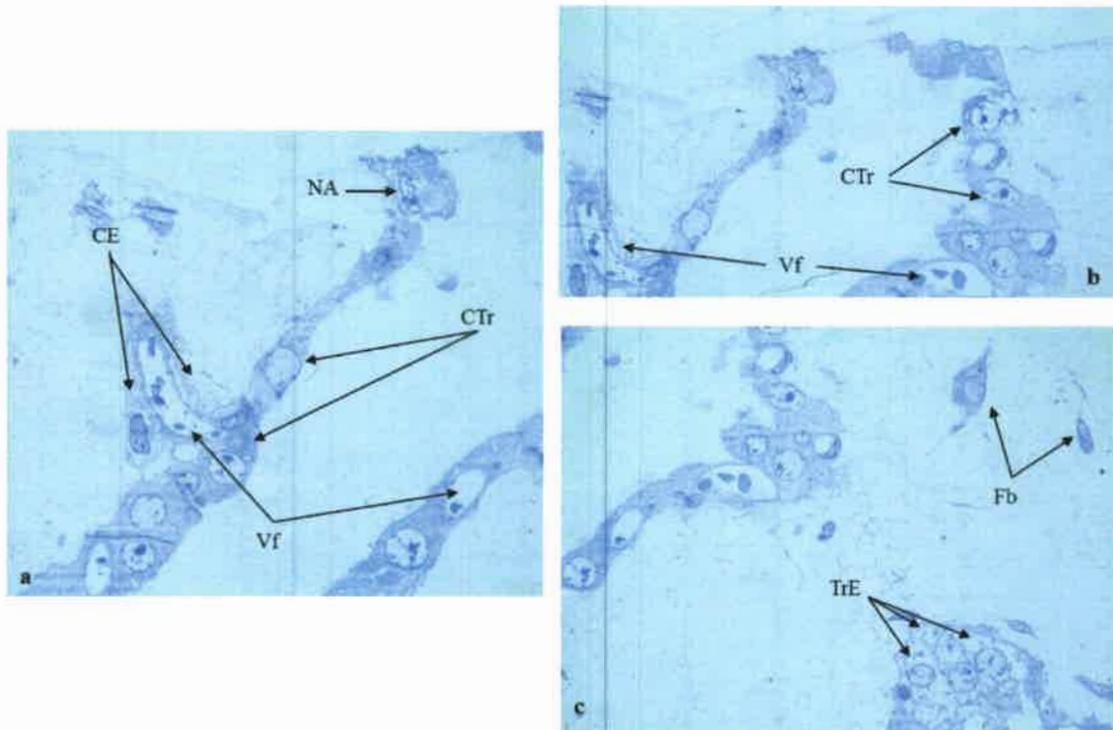


Figura N° 28: Imágenes de cortes semifinos de tejido placentario porcino de 114 días de preñez tratados con la técnica de MOAR (1000x). CE: célula endotelial; NA: núcleo apoptótico; CTr: célula trofoblástica; Vf: vasos fetales; TrE: células trofoblásticas en empalizada; Fb: fibroblasto.

3. Análisis de proteínas de matriz extracelular

3.1. Determinación de colágeno por Picrosirius red

Para el estudio correspondiente a fibras colágenas en muestras placentarias porcinas, fue necesario poner a punto la técnica de Picrosirius red. La misma implicó la preparación de diversas soluciones colorantes y fue necesario ajustar los tiempos adecuados al tejido en estudio.

La técnica de Picrosirius red permitió diferenciar fibras colágenas de distinto grosor según el color y la semicuantificación de las mismas en función de la intensidad de tono observada.

En la tabla II se detallan los resultados obtenidos con la técnica de Picrosirius red.

Tabla II: Determinación de colágeno en los diferentes estadios gestacionales analizados. (-): ausencia de color; (+): coloración débil; (++): coloración abundante; (+++): coloración cuantiosa.

Período gestacional (días)	Estructuras placentarias		
	Vellosidad placentaria	Tejido conectivo	Miometrio
30	(-)	(++) fibras verdes (++) fibras amarillas (+) fibras naranjas	(+++) fibras amarillas (++) fibras naranjas
60	(-)	(++) fibras amarillas (+) fibras naranjas	(+++) fibras amarillas (++) fibras naranjas
80	(-)	(+) fibras verdes (++) fibras amarillas (++) fibras naranjas	(+) fibras verdes (+++) fibras amarillas (+++) fibras naranjas
90	(-)	(+) fibras amarillas (++) fibras naranjas	(+) fibras amarillas (++) fibras naranjas
114	(-)	(+) fibras verdes (+++) fibras amarillas (+++) fibras naranjas	

Se hallaron fibras colágenas de diferente grosor en el tejido conectivo materno y fetal y formando parte de los haces musculares lisos que constituyen el miometrio en todos los momentos de la gestación estudiados.

Al día 80 de preñez se observó un leve incremento en la cantidad de fibras de mediano y gran espesor (amarillas y naranjas, respectivamente) con respecto al día 60, tanto en el tejido conectivo como en miometrio. Por el contrario, al día 90 se detectó una disminución de fibras amarillas en tejido conectivo y de naranjas en miometrio, con la desaparición de fibras colágenas finas, coloreadas de verde. En tejidos placentarios a término, se destaca la presencia de abundantes fibras colágenas gruesas y de mediano grosor.

A continuación, se muestra una serie de imágenes en campo claro de tejidos placentarios porcinos de todos los períodos analizados y su correspondiente en microscopía de luz polarizada (Fig. N° 29). Las primeras (Fig. N° 29a-e) se obtienen tras la manipulación del microscopio en la modalidad de nicoles paralelos y las segundas (Fig. N° 29a'-e') en el modo de nicoles cruzados. Las imágenes en campo claro permiten la ubicación estructural en el preparado, mientras que las imágenes de polarización nos brindan la posibilidad de visualizar la birrefringencia característica de las fibras colágenas tratadas con esta técnica.

A continuación, en la Figura N° 29a', se observan glándulas endometriales rodeadas de fibras colágenas medianas y gruesas, visualizadas en amarillo y naranja, respectivamente. Vasos sanguíneos maternos (Fig. N° 29b' y N° 29d') se presentan rodeados de fibras finas (verdes) y de mediano grosor (amarillas), mientras que el colágeno circundante a los vasos fetales se muestra teñido de naranja, poniendo de manifiesto su composición en fibras gruesas (Fig. N° 29e').

En las Figuras N° 29c' y N° 29e' se observan vellosidades placentarias maternas y fetales, respectivamente, con presencia de fibras colágenas finas y de mediano grosor.

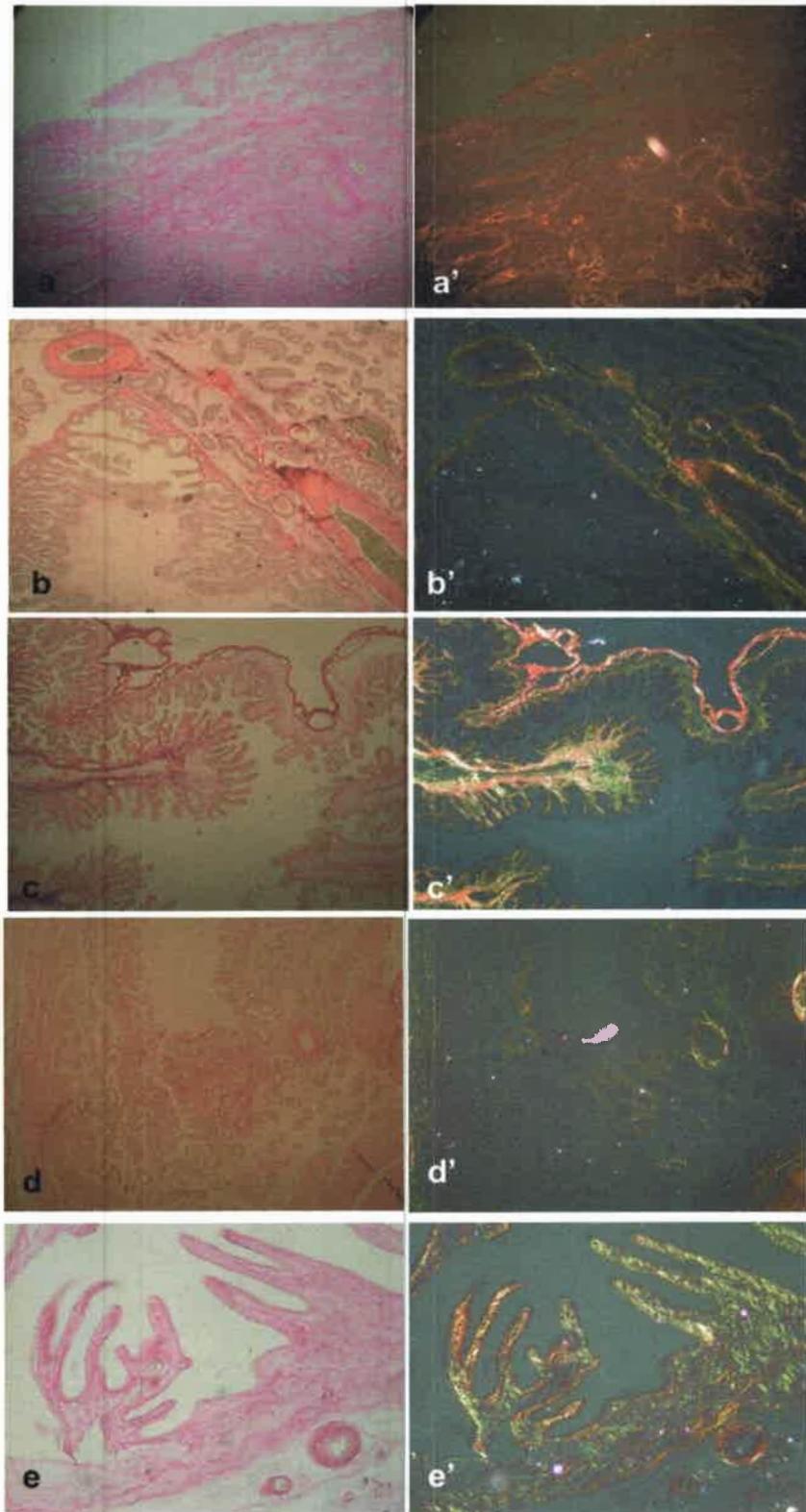


Figura N° 29: Fotografías de tejidos placentarios porcinos tratados con Picosirius red. a), b), c), d), e) 30, 60, 80, 90 y 114 días de gestación, respectivamente, con nicoles paralelos; a'), b'), c'), d'), e') 30, 60, 80, 90 y 114 días de gestación, respectivamente, con nicoles cruzados. a), a'), b), b'), e), e') 100x; c), c'), d), d') 400x.

La presencia de fibras colágenas de distinto grosor en el endometrio de la preñez temprana se evidencia en las imágenes que se presentan a continuación (Fig. N° 30). En las mismas se observan fibras finas, de color verde, a modo de puntillado en un estroma con abundancia de fibras de mediano y mayor grosor, visualizadas en amarillo y naranja.

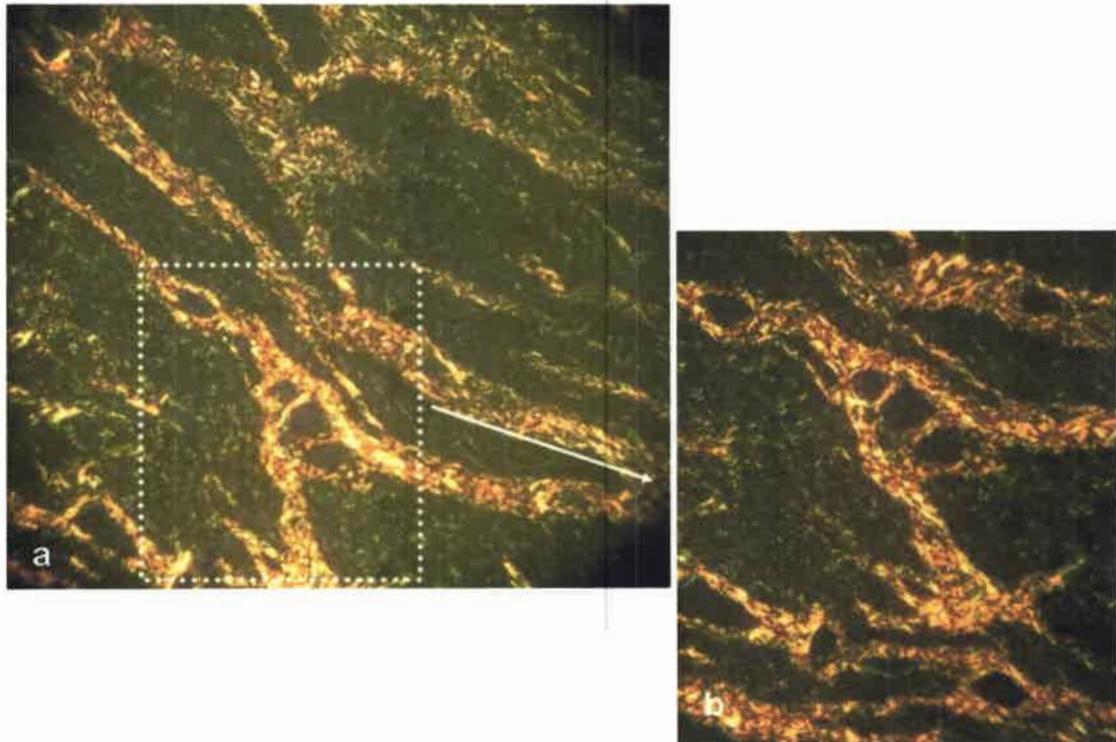


Figura N° 30: Imagen de tejido placentario porcino de 30 días de gestación procesado con técnica Picrosirius red y microscopía óptica de luz polarizada **a)** (200x). **b)** Ampliación de imagen a) (400x).

3.2. Determinación de osteopontina por inmunohistoquímica

El ensayo inmunohistoquímico permitió detectar la distribución temporo-espacial de osteopontina (OPN) en los tejidos placentarios porcinos a lo largo de la preñez. El mismo se llevó a cabo según lo descrito en la sección 7.1. de *Materiales y Métodos*.

Los resultados, expuestos en la Tabla III, muestran la presencia de la glicoproteína en los epitelios uterino y trofoblástico que forman parte de las

vellosidades placentarias porcinas sólo en el período de 30 de preñez, con cuantiosa inmunorreactividad.

Tabla III: Inmunorreactividad de osteopontina en los diferentes estadios gestacionales analizados (Ut: epitelio uterino; Tr: epitelio trofoblástico; vsm: vasos sanguíneos maternos; vsf: vasos sanguíneos fetales; EG: epitelio glandular; E: endometrio; Mf: mesénquima fetal). (-): ausencia de marcación; (+): marcación débil; (++): marcación abundante; (+++): marcación cuantiosa.

Período gestacional (días)	Estructuras placentarias			
	Vellosidad	Vasos sanguíneos	Glándulas	Tejido conectivo
30	Ut (+++) Tr (+++)	vsm (++) vsf (++)	EG (++) Histiotrofo (++)	E (++) Mf (+)
60	Ut (-) Tr (-)	vsm (++) vsf (++)	EG (-) Histiotrofo (-)	E (++) / (+++) Mf (+)
80	Ut (-) Tr (-)/(+)*	vsm (-) vsf (-)	EG (-) Histiotrofo (-)	E (++) Mf (+)
90	Ut (-) Tr (-)	vsm (-) vsf (-)	EG (-) Histiotrofo (-)	E (+) Mf (+)
114	Tr (-)	vsf (+)	/	Mf (+)

* marcación apical en fosas

En cuanto a la marcación de osteopontina en el tejido conectivo, se destaca la inmunomarcación abundante a cuantiosa en el endometrio uterino (Fig. N° 31a, b, c.). En el día 60 se presentó una marca heterogénea, menor en el conectivo que forma parte de las vellosidades y mayor en el tejido sobre el que asientan las glándulas endometriales (Fig. N° 31b y N° 31c). Por otra parte, en los distintos períodos

gestacionales estudiados el mesénquima fetal presentó marcación débil (Fig. N° 31a, c, e).

En referencia a los vasos sanguíneos placentarios, la glicoproteína se halló formando parte de la túnica adventicia con marcación diferencial según el período analizado (Fig. N° 31a, b, e), salvo en los períodos de gestación avanzada de 80 y 90 días en que la marcación fue negativa (Fig. N° 31c y 31d, respectivamente). No se observó presencia de la molécula en el endotelio de los vasos sanguíneos placentarios en ninguno de los períodos estudiados.

Resulta relevante la presencia de OPN en el epitelio de las glándulas endometriales y en el contenido histiotrófico sólo en el período de gestación temprana, observándose reactividad abundante en ambos casos (Fig. N° 31a).

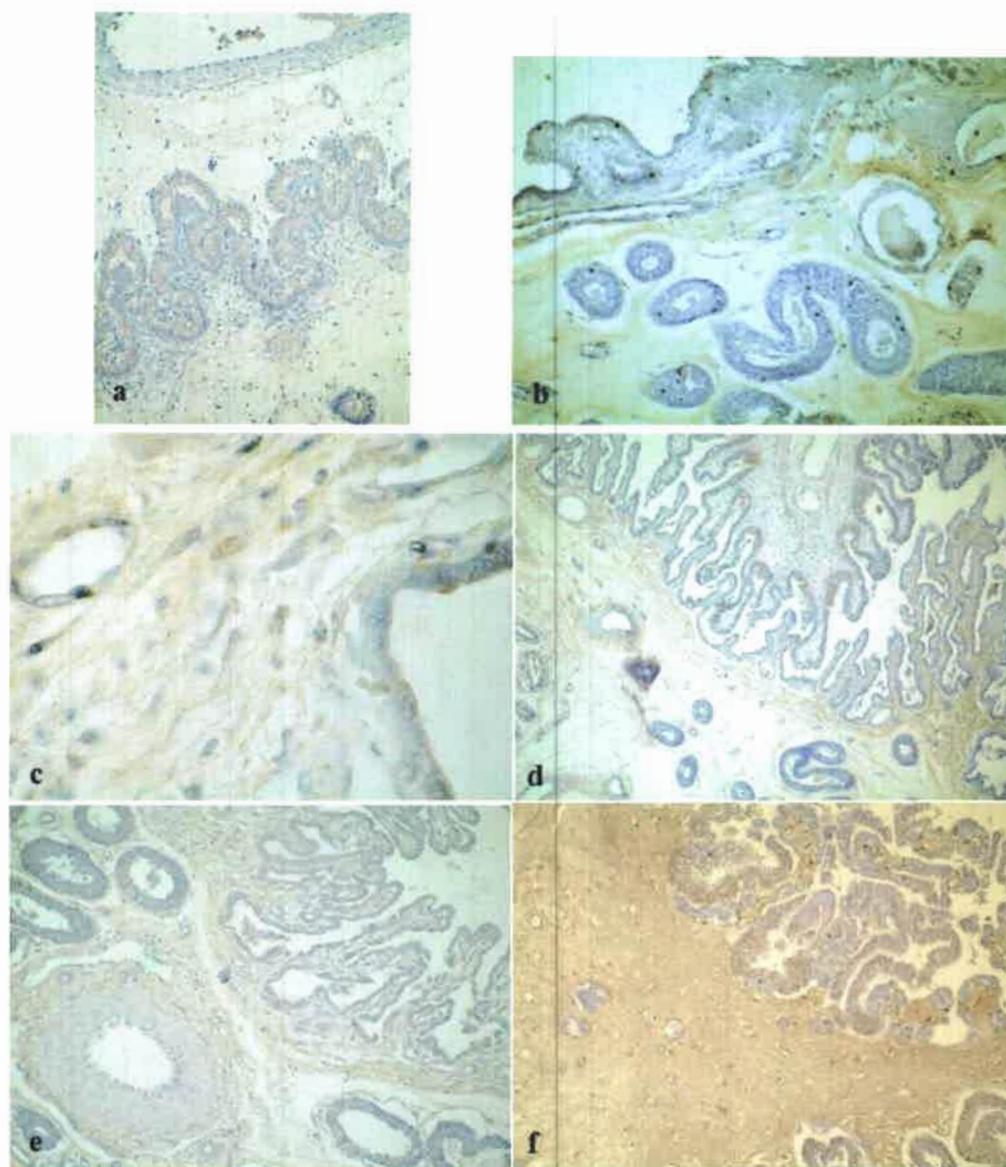


Figura N° 31: Imagen de tejido placentario porcino con ensayo inmunohistoquímico para OPN. **a)** 30 días de gestación (200x); **b)** 60 días de gestación (200x); **c)** 60 días de gestación, donde se observa a mayor aumento la falta de reactividad en el epitelio uterino (400x); **d)** 80 días de gestación (100x); **e)** 90 días de gestación (200x); **f)** 114 días de gestación (200x).

Resultó remarcable la presencia de la glicoproteína en las fosas trofoblásticas del día 80, con marcación apical. Sin embargo, el epitelio uterino así como los ápices trofoblásticos de dicho período no se marcaron.

A continuación se observan cuatro microfotografías de un tejido placentario de 80 días. En la primera (Fig. N° 32a), se observa ausencia de reactividad para OPN en el

epitelio uterino y endometrio; sin embargo las vellosidades trofoblásticas denotan ausencia de marca en los ápices, pero marcación abundante en las fosas, con ubicación apical. En las Figuras N° 32b y N° 32c se observan con mayor aumento sendas zonas de tejido con inmunomarcación de OPN en las fosas que conforman los pliegues trofoblásticos. En la Figura N° 32d se muestra con mayor detalle la marcación positiva en las fosas del trofoblasto.

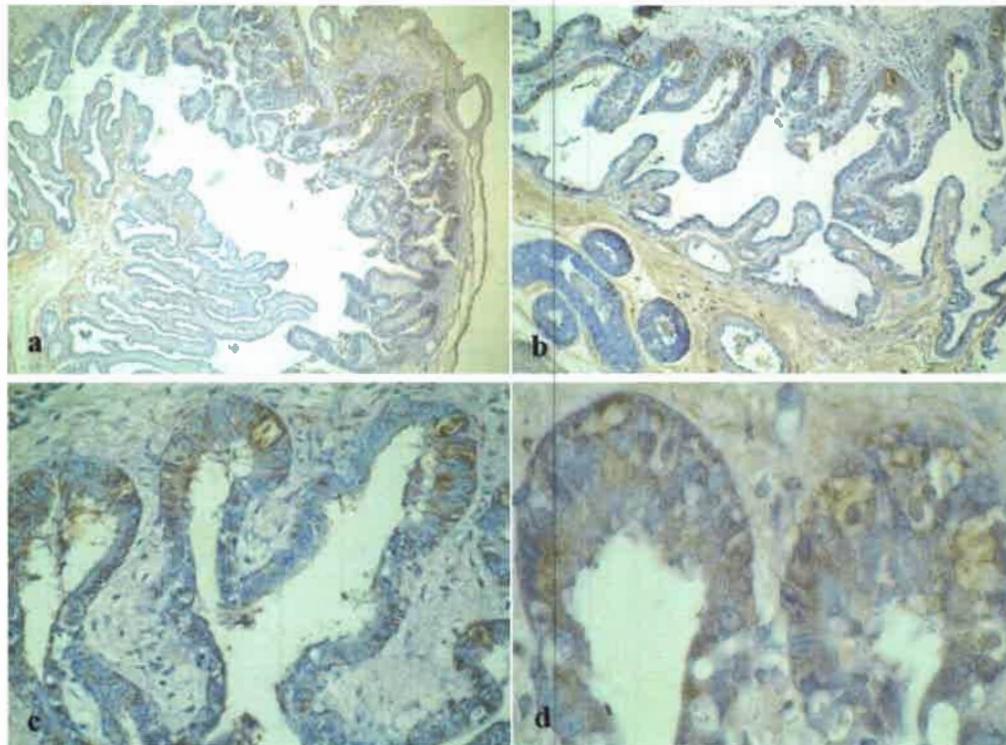


Figura N° 32: Imagen de tejido placentario porcino de 80 días de preñez con ensayo inmunohistoquímico para OPN. **a)** (100x); **b)** (200x); **c)** (400x); **d)** (1000x).

A partir de los resultados obtenidos tras la determinación de la distribución de intensidad de marcación, se evaluó la independencia estadística del valor High Score con respecto al día de gestación.

El test de Kruskal Wallis no detectó efecto del estadio gestacional sobre el High Score de OPN, tal como se observa en la Figura N° 33.

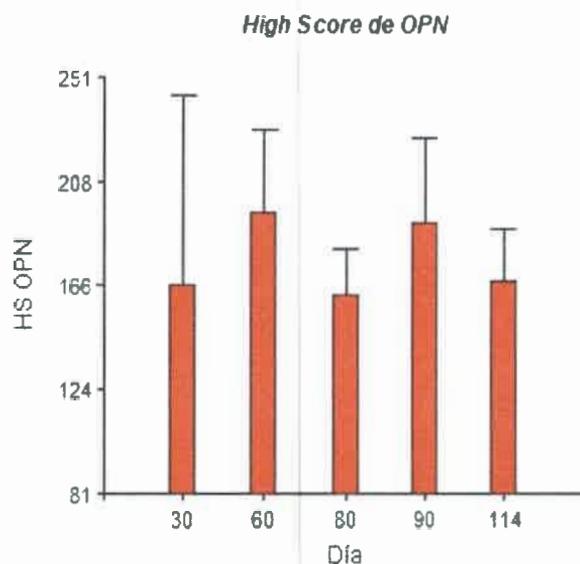


Figura N° 33: Distribución de intensidad de OPN en la placenta porcina.

3.3. Determinación de fibrinógeno por inmunohistoquímica

En la Tabla IV se informan los resultados obtenidos en la determinación de fibrinógeno (Fg), según la metodología descrita en el apartado 7.1. *de Materiales y Métodos*.

La proteína fue detectada sólo en tejido conectivo, formando parte de la matriz extracelular placentaria, con marcación abundante en endometrio y mesénquima fetal en la mayor parte de los períodos seleccionados para el estudio, tal como se observa en la Figura N° 34.

También se remarca la presencia de la proteína en los vasos sanguíneos fetales al día 80 de preñez en porcinos.

Tabla IV: Inmunorreactividad de fibrinógeno en los diferentes estadios gestacionales analizados (Ut: epitelio uterino; Tr: epitelio trofoblástico; vsm: vasos sanguíneos maternos; vsf: vasos sanguíneos fetales; EG: epitelio glandular; E: endometrio; Mf: mesénquima fetal). (-): ausencia de marcación; (+): marcación débil; (++): marcación abundante; (+++): marcación cuantiosa.

Período gestacional (días)	Estructuras placentarias			
	Vellosidad placentaria	Vasos sanguíneos	Glándulas	Tejido conectivo
30	Ut (-) Tr (-)	vsm (-) vsf (-)	EG (-)	E (++) Mf (++)
60	Ut (-) Tr (ND)	vsm (-) vsf (-)	EG (-)	E (++) Mf (+)
80	Ut (-) Tr (-)	vsm (-) vsf (+)	EG (-) H (-)	E (++) Mf (++)
90	Ut (-) Tr (-)	vsm (-) vsf (-)	EG (-) H (-)	E (+++) Mf (++)
114	Tr (-)	vsf(-)	/	Mf (++)

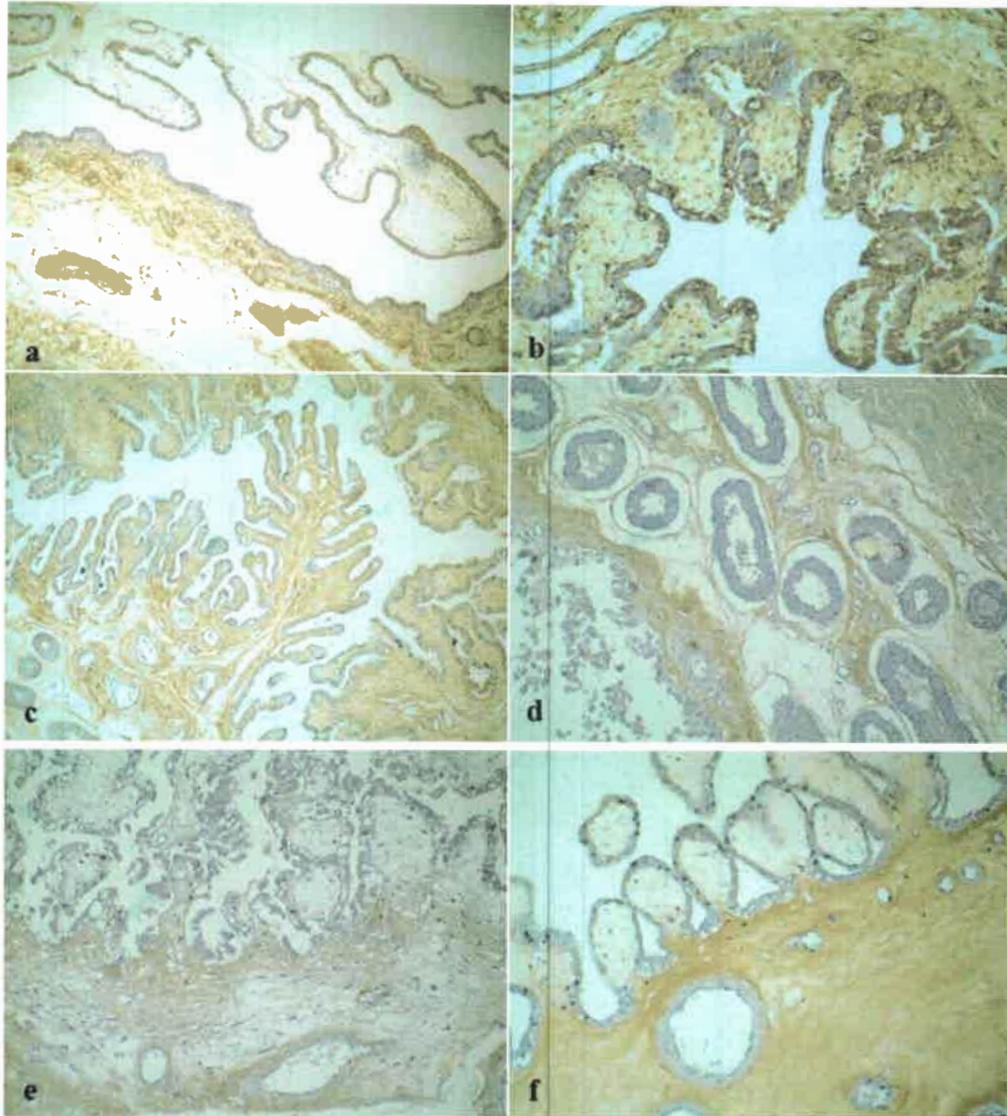


Figura N° 34: Imagen de tejido placentario porcino con ensayo inmunohistoquímico para Fg. **a)** 30 días de preñez (100x); **b)** 60 días de preñez (200x); **c)** 80 días de preñez (100x); **d)** tejido placentario materno de 90 días de preñez (200x); **e)** tejido placentario fetal de 90 días de preñez (200x); **f)** tejido placentario de 114 días de preñez (200x).

Tras analizar la independencia del High Score de Fg con respecto al día de gestación, el ANOVA test detectó efecto del estadio gestacional ($p=0,01$), con el mayor valor medio al día 114 de preñez ($p\leq 0,05$) (Fig. N° 35).

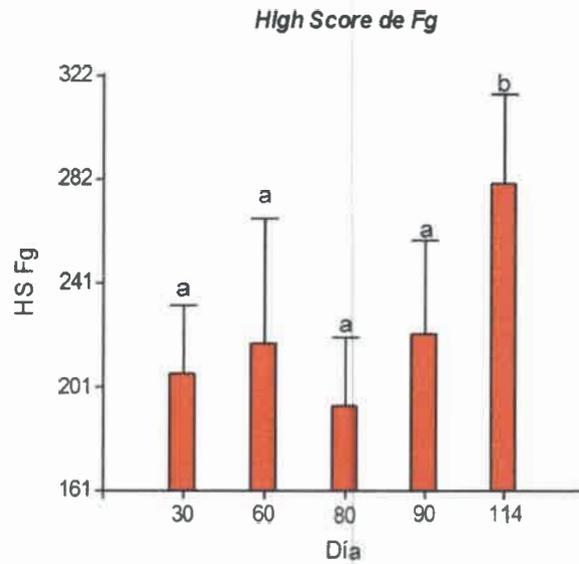


Figura N° 35: Distribución de intensidad de Fg en la placenta porcina.

4. Estudio de la vascularización

4.1. Determinación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) por técnica inmunohistoquímica

La distribución de VEGF en tejidos placentarios porcinos detectada por inmunohistoquímica se muestra en la Tabla V.

VEGF estuvo presente en prácticamente todas las estructuras placentarias, tal como se observan en las imágenes de la Figura N° 36, salvo en los estadíos de 80 y 90 días. En estos períodos de gestación avanzada, los epitelios que conforman la interfase, así como las glándulas endometriales y los vasos sanguíneos placentarios no presentaron marcación para el factor angiogénico.

La marcación del factor angiogénico en el endotelio de los vasos sanguíneos maternos y fetales fue positiva en gran parte de los períodos gestacionales analizados.

Las glándulas uterinas también expresaron VEGF con marcación abundante y débil en cara luminal y citoplasma, respectivamente. Al estadío de 80 días sólo se observó marcación positiva débil en el histiotrofo de algunas glándulas.

Además, tanto el tejido conectivo estromal como el mesenquimático fetal y las fibras musculares lisas que conforman el miometrio, expresaron este factor pro-angiogénico en la mayoría de los períodos analizados.

Tabla V: Inmunoexpresión de VEGF en muestras placentarias porcinas de diferentes estadios de preñez. (Ut: epitelio materno; Tr: epitelio trofoblástico; vsm: vasos sanguíneos maternos; vsf: vasos sanguíneos fetales; EG: epitelio glandular; E: endometrio; Mf: mesénquima fetal). (-): ausencia de marcación; (+): marcación débil; (++): marcación abundante; (+++): marcación cuantiosa.

Período gestacional (días)	Estructuras placentarias				
	Vellosidad placentaria	Vasos sanguíneos	Glándulas	Tejido conectivo	Miometrio
30	Ut (++) marcación citoplasmática Tr (+) marcación apical	vsm (+) vsf (-)	EG (++) en cara luminal	E (+) Mf (+) / (++)	(+)
60	Ut (+) marcación citoplasmática Tr (+) marcación apical	vsm (+) vsf (+)	EG (++) en cara luminal (+) en citoplasma	E (+) / (++) Mf (+)/(++)	(+) / (++)
80	Ut (-) Tr (-)/(+)*	vsm (-) vsf (-)	EG (-) H (-)/(+)	E (+) Mf (+)	(-)/(+)
90	Ut (-) Tr (-)/(+)*	vsm (-) vsf (-)	EG (-) H (-)	E (+/+++) Mf (+)	(+)
114	Tr (+) marcación apical	vsf (+)	/	Mf (+)	/

* marcación apical en fosas

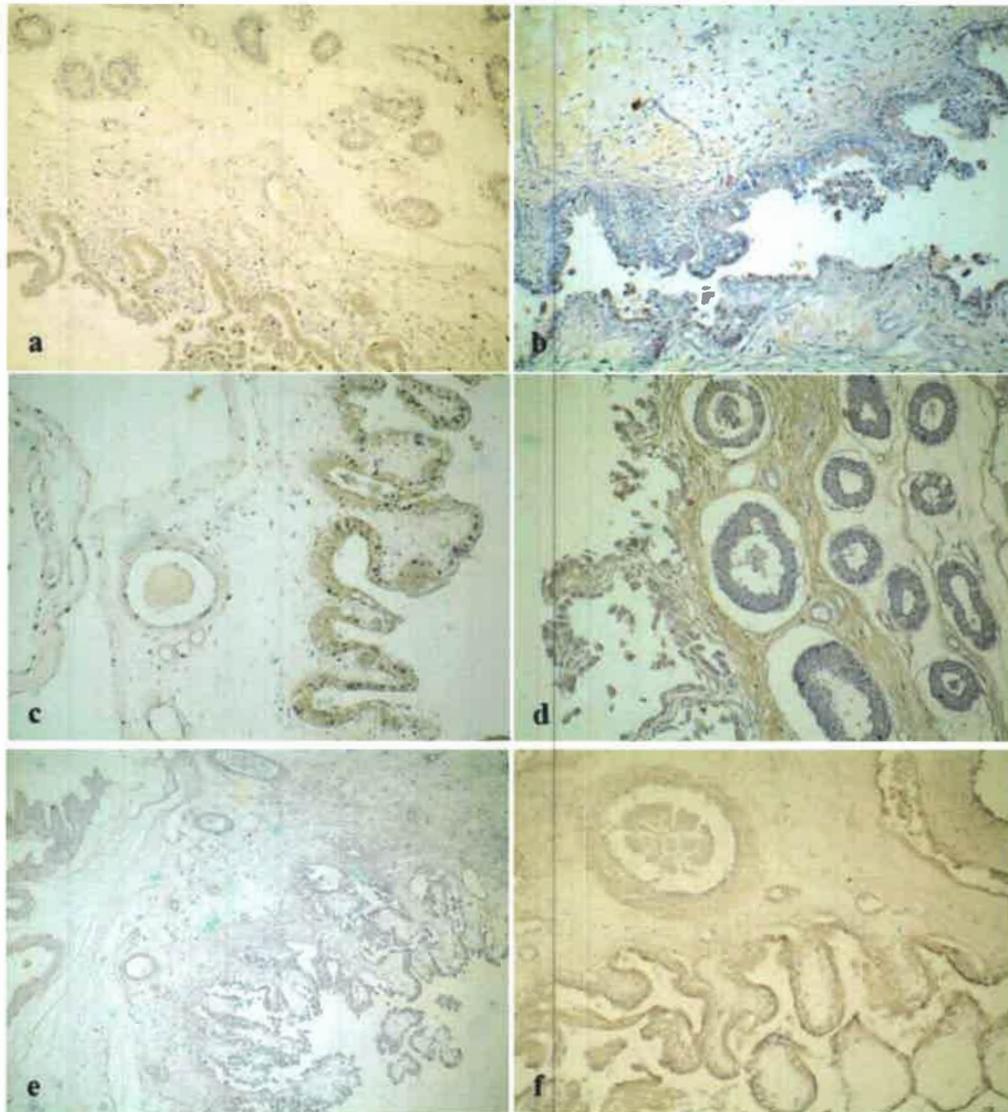


Figura N° 36: Imágenes de tejidos placentarios porcinos tratados con ensayo inmunohistoquímico para VEGF. **a)** 30 días de gestación (200x); **b)** 60 días de gestación (200x); **c)** 80 días de gestación (200x); **d)** 90 días de gestación de origen materno (200x); **e)** 90 días de gestación de origen fetal (100x); **f)** 114 días de gestación (200x).

A continuación, en la Figura N° 37 se observan imágenes de vasos sanguíneos placentarios de 60 días de preñez, donde se observa marcación positiva para el factor angiogénico en endotelio y túnica adventicia.

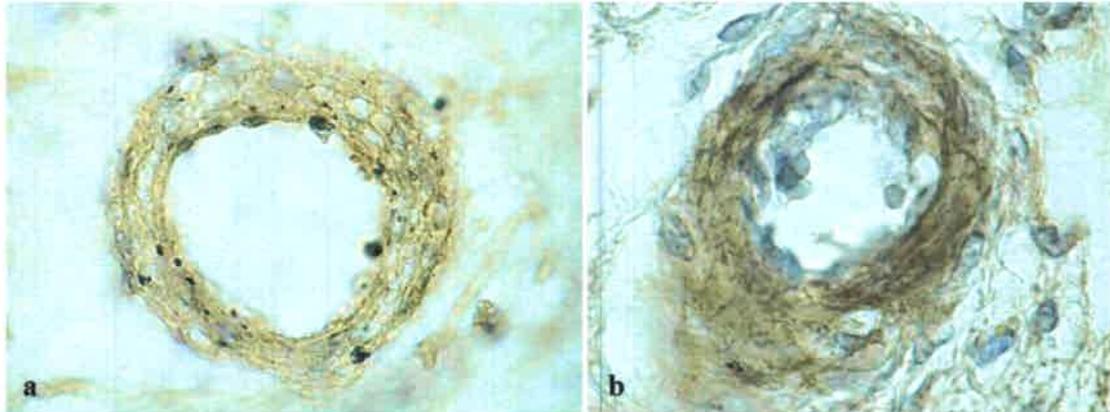


Figura N° 37: Imágenes de vasos sanguíneos placentarios de 60 días de preñez con ensayo inmunohistoquímico para VEGF. **a)** vaso sanguíneo fetal; **b)** vaso sanguíneo materno. (1000x).

El factor de crecimiento vascular endotelial marcó débilmente en las fosas trofoblásticas de 80 y 90 días de gestación, con ubicación apical en las células del epitelio coriónico de ambos períodos. El resto de las células que conforman las vellosidades marcaron negativamente en los estadios analizados.

A continuación se observa una imagen de tejido placentario porcino de 80 días de gestación con marcación apical en las células del epitelio trofoblástico, principalmente a nivel de las fosas coriónicas (Fig. N° 38a). En la imagen N° 38b se observa algo similar en un tejido placentario porcino de 90 días. Visto a mayor aumento (Fig. N° 38c) es posible apreciar la marcación de VEGF en las fosas trofoblásticas.

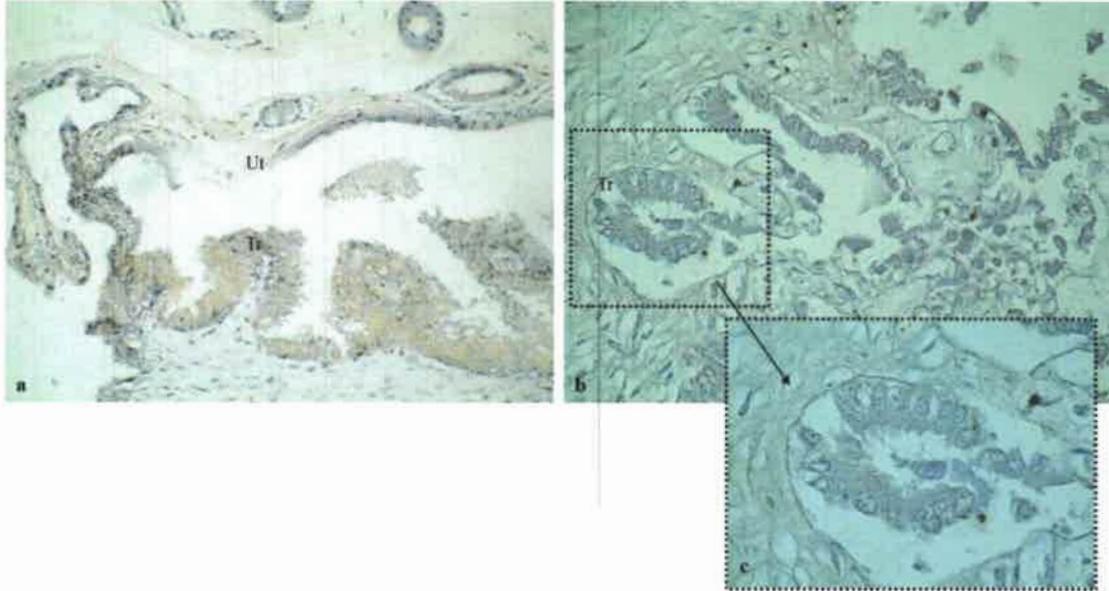


Figura N° 38: Imágenes de tejidos placentarios porcinos de con ensayo inmunohistoquímico para VEGF. **a)** 80 días de preñez (200x); **b)** 90 días de preñez de origen fetal (400x); **c)** ampliación de b) (1000x). Ut: epitelio uterino; Tr: epitelio trofoblástico.

Tras la determinación de la distribución de la intensidad de marcación de VEGF a lo largo de la gestación porcina, se evaluó la independencia del High Score de VEGF con respecto al estadio gestacional (Fig. N° 39).

Se realizó el análisis estadístico sobre todos los períodos gestacionales analizados hasta el momento (30, 60, 80, 90 y 114 días) a través del software InfoStat. El test de Kruskal Wallis detectó efecto del día de gestación sobre el High Score de VEGF ($p=0,001$). Se detectaron diferencias entre los mayores valores medios de High Score a los 30 y 60 días y los menores hallados en los restantes períodos ($p\leq 0,05$; letras diferentes indican diferencias significativas).

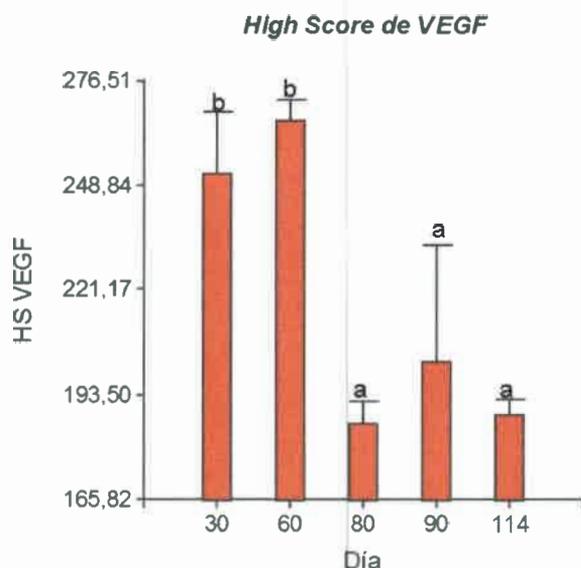


Figura N° 39: Distribución de intensidad de VEGF en la placenta porcina.

4.2. Determinación de los receptores del factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF-R1 y VEGF-R2, por inmunohistoquímica

4.2.1. Determinación de VEGF-R1

Se detectó marcación positiva del receptor Flt-1 del factor de crecimiento vascular endotelial en las vellosidades placentarias porcinas del inicio y del final de la preñez, con intensidad abundante y débil respectivamente (Fig. N° 40a, f). En los períodos intermedios de gestación, no se observó marcación de VEGF en las mencionadas estructuras (Fig. N° 40b-e). Resultados similares se obtuvieron en el tejido conectivo que conforma el estroma uterino y el mesénquima fetal (Fig. N° 40b-e).

No se observó marcación de VEGF-R1 en los vasos sanguíneos ni en el miometrio en ninguno de los períodos gestacionales estudiados (Fig. N° 40a-f).

En cuanto a las glándulas uterinas, se halló marcación del receptor en el epitelio e histiotrofo únicamente en placentas de gestación temprana (Fig. N° 40a).

A continuación se muestran en la Tabla VI los resultados obtenidos para el receptor VEGF- R1.

Tabla VI: Inmunoexpresión de VEGF-R1 en muestras placentarias porcinas de diferentes estadios gestacionales. (Ut: epitelio uterino; Tr: epitelio trofoblástico; vsm: vasos sanguíneos maternos; vsf: vasos sanguíneos fetales; EG: epitelio glandular; E: endometrio; Mf: mesénquima fetal). (-): ausencia de marcación; (+): marcación débil; (++): marcación abundante; (+++): marcación cuantiosa.

Estructuras placentarias					
Período gestacional (días)	Vellosidad placentaria	Vasos sanguíneos	Glándulas	Tejido conectivo	Miometrio
30	Ut (++) marcación citoplasmática	vsm (-)	EG (+)	E (+)	ND
	Tr (++) marcación apical	vsf (-)	H (++)	Mf (+)	
60	Ut (-)	vsm (-)	EG (-)	E (-)	(-)
	Tr (-)	vsf (-)	H (-)	Mf (-)	
80	Ut (-)	vsm (-)	EG (-)	E (-)	(-)
	Tr (-)	vsf (-)	H (-)	Mf (-)	
90	Ut (-)	vsm (-)	EG (-)	E (-)	(-)
	Tr (-)	vsf (-)	H (-)	Mf (-)	
114	Tr (+) marcación apical	vsf (-)		Mf (+)	

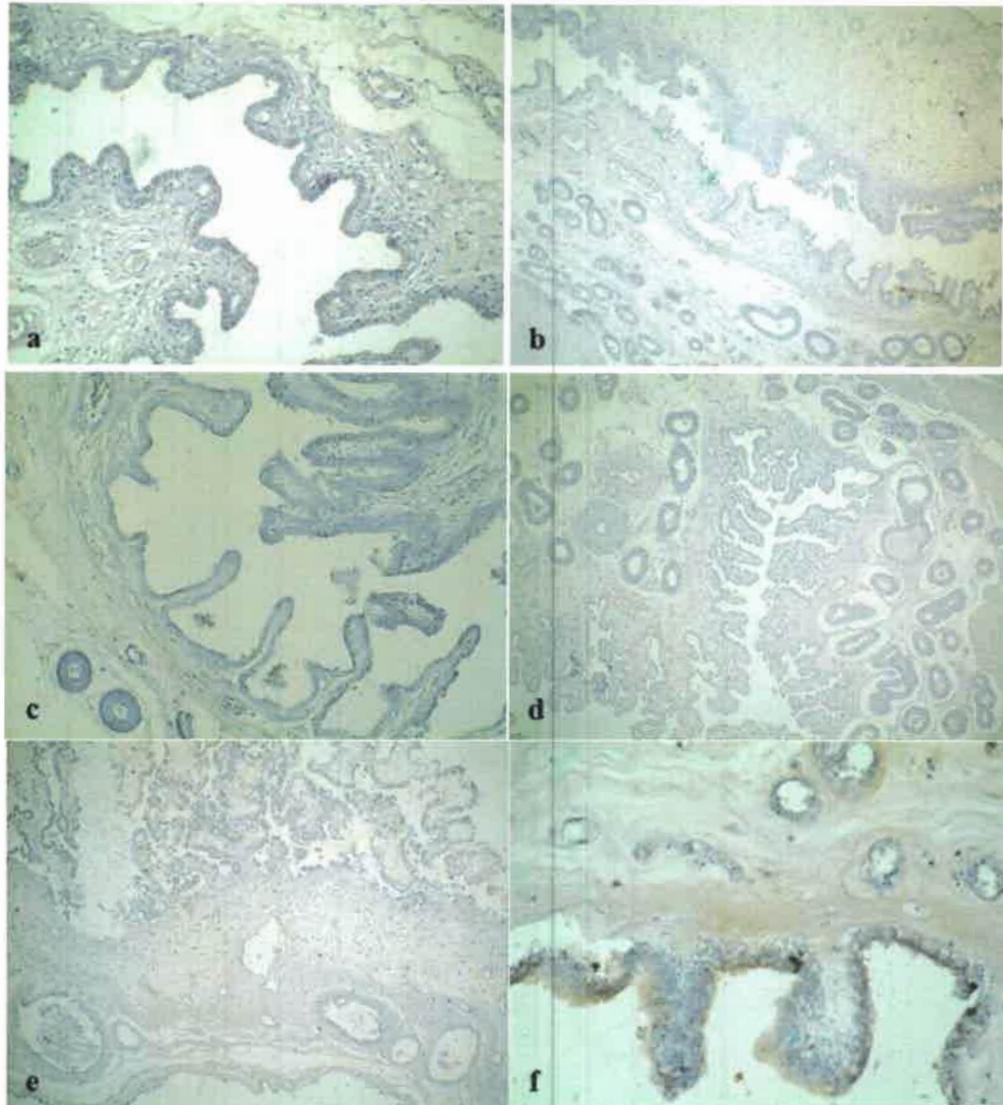


Figura N° 40: Imagen de tejido placentario porcino con ensayo inmunohistoquímico para Flt-1. **a)** 30 días de preñez (200x); **b)** 60 días de preñez (100x); **c)** 80 días de preñez (200x); **d)** 90 días de preñez de origen materno (100x); **e)** 90 días de preñez de origen fetal (100x); **f)** 114 días de preñez (400x).

Se evaluó la independencia del High Score de VEGF-R1 con respecto al estadio gestacional (Fig. N° 41). Se realizó el análisis estadístico sobre todos los períodos gestacionales analizados (30, 60, 80, 90 y 114 días) a través del software InfoStat. El test de Kruskal Wallis detectó efecto del día de gestación sobre el High Score de VEGF-R1 ($p=0,0001$). Se detectaron diferencias entre los mayores valores medios de HS a los 30 y 114 días y los menores hallados en los períodos de gestación intermedia y avanzada (días 60, 80 y 90) ($p \leq 0,05$; letras diferentes indican diferencias significativas).

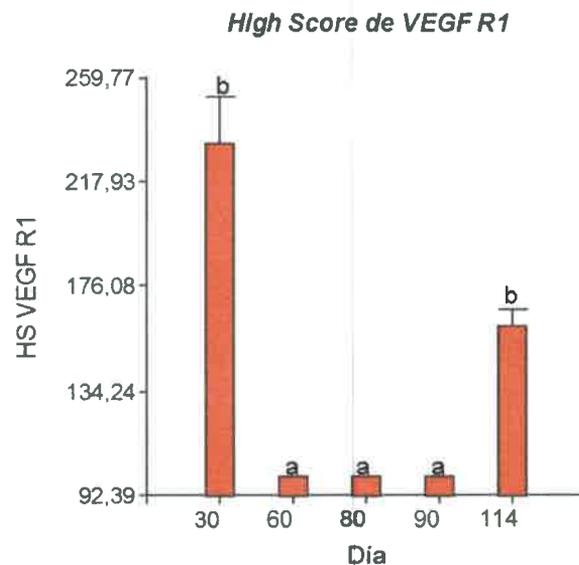


Figura N° 41: Distribución de intensidad de VEGF-R1 en la placenta porcina.

4.2.2. Determinación de VEGF-R2

El epitelio uterino mostró evidencias de marcación con el receptor R2 de VEGF sólo al día 30 de preñez, con intensidad débil. Por su parte, el epitelio trofoblástico presentó igual marcación hasta el día 80, no hallándose presencia de la citada molécula en períodos posteriores.

Al igual que en el caso del receptor Flt-1, no se detectó marcación de Flk-1 en los vasos sanguíneos de ninguno de los estadios gestacionales estudiados. En el caso de las glándulas endometriales, una débil marcación para VEGF-R2 se detectó únicamente en las muestras placentarias de gestación temprana.

Una débil marcación para esta molécula se observó en el tejido conectivo estromal y mesenquimático fetal en la mayoría de los estadios analizados, siendo la excepción el período de 90 días en que no se detectó marcación del receptor. Al día 80, se destaca la marcación negativa en el mesénquima próximo al trofoblasto y positiva en el resto de la estructura.

En cuanto al miometrio, sólo se detectó inmunomarcación para Flk-1 a los 60 días.

En la Tabla VII se resumen los resultados obtenidos tras la inmunodetección de Flk-1.

Tabla VII: Inmunoexpresión de VEGF-R2 en muestras placentarias porcinas de diferentes estadios gestacionales. (Ut: epitelio uterino; Tr: epitelio trofoblástico; vsm: vasos sanguíneos maternos; vsf: vasos sanguíneos fetales; EG: epitelio glandular; E: endometrio; Mf: mesénquima fetal). (-): ausencia de marcación; (+): marcación débil; (++): marcación abundante; (+++): marcación cuantiosa.

Estructuras placentarias					
Período gestacional (días)	Vellosidad placentaria	Vasos sanguíneos	Glándulas	Tejido conectivo	Miometrio
30	Ut (+) marcación citoplasmática Tr (+) marcación apical	vsm (-) vsf (-)	EG (+) marcación citoplasmática H (+)	E (+) Mf (+)	ND
60	Ut (-) Tr (+) marcación apical	vsm (-) vsf (-)	EG (-) H (-)	E (+) Mf (+)	(+)
80	Ut (-) Tr (+) marcación apical	vsm (-) vsf (-)	EG (-) H (-)	E (+) Mf (-)/(+)*	ND
90	Ut (-) Tr (-)	vsm (-) vsf (-)	EG (-) H (-)	E (-) Mf (-)	(-)
114	Tr (-)	vsf (-)		Mf (+)	

* cercano a epitelio trofoblástico (-); resto de tejido conectivo (+).

A continuación se muestran imágenes de tejidos placentarios porcinos tratados con anticuerpos contra VEGF-R2 (Fig. N° 42a-f).

Se observa la débil marcación del receptor en los epitelios y tejido conectivo de la gestación temprana (Fig. N° 42a).

Se remarca la inmunointensidad débil en el epitelio trofoblástico con disposición apical al día 80 de preñez, mientras que el resto de las estructuras se muestran de coloración azul-violácea, característica de la coloración de contraste (Fig. N° 42c).

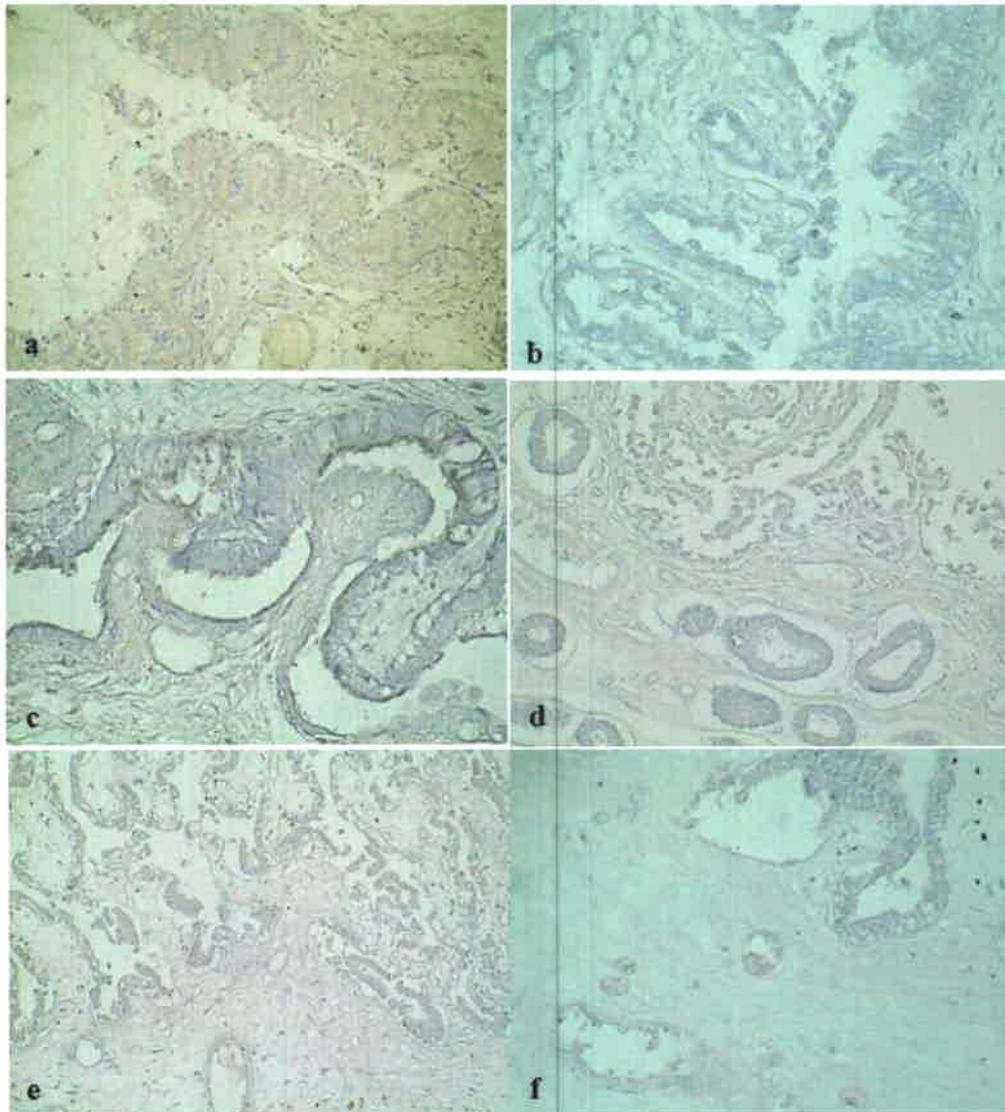


Figura N° 42: Imagen de tejido placentario porcino con ensayo inmunohistoquímico para Flk-1. **a)** 30 días de preñez (200x); **b)** 60 días de preñez (400x); **c)** 80 días de preñez (400x); **d)** 90 días de preñez de origen materno (200x); **e)** 90 días de preñez de origen fetal (200x); **f)** 114 días de preñez (400x).

En las imágenes que se muestran a continuación (Fig.N° 43a, b), se observa la inmunomarcación positiva para el receptor Flk-1 en el citoplasma de las células epiteliales uterinas, así como en la cara apical del trofoblasto.

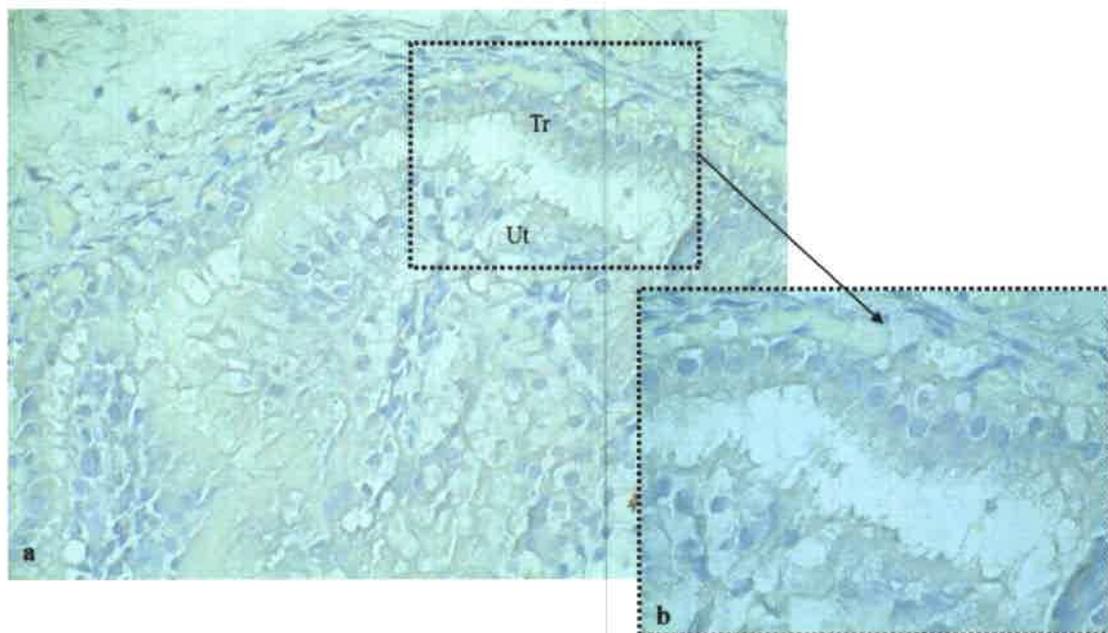


Figura N° 43: Imagen de tejido placentario porcino de 30 días de preñez con ensayo inmunohistoquímico para Flk-1. **a)** (400x); **b)** ampliación de la imagen a) (1000x). Ut: epitelio uterino; Tr: epitelio trofoblástico.

El análisis estadístico de la distribución de la intensidad de marcación (High Score) de VEGF-R2, indicó que existe dependencia con respecto al estadio de preñez ($p=0,0005$) (Fig. N° 44). El test *a posteriori* con rangos determinó que el menor High Score se observa al día 90, mientras que el mayor valor medio se detectó al estadio de gestación temprana ($p \leq 0,05$; letras diferentes indican diferencias significativas).

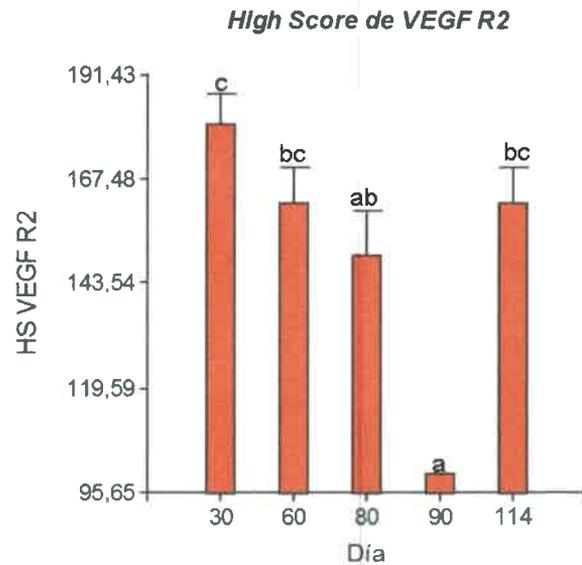


Figura N° 44: Distribución de intensidad de VEGF-R2 en la placenta porcina.

4.3. Análisis del área vascular placentaria

Para el estudio del área vascular placentaria se midieron un total de 5814 vasos sanguíneos, correspondientes a muestras placentarias de 30 días de gestación (1376 vasos sanguíneos), de 40 (554 vasos sanguíneos), de 60 días de gestación (1133 vasos), 80 (523 vasos sanguíneos), 90 (1008 vasos sanguíneos) y de gestaciones a término (1220 vasos). Se adquirieron imágenes de los preparados histológicos teñidos con tinción tricrómica de Gallego, y posteriormente se procesaron con el software AxioVision, tal como se menciona en el apartado 8 de la sección *Materiales y Métodos*.

A continuación se muestran imágenes de microscopía óptica de cada período gestacional estudiado previo a la determinación del área vascular placentaria y luego de la misma a través del software mencionado (Figuras N° 45, 46, 47, 48, 49, 50).

Conforme avanza el período gestacional se observan vasos sanguíneos más pequeños, principalmente en las proximidades de los epitelios uterino y trofoblástico que conforman la interfase feto-placentaria.

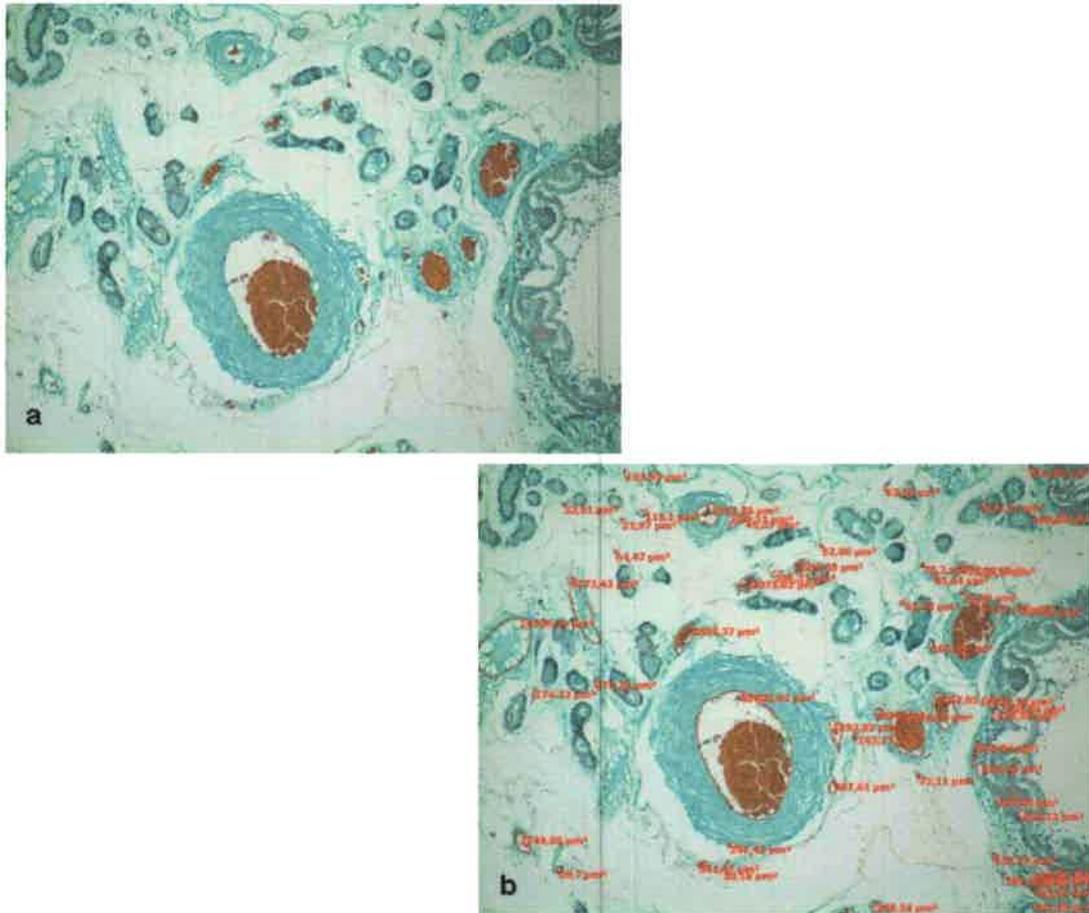


Figura N° 45: Imagen de tejido placentario porcino de 30 días de gestación teñido con tricrómica de Masson. a) Imagen tomada antes de la medición del área vascular. b) Se observa la medición de área correspondiente a cada uno de los vasos sanguíneos presentes en el campo (100x).



Figura N° 46: Imagen de tejido placentario porcino de 40 días de gestación teñido con tinción tricrómica de Gallego. **a)** Imagen tomada antes de la medición del área vascular. **b)** Se observa la medición de área correspondiente a cada uno de los vasos sanguíneos presentes en el campo (100x).

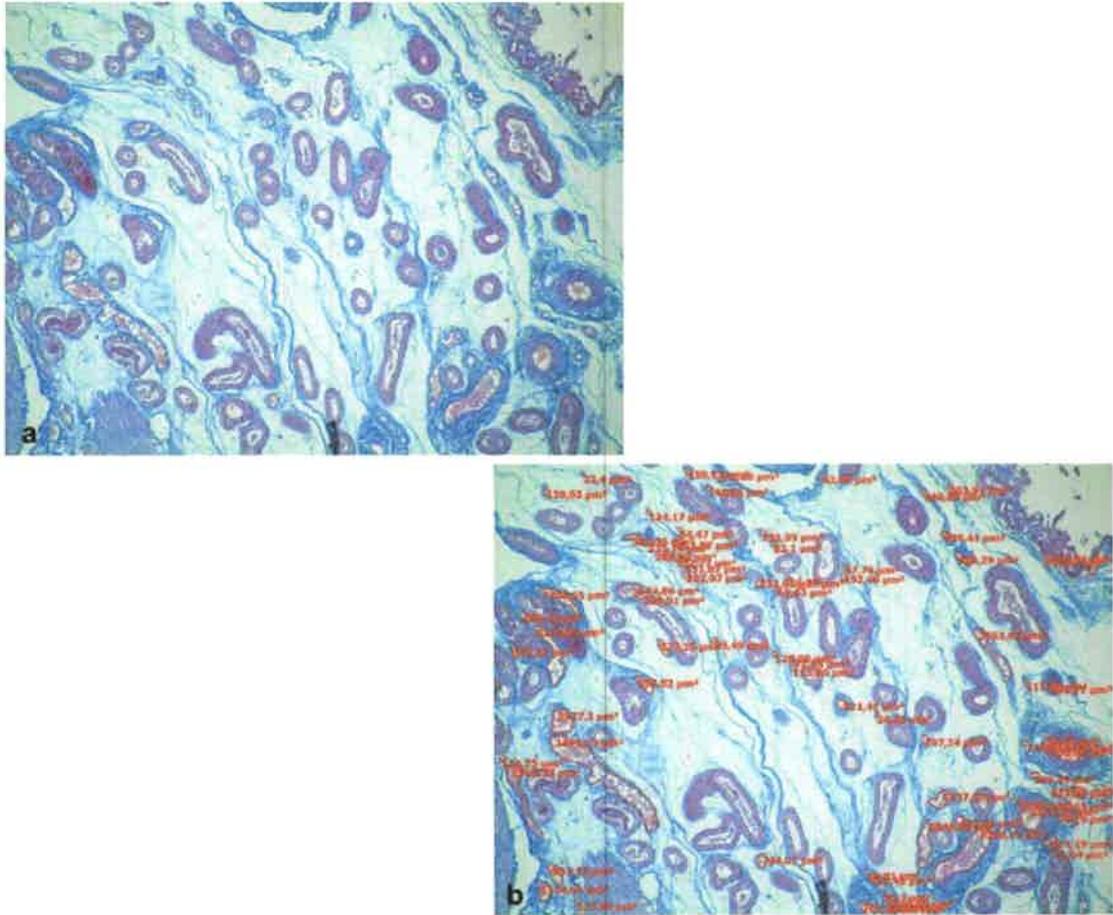


Figura N° 47: Imagen de tejido placentario porcino de 60 días de gestación teñido con tricrómica de Gallego. **a)** Imagen tomada antes de la medición del área vascular. **b)** Se observa la medición de área correspondiente a cada uno de los vasos sanguíneos presentes en el campo (100x).

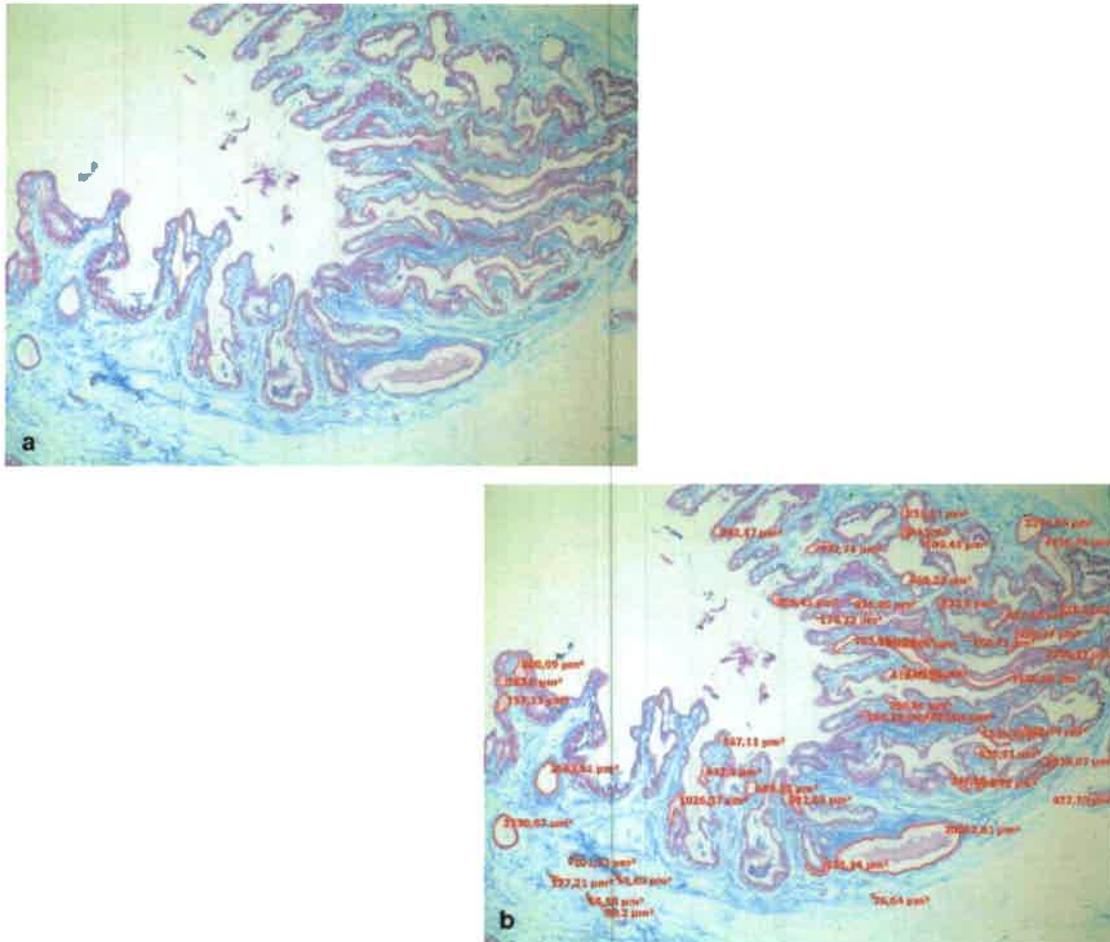


Figura N° 48: Imagen de tejido placentario porcino de 80 días de gestación teñido con tinción tricrómica de Gallego. **a)** Imagen tomada antes de la medición del área vascular. **b)** Se observa la medición de área correspondiente a cada uno de los vasos sanguíneos presentes en el campo (100x).

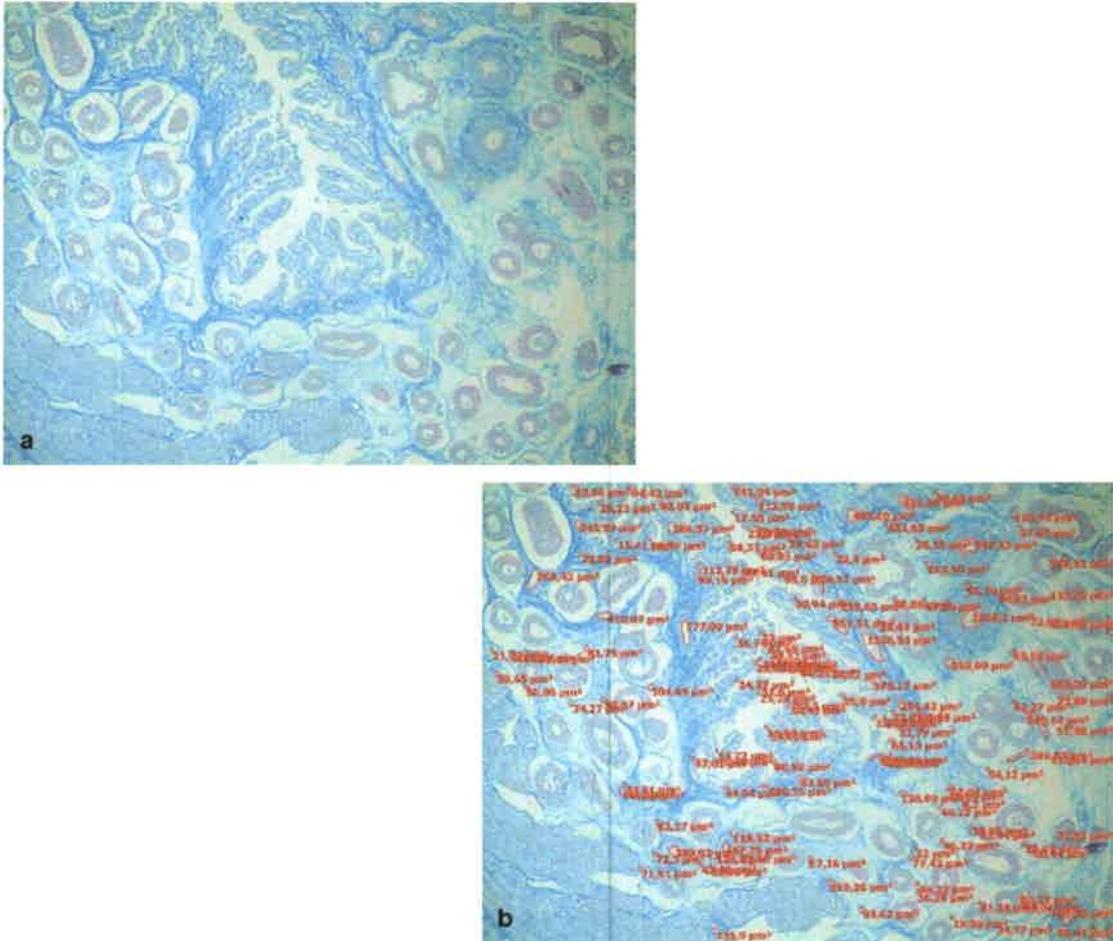


Figura N° 49: Imagen de tejido placentario porcino de 90 días de gestación teñido con tinción tricrómica de Gallego. **a)** Imagen tomada antes de la medición del área vascular. **b)** Se observa la medición de área correspondiente a cada uno de los vasos sanguíneos presentes en el campo (100x).

Tabla VIII: Análisis descriptivo de las mediciones del área vascular placentaria.

Estadísticos	Período gestacional					
	30	40	60	80	90	114
N	1376	554	1133	523	1008	1220
Media	1319,69	1873,79	1999,88	2179,18	294,37	869,77
Sd	7707,26	11301,12	14718,41	10423,36	927,52	6300,80
EEs	207,77	480,14	437,27	455,78	29,21	180,39
CV	584,02	603,21	735,96	478,31	315,08	724,42

Dada la gran variabilidad de datos, dentro y entre los períodos gestacionales analizados, los supuestos de normalidad de los residuos y homogeneidad de la varianza, no se cumplieron. En consecuencia, no fue posible realizar un test paramétrico y se procedió al análisis mediante un test no paramétrico.

Se realizó el test de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en el área media de los vasos sanguíneos entre los estadíos gestacionales evaluados (Kuehl, 2001).

Las hipótesis a probar fueron las siguientes:

H_0 : No hay efecto del día de gestación sobre el área media de los vasos sanguíneos.

H_1 : Hay efecto de, al menos, uno de los días de gestación sobre el área media de los vasos sanguíneos.

Con un valor $p=2,2 \times 10^{-16}$ se concluyó que existen diferencias estadísticamente significativas para afirmar que hay efecto de al menos uno de los días de gestación analizados sobre el área media de los vasos. Plataforma R (R Development Core Team, 2007; <http://www.R-project.org>).

A continuación se realizó un test *a posteriori* con los rangos, el Test de Tukey, para evaluar entre qué períodos gestacionales se hallaban las diferencias. Usando un p valor inferior a 0,1 ($p < 0,1$), se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los días 30 y 90 ($p=0,084$), 40 y 90 ($p=0,016$), 60 y 90 ($p=0,0003$), 80 y 90 días ($p=0,002$), 60 y 114 ($p=0,038$) y entre 80 y 114 ($p=0,077$).

5. Determinación de la apoptosis “*in situ*”

Se analizaron 70 campos por período, sumando un total de 350 campos y 2749 células analizadas a lo largo de la gestación.

En las vellosidades placentarias se detectó efecto del estadio gestacional ($p < 0,0001$), con diferencias significativas entre el IAp medio mayor al día 90 (73,97) y los menores valores medios en los estadios de 60 (11,90) y 114 (10,93) ($p \leq 0,05$) (Fig. N° 51a).

Tras comparar los componentes de las vellosidades por separado, se detectó efecto del estadio gestacional sobre el índice IAp del epitelio uterino ($p < 0,0001$), observándose diferencias entre los distintos períodos evaluados ($p \leq 0,05$), con el mayor valor medio hallado al día 90 (78,59) y el menor al día 60 (10,94) (Fig. N° 51b).

Por otra parte, el análisis estadístico realizado arrojó que existe efecto del día de gestación sobre el IAp en trofoblasto ($p < 0,0001$). El mayor índice apoptótico se observó al día 90 de preñez (69,35), mientras que los valores más bajos se detectaron en los períodos de 60 (12,86) y 114 días (10,93) ($p \leq 0,05$) (Fig. N° 51c).

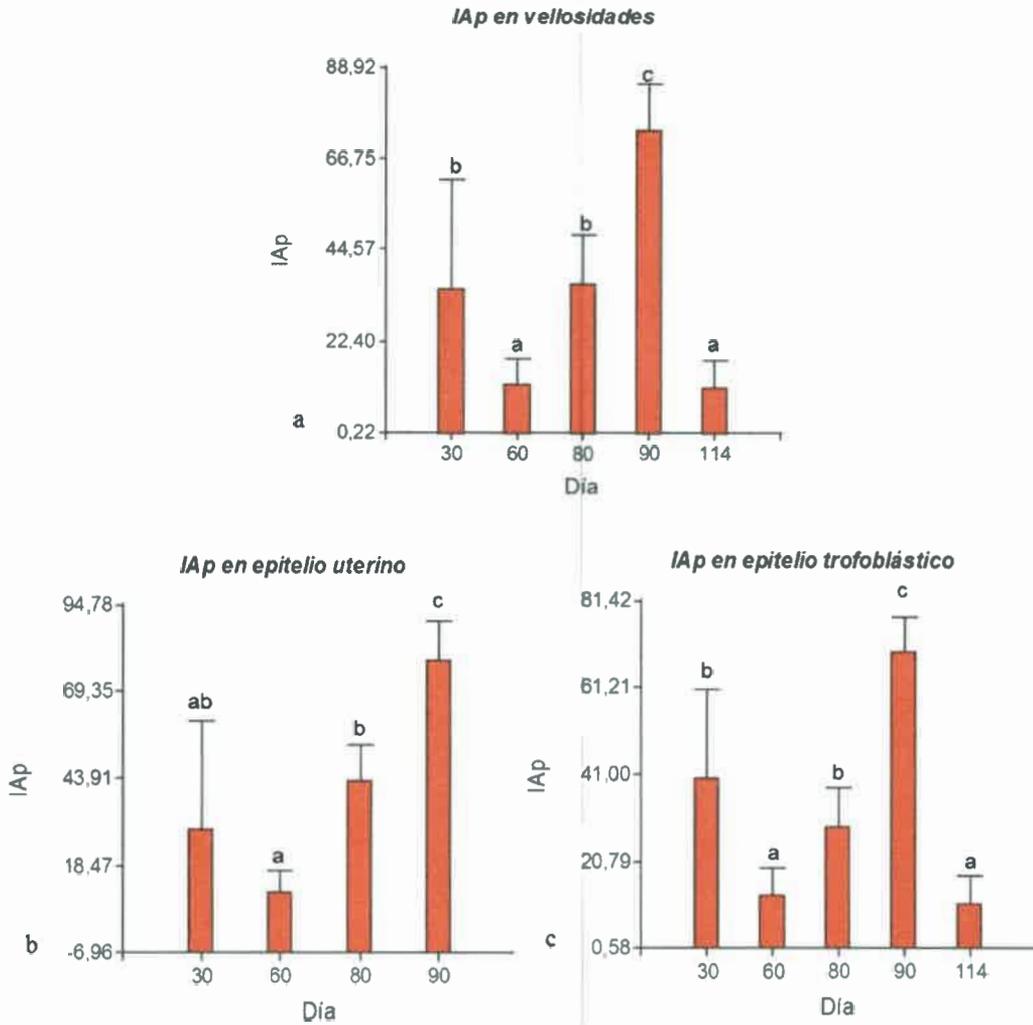


Figura N° 51: Índice apoptótico (IAP) durante la gestación porcina. **a)** En las vellosidades placentarias; **b)** En el epitelio uterino; **c)** En el epitelio trofoblástico.

En el tejido conectivo se observó efecto del estadio gestacional ($p < 0,0001$). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el día 90 (77,08) y el resto de los estadios analizados ($p \leq 0,05$) (Fig. N° 52a).

Analizados estadísticamente los valores de IAP en endometrio, se detectó efecto del día de gestación ($p < 0,0001$). Se hallaron diferencias significativas entre los mayores valores medios de IAP a los 30 (64,07) y 90 (79,37) días y los menores detectados a los 60 (29,55) y 80 días (36,73) ($p \leq 0,05$) (Fig. N° 52b).

Por otra parte, hubo efecto del estadio gestacional sobre el índice apoptótico calculado en el mesénquima fetal ($p = 0,0002$), detectándose diferencias estadísticamente

significativas entre el mayor valor medio al día 90 (74,79) y el resto de los estadios evaluados ($p \leq 0,05$) (Fig. N° 52c).

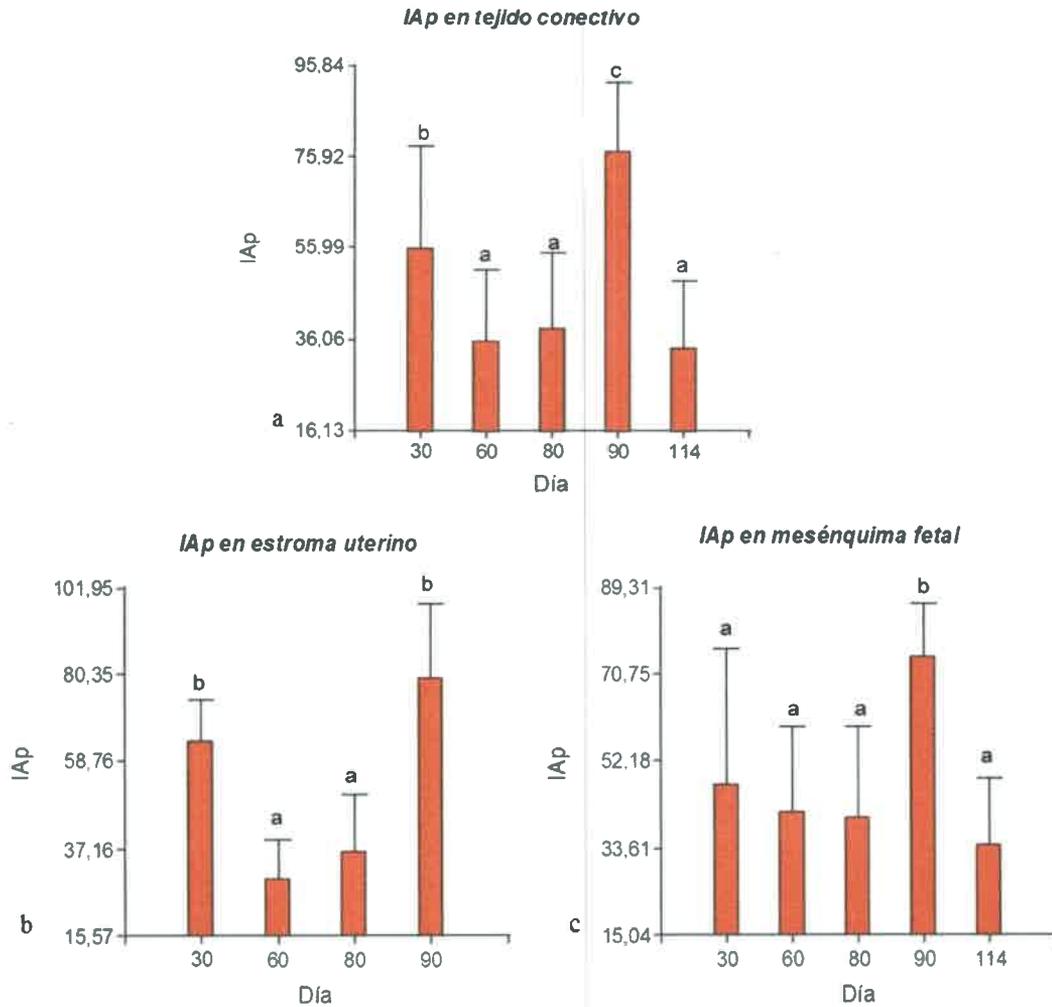


Figura N° 52: Índice apoptótico (IAP) durante la gestación porcina. **a)** En el tejido conectivo placentario; **b)** En el estroma uterino; **c)** En el mesénquima fetal.

Con el fin de evaluar el rol de la apoptosis en la remodelación vascular placentaria porcina, se determinó el índice apoptótico en los vasos sanguíneos de diferentes períodos gestacionales.

En cuanto a los vasos sanguíneos placentarios, en la Figura N° 53a se muestra que la Prueba de Kruskal Wallis detectó efecto del estadio gestacional sobre el índice IAP ($p=0,0004$). Por otra parte, el test *a posteriori* con rangos detectó diferencias

significativas entre el mayor IAp medio al día 90 (64,31) y el resto de los estadios analizados ($p \leq 0,05$).

El ANOVA test detectó efecto del período gestacional sobre el IAp de vasos sanguíneos maternos ($p=0,001$), detectándose diferencias entre los mayores valores medios a los 30 (66,63) y 90 (62,88) días y los menores hallados a los 60 (35,55) y 80 (39,34) días de preñez ($p \leq 0,05$) (Fig. N° 53b).

Las únicas estructuras placentarias que no evidenciaron efecto del día de gestación sobre el índice de células apoptóticas fueron los vasos sanguíneos fetales ($p=0,06$) (Fig. N° 53c).

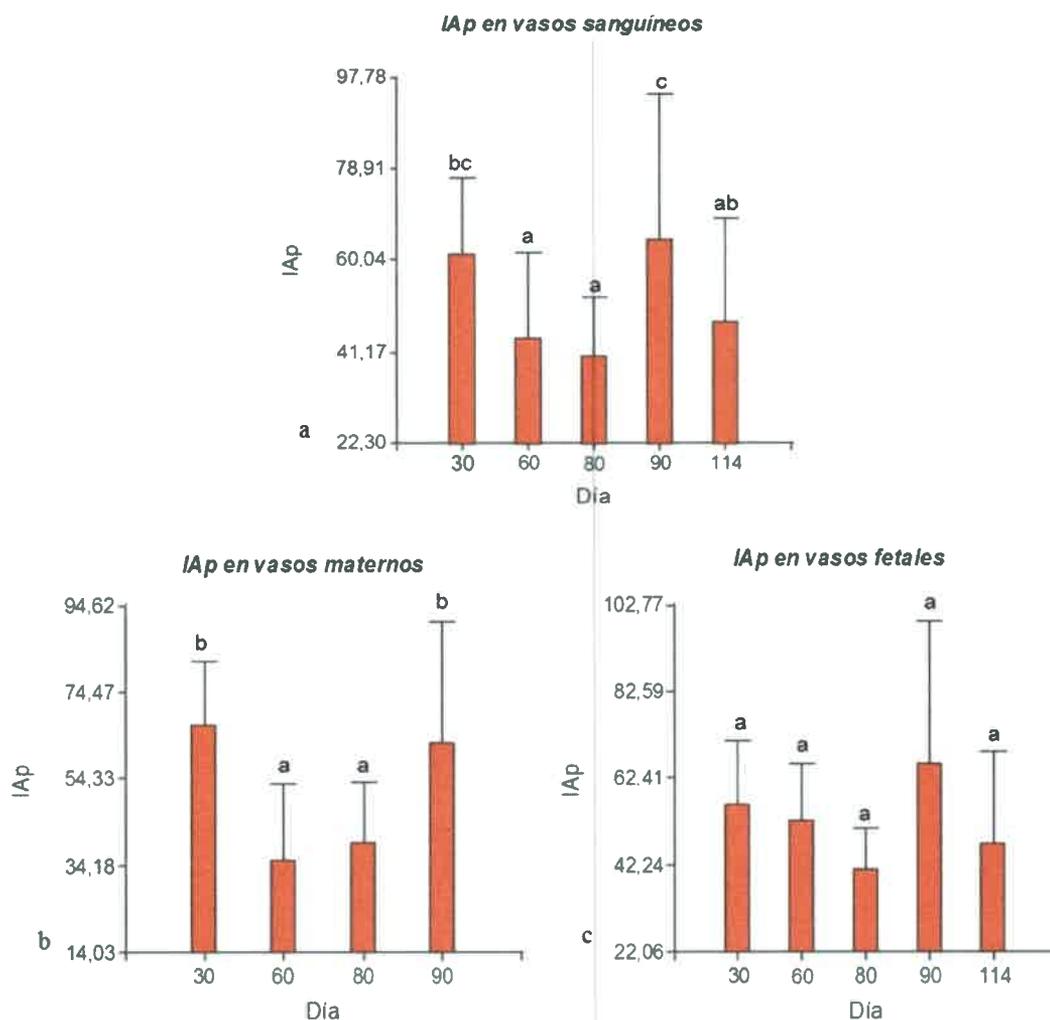


Figura N° 53: Índice apoptótico (IAp) durante la gestación porcina. **a)** En los vasos sanguíneos placentarios; **b)** En los vasos placentarios maternos; **c)** En los vasos placentarios fetales.

En la Figura N° 54 se observan los resultados obtenidos en las glándulas endometriales. Se detectó efecto del día de gestación sobre el índice apoptótico del epitelio glandular ($p < 0,0001$). Diferencias significativas se hallaron entre el mayor valor IAp medio al día 30 (52,41) y el menor detectado al día 60 (3,70) ($p \leq 0,05$).

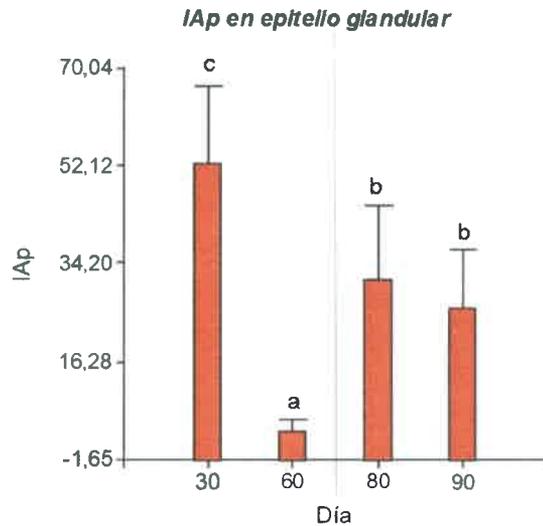


Figura N° 54: Índice apoptótico (IAp) en epitelio glandular durante la gestación porcina.

En las Figuras N° 55a y N° 55b que se muestran a continuación, se observa una zona con elevado contenido de células epiteliales uterinas en apoptosis (núcleos marrones), al día 30 de preñez en porcinos. También es posible observar numerosas células estromales (Fig. N° 55a, c) y mesenquimáticas fetales (Fig. N° 55d) TUNEL positivas. Además, células endoteliales pertenecientes a vasos sanguíneos maternos (Fig. N° 55a, c) y fetales (Fig. N° 55d) marcaron positivamente para el ensayo TUNEL. En la Figura N° 55c se aprecian células del epitelio glandular con fragmentación de ADN.

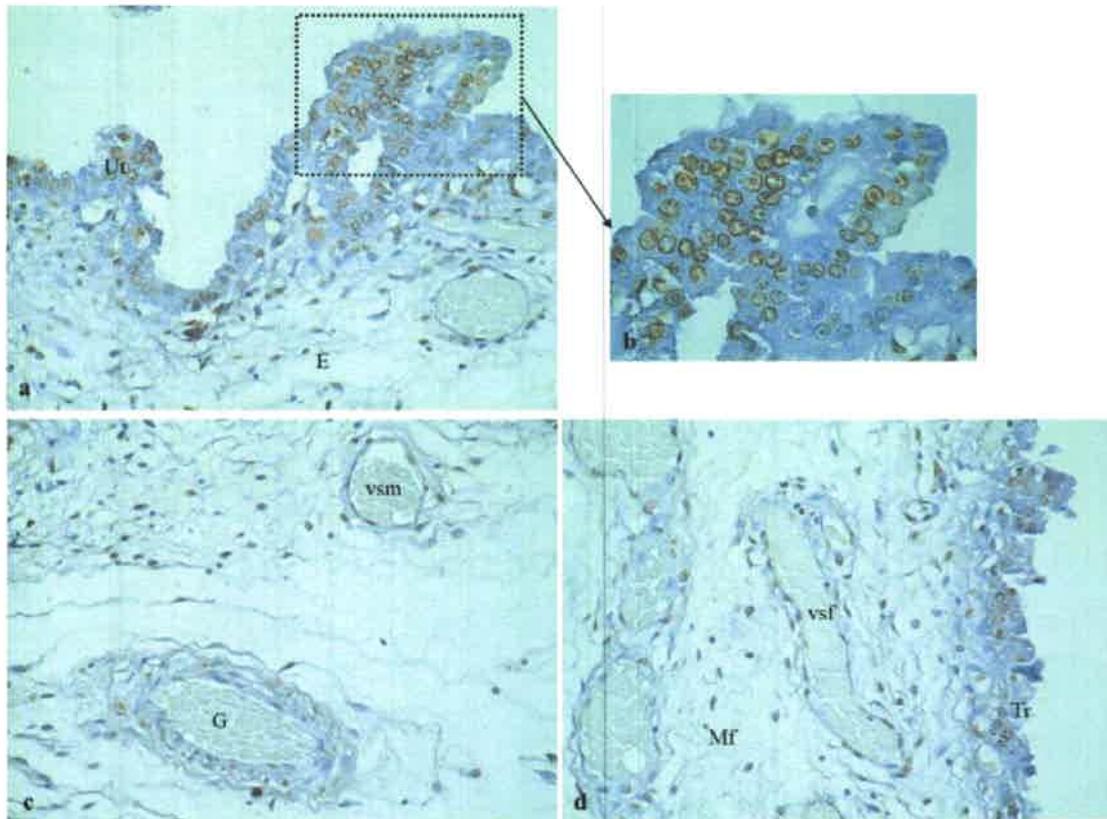


Figura N° 55: Imagen de tejido placentario porcino de 30 días de gestación con ensayo TUNEL. **a)** Tejido placentario materno (1000x); **b)** Ampliación de a); **c)** Tejido placentario materno (1000x); **d)** Tejido placentario fetal (1000x). **Ut:** epitelio uterino; **Tr:** epitelio trofoblástico; **E:** endometrio; **Mf:** mesénquima fetal; **vsm:** vasos sanguíneos maternos; **vsf:** vasos sanguíneos fetales; **G:** glándula endometrial.

A los 60 días de gestación, observamos en la Figura N° 56a células epiteliales uterinas en estado de apoptosis. Células TUNEL positivas también se visualizan en los vasos sanguíneos maternos y fetales (Fig. N° 56b y N° 56d, respectivamente), tanto en el endotelio como en la túnica adventicia que los rodea. En la Figura N° 56c células con fragmentación del ADN se hallan dispersas en el tejido conectivo mesenquimático fetal.

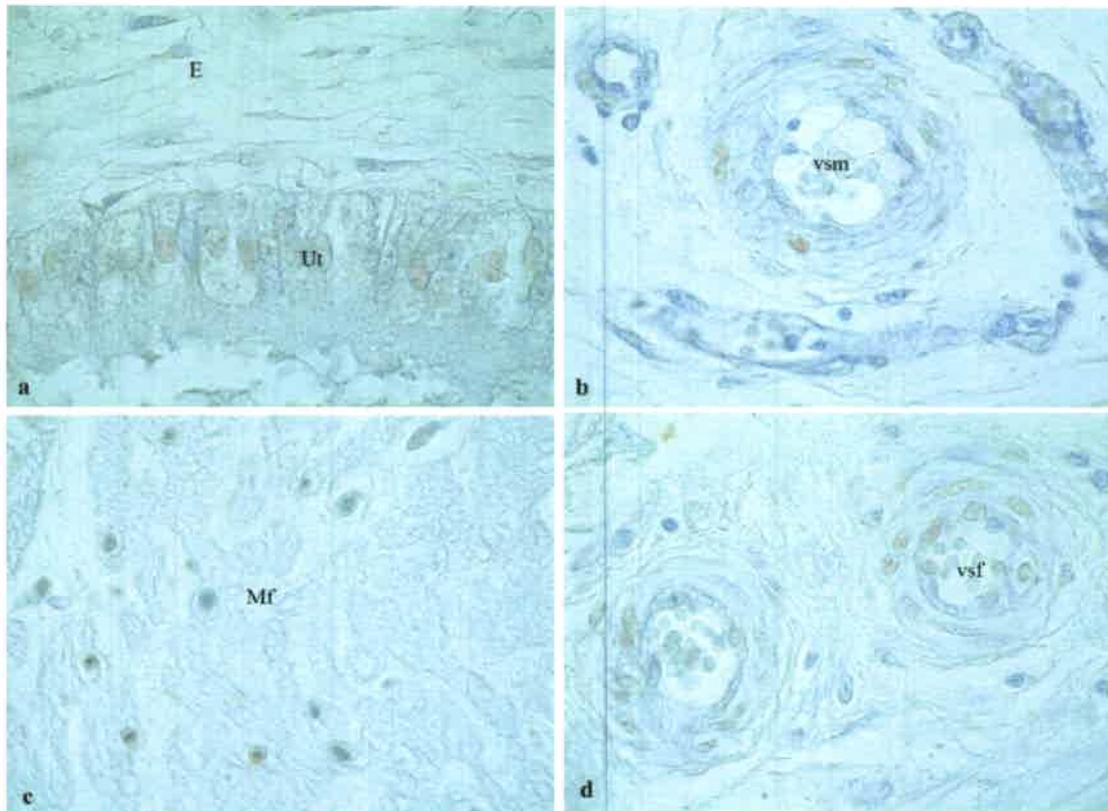


Figura N° 56: Imagen de tejido placentario porcino de 60 días de gestación con ensayo TUNEL. **a)** Tejido placentario materno con presencia de células apoptóticas en epitelio uterino (1000x); **b)** Tejido placentario materno con presencia de células TUNEL vasos sanguíneos (1000x); **c)** Tejido placentario fetal mostrando células con fragmentación del ADN en mesénquima (1000x); **d)** tejido placentario fetal con células apoptóticas en vasos sanguíneos. **Ut:** epitelio uterino; **E:** endometrio; **Mf:** mesénquima fetal; **vsm:** vaso sanguíneo materno; **vsf:** vaso sanguíneo fetal.

A continuación, se muestran imágenes de tejido placentario porcino de 80 días de gestación sometido a la técnica de TUNEL para poner de manifiesto la presencia de células con ADN fragmentado, producto de la muerte celular por apoptosis. Se observan células TUNEL positivas en los ápices uterinos (Fig. N° 57a) y en las fosas trofoblásticas (Fig. N° 57b), producto de una activa remodelación celular a nivel de las vellosidades placentarias.

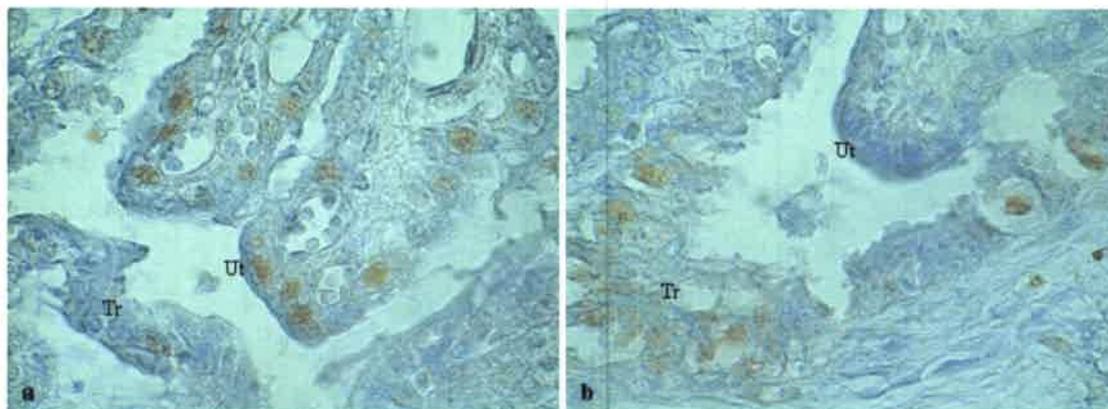


Figura N° 57: Imagen de tejido placentario porcino de 80 días de gestación con ensayo TUNEL. **a)** Se observan células apoptóticas en los ápices uterinos (1000x); **b)** Se observan células apoptóticas en las fosas trofoblásticas (1000x). **Ut:** epitelio uterino; **Tr:** epitelio trofoblástico.

Se observan células TUNEL positivas formando parte del epitelio de las glándulas endometriales y del endotelio de vasos sanguíneos maternos de tejidos placentarios porcinos de 80 días de preñez (Fig. N° 58a). Las distintas estructuras placentarias fetales analizadas por TUNEL mostraron células con núcleos TUNEL positivos (Fig. N° 58b). También se observan núcleos con fragmentación del ADN en el epitelio que conforma las vellosidades uterinas (Fig. N° 58c).

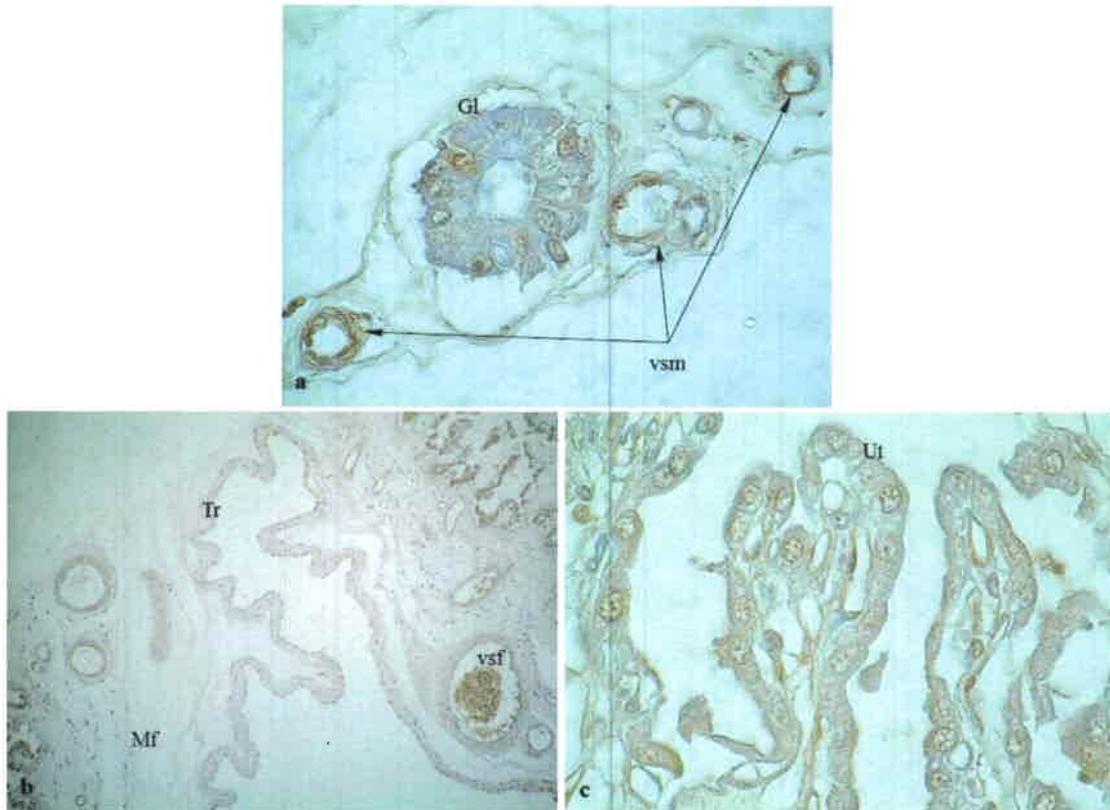


Figura N° 58: Imagen de tejido placentario porcino de 90 días de gestación con ensayo TUNEL. **a)** Se observan células apoptóticas en epitelio glandular y vasos sanguíneos maternos (1000x); **b)** Presencia de células TUNEL (+) en trofoblasto, vasos sanguíneos y mesénquima fetal (100x); **c)** Vellosidades uterinas mostrando células con fragmentación del ADN (1000x). **Ut:** epitelio uterino; **Mf:** mesénquima fetal; **vsm:** vaso sanguíneo materno; **vsf:** vaso sanguíneo fetal; **Gl:** glándula endometrial.

En placentas de gestación a término, se observan células apoptóticas en el mesénquima fetal (Fig. N° 59a) y en el epitelio coriónico (Fig. N° 59a, b).

En el epitelio trofoblástico mostrado en las Figuras N° 59a y N° 59b se observan células en estadios avanzados de apoptosis, identificadas con un asterisco (*).

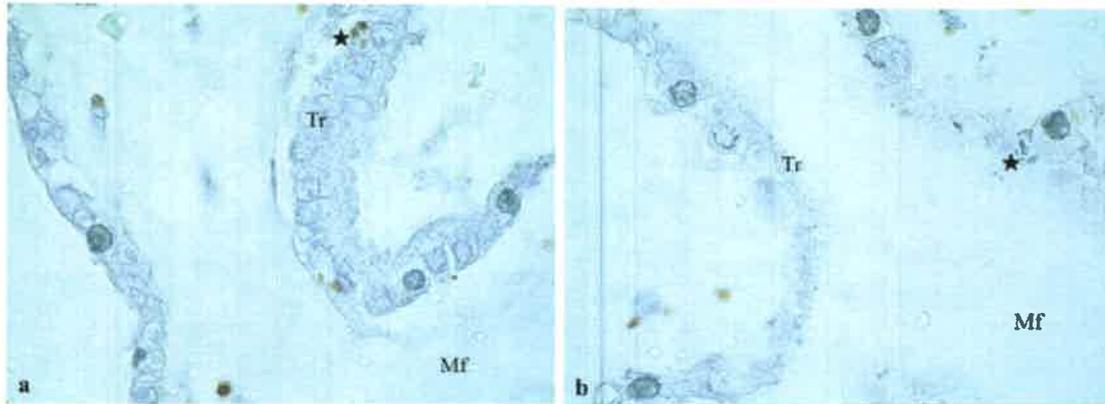


Figura N° 59: Imagen de tejido placentario porcino de 114 días de gestación con ensayo TUNEL. **a)** Tejido placentario fetal con presencia de células apoptóticas en epitelio trofoblástico y mesénquima (1000x); **b)** Tejido placentario fetal con presencia de células TUNEL positivas trofoblasto (1000x). **Tr:** epitelio trofoblástico; **Mf:** mesénquima fetal. *Células en avanzado estado de apoptosis, con formación de cuerpos apoptóticos.

6. Estudio de la proliferación celular

Para la determinación de la proliferación celular placentaria, se calculó el porcentaje de células con núcleos marcados positivamente con el anticuerpo anti-Ki67 (% Ki67). Los datos obtenidos en diferentes estructuras placentarias porcinas, fueron analizados estadísticamente a través del software InfoStat con el fin de hallar dependencia entre la proliferación celular y el estadio gestacional.

Para evaluar el efecto de la recuperación antigénica mediante la técnica de irradiación con microondas sobre los cortes parafinados de tejido placentario porcino, se realizó un test de medias para muestras independientes. Para ello, se compararon los valores de %Ki67 obtenidos tras la realización de la técnica de inmunohistoquímica sin mediar recuperación antigénica con los resultantes de la recuperación por microondas y posterior IHQ. Dicha comparación se realizó sobre tejidos placentarios de 30 y 60 días de preñez.

Al día 30, el test T detectó efecto de la recuperación antigénica sobre el porcentaje de Ki67. Las diferencias entre los valores medios de %Ki67 con (19,48) y sin (1,41) recuperación antigénica se detectaron con un p-valor <0,0001. Al día 60 se

obtuvieron resultados similares; se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de %Ki67 (p -valor $<0,0001$) para muestras con (5,95) y sin (1,83) recuperación antigénica, demostrando los presentes resultados la importancia de la aplicación de esta técnica para la inmunodeterminación del antígeno.

El test de Kruskal-Wallis detectó efecto del estadio gestacional sobre el %Ki67 en las vellosidades placentarias ($p < 0,0009$), constituidas por un componente uterino, el epitelio uterino, y su correspondiente del lado fetal, el trofoblasto. El mayor índice medio de %Ki67 se observó al día 80 (4,46), seguido por el día 30 (3,74) ($p \leq 0,05$), tal como se observa en la Figura N° 60a.

Cuando se analizaron ambos epitelios por separado, se detectó un efecto del día de gestación sobre el %Ki67 en trofoblasto ($p = 0,0263$), con los mayores valores medios a los 30 (5,14) y 80 (4,90) días ($p \leq 0,05$), como se puede apreciar en la Figura N° 60b. Resultados similares se obtuvieron en el epitelio uterino ($p = 0,0274$), con el mayor valor medio al día 80 de preñez (4,02) ($p \leq 0,05$) (Fig. N° 60c).

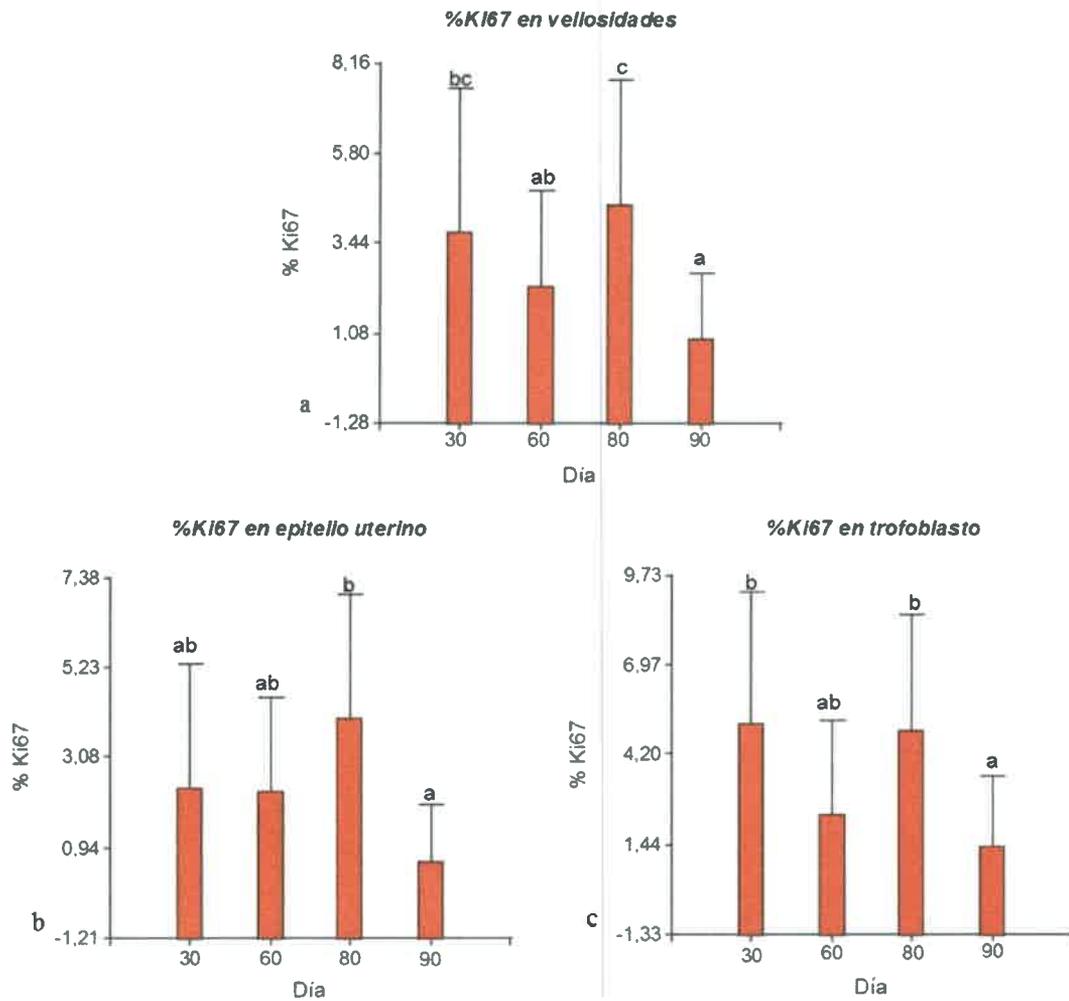


Figura N° 60: %Ki67 durante la gestación porcina. a) En las vellosidades placentarias; b) En el epitelio uterino; c) En el epitelio trofoblástico.

En la Figura N° 61a se muestran los resultados obtenidos en el tejido conectivo. El test no paramétrico con rangos detectó efecto del estadio gestacional sobre el %Ki67 ($p=0,002$) y el menor valor medio de la variable en estudio al día 60 de preñez (6,32) ($p\leq 0,05$).

El componente materno, el endometrio, evidenció efecto del estadio gestacional sobre el porcentaje de células marcadas con Ki67 ($p=0,006$), observándose el mayor valor medio en el período de gestación temprana (26,64) (Fig. N° 61b). Contrariamente, el tejido conectivo mesenquimático fetal aunque presentó efecto del estadio gestacional sobre el %Ki67 ($p=0,02$), mostró el mayor valor de la variable al día 90 de gestación (19,10) (Fig. N° 61c).

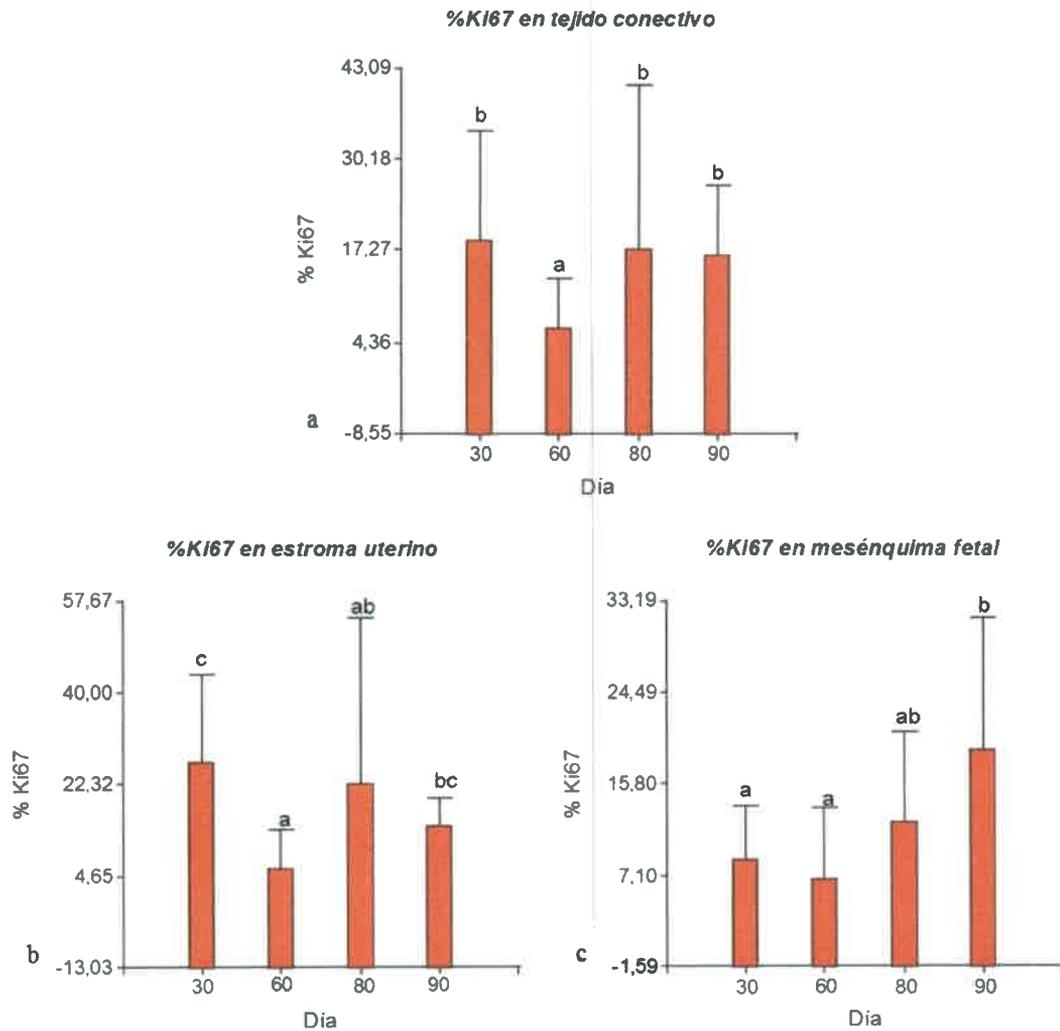


Figura N° 61: %Ki67 durante la gestación porcina. **a)** En el tejido conectivo; **b)** En el estroma uterino; **c)** En el mesénquima fetal.

Se detectó efecto del estadio de preñez sobre el %Ki67 de los vasos sanguíneos placentarios ($p < 0,0001$). Los mayores valores medios se mostraron a los días 30 (42,01) y 80 (35,71) de gestación ($p \leq 0,05$), tal lo observado en la Figura N° 62a.

Analizando sus componentes por separado, en los vasos sanguíneos fetales los mayores valores medios se detectaron a los 30 (27,14) y 80 (37,48) días de gestación ($p < 0,0001$) (Fig. N° 62b). Obtuvimos resultados similares en los vasos sanguíneos maternos, con el mayor valor medio de %Ki67 al día 30 (56,88), seguido por el día 80 (33,94) ($p < 0,0002$) (Fig. N° 62c).

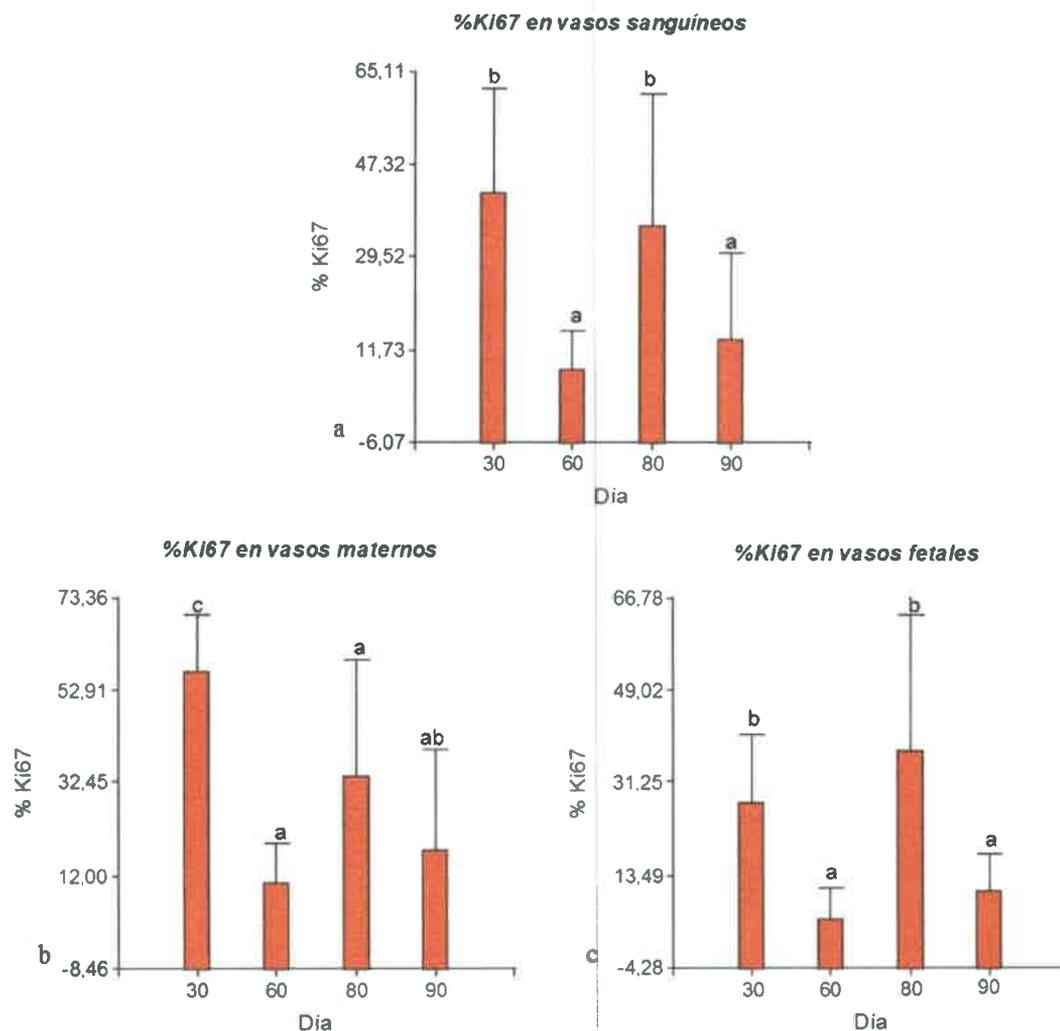


Figura N° 62: %Ki67 durante la gestación porcina. **a)** En los vasos sanguíneos placentarios; **b)** En los vasos sanguíneos maternos; **c)** En los vasos sanguíneos fetales.

Por último, tal como se muestra en la Figura N° 63, también se observó efecto del día de gestación sobre las glándulas endometriales ($p < 0,0001$), que mostraron los mayores índices a los días 30 (7,54) y 80 (6,76) ($p \leq 0,05$).

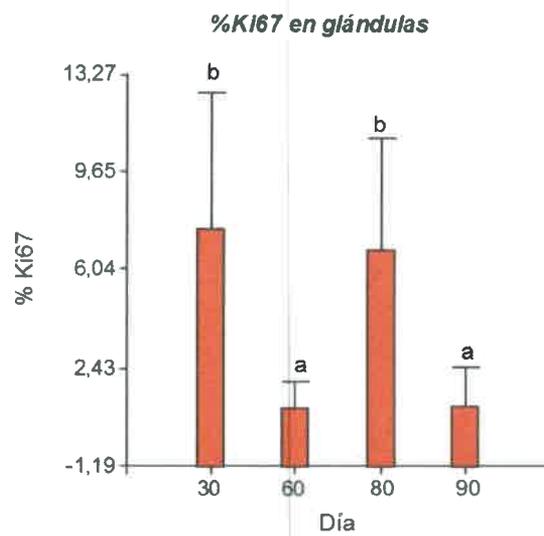


Figura N° 63: %Ki67 en las glándulas endometriales durante la gestación porcina.

La siguiente imagen (Fig. N° 64) muestra un tejido placentario porcino de 30 días de gestación tratado por inmunohistoquímica con anticuerpos contra el marcador Ki67. Se observa marcación puntual en el núcleo de dos células endometriales.

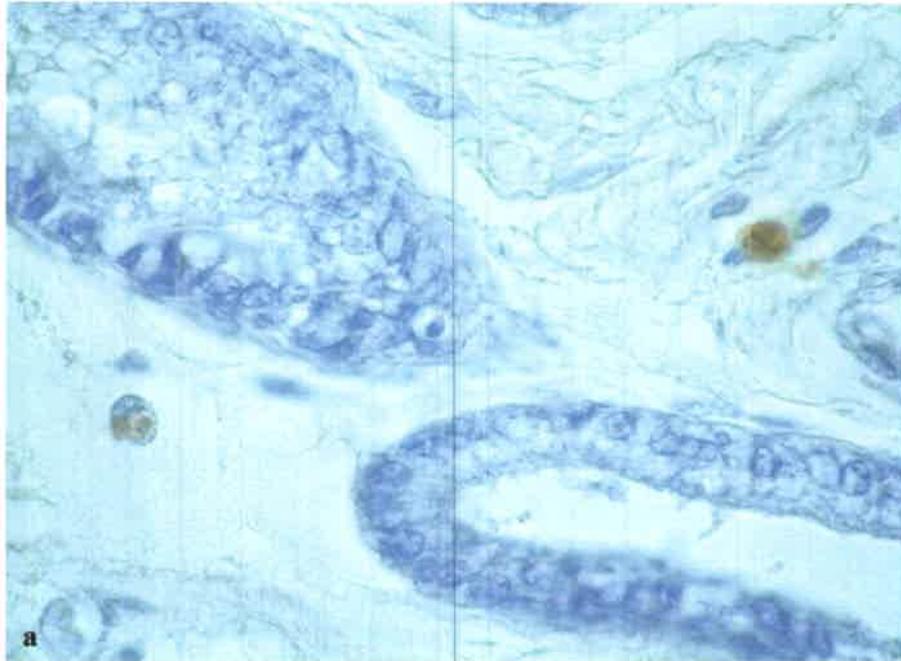


Figura N° 64: Imagen de tejido placentario porcino de 30 días de preñez con ensayo inmunohistoquímico para Ki67 (100x). Se observa la inmunorreactividad positiva para Ki67 en el estroma uterino.

En la siguiente serie de imágenes se observan células estromales uterinas (Fig. N° 65a, c, d) y una célula del epitelio glandular (Fig. N° 65b) en activa proliferación.

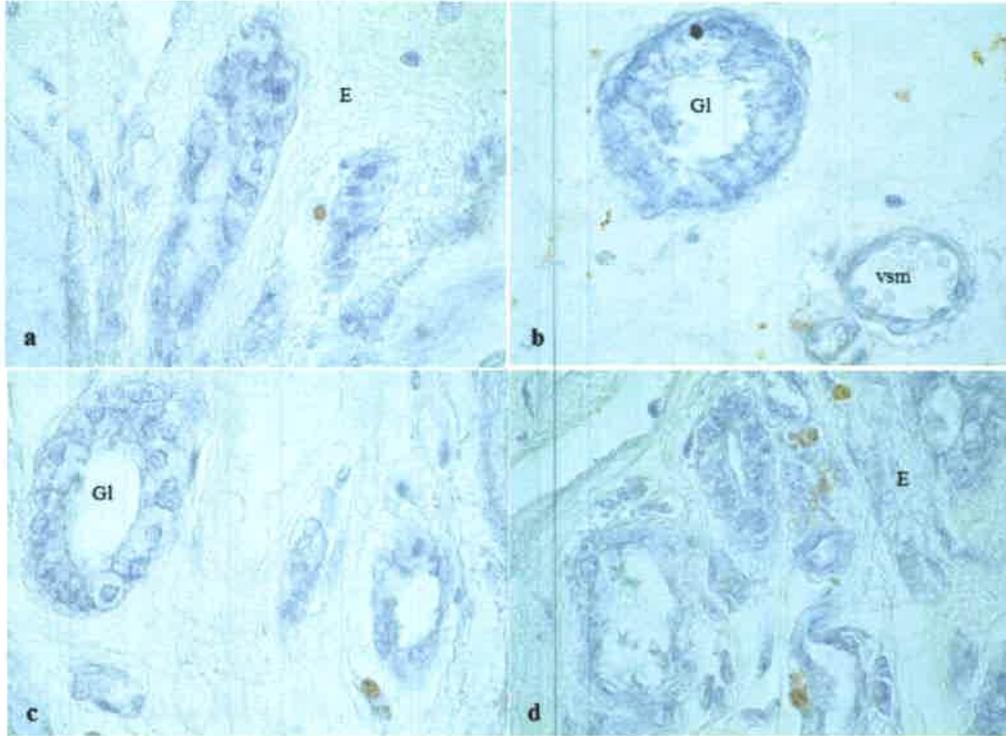


Figura N° 65: Imágenes de tejido placentario porcino de 60 días de preñez con ensayo inmunohistoquímico para Ki67. Se observa la inmunorreactividad positiva para Ki67 en el estroma uterino y el epitelio glandular. **a), b), c) d)** (100x).

A continuación, se muestran microfotografías de tejidos placentarios porcinos de 80 (Fig. N° 66) y 90 días (Fig. N° 67) de gestación con ensayo inmunohistoquímico para el marcador de proliferación celular Ki67.

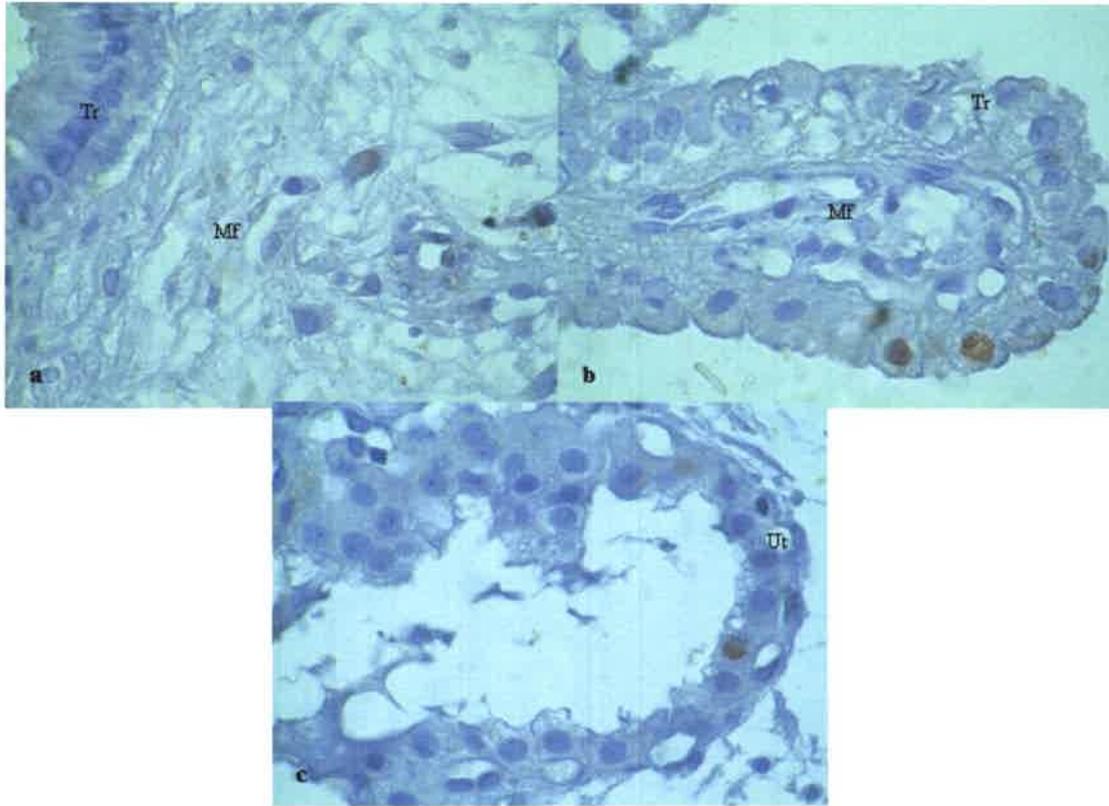


Figura N° 66: Imagen de tejido placentario porcino de 80 días de preñez con ensayo inmunohistoquímico para Ki67. Se observa la inmuno-reactividad positiva para Ki67 en **a)** Mesénquima fetal (1000x); **b)** Epitelio trofoblástico (1000x); **c)** Epitelio uterino (1000x). **Tr:** epitelio trofoblástico; **Mf:** mesénquima fetal; **Ut:** epitelio uterino.

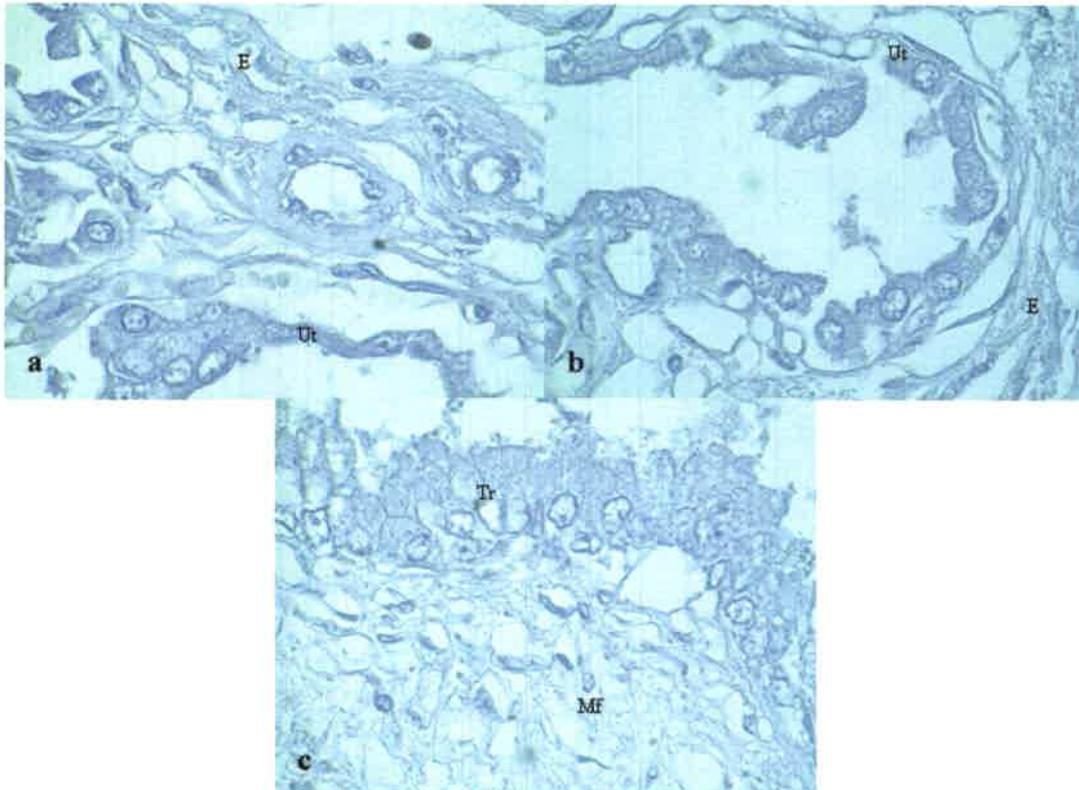


Figura N° 67: Imagen de tejido placentario porcino de 90 días de preñez con ensayo inmunohistoquímico para Ki67. **a)** Inmunorreactividad positiva en célula endometrial (1000x); **b)** Ausencia de marcación en epitelio uterino (1000x); **c)** Ausencia de reactividad en epitelio trofoblástico y mesénquima fetal. **Ut:** epitelio uterino; **E:** endometrio; **Tr:** epitelio trofoblástico; **Mf:** mesénquima fetal.

A continuación se muestran imágenes de tejidos placentarios porcinos con presencia de células con marcación positiva para Ki67. Las mismas se visualizan en marrón en el epitelio coriónico (Fig. N° 68a), en el tejido conectivo mesenquimático fetal (Fig. N° 68a, b, c) y en el endotelio vascular (Fig. N° 68c).

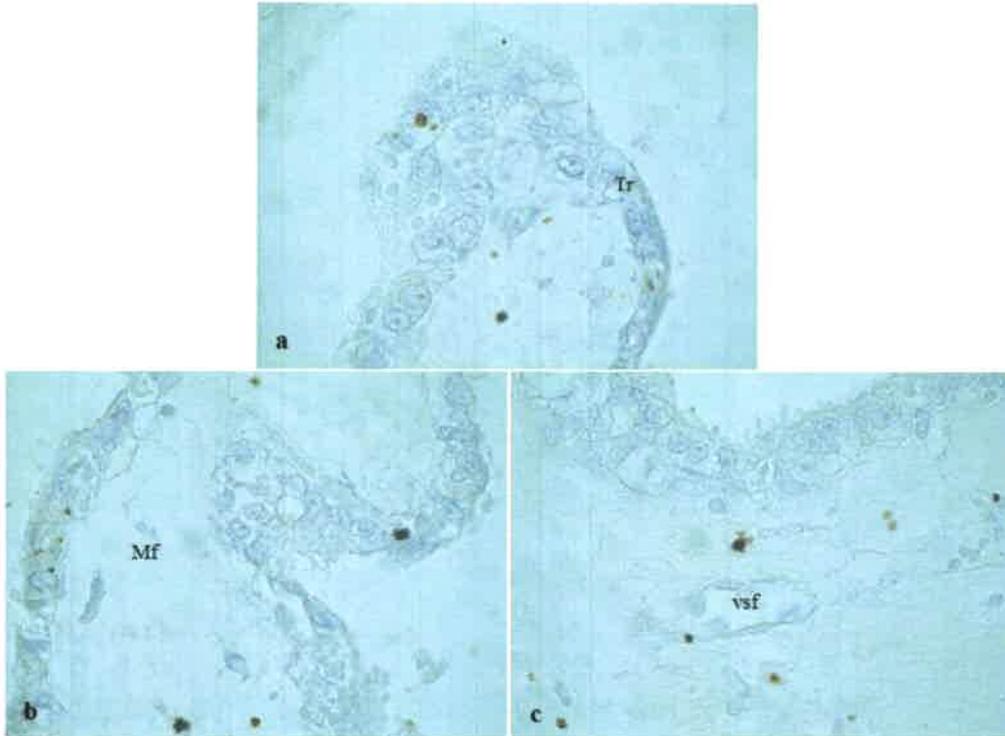


Figura N° 68: Imagen de tejido placentario porcino de 114 días de gestación con ensayo inmunohistoquímico para Ki67 (1000x). **Tr:** epitelio trofoblástico; **Mf:** mesénquima fetal; **vsf:** vaso sanguíneo fetal.

7. Correlación entre apoptosis y proliferación celular

Se realizó un test de correlación lineal por período y estructura tisular placentaria para estudiar la asociación lineal entre las variables IAp y Ki67.

Se analizaron muestras placentarias de 30, 60, 80 y 90 días de gestación en siete (7) estructuras placentarias diferentes: epitelio uterino, trofoblasto, tejido conectivo del endometrio, mesénquima fetal, vasos sanguíneos maternos, vasos sanguíneos fetales y glándulas endometriales.

Se halló correlación negativa entre los factores estudiados en el trofoblasto del día 30 y en el endometrio del día 60 y 80 (Fig. N° 69).

Por otra parte, se detectó correlación positiva en los vasos maternos del día 30, los epitelios uterino y glandular del día 80, y el trofoblasto de 80 y 90 días de preñez (Fig. N° 70).

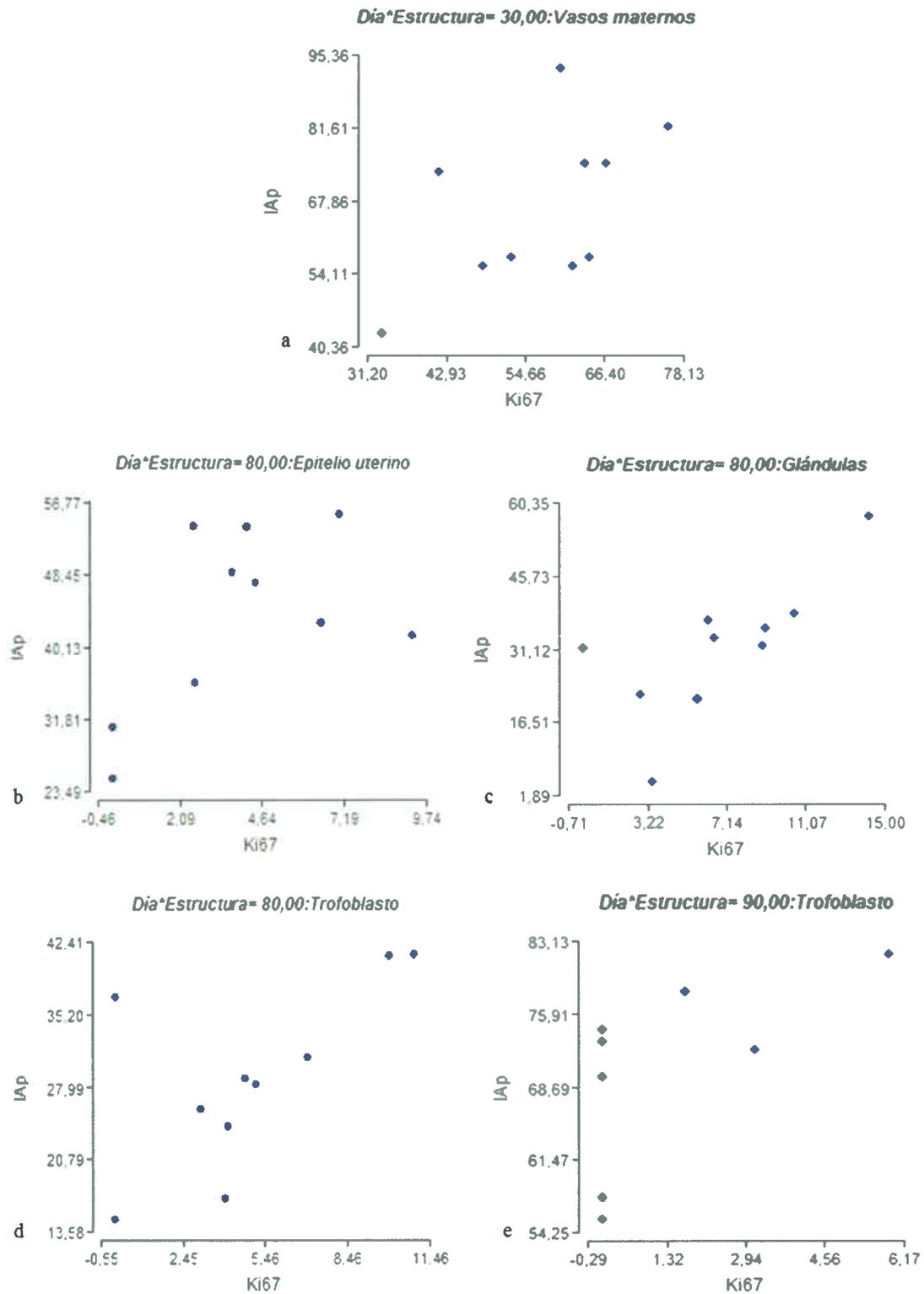


Figura N° 70: Correlación positiva entre IAp y Ki67. **a)** Vasos sanguíneos maternos del día 30; **b)** Epitelio uterino del día 80; **c)** Epitelio glandular del día 80; **d)** Trofoblasto del día 80; **e)** Trofoblasto del día 90.

..... *DISCUSIÓN*

DISCUSIÓN

La placenta contribuye al crecimiento fetal aportando nutrientes y oxígeno, regulando la difusión a la circulación materna de los productos del metabolismo fetal y actuando como auténtico órgano endocrino (Barrio y col, 2003).

Está ampliamente aceptado que en animales con placentación epiteliochorial la comunicación entre los tejidos maternos y fetales depende de precisas interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular (Rashev *et al.*, 2005). Incluso, las pérdidas embrionarias que afectan directamente el tamaño de la camada podrían ser la consecuencia de fallas en las señales de comunicación entre madre y fetos. Aplin y Kimber (2004) han destacado la importancia de las interacciones y conexiones intercelulares durante el desarrollo de la placenta.

El lecho vascular placentario se asienta sobre una matriz extracelular. Como tal, la matriz extracelular placentaria se halla constituida por diversas moléculas, entre las cuales encontramos al sistema colágeno, la osteopontina (OPN) y el fibrinógeno (Fg) (Rozario and DeSimone, 2010).

Es de interés destacar que para el estudio de fibras colágenas la combinación de la técnica de Picosirius red y la microscopía de luz polarizada constituye una herramienta sencilla, útil y de bajo costo. La utilidad y practicidad obtenidas con la mencionada técnica han sido enfatizadas en investigaciones recientes (Acta Histoquímica, 2011). Más aún, la diferenciación de fibras colágenas de distinto grosor según la tonalidad adquirida tras la tinción y la consiguiente semicuantificación por intensidad de refringencia, nos permitió ahondar en el estudio composicional y estructural de la matriz extracelular placentaria porcina.

La abundancia de fibras colágenas en el tejido conectivo materno y fetal, así como en el miometrio de tejidos placentarios porcinos, puesta de manifiesto con las tinciones tricrómicas de Masson y de Gallego, y confirmada a través la técnica específica de Picosirius red, sugiere un papel sustancial de estas moléculas en la composición de la matriz extracelular placentaria porcina. En investigaciones llevadas a cabo en placentas humanas, Demir-Weusten *et al.* (2007) demostraron que la matriz extracelular juega un rol clave en la arquitectura estromal. Por su parte, Sati *et al.* (2008) postularon que serían las células mesenquimáticas residentes las que

contribuirían significativamente a la producción de la mencionada matriz en placentas humanas.

Nuestros resultados indican que la red de fibras colágenas de la matriz extracelular placentaria actuaría en la resistencia y el sostén del sistema vascular, coincidiendo con lo encontrado en placentas humanas por Vizza *et al.* (2001). Además, permitiría asegurar un microambiente favorable para el intercambio feto-materno (Vizza *et al.*, 2005). Postulamos además que desempeñaría estas mismas funciones sobre el sistema glandular-areolar de los tejidos estromales. Como constituyente del miometrio, se halló predominancia de fibras gruesas y de mediano espesor, resaltando la importancia de las fibras colágenas en limitar la distensabilidad del tejido (Rozario and De Simone, 2010). De manera tal que la determinación del sistema colágeno fibrilar en el tejido materno-embionario nos permite evaluar su aporte al mantenimiento de la integridad estructural placentaria, tal como ha sido enfatizado previamente por nuestro equipo de investigación (Cristofolini *et al.*, 2009).

El incremento en el contenido de fibras colágenas de mediano y gran grosor, amarillas y naranjas respectivamente, observadas en el presente trabajo, coincide con lo hallado por Benirschke y Kaufmann (2000) en placentas humanas. Estos autores observaron que las fibras colágenas maduras constituyen la mayor parte del tejido conectivo de las vellosidades placentarias y el principal componente de la matriz extracelular. La placenta es un órgano en continuo proceso de maduración, por lo tanto el incremento en fibras de mediano y mayor grosor en placentas de gestaciones avanzadas remarca la particularidad del colágeno, de ser la única proteína en el organismo que expresa cambios definidos acorde a la edad (Debessa *et al.*, 2001).

Otra proteína de matriz, la OPN, ha sido ubicuamente hallada en la placenta porcina. La presencia de OPN en la placenta de animales con diferentes tipos de placentación ha estimulado por muchos años a los investigadores a dilucidar su rol en períodos críticos a lo largo de la preñez (Garlow *et al.*, 2002; Joyce *et al.*, 2005; Sanchis *et al.*, 2009).

Aún no habiéndose detectado efecto del estadio gestacional sobre la intensidad de la marcación con el anticuerpo anti-osteopontina, la distribución témporo-espacial de la molécula en las vellosidades placentarias y la abundancia de la misma principalmente al día 30 de gestación, sugiere un rol preponderante de la proteína a estadios tempranos de la preñez porcina, no sólo como proteína regulatoria de la implantación sino también

asegurando la adhesión y unión del trofoectodermo al epitelio luminal uterino. Se ha informado que aunque la OPN no se sintetiza en el trofoblasto porcino, su elevada afinidad por este tejido podría indicar roles esenciales de OPN en mediar cambios placentarios embrionarios tendientes a favorecer la adhesión al útero durante la implantación y placentación (Johnson *et al.*, 2003a). Más aún, White *et al.* (2005) sugieren que la OPN presente en el trofoectodermo porcino favorecería la transducción de señales, la migración celular y la remodelación tisular, como así también la alteración de la migración y función de células inmunes en los sitios de implantación.

Antecedentes de expresión uterina y placentaria de OPN han sido previamente informados en otras especies con un patrón de placentación diferente del existente en la cerda (Johnson *et al.*, 2003b, 2003c, Joyce *et al.*, 2005). En ovejas, Kimmins *et al.* (2004) hallaron un patrón de inmunolocalización de OPN similar al demostrado en este trabajo en la cerda, en la superficie apical del epitelio uterino y del trofoblástico. El trabajo de Kimmins fue realizado en ovejas de 13 días de preñez y se sabe que la placentación sinepiteliocorial característica de la oveja, así como de la cabra, se desarrolla primeramente como una placentación epiteliocorial verdadera, como la que posee la cerda (Wooding and Burton, 2008).

Los resultados aquí expuestos confirman el rol de OPN como producto de secreción de las glándulas endometriales, tal como ha sido previamente descrito (Apparao *et al.*, 2001; Garlow *et al.*, 2002; Sanchis *et al.*, 2009; Sanchis *et al.*, 2010). La OPN de origen glandular se uniría a integrinas expresadas en el epitelio uterino luminal y en el trofoblasto para mediar la adhesión entre ambos epitelios e iniciar cascadas de señalización intracelular tendientes a influir sobre el desarrollo embrionario, la adhesión y la placentación porcina (Garlow *et al.*, 2002). Tras un estudio realizado sobre la co-expresión de OPN y la integrina $\alpha_v\beta_3$ en tejidos placentarios porcinos hallamos que ambas moléculas se expresan en los epitelios uterino y trofoblástico al día 30 de preñez, pero sólo integrina $\alpha_v\beta_3$ se encuentra en períodos más avanzados de gestación (Sanchis *et al.*, 2009). Esto es coincidente con lo informado por Williamson y Konkurat (2009) en cerdas mestizas, quienes detectaron integrina $\alpha_v\beta_3$ en ambos epitelios a lo largo de la gestación. Por otra parte, nuestros resultados sobre OPN concuerdan con los hallazgos de Garlow *et al.* (2002) en cerdas mestizas, quienes confirman tanto la presencia del ARNm de OPN como de la proteína en los epitelios uterino y trofoblástico alrededor del día 35 de gestación. La ausencia de OPN en los epitelios uterino, trofoblástico y glandular, así como en el histiotrofo porcino en

períodos más avanzados de preñez, nos permiten sugerir la participación de otras moléculas de unión a integrinas diferentes de OPN en los eventos involucrados en la placentación porcina de tales estadíos (Sanchis *et al.*, 2009). Los presentes resultados difieren con lo hallado en la interfase feto-materna ovina (Johnson *et al.*, 2003b), dado que en la mencionada especie osteopontina está presente desde la gestación temprana a la tardía.

Otro aspecto que resulta relevante es la marcación puntual de OPN en las fosas trofoblásticas porcinas de 80 días de preñez. Dicho período coincide con el de mayor área vascular, permitiendo inferir una vinculación entre la OPN y la vascularización. Incluso, la detección de OPN en las fibras musculares lisas que componen la capa adventicia de los vasos sanguíneos maternos y fetales, fortalecen nuestra hipótesis. Estos hallazgos concuerdan con lo hallado por Kimmins *et al.* (2004) en períodos tempranos de gestación en ovinos. La participación de OPN en el proceso angiogénico ha sido puesta de manifiesto por Liaw *et al.* (1994) en un estudio realizado en cultivo con células musculares lisas (SMCs) de rata y células endoteliales aórticas bovinas. Liaw y colaboradores demostraron que la OPN derivada de SMCs vasculares era capaz de promover la adhesión de SMCs y células endoteliales vía RGD- $\alpha_v\beta_3$ y poseer propiedades quimiotácticas sobre SMCs. Se ha informado que el colágeno también presenta propiedades quimiotácticas similares (Fleck and Simman, 2010).

La expresión constante de OPN en los tejidos estromales maternos y fetales que rodean la interfase útero-placentaria a lo largo de la gestación porcina indica que la OPN es un componente importante de la matriz extracelular placentaria, fundamentalmente en la primera mitad de la gestación. Esto es coincidente con lo hallado en el estroma uterino a lo largo de la preñez ovina (Johnson *et al.*, 2003b).

Coincidiendo con Johnson *et al.* (2003a), la regulación e implicancias funcionales inmediatas de los eventos que involucran OPN, aunque independientes, probablemente están orquestados temporal y espacialmente para asegurar el establecimiento y mantenimiento de una preñez exitosa.

En cuanto al fibrinógeno, la detección abundante a lo largo de la gestación en el tejido conectivo endometrial y mesenquimático fetal coincide con lo establecido previamente por Cristofolini y col. (2008), quienes afirman que en el cerdo existe una matriz extracelular placentaria rica en material fibrinoide. La generosa expresión de fibrinógeno en la placenta porcina tiene su sustento en las funciones que esta molécula

desarrolla. En ratón, ha sido demostrado que el Fg materno juega un rol crítico en el mantenimiento de la preñez, dado que no sólo mantiene un desarrollo apropiado de la comunicación vascular feto-materna, sino que también estabiliza la implantación del embrión (Iwaki *et al.*, 2002). Palumbo *et al.* (2004) informaron que la deficiencia de fibrinógeno en ratones no conlleva un desarrollo intrauterino anormal, pero sin embargo, los ratones recién nacidos no sobreviven más que unos días.

Por otra parte, como componente de la matriz extracelular, el Fg juega un rol importante en las interacciones célula-matriz (Mosesson *et al.*, 2001). Participa en la regulación de la hemostasis y en la generación de componentes sanguíneos necesarios para una vascularización adecuada (Iwaki *et al.*, 2002; Iwaki and Castellino, 2005). De manera tal que la abundante expresión de Fg encontrada en la placenta porcina privilegiaría la vascularización y sería responsable, al menos en parte, de los resultados obtenidos en el área vascular, que presenta un incremento desde la gestación temprana hasta la gestación avanzada. A este fin, la capacidad de unión del Fg al factor pro-angiogénico VEGF sería de vital importancia. Son conocidas las características de especificidad y saturabilidad de unión del Fg al factor de crecimiento vascular endotelial e incluso el VEGF así unido retiene su actividad funcional de estimular la proliferación celular endotelial (Sahni and Francis, 2000). Más aún, la detección temporo-espacial de Fg coincide con la hallada para VEGF, en endometrio y estroma fetal en todos los estadios gestacionales evaluados. La actividad angiogénica del fibrinógeno se sustenta además, en su capacidad de unión a otro factor altamente importante en la vascularización placentaria, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF). El FGF-2 es un regulador de la angiogénesis y de la arteriogénesis (Presta *et al.*, 2005) y se ha visto que incrementa la proliferación de células musculares lisas y endoteliales (Tomanek *et al.*, 2008). Se ha informado, que el Fb posee sitios específicos de unión al FGF-2 que son independientes de los que posee para VEGF, y que dicha unión incrementa la capacidad de FGF-2 de estimular la proliferación de células endoteliales (Sahni and Francis, 2000).

Al día 80, se destaca la presencia del fibrinógeno en los vasos sanguíneos fetales, coincidiendo con el período de mayor área vascular, reafirmando lo establecido por diversos autores sobre el rol del Fg en la generación de componentes sanguíneos (Iwaki *et al.*, 2002; Iwaki and Castellino, 2005). Además, ha sido señalado que el Fg favorece la migración endotelial y por ende la angiogénesis (Wilson, 2002; Merkis y col, 2006; Cristofolini y col, 2008).

Se hallaron diferencias estadísticamente significativas tras el análisis del High Score de fibrinógeno, mostrando los mayores niveles en placentas de gestación a término. En placentas humanas a término, Sutcliffe *et al.* (1982) hallaron material proteico de tipo fibrinoide en el lado materno de la interfase útero-placentaria. La misma se hallaba principalmente en forma de fibrina. Poco se ha informado sobre el rol de fibrinógeno de matriz en la gestación a término, sin embargo, en humanos la secreción del material fibrinoide de matriz a los fluidos cérvico-vaginales sería indicador de riesgo de parto prematuro (Lockwood *et al.*, 1991).

La importancia del desarrollo vascular para la función placentaria ha sido ampliamente reconocida (Reynolds and Redmer, 2001; Reynolds *et al.*, 2005a,b; Háfiez *et al.*, 2010), dado que afecta el crecimiento fetal y es responsable de una productividad saludable y sostenida en el tiempo (Greenwood *et al.*, 2000; Breier *et al.*, 2001; Oken and Gillman, 2003; Reynolds *et al.*, 2005a). De tal manera, la formación de vasos sanguíneos que acontece durante la morfogénesis placentaria en la gestación porcina resulta de vital importancia (Merkis y col, 2006).

La detección de VEGF, principal protagonista de la angiogénesis, fue prácticamente constante a lo largo de la gestación porcina en los epitelios uterino y coriónico, indicando la relevancia del mencionado ligando durante la gestación. Desde el punto de vista de la preñez, se sabe que VEGF es un producto tanto del útero como de la placenta que resulta crítico para la angiogénesis útero-placentaria (Grummer *et al.*, 2009). La presencia de VEGF en las vellosidades placentarias en la mayoría de los períodos gestacionales evaluados, coincide con lo hallado en la yegua (Allen *et al.*, 2007), con quien la cerda comparte el tipo de placentación corioalantoidea no invasiva (Wooding and Burton, 2008). Por otra parte, nuestros hallazgos concuerdan con lo informado previamente por Vonnahme *et al.* (2001) y Charnock-Jones *et al.* (2001), quienes detectaron VEGF a lo largo de la gestación porcina en cerdas cruza de composición blanca (Landrace, Large White, and/or Yorkshire) y en cerdas puras Large White, respectivamente.

Actualmente se sabe que las células endoteliales no son las únicas capaces de unir VEGF, lo que justifica el hallazgo de esta molécula en las células musculares lisas del miometrio, en las células que constituyen el tejido conectivo endometrial y mesenquimático fetal, así como en las células epiteliales de las glándulas endometriales, tal como se ha informado con anterioridad (Charnock-Jones *et al.*, 2001). Sin embargo, contrario a lo hallado previamente (Vonnahme *et al.*, 2001) los niveles del factor pro-

angiogénico VEGF experimentaron una abrupta caída luego del día 60 de preñez. La disminución de VEGF fue acompañada por una caída en los niveles de Flt-1 y Flk-1 en la mitad de la gestación. La reducción en el High Score de VEGF y sus receptores, va en paralelo a la disminución hallada en el área de los vasos sanguíneos luego del día 80 de preñez. Estos resultados, junto con la ausencia de expresión de VEGF en los vasos sanguíneos placentarios, nos permiten suponer que la angiogénesis en cerdas mestizas de gestación avanzada, y particularmente en los vasos sanguíneos, podría ser debida a otros factores potenciadores de la vascularización. Si bien VEGF es el factor angioestimulador más estudiado, otras proteínas, las angiopoyetinas 1 y 2 (Ang-1 y Ang-2), trabajan sincronizadamente con VEGF para estimular la vascularización (Babischkin *et al.*, 2007). Profundizando esa hipótesis, Goldman-Wohl *et al.* (2000) proponen que la Ang-2 y su receptor Tie-2 estarían involucrados en la remodelación de vasos maternos en la interfase materno-fetal y que también jugarían un rol en la formación del árbol vascular placentario fetal. Por otra parte, se ha informado que otros factores de crecimiento juegan un rol crucial en la vasculogénesis y angiogénesis durante el desarrollo placentario, como potentes agentes angioestimuladores, tal es el caso del factor de crecimiento placentario, PlGF, (Zygmunt *et al.*, 2003) y del factor de crecimiento fibroblástico (FGF; Pfarrer *et al.*, 2005; Presta *et al.*, 2005; Pfarrer *et al.*, 2006). Sin embargo, dado que la acción de PlGF es mediada únicamente por el receptor Flt-1 (Tjwa *et al.*, 2003; Roskoski, 2008; Valdés and Corthorn, 2011), compartido con VEGF y ausente en este período, serían otras proteínas las encargadas de llevar a cabo el proceso angiogénico, aún cuando la presencia de PlGF en la placenta porcina ha sido demostrada (Sanchis y col, resultados no publicados). Por otra parte, se ha informado que los miembros de la familia del FGF estimulan la angiogénesis y la diferenciación celular durante la embriogénesis y la placentación porcina (Welter *et al.*, 2004; Wollenhaupt *et al.*, 2005).

En las vellosidades placentarias de 80 y 90 días de preñez, VEGF fue detectado únicamente en las fosas del epitelio trofoblástico. En 1980, Friess y colaboradores presentaron evidencias morfológicas e histológicas de que el transporte del material menos difusible tiene lugar precisamente en esta zona, donde el epitelio coriónico y uterino es de tipo columnar. Por otra parte, dicha marcación coincide con la región areolar, donde las glándulas uterinas vuelcan su contenido histiotrófico sobre el epitelio coriónico, para ser captado por células especializadas en fagocitosis. Estudios previos han informado que células con propiedades fagocíticas, las células de Hofbauer, serían

fuelle de VEGF en las vellosidades placentarias humanas (Demir *et al.*, 2004). Más aún, la región areolar es rica en vasos sanguíneos, situados muy próximos a la membrana basal que subyace al epitelio coriónico, tal como hemos observado en las imágenes de MOAR. Charnock-Jones y colaboradores (2001) postularon que el VEGF producido por las células epiteliales de la interfase útero-placentaria actuaría en forma parácrina sobre las células endoteliales de los capilares allí presentes, lo que favorecería el desarrollo y acercamiento de los mismos hacia la superficie epitelial, aumentando la capacidad de intercambio de la placenta. Las imágenes de MOAR tomadas de tejidos placentarios porcinos de 60 y 114 días de preñez, confirman lo anteriormente expuesto. En ellas se destaca la estrecha distancia que separa a los vasos sanguíneos maternos y fetales del correspondiente epitelio. Esto resulta indispensable dada la placentación presente en la cerda, epiteliochorial y no invasiva, que no involucra pérdida de continuidad de las membranas uterinas y, por ende, impide el contacto directo entre los flujos sanguíneos maternos y fetales. Por otra parte, la detección del factor pro-angiogénico en los vasos sanguíneos placentarios en gran parte de los estadios gestacionales analizados, constituye un fuerte indicador de la unión de VEGF a las células endoteliales, donde ejerce sus funciones mediante la unión a receptores específicos (Vonnahme and Ford, 2004).

Diversos autores han señalado la relevancia de los receptores de membrana de VEGF, Flt-1 y Flk-1, en la angiogénesis mediada por VEGF (Ferrara *et al.*, 2003; Demir *et al.*, 2004; Kaczmarek *et al.*, 2009). En el presente estudio hemos observado que a períodos de gestación temprana y en gestaciones a término, VEGF actuaría principalmente vía el receptor Flt-1, aún cuando ambos receptores están presentes. Esta propuesta se basa en el hecho de que VEGF-R1 presenta mayor afinidad de unión a VEGF que VEGF-R2 (15 pM vs. 750 pM; Roskoski, 2008). Ha sido demostrado que la acción de VEGF es mediada preferentemente por VEGF-R2 (Ferrara *et al.*, 2003), sin embargo nuestros resultados concuerdan con Kacsmarek *et al.* (2009) y con Moliva *et al.* (2011), quienes sugieren un rol sustancial de VEGF-R1 durante la gestación temprana en cerdos. Fallas en este proceso llevarían a una placentación defectuosa, una de las principales causas del elevado índice de pérdidas embrionarias al final del primer trimestre en gestaciones humanas (Goldman-Wohl *et al.*, 2000), coincidiendo este período con el de mayor porcentaje de pérdidas embrionarias en porcinos (Bosch y col, 2001; Van der Lende and Van Rens, 2003). Los datos obtenidos al día 114 se comparan

con estudios previos llevados a cabo en gestaciones humanas a término, que demuestran que las células trofoblásticas expresan preferentemente VEGF-R1 (Ahmed *et al.*, 2000).

En períodos intermedios de preñez, de 60 días, la ausencia de inmunoexpresión del receptor Flt-1 indica que VEGF actuaría exclusivamente vía el receptor Flk-1 en los epitelios que conforman la interfase materno-fetal, en tejido conectivo y en miometrio. A este respecto, se ha informado que la señalización celular que afecta la funcionalidad de VEGF es mediada fundamentalmente por VEGF-R2 o está, al menos, sospechada de incluir a VEGF-R2 sobre la base de especificidad de ligando (Zachary and Glik, 2001). La presencia del ligando en placentas porcinas de este estadio ha sido informada previamente por nuestro equipo (Sanchis y col, 2012a).

Al día 80 de gestación porcina, hubo expresión sólo del receptor Flk-1, mientras que al día 90 no se detectó inmunoexpresión de ninguno de los receptores de VEGF. Estos resultados indican la participación de otras moléculas angiogénicas y sus correspondientes receptores, distintos de los pertenecientes a la familia de VEGF.

Según nuestros resultados, en cerdas mestizas los tejidos placentarios experimentan un marcado aumento del área vascular hasta el día 80 de preñez. Según estudios anteriores, el mismo se debería a un incremento en el número de vasos grandes (Merkis y col, 2006). Esto es coincidente con lo informado por Biensen *et al.*, (1998), quienes informan que entre los 70 y 90 días existe un período de rápida proliferación vascular placentaria en las cerdas Meishan. El incremento en el área vascular está en relación con el aumento en las demandas metabólicas de los *concepti* en rápido desarrollo que acontece en cerdos a partir del día 50 y que resulta en un aumento notable en la masa fetal y, por consiguiente, en la superficie de contacto (Goldstein *et al.*, 1980). El desarrollo de esta increíble red vascular resultaría esencial, no sólo para el efectivo intercambio útero-fetal, sino que también desempeñaría un rol mecánico esencial para la elaboración de las vellosidades placentarias (Burton *et al.*, 2009). De acuerdo a los datos previamente discutidos, este período de proliferación vascular estaría caracterizado por la acción angiogénica de VEGF sobre células endoteliales que expresan en sus membranas el receptor VEGF-R2 al día 60 y por otros factores angiogénicos en períodos de gestación avanzada.

Según Zachary and Glik (2001) un mecanismo celular fundamental por el cual VEGF promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos y mantiene su integridad es

la activación de células endoteliales sobrevivientes o de señalización anti-apoptótica. De manera tal que apoptosis y angiogénesis son procesos estrechamente relacionados, tal como ha sido informado por Cristofolini y col (2008). Sin embargo, nuestros resultados difieren con lo postulado por Zachary y Gliki, dado que la mayor expresión de VEGF coincide con la de la apoptosis celular en la gestación temprana. De hecho, ambos procesos tienen un factor desencadenante en común: la hipoxia. El aumento en masa fetal, experimentado en la primera mitad de la gestación, conlleva un impedimento para la libre difusibilidad del oxígeno, provocando la estimulación de VEGF (Goldberg and Schneider, 1994) y de la apoptosis (Levy and Nelson, 2000; Barrio y col, 2003).

La muerte celular programada constituye un factor esencial en el desarrollo placentario (Merkis *et al.*, 2010). Su rol en la remodelación celular placentaria y los mecanismos por los cuales se lleva a cabo han sido ampliamente estudiados por nuestro equipo de investigación (Merkis *et al.*, 2007; Cristofolini *et al.*, 2009; Cristofolini, 2010; Merkis *et al.*, 2010; Cristofolini *et al.*, 2011; Cristofolini *et al.*, 2012; Cristofolini y col, 2012). Más aún, la remodelación celular por apoptosis es uno de los mecanismos de regulación de la homeostasis placentaria en cerdos más estudiados (Okano *et al.*, 2007).

Elevados índices de células con fragmentación del ADN se hallaron al día 30 de preñez en la mayoría de las estructuras placentarias analizadas. Esto coincide con estudios previos realizados en porcinos por Okano *et al.* (2007) y por nuestro equipo de investigación (Merkis *et al.*, 2007; Cristofolini, 2010; Merkis *et al.*, 2010; Cristofolini y col, 2012), donde se relaciona la apoptosis placentaria en la gestación temprana con la homeostasis tisular. Hemos sugerido que el elevado índice apoptótico hallado en la gestación temprana sería indicativo de una mayor necesidad de remodelación tisular por el rápido aumento en masa fetal hasta el día 55 de preñez (Merkis y col, 2005). Cristofolini *et al.* (2011) han postulado que la apoptosis en la gestación temprana sería responsable de la remodelación de la interfase placentaria que favorecería el contacto materno-fetal. Por otra parte, el crecimiento fetal en detrimento del crecimiento placentario genera un estado de hipoxia, el cual se sabe constituye un fuerte estimulante de la apoptosis en diversos tejidos (Greijer and van der Wall, 2004), incluso en la placenta humana (Levy and Nelson, 2000; Barrio y col, 2003). Este período de rápido crecimiento embrionario constituye, además, uno de los momentos críticos de la gestación porcina por los elevados índices de muerte embrionaria (Van der Lende and Van Rens, 2003). Resulta relevante en este estadio el elevado índice apoptótico de los

vasos sanguíneos maternos y de las glándulas endometriales, principales estructuras encargadas de la nutrición hemotrofa e histiotrofa, respectivamente, de los productos fetales. Cabe destacar que un aporte adecuado de nutrientes a la circulación fetal y la expresión correcta de factores de crecimiento tisulares son fundamentales para el crecimiento del feto (Barrio y col, 2003). Postulamos, entonces, que la apoptosis sería un instrumento necesario para la remodelación vascular en favor de la angiogénesis, indispensable en este estadio de crecientes demandas metabólicas. Esto es coincidente con la elevada marcación de VEGF, reseñada anteriormente. Si bien diversos estudios han sugerido que una apoptosis elevada en las células endoteliales inhibe la angiogénesis (Dimmeler *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Troyanovsky *et al.*, 2001), nuestros resultados indican que niveles aceptables de apoptosis en la placenta normal del cerdo posee efectos favorables sobre la vascularización, tal como ha sido previamente descrito por Tertemiz *et al.* (2005) en humanos. La elevada apoptosis en las glándulas endometriales en este estadio refleja una importante remodelación estructural, indicando una posible contribución del epitelio glandular al embriotrofo y, más puntualmente, al histiotrofo.

A partir del día 60, en que se observan los menores índices IAp en casi la totalidad de las estructuras placentarias analizadas, existe un aumento en la muerte celular programada por apoptosis en todas las estructuras, alcanzando el máximo IAp al día 90 de preñez, siendo ésto particularmente importante en las vellosidades placentarias y sus componentes maternos y fetales. Sugerimos que los valores de IAp hallados en la gestación avanzada estarían relacionados con la remodelación tisular que acompaña a la gestación, necesaria para acondicionar los tejidos placentarios al progresivo aumento en masa fetal. Esto incluiría la transformación de las vellosidades secundarias en vellosidades terciarias indispensables para aumentar la superficie de contacto entre los componentes maternos y fetales de la interfase placentaria, lo que lleva a la optimización del intercambio de sustancias entre madre y fetos. Ha sido demostrado en humanos que la apoptosis aumenta a medida que avanza la gestación, sugiriendo un rol importante en la formación del sincitio, así como en la diferenciación y degeneración de las vellosidades trofoblásticas (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Huppertz *et al.*, 2006). Resultados similares han sido descritos en cerdos (Cristofolini *et al.*, 2009, Cristofolini, 2010; Cristofolini *et al.*, 2011; Cristofolini *et al.*, 2012; Cristofolini y col, 2012). Por otra parte, se ha informado que el aumento de apoptosis en el tejido placentario es el resultado de mecanismos compensatorios debido a un transporte

defectuoso de nutrientes o de gases. Uno de los factores etiológicos es la hipoxia. La placenta reacciona al estrés hipóxico aumentando el número de células apoptóticas (Barrio y col, 2003). Otro de los factores propiciadores de la apoptosis podría estar relacionado con la menor expresión de Bcl-2, conocido gen antiapoptótico (Thiet *et al.*, 2000; Cristofolini y col, 2010).

Nuestros resultados en placentas a término muestran una abrupta caída en el índice apoptótico, detectándose en varias de las estructuras analizadas el menor IAP medio en este estadio. Esta disminución en la apoptosis hacia el término de la gestación es contraria a lo informado por otros autores (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Huppertz *et al.*, 2006; Cristofolini y col, 2012). Dada la condición de atermo de la placenta porcina, los tejidos obtenidos tras el parto y procesados en el presente trabajo son únicamente fetales. Por lo anteriormente expuesto, es posible que el incremento en la apoptosis ocurra en el componente materno, donde se ha informado que la apoptosis participa en la remodelación tisular que acompaña la involución uterina post-parto en esta especie (Okano *et al.*, 2007). Por otra parte, aunque disminuida, la apoptosis detectada en los tejidos fetales podría estar igualmente participando de la remodelación celular placentaria que contribuye a la separación de las membranas maternas y fetales durante al parto, como ha sido informado en cerdos (Okano *et al.*, 2007; Cristofolini, 2010), así también en bovinos (Boos *et al.*, 2003) y en humanos (Reti *et al.*, 2007).

Dado que el desarrollo placentario depende de la progresión del ciclo celular (Unek *et al.*, 2012), resulta necesario evaluar la expresión de la proteína Ki67 a lo largo de la gestación porcina. Ki67 constituye un marcador excelente para determinar la fracción de crecimiento de una población celular (Scholzen and Gerdes, 2000) y ha sido empleado como marcador de proliferación celular en diversos procesos fisiológicos (Olvera *et al.*, 2001; Korgun *et al.*, 2006).

Elevados porcentajes de Ki67 se observaron al día 30 de preñez en las células trofoblásticas de las vellosidades placentarias. Esta actividad podría ser responsable del incremento en el área de las vellosidades coriónicas descrito en cerdas (Merkis y col, 2005), con el fin de aumentar la superficie de intercambio entre los componentes fetales y maternos. La proliferación celular en el trofoblasto de preñeces tempranas también ha sido encontrada en placentas humanas de gestaciones normales (Olvera *et al.*, 2001).

En la mayoría de las estructuras estudiadas, el mayor porcentaje de Ki67 se observó en el día 80 de preñez. Esto es particularmente relevante en lo referente a los

vasos sanguíneos, tanto maternos como fetales. Este período coincide con el de mayor área vascular, indicando una intensa actividad proliferativa de esta población celular, coincidente con el análisis cuantitativo de la inmunomarcación de Ki67. Dada la baja expresión de VEGF, determinada a través del High Score, y la inmunolocalización negativa para el factor pro-angiogénico en los vasos sanguíneos maternos y fetales, la marcada actividad proliferativa de las células endoteliales y vasculares sería debida a otro agente mitógeno distinto de VEGF. Esta intensa proliferación vascular llevaría a la disminución del espesor de la barrera interhemal detectada en placentas porcinas de 70 y 80 días de preñez (Sanchis y col, 2012), así como de la distancia de difusión hemotrófica conforme avanza la gestación (Cristofolini y col, 2012). Esto permitiría optimizar el intercambio de sustancias a través de la interfase materno-fetal. En concordancia, en placentas humanas se ha indicado que existe una continua proliferación y remodelación posterior de las células endoteliales vasculares con el avance de la gestación (Mayhew, 2002). Dado que la placenta ayuda a mantener el bienestar fetal mediando el transporte entre las circulaciones materna y fetal, la proliferación de las células vasculares con la consiguiente formación de nuevos vasos o vasos de mayor calibre, resulta indispensable con el avance de la preñez para alcanzar las demandas exponenciales de la creciente masa fetal.

Del día 80 al 90 se observa una disminución en el %Ki67 en la mayoría de las estructuras analizadas, en oposición a lo observado en el IAp. Esta relación inversa entre proliferación celular y apoptosis es coincidente con lo previamente informado (Boos *et al.*, 2003). Incluso, Heazell *et al.* (2006) han establecido que en un tejido maduro en activa proliferación, también deben perderse células para mantener constante el número de células. La disminución hallada en el %Ki67 en los períodos de gestación avanzada nos permite suponer que existiría una reducida proliferación celular en placentas de gestación a término, tal como ha sido descrito en placentas de rata (Unek *et al.*, 2012) y humanas (Olvera *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2003) a través del uso de los marcadores PCNA y Ki67, respectivamente.

Si bien diversos autores han señalado que existe una relación inversa entre proliferación celular y apoptosis (Boos *et al.*, 2003; Heazell and Crocker, 2008), en el presente estudio esto fue sólo constatado a nivel del trofoblasto del día 30 y del estroma uterino a los 60 y 80 días. Numerosas estructuras placentarias de distintos períodos gestacionales evidenciaron una correlación positiva entre ambos parámetros,

remarcando la necesidad de continuar los estudios para establecer la relación que se establece entre ambos procesos, sumamente importantes, en la placenta de la cerda.

Este es el primer trabajo que relaciona proliferación celular y angiogénesis placentaria en porcinos. Existe un patrón específico de inmunolocalización del marcador Ki67 dependiente del estadio de preñez y de la estructura tisular evaluada, siendo los periodos con mayor actividad proliferativa los de 30 y 80 días de preñez.

A lo largo de este estudio quedó demostrada la complejidad del proceso de vascularización placentaria, donde intervienen no sólo diversos factores pro-angiogénicos que posibilitan el desarrollo continuo de la vascularización materno-fetal, sino también moléculas de matriz extracelular que brindan un lecho de sostén al sistema vascular e interactúan con los factores pro-angiogénicos. Hemos observado que el desarrollo placentario, necesario para una gestación exitosa en diversas especies mamíferas, está íntimamente relacionado con la producción de matriz extracelular. Encontramos que la presencia de moléculas tales como osteopontina, fibrinógeno y colágeno sería fundamental en la constitución de la mencionada matriz en cerdas, no sólo para el sostén de los sistemas vascular y glandular-areolar y para la comunicación intercelular, sino también para el desarrollo del lecho vascular placentario. Por otra parte, hemos establecido que la acción de VEGF mediada por sus receptores, coadyuvada por la presencia de una matriz extracelular rica en material fibrinoide, favorecería el proceso angiogénico y la neovascularización placentaria a lo largo de la gestación porcina. Por último, un adecuado balance entre los procesos de proliferación y remodelación vascular y placentaria por apoptosis serían indispensables para llevar a término la gestación.

El estudio de las mencionadas moléculas angiogénicas y de matriz extracelular placentaria, junto a los de apoptosis y proliferación celular, aportarán información acerca de las interrelaciones de diversos factores para contribuir a la formación de una red vascular apropiada al estado fisiológico de la cerda gestante. Esto permitirá a futuro elaborar estrategias tendientes a minimizar las elevadas pérdidas económicas sufridas por el sector pecuario en nuestra zona de influencia.

..... *CONCLUSIONES*

CONCLUSIONES

- El uso de microscopía óptica y tinciones simples y diferenciales permitió la visualización de diversas estructuras placentarias típicas y de la remodelación que sufren conforme avanza la gestación. El empleo de MOAR posibilitó la visualización de las características de las células uterinas y placentarias con una mayor definición y resolución que con las técnicas convencionales de microscopía óptica.

- La aplicación de la técnica de Picrosirius red, conjuntamente con la microscopía de luz polarizada y la semicuantificación por intensidad de tono y refringencia, permitió la detección específica de fibras colágenas y la diferenciación de las mismas según el grosor, en poco tiempo y a bajo costo. Se observó que el colágeno constituye un componente esencial de la matriz extracelular placentaria porcina, actuando directamente como sostén del sistema vascular y glandular-areolar. En placentas de gestación a término, para sostener la masa fetal de la camada porcina, sería indispensable la presencia de abundantes fibras colágenas gruesas y de mediano espesor.

- La distribución témporo-espacial de osteopontina resultó variable según la estructura tisular placentaria y el estadio de preñez. Esta glicoproteína ejercería un rol preponderante en la vascularización placentaria y en funciones relacionadas al desarrollo embrionario, siendo secretada por las glándulas endometriales únicamente durante la gestación temprana. En este estadio participaría en funciones de adhesión y comunicación entre los epitelios que conforman la interfase, mientras que en estadios posteriores intervendrían otras moléculas de unión a integrinas en la interfase útero-placentaria.

- El fibrinógeno participaría en la generación de los componentes sanguíneos necesarios para una vascularización adecuada y sería responsable, junto con VEGF, del incremento en el área vascular placentaria porcina hasta el día 80 de preñez.

- La presencia del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y una matriz extracelular rica en fibrinógeno, favorecería el proceso angiogénico y la neovascularización en todos los períodos gestacionales evaluados. El factor de crecimiento vascular endotelial presente en las células trofoblásticas permitiría incrementar el intercambio de gases y nutrientes en la región areolar, gracias a la atracción de células endoteliales adyacentes. En los períodos de gestación avanzada, 80 y 90 días, en la vascularización placentaria porcina intervendrían otras moléculas pro-angiogénicas, no pertenecientes a la superfamilia de VEGF. En la gestación temprana y a término VEGF actuaría principalmente vía el receptor Flt-1, mientras que al día 60 ejercería su acción fundamentalmente a través de Flk-1.

- El área media de los vasos sanguíneos es dependiente del período gestacional. Se observa una abrupta disminución del área vascular luego del día 80, en que se observan los mayores valores elevados.

- Nuestros resultados demuestran que la proliferación y la apoptosis exhiben patrones específicos de estadio de gestación y de estructura tisular en la placenta porcina. Al inicio de la gestación, la proliferación celular, principalmente en las vellosidades placentarias, jugaría un papel esencial en el aumento de la superficie de contacto entre los componentes maternos y fetales de la interfase placentaria. La proliferación celular en vasos sanguíneos al día 80 de preñez indica que existe una elevada actividad mitótica de las células endoteliales y vasculares, responsable de los valores elevados de área vascular placentaria. La apoptosis desempeñaría un rol vital en el mantenimiento del balance fisiológico durante la gestación, particularmente al inicio y al final de la preñez en la cerda. En períodos de gestación temprana participaría en la remodelación vascular y tisular placentaria, principalmente a nivel de la interfase, y en la regulación de homeostasis celular. Por otra parte, durante la gestación avanzada estaría involucrada en la formación de las vellosidades terciarias con el fin de incrementar la superficie de contacto entre los tejidos maternos y fetales. En placentas a término, la apoptosis observada a nivel de trofoblasto estaría

participando en los mecanismos desencadenantes del parto y en la separación de los componentes maternos y fetales.

- En cerdas mestizas, la participación de las moléculas de matriz, osteopontina, fibrinógeno y colágeno, la acción conjunta de VEGF y sus receptores, sumado a un balance entre apoptosis y proliferación celular, serían responsables del incremento en el área vascular con el avance de la preñez, lo que permitiría desarrollar con éxito la gestación.



..... *BIBLIOGRAFÍA*

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elnaeim M, Leiser R, Wilsher S, Allen W. (2006) Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta*, 27(11): 1103-1113.
- Acta Histoquémica. (2011) Picrosirius red staining revisited. *Acta Histoquem*, 113: 231-233.
- Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. (2000) Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen. *Placenta*, 21 (Suppl A, Trophoblast Research, 14): 16-24.
- Allen W, Gower S, Wilsher S. (2007) Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (Flt-I and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. *Reprod Dom Anim*, 42(5): 516-526.
- Amoroso E. (1952) Placentation. In: Marshall's Physiology of Reproduction, Vol. II, Chap. 15. Ed.: A. Parkesed, Longman, Green and Co. London, pp.: 127-311.
- Angosto M. (2003) Bases moleculares de la apoptosis. *Anal Real Acad Nal Farm*, 69(1): 36-63.
- Aplin J. and Kimber S. (2004) Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol and Endocrinol*, 2: 48.
- Apparao K, Murray M, Fritz M, Meyer W, Chambers A, Truong P, Lessey B. (2001) Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 4991-5000.
- Arai K and Nishiyama T. (2007) Developmental changes in extracellular matrix messenger RNAs in the mouse placenta during the second half of pregnancy: Possible factors involved in the regulation of placental extracellular matrix expression. *Biol Reprod*, 77: 923-933.
- Asociación Argentina de Productores de Porcinos (AAPP) (2010) La carne de cerdo y su valor nutricional. Sitio porcino de producción animal. <http://www.porcinos.org.ar/0020.htm>
- Austgulen R, Chedwick L, Vogt Isaksen C, Vatten L, Craven C. (2002) Trophoblast apoptosis in human placenta at term as detected by expression of a cytokeratin 18 degradation product of caspase. *Arch Pathol Lab Med*, 126: 1480-1486.
- Babischkin J, Suresch D, Pepe G, Albrecht E. (2007) Differential expression of placental villous angiopoietin-1 and -2 during early, mid and late baboon pregnancy. *Placenta*, 28: 212-218.

- Barrio E, Calvo M, Romo A, Alvarez R, Gutierrez J, Fernández Longás A. (2003) Crecimiento intrauterino restringido: estudio de la apoptosis en la placenta. *Anal Pediatr*, 58(2): 51-54.
- Bartholomew J, Cantwell G, Clark G, Coalson R, Dougherty W, Kasten F, Mohr J, Phillips R, Schneider H, Spicer S. (1981) Staining procedures. Ed.: Williams and Wilkins. ISBN 0-683-01707-1.
- Baur R. (1977) Morphometry of the placental exchange area. In: Wooding P. and Burton G. Comparative placentation. Structures, functions and evolution, (5):107. Berlín Heidelberg. Ed. Springer-Verlag.
- Bayless K, Meininger G, Scholtz J, Davis G. (1998) Osteopontin is a ligand for the $\alpha_4\beta_1$ integrin. *J Cell Sci*, 111: 1165-1174.
- Bazer F and First N. (1983) Pregnancy and parturition. In: Wooding P. and Burton G. Comparative placentation. Structures, functions and evolution, (5):107. Berlín Heidelberg. Ed. Springer-Verlag.
- Belstra B, Flowers W, Croom W, DeGroot J, See M. (2005) Urinary excretion of collagen degradation markers by sows during postpartum uterine involution. *Animal Reproduction Science*, 85(1-2): 131-145.
- Benirschke K and Kaufmann P. (2000) In: Pathology of the Human Placenta, 4th edn. New York, USA: Springer-Verlag.
- Biensen N, Wilson M, Ford S. (1998) The impact of either a Meishan or a Yorkshire uterus on Meishan or a Yorkshire fetal and placental development to days 70, 90 and 110 of gestation. *J Anim Sci*, 76: 2169-2176.
- Björkman N. and Dantzer V. (1987) Placentation. In: Dellman HD and Brown EM. Textbook of veterinary histology, 3: 340-360. Ed. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Boos A, Janssen V, Mülling C. (2003) Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction*, 126: 469-480.
- Bosch R, Alanis G, Allende R, Blanch M, Bosch P, Callejas S. (2001) En: Actualización en temas de reproducción animal, pp: 150-152. Compilador, Bosch R. Ed Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.
- Breier B, Vickers M, Ikenasio B, Chang K, Wong W. (2001) Fetal programming of appetite and obesity. *Mol Cell Endocrinol*, 20: 73-79.

- Brodsky B. and Eikenberry E. (1982) Characterization of fibrous forms of collagen. In: Cunningham L., Frederiksen D. (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 82: Structural and Contractile Proteins. NY: Academic Press, pp. 127-73.
- Buehler M. (2006) Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils. *PNAS*, 103(33): 12285-12290.
- Burton G, Charnock-Jones D, Jauniaux E. (2009) Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction*, 138: 895- 902.
- Butler W, Ridall A, McKee M. (1996) Osteopontin. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds), *Principals of Bone Biology*, pp: 167-181. New York: Academic Press, Inc.
- Charnock-Jones D, Clark D, Licence D, Day K, Wooding F, Smith S. (2001) Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal–fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction*, 122: 753–760.
- Charnock-Jones D, Kaufmann P, Mayhew T. (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I Molecular regulation. *Placenta*, 25(2-3): 103-113.
- Charnock-Jones D, Sharkey A, Boocock C, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N. (1994) Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod*, 51: 524-530.
- Cheung C, Singh M, Ebaugh M, Brace R. (1995) Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstets Gynec*, 173: 753-759.
- Cheung C. (1997) Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. *J Soc Gynecol Invest*, 4: 169-177.
- Cíntora I. (2006) Reproducción porcina. En: http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?AREA=POR&art=.
- Clamp A. and Jayson G. (2005) Angiogenesis and the Extracellular Matrix. In: Zubar R. Trends in Angiogenesis Research, Chap. Proteolytic Fragments of Extracellular Matrix Components as Angiogenic Regulators. Ed.: Nova Publishers, Hauppauge, New York, pp.: 3-6.
- Consejo Federal de Inversiones (CFI) (2010) Producción porcina. En: <http://www.cfired.org.ar/Default.aspx?cId=123>
- Cristofolini A, Merkis C, Barroso F, Vaquer Balmaceda V, Allende F, Chanique A, Koncurat M (2010) Determinación de apoptosis por TUNEL e inmunoreactividad de las proteínas BCL-2 y BAX durante la placentación porcina. *Rev Arg Prod Anim*, 30 (1).

- Cristofolini A, Merkis C, Barroso F, Vaquer V, Lloret M, Moschetti E, Koncurat M. (2008) Detección de fibrinógeno, FAS B-10, FAS ZB4 y FAS C-20 durante la placentación porcina. *REDVET*, IX(7): 1-10.
- Cristofolini A, Merkis C, Koncurat M. (2012) Remodelación celular durante la placentación porcina. Editorial Académica Española, LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Germany.
- Cristofolini A, Merkis C, Sanchis E, Chanique A, Allende F, Campos M, Alessio A, Taglialegra A, Moschetti E, Koncurat M. (2009) Cellular apoptosis in porcine placenta of different periods of gestation. *Acta Microsc*, 18(C): 691-692.
- Cristofolini A, Merkis C, Sanchis G, Chanique A, Campos M, Alessio A, Taglialegra A, Koncurat M. (2009) Localization of collagen through picosirius red in porcine placenta. *Biocell*, 33(3).
- Cristofolini A, Merkis C, Sanchis G, Turiello P, Campos M, Koncurat M. (2011) IAp in crossbred swines. *Biocell*, 35(2): A134.
- Cristofolini A, Merkis C, Zubeldía D, Lajmanovich A, Koncurat M. (2007) Detection of apoptosis with immunocytochemistry and TUNEL during porcine placentation. *Biocell*, 31(2): 298.
- Cristofolini A, Sanchis G, Alonso L, Moliva M, Chanique A, Merkis C. (2012) Distancia de difusión hemotrófica placentaria porcina. *Acta Microsc*, en prensa.
- Cristofolini A, Sanchis G, Moliva M, Alonso L, Chanique A, Koncurat M, Merkis C. (2012) Cellular remodelling by apoptosis during porcine placentation. *Reprod Dom Anim*, en prensa.
- Cristofolini A. (2010) Estudio de la remodelación celular durante la placentación porcina. Tesis Doctoral. Biblioteca Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Dantzer V. (1985) Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat Embryol*, 172: 281-293.
- Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis J, Wolman M. (1989) Are the polarization colors of picosirius-red stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*, 93: 27-29.
- Debessa C, Mesiano Maifrino L, Rodrigues de Souza R (2001) Age related changes of the collagen network of the human heart. *Mech Ageing Dev*, 122: 1049-1058.
- Demir R, Kayisli U, Sevala Y, Celik-Ozencia C, Korguna E, Demir-Weustenb A, Huppertz B. (2004) Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi

- during very early pregnancy: Differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta*, 25: 560-572.
- Demir-Weusten A, Seval Y, Kaufmann P, Demir R, Yucel G, Huppertz B. (2007) Matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human term placenta. *Acta Histochem*, 109 (5): 403-412.
- Denhardt D, Giachelli C, Rittling S. (2001) Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Review Pharmacol*, 41: 723-749.
- Denhardt D. and Guo X. (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*, 7: 1475-1482.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. (2009) InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dimmeler S and Zeiher A. (2000) Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res*, 87: 434-439.
- Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A. (2000) Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Activate Trophoblast Tie-2 to Promote Growth and Migration during Placental Development. *Am J Pathol*, 156 (6): 2185-2199.
- Endl E and Gerdes J. (2000) The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res*, 257: 231-7.
- Fenoglio D. (2007) Producción porcina: un sector olvidado por las políticas argentinas pero con un potencial ilimitado. *Revista Nuestro Agro*. En <http://www.nuestroagro.com.ar/noticia.asp?id=203&Fuente=2&Categoria>
- Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9: 669-76.
- Fleck C and Simman R. (2010) Modern collagen wound dressings: Function and purpose. *JCCW*, 2(3): 50-54.
- Font J. (1999) Situación y perspectivas de la mejora genética porcina. En: Producción porcina: Aspectos claves 2º ed., 4.2:199-222. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Friess A, Sinowatz F, Skolek-Winnisch R, Trautner W. (1980) The placenta of the pig. *Anat Embryol*, 158: 179-191.
- Fuentes Cintra M, Pérez García L, Suárez Hernández Y, Soca Pérez M. (2006) Características reproductivas de la cerda. Influencia de algunos factores ambientales y nutricionales. *REDVET*, VII(01): 1-36.
- Gallegos A y Mellisho E. (2006) Desarrollo fetal. En: Curso de Reproducción Animal. Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Perú).

- Garlow J, Hakhyun K, Johnson G, Burghardt R, Jaeger L, Fuller W. (2002) Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biol Reprod*, 66: 718-725.
- Ghida Daza C. (2010) Evolución de la actividad porcina. En: Sitio porcino de producción animal. <http://www.porcinos.org.ar/0020.htm>
- Goldberg M and Schneider T. (1994) Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem*, 269: 4355-4359.
- Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield G, Lavy Y, Yagel S. (2000) Tie-2 and Angiopoietin-2 expression at the fetal-maternal interface: a receptor ligand model for vascular remodelling. *Mol Hum Reprod*, 6 (1): 81-87.
- Goldstein M, Bazer F, Barron D. (1980) Characterization of changes in volume, osmolarity and electrolyte composition of porcine fetal fluids during gestation. *Biol Reprod*, 22:1168-1180.
- Greenwood P, Slepatis R, Bell A. (2000) Influences on fetal and placental weights during mid to late gestation in prolific ewes well nourished throughout pregnancy. *Reprod Fertil Dev*, 12: 149-156.
- Greijer A and van der Wall E. (2004) The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*; 57: 1009-1014.
- Grummer M, Sullivan J, Magness R, Bird I. (2009) Vascular endothelial growth factor acts through novel, pregnancy-enhanced receptor signalling pathways to stimulate endothelial nitric oxide synthase activity in uterine artery endothelial cells. *Biochem J*, 417: 501-511.
- Háñez E y Háñez B. (2000) En: Reproducción e Inseminación Artificial en animales, 7° ed. Ed. Mc Graw Hill.
- Háñez S, Borowicz P, Reynolds L, Redmer D. (2010) Maternal and fetal microvasculature in sheep placenta at several stages of gestation. *J Anat*, 216: 292-300.
- Heazell A and Crocker I. (2008) Live and Let Die. Regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Placenta*, 29: 772-783.
- Heazell A, Harris L, Forbes K, Crocker I. (2006) Placental cell turnover in health and disease. *Reviews in Gynaecological and Perinatal Practice*, 6: 80-86.
- Hedge U. (1991) Immunomodulation of the mother during pregnancy. *Med Hypotheses*, 35: 159-164.
- Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. (2006) Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol*, 195: 29-39.

- Informe Mensual de Carnes. (2011). Porcinos. Agosto 2011. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino (INTA EEA Pergamino) (2003) Grupo de investigación porcina, Reproducción En: <http://www.inta.gov.ar/Pergamino/investiga/grupos/Porcinos/porcinos.htm>
- Iwaki T and Castellino F. (2005) Maternal fibrinogen is necessary for embryonic development. *Current Drug Targets*, 6(5):535-539.
- Iwaki T, Sandoval-Cooper M, Paiva M, Kobayashi T, Ploplis V and Castellino F. (2002) Fibrinogen stabilizes placental-maternal attachment during embryonic development in the mouse. *Am J Pathol*, 160: 1021 - 1034.
- Johansson S, Dencker L, Dantzer V. (2001) Immunohistochemical localization of retinoid binding proteins at the materno-fetal interface of the porcine epitheliochorial placenta. *Biol Reprod*, 64: 60-68.
- Johnson G, Burghardt R, Bazer F, Spencer T. (2003a) Osteopontin: Roles in Implantation and Placentation. *Biol Reprod*, 69: 1458–1471.
- Johnson G, Burghardt R, Joyce M, Spencer T, Bazer F, Gray C, Pfarrer C. (2003b) Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45-kDa cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. *Biol Reprod*, 69: 92–98.
- Johnson G, Burghardt R, Joyce M, Spencer T, Bazer F, Pfarrer C, Gray C. (2003c) Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization-like differentiation during ovine pregnancy. *Biol Reprod*, 68: 1951–1958.
- Joyce M, González J, Lewis S, Woldesenbet S, Burghardt R, Newton G, Johnson G. (2005) Caprine uterine and placental osteopontin expression is distinct among epitheliochorial implanting species. *Placenta*, 26(2): 160-170.
- Junqueira L, Bignolas G, Brentani R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, 11: 447-455.
- Kaczmarek M, Kiewisz J, Schams D, Ziecik A. (2009) Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology*, 71: 1298-1306.
- Kaufmann, Huppertz B, Hans-Georg F. (1996) The fibrinoids of the human placenta: origin, composition and functional relevance. *Ann Anat*, 178: 485-501.

- Keck P, Hauser S, Krivig Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly D. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 246: 1309-1312.
- Kelten C, Zekioğlu O, Terek C, Özdemir N, Düzcan E. (2010) Expression of Ki-67, Bcl-2 and Bax in the first trimester abortion materials. *Turk J Pathol*, 26(1): 31-37.
- Kimmins S, Lim H, MacLaren L. (2004) Immunohistochemical localization of integrin alpha V beta 3 and osteopontin suggests that they do not interact during embryo implantation in ruminants. *Reprod Biol Endocrin*, 2:19.
- Klagsbrun M and D'Amore P. (1991) Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*, 53: 217-239.
- Koblizek T, Weiss C, Yancopoulos G, Deutsch U, Risau W. (1998) Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis *in vitro*. *Curr Biol*, 8, 529-532.
- Korgun E, Celik-Ozenci C, Acar N, Cayli S, Desoye G, Demir R. (2006) Location of cell cycle regulators cyclin B1, cyclin A, PCNA, Ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas. *Histochem Cell Biol*, 125: 615-624.
- Leiser R. and Dantzer V. (1994) Initial vascularization in the pig placenta: II: Demonstration of gland and areola-gland subunits by histology and corrosion cast. *Anat Rec*, 238: 326-334.
- Leiser R. and Kaufmann P. (1994) Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol*, 102: 122-134.
- Levy N, Chung S, Furneaux H, Levy A. (1998) Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*, 273: 6417-6423.
- Levy R and Nelson D. (2000) To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in the human placenta. *Placenta*, 21: 1-13.
- Liaw L, Almeida M, Hart C, Schwartz S, Giachelli C. (1994) Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells *in vitro*. *Circ Res*, 74: 214-224.
- Lockwood CH, Senyei A, Dische M, Casal D, Shah K, Thung S, Jones L, Deligdisgh L, Garite T. (1991) Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *N Engl J Med*, 325: 669-674.
- Lukasz A, Hellpap J, Horn R, Kielstein J, David S, Haller H, Kümpers P. (2008) Circulating angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in critically ill patients: development and clinical application of two new immunoassays. *Crit Care*, 12(R94): 1-11.
- Manase K, Endo T, Chida M, Nagasawa K, Honnma H, Yamazaki K, Kitajima Y, Goto T, Kanaya M, Hayashi T, Mitaka T, Saito T. (2006) Coordinated elevation of membrane

- type 1-matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 expression in rat uterus during postpartum involution. *Reprod Biol Endocrin*, 4(32): 1-7.
- Marrable A. (1971) The embryonic pig: A chronological account. Ed. Exeter, Pitman Medical, London.
- Matwee C, Betts D, King W. (2000) Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, 8: 57-68.
- Mayhew T. (2002) Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodeling of vascular endothelial cells. *Placenta*, 23: 742-750.
- Merkis C, Cristofolini A, Franchino M, Moschetti E, Koncurat M. (2005) Relación entre área total y área epitelial de vellosidades placentarias porcinas de diferentes estadios gestacionales. *InVet*, 7(1): 47-54. ISSN 1514-6634.
- Merkis C, Cristofolini A, Franchino M, Sanchis E, Moschetti E, Koncurat M. (2006) Angiogenesis placentaria durante la gestación porcina. *REDVET*, 7(4): 1-4. ISSN 1695-7504.
- Merkis C, Cristofolini A, Koncurat M (2007) Apoptotic phenomena during porcine placentation. *Revista Electrónica de Veterinaria (REDVET)*, 8(1). ISSN 1695-7504.
- Merkis C, Cristofolini A, Sanchis E, Koncurat M. (2010) Expression of death cellular receptors FAS/CD95 and DR4 during porcine placentation. *Int J Morphol*, 28(3): 829-834.
- Merkis C, Cristofolini A, Sanchis G, Chanique A, Moschetti E, Campos M, Taglialegna A, Alessio A, Allende F, Koncurat M. (2009) Localization of collagen through Picrosirius red in porcine placenta. *Biocell*, 33(3): 256.
- Merkis C, Turiello P, Cristofolini A, Sanchis G, Chanique A, Campos M, Pastorino I (2009) Placental structure and ultrastructure in Anglo-Nubian goats. Preliminary study. *Biocell*, 33(3).
- Meschia G. (1983) Circulation to female reproductive organs. In: Shepherd, JT and Abboud, FM editors. *Handb Physiol*. Vol. III, pp: 241-269, Sect. 2, part 1. Bethesda, MD: American Physiological Society.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación (2011) Boletín Trimestral de Información Porcina. *Dirección de Ovinos, Porcinos, Aves de Granja y Pequeños Rumiantes*, Agosto de 2011.
- Moliva M, Cristofolini A, Alonso L, Sanchis G, Chanique A, Merkis C. (2011) High Score of VEGF receptors, Flt-1 and Flk-1, during porcine gestation. Preliminary study. *Biocell*, 35(3): A291.

- Mosesson M, Siebenlist K, Meh D. (2001) The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin. *Annals New York Academy of Sciences*, 936 (Issue Fibrinogen: XVITH International Fibrinogen Workshop): 11-30.
- Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi B. (1994) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res*, 5. 89-95.
- Nuevo Diario (2012) El Gobierno concedió créditos oficiales a la industria porcina. En: <http://www.nuevodiarioweb.com.ar/notas/2012/2/7/gobierno-concedio-creditos-oficiales-industria-porcina-384885.asp>
- Oficina Nacional de Control Comercial Agropecuario (ONCCA). (2011) Las ventajas de la producción porcina, según un informe de la ONCCA. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. Enero de 2011.
- Okano A, Ogawa H, Takahashi H, Geshi M. (2007) Apoptosis in the porcine uterine endometrium during the estrous cycle, early pregnancy and *post partum*. *J Reprod Dev*, 53(4): 923-930.
- Oken E and Gillman M. (2003) Fetal origins of obesity. *Obes Res*, 11: 495-506.
- Olvera M, Harris S, Amezcua C, McCourty A, Rezk S, Koo C, Felix J, Brynes R. (2001) Immunohistochemical expression of cell cycle proteins E2F-1, Cdk-2, Cyclin E, p27kip1, and Ki-67 in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Mod Pathol*, 14(10): 1036-1042.
- Otrock Z, Makarem J, Shamseddine A. (2007) Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cell Mol Dis*, 38: 258-268.
- Pallás Alonso R. (2008) Factores que afectan la fertilidad y prolificidad en el ganado porcino. *Taurus*, Bs. As., 10(39):26-38. En: www.produccion-animal.com.ar
- Palumbo J, Zogg M, Talmage K, Degen J, Weiler H, Isermann B. (2004) Role of fibrinogen and platelet-mediated hemostasis in mouse embryogenesis and reproduction. *J Thromb Haemost*, 2: 1368-1379.
- Parsi J, Echevarría A, Trolliet J, Grivel C, Rossi D, Yanke M. (2007) Efectos del tamaño de grupo y de diferentes disponibilidades de comederos sobre la conversión del alimento y el aumento diario de peso en cerdos pos-destete en sistemas de producción al aire libre. *REDVET*, 8:1695-7504.
- Perry J and Rowlands I. (1962) Early pregnancy in the pig. *J Reprod Fertil*, 4:175-188.
- Pfarrer C, Abd-Elnaeim M, Allen W, Wilsher S, Schams D, Leiser R. (2005) Expression of Fibroblast Growth Factor (FGF) and FGF Receptor (FGFR) in the horse placenta. *Anat Histol Embryol*, 34(1): 39-40.

- Pfarrer C, Weise S, Berisha B, Schams D, Leiser R, Hoffmann B, Shculer G. (2006) Fibroblast Growth Factor (FGF)-1, FGF-2, FGF-7 and FGF Receptors are uniformly expressed in trophoblast giant cells during restricted trophoblast invasion in cows. *Placenta*, 27(6-7): 758-770.
- Pond W. and Houpt K. (1981) En: *Biología del cerdo*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Pope W. (1994) Embryonic mortality in swine. In: *Embryonic mortality in domestic species*. Ed. Zavy M and Geisert R. Boca Raton, FL; CRC Press, Inc., pp: 53-77.
- Presta M, Dell'era P, Vitola S, Moroni R, Ronca R, Rusnati M. (2005) Fibroblast Growth Factor/ Fibroblast Growth Factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth F R*, 16: 159-178.
- R Development Core Team (2007) In: *A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. En: <http://www.R-project.org>.
- Ramos-Vara J. (2005) Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42: 405-426.
- Ranger A, Malynn B, Korsmeyer S. (2001) Mouse models of cell death. *Nat Genet*, 28: 113-118.
- Rashev P, Georgieva D, Rees R. (2005) Expression of $\alpha_5\beta_1$ Integrin and fibronectin during early pregnancy in pigs. Institute of Biology and Immunology of Reproduction. *Folia Biol-Prague*, 51: 121-125.
- Recalde M y Barraud A. (2002) Competitividad de la carne vacuna en Argentina. *Actualidad Economica*, XII(52).
- Reti N, Lappas M, Riley C, Wlodek M, Permezel L, Walker S, Rice G. (2007) Why do membranes rupture at term? Evidence of increased cellular apoptosis in the supracervical fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 196(5): 484.e1-484.e10.
- Reynolds L and Redmer D. (2001) Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod*, 64: 1033-1040.
- Reynolds L, Biondini M, Borowicz P, Vonnahme K, Caton J, Grazul-Bilska A, Redmer D. (2005a) Functional significance of developmental changes in placental microvascular architecture: the sheep as a model. *Endothelium*, 12: 1-9.
- Reynolds L, Borowicz P, Vonnahme K, Johnson M, Grazul-Bilska A, Wallace J, Caton J, Redmer D. (2005b) Animal models of placental angiogenesis. *Placenta*, 26: 689-708.
- Reynolds L, Caton J, Redmer D, Grazul-Bilska A, Vonnahme K, Borowicz P, Luther J, Wallace J, Wu G, Spencer T. (2006) Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol*, 572(1): 51-58.

- Rich L and Whittaker P. (2005) Collagen and Picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci*, 22(2): 97-104.
- Rodríguez Jerez J. (2005) La calidad de la carne de cerdo. En: www.consumaseguridad.com
- Roskoski R Jr. (2008) VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochem Bioph Res Co*, 375: 287-291.
- Rozario T and DeSimone D. (2010) The Extracellular Matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev Biol*, May 1, 341(1): 126-140.
- Sahni A and Francis Ch. (2000) Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibron and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood*, 96: 3772-3778.
- Sanchis E, Cristofolini A, Merkis C, Chanique A, Moschetti E, Koncurat M. (2010) Preliminary results of osteopontin immunoexpression in the porcine placenta. *Anat Histol Embryol*, 39: 87-91.
- Sanchis E, Cristofolini A, Moliva M, Alonso L, Moschetti E, Chanique A, Merkis C. (2012a) Barrera interhemal placentaria porcina. *Rev Arg Morfol*, 1:1.
- Sanchis E, Williamson D, Cristofolini A, Merkis C, Koncurat M. (2009) Osteopontin and $\alpha_v\beta_3$ integrin immunoexpression in porcine placental tissues. Preliminary study. *Biocell*, 33: 3.
- Sanchis G, Cristofolini A, Merkis C. (2012b) Moléculas de matriz extracelular y vascularización en la placenta porcina. Ed. Académica Española, Alemania. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG. ISBN 978-3-659-00805-4.
- Sanchis G, Cristofolini A, Merkis C. (2012b) Arquitectura celular placentaria. Proteínas de matriz extracelular. *Rev Arg Morfol*, 1: 100.
- Sanchis G, Cristofolini A, Taglialegra A, Merkis C. (2011) Porcine uterine extracellular matrix molecules throughout pregnancy. *Int J Morphol*, 29(4): 1438-1443.
- Santomá G y Pontes M. (2011) ¿Qué medidas nutricionales tomar ante la preproductividad de la cerda actual? 1º Parte. XXVII Curso de Actualización FEDNA. En: Sitio porcino de producción animal. <http://www.porcinos.org.ar/0020.htm>
- Sati L, Demir A, Sarikcioglu L, Demir R. (2008) Arrangement of collagen fibers in human placental stem villi. *Acta Histochem*, 110 (5): 371-379.
- Scholzen T and Gerdes J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182: 311-22.
- Selam B, Kayisli U, Mulayim N, Arici A (2011) Regulation of Fas Ligand Expression by Estradiol and Progesterone in Human Endometrium. *Biol Reprod*, 65: 979-985.

- Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. (2008) The Distribution of Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 and Their Receptors Tie-1 and Tie-2 in the Very Early Human Placenta. *Placenta*, 29: 809-815.
- Sharpe K, Eiler H, Hopkins F. (1990) Changes in the proportion of type I and type III collagen in the developing and retained bovine placentome. *Biol Reprod*, 43: 229-235.
- Silvera Arenas L y Barrios de Zurbarán C. (2002) La matriz extracelular: el ecosistema de la célula. *Salud Uninorte*, 16: 9-18.
- Sitio porcino de producción animal. (2006) La carne de cerdo y su valor nutricional. En: www.produccion-animal.com.ar
- Spencer T, Burghardt R, Johnson G, Bazer F. (2004) Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci*, 82-83: 539-550.
- Straszewski-Chavez S, Abrahams V, Mor G. (2005) The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev*, 26: 877-897.
- Sutcliffe R, Davies M, Hunter J, Waters J, Parry J. (1982) The protein composition of the fibrinoid material at the human uteroplacental interface. *Placenta*, 3(3): 297-308.
- Tertemiz F, Kayisli UA, Arici A, Demir R. (2005) Apoptosis contribuyes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis. *Biol Reprod*, 72: 727-735.
- Thiet M, Suwanvanichkij V, Hasselblatt K, Yeh J. (2000) Apoptosis in human term placenta. A morphological and gene expresión study. *Gynecol Obstet Invest*, 50: 88-91.
- Tjwa M, Luttun A, Autiero M, Carmeliet P. (2003) VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell Tissue Res*, 314: 5-14.
- Tomanek R, Hansen H, Christensen L. (2008) Temporally expressed PDGF and FGF-2 regulate embryonic coronary artery formation and growth. *Arterioscl Throm Vas*, 28: 1237-1243.
- Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, Matvijenko O, Holmgren L. (2001) Angiostatin: an angiostatin-binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol*, 152: 1247-1254.
- Tuder R, Flook B, Voelkel N. (1995) Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest*, 95: 1798-1807.
- Unek G, Ozmen A, Kipmen-Korgun D, TurkeyKorgun E. (2012) Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. *Acta Histochem*, 114(1): 31-40.

- Valdés G and Corthorn J. (2011) Review: The angiogenic and vasodilatory utero-placental network. *Placenta*, 32(2): S170-S175.
- Van der Lende T and Van Rens B. (2003) Critical periods for fetal mortality in gilts identified by analysing the length distribution of mummified fetuses and frequency on non-fresh stillborn piglets. *Anim Reprod Sci*, 75:141-150.
- Vizza E, Correr S, Barberini F, Heyn R, Bianchi S, Macchiarelli G. (2005) 3-D ultrastructural distribution of collagen in human placental villi at term in relation to vascular tree. *J Reprod Dev*; 51: 433-443.
- Vizza E, Goranova V, Heyn R, Correr S, Motta P. (2001) Extracellular fibrillar matrix architecture of human placental villi at term. *Ital J Anat Embryol*, 106: 317-323.
- Vonnahme K and Ford S. (2004) Placental vascular endothelial growth factor receptor system mRNA expression in pigs selected for placental efficiency. *J Physiol*, 554(1): 194-201.
- Vonnahme K, Wilson M, Ford S. (2001) Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biol Reprod*, 64: 1821-1825.
- Weber G and Cantor H. (1996) The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth F R*, 7: 241-248.
- Weisel J. (2005) Fibrinogen and Fibrin. *Adv Protein Chem*, 70: 247-299.
- Welter H, Wollenhaupt K, Einspanier R. (2004) Developmental and hormonal regulated gene expression of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) and its receptors in porcine endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 88: 295-304.
- White F, Ross J, Joyce M, Geisert R, Burghardt R, Johnson G. (2005) Steroid Regulation of Cell Specific Secreted Phosphoprotein 1 (Osteopontin) Expression in the pregnant porcine uterus. *Biol Reprod*, 73: 1294-1301.
- Williamson D y Koncurat M. (2009) Expresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$ y de las subunidades de integrinas α_3 y β_1 durante la placentación porcina. *InVet*, 11(1-2): 31.
- Wilson M. (2002) Role of placental function in mediating *conceptus* growth and survival. *J Anim Sci*, 80: E195-E201.
- Winther H, Ahmed A, Dantzer V. (1999) Immunohistochemical localization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus. *Placenta*, 20: 35-43.
- Wollenhaupt K, Welter H, Brüßow K, Einspanier R. (2005) Regulation of endometrial fibroblast growth factor 7 (FGF-7) and its receptor FGFR2IIb in gilts after sex steroid

- replacements, and during the estrous cycle and early gestation. *J Reprod Dev*, 51(4): 509-519.
- Wooding P and Burton G. (2008) In: Comparative placentation. Structures, functions and evolution. Ed. Springer-Verlag. Berlín Heidelberg.
- Wulff C, Wilson H, Dickson S, Wiegand S, Fraser H. (2002) Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod*, 66: 802-812.
- Xue W, Khoo U, Ngan H, Chan K, Chiu P, Tsao S, Cheung A. (2003) Minichromosome maintenance protein 7 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with Ki67, PCNA and clinicopathological parameters. *Histopathology*, 43: 485-490.
- Zachary I and Glick G. (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*, 49: 568-581.
- Zhang J, Claffey K, Sakthivel R, Darzynkiewicz Z, Shaw D, Leal J, Wang Y, Lu F, McCrae K. (2000) Two-chain high-molecular-weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *FASEB J*, 14: 2589-2600.
- Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang O. (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 110(1): S10-S18.

72688

U.N.R.C.
Biblioteca Central



72688