

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



Trabajo final para optar al Grado de Médico Veterinario
Modalidad: Monografía. Trabajo de investigación y desarrollo tecnológico.

**ANÁLISIS VASCULAR DE LA PLACENTA PORCINA A LO
LARGO DE LA GESTACIÓN**

Nombre del alumno: Bianca Cassina

D.N.I: 37.491.464

Directora: Cecilia Inés Merkis

DNI: 17. 921. 785

Co-directora: Andrea Lorena Cristofolini

DNI: 25. 582. 934

Río Cuarto, Córdoba

Junio, 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del trabajo final: Análisis vascular de la placenta porcina a lo largo de la
gestación.

Autor: Bianca Cassina

D.N.I: 37.491.464

Director: Dra. Cecilia Inés Merkis

Co-director: Dra. Andrea Lorena Cristofolini

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Virginia Mac Loughlin _____

Mariana Fiorimanti _____

Fecha de presentación: ____ / ____ / ____

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

A mis papás Miguel y Lillián, gracias a ellos conocí este camino. Han estado siempre, tanto en los buenos como en los momentos en que me perdí. Sólo con el tiempo entendí el sacrificio de dejarme abrir las alas.

A Katy y Andrea, ambas con un entusiasmo para vivir y trabajar, que siempre han logrado contagiarme. Pocas veces me he cruzado con personas como ellas, y por eso...¡¡¡Muchas Gracias!!!

A Mariana, por su gran voluntad, por estar siempre dispuesta a lo que necesité, por ayudarme siempre.

A mis compañeros de la Facultad, sin ellos, claramente mi vida en Río Cuarto no hubiese sido lo mismo.

A mi hermana Soraya, que me ha enseñado a dar mis primeros pasos en la Facultad... y en la vida.

A Dios, porque siempre confió en mí.

ÍNDICE DE TEXTO

	Página
Índice de figuras	6
Índice de tablas	8
Resumen en español	9
Summary	10
INTRODUCCIÓN	11
1. Cerdas	11
1.1 Producción de carne porcina	11
1.2 Reproducción porcina	12
2. Placenta	13
2.1 Desarrollo placentario	13
2.2 Funciones placentarias	16
2.3 Nutrición placentaria	16
2.4 Circulación placentaria	17
2.5 Factor de crecimiento endotelial (VEGF)	20
2.6 Angiopoyetinas	20
2.7 Proteína CD31	21
3. Glicobiología	22
3.1 Aplicaciones de las lectinas	23
3.2 Tipos de lectinas	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
A. Obtención de tractos reproductivos y placentas	27
B. Análisis de estructura	27
B.1 Técnicas utilizadas para el procesamiento de placentas	27
B.1.1 Técnica de microscopía convencional por microscopía óptica	27
B.1.2 Preparación de solución tamponada de Sørensen (PBS) 0,1 M pH 7,4	27
B.1.3 Tratamiento de tejidos incluidos en parafina	28
B.1.4 Tinción de hematoxilina/eosina	28
B.1.5 Tinción tricrómica de Gallego	29
B.2 Técnica de Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR)	30
B.3 Estudio de vasos sanguíneos	30

B.3.1 Inmunohistoquímica para la marcación de células endoteliales mediante CD31.	30
B.3.2 Lectinhistoquímica para la marcación de células endoteliales mediante la lectina <i>Ulex europaeus</i> (UEA)	31
B.3.3 Análisis morfométrico de los vasos sanguíneos	31
B.3.4 Lectinhistoquímica para la determinación del patrón de glicosilación en vasos sanguíneos mediante las lectinas AIA, Con-A, MAA, PHA-E y PSA	31
B.3.5 Semicuantificación	33
C. Análisis estadístico	33
RESULTADOS	34
A. Análisis de la estructura placentaria	34
A.1 Estudio macroscópico	34
A.2 Estudio microscópico	35
A.3 Estudio con tinción de hematoxilina/eosina	35
A.4 Estudio con tinción tricrómica de Gallego	38
A.5 Estudio por Microscopia Óptica de Alta Resolución	39
A.6 Determinación inmunohistoquímica de CD31	41
A.7 <i>Ulex europaeus</i> (UEA)	45
A.8 Lectinhistoquímica para la determinación del patrón de glicosilación en vasos sanguíneos	46
A.8.1 <i>Artocarpus integrifolia</i> (AIA)	48
A.8.2 <i>Concanavalin A</i> (Con-A)	49
A.8.3 <i>Maackia amurensis</i> (MAA)	50
A.8.4 <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA-E)	52
A.8.5 <i>Pisum sativum</i> (PSA)	53
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIÓN	59
BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Consumo de carne a nivel mundial.	11
2 Consumo de carne porcina en Kg/ha/año.	12
3 Esquema de las etapas del ciclo estral de la cerda y comportamiento hormonal a lo largo del mismo.	13
4 A) y B) Esquema que representa la morfogénesis de las membranas fetales.	14
5 Esquema de la placentación epiteliocorial.	15
6 Esquema de las vellosidades primarias, secundarias y terciarias.	15
7 Esquema de una sección de la placenta y pared uterina.	17
8 A) y B) Representación esquemática de la pared de una arteria.	18
9 Esquema de arteriola, vénula y vaso linfático.	18
10 Clasificación de los procesos de desarrollo de los vasos sanguíneos, vasculogénesis y angiogénesis.	19
11 Esquema de las interacciones entre lectinas y carbohidratos en la superficie celular.	24
12 Tracto reproductivo de una cerda de ± 30 días de gestación.	34
13 Conceptus de ± 30 días de gestación.	35
14 A y B) Corte histológico de una placenta porcina de ± 30 días de gestación, coloreada con hematoxilina/eosina.	36
15 Corte histológico de una placenta porcina de ± 60 días de gestación, coloreada con hematoxilina/eosina.	37
16 A), B) y C) Cortes transversales de vellosidades en placenta de 114 días de gestación.	38
17 Imagen de tejido placentario porcino, a los 60 días de gestación, coloreado con la tinción tricrómica de Gallego.	38
18 Imagen de tejido placentario porcino a los 114 días de gestación, coloreado con la tinción tricrómica de Gallego.	39
19 Imagen de corte semifino de tejido placentario porcino de ± 30 días de gestación, observada por MOAR.	40
20 Imagen de tejido placentario de ± 60 días de gestación, observado por MOAR.	40
21 A) y B) Cortes semifinos de tejido placentario de ± 114 días de gestación, correspondiente al tejido fetal, observado por MOAR.	41

22 Inmunomarcación de CD31 en tejido placentario de 30 días de gestación, contrastado con hematoxilina/eosina.	42
23 Localización de vasos sanguíneos en tejido placentario de 30 días de gestación, a través de inmunomarcación con CD31.	43
24 Inmunomarcación de CD31 en tejido placentario de 30 días de gestación, revelado con la tinción de hematoxilina/eosina.	43
25 A) y B) Inmunomarcación de CD31 (400x).	44
26 A) y B) Inmunomarcación de CD31 (200x).	46
27 Tejido placentario de \pm 30 días de gestación, enfrentado con UEA.	46
28 Valores de HS de UEA en función de los días de gestación.	48
29 Tejido placentario de \pm tejido placentario de \pm 60 días de gestación, enfrentado con Con-A.	49
30 Valores de HS de AIA en función de los días de gestación.	49
31 Tejido placentario de \pm 60 días de gestación, enfrentado con Con-A.	50
32 Tejido placentario de \pm 114 días de gestación, enfrentado con Con-A.	50
33 Valores de HS de Con-A de Con-A en función de los días de gestación.	51
34 Tejidos placentarios de \pm 30, 60 y 114 días de gestación, enfrentado con MAA.	52
35 Valores de HS de MAA en función de los días de gestación.	52
36 Tejido placentario de \pm 60 días de gestación, enfrentado con PHA-E.	53
37 Tejido placentario de \pm 114 días de gestación, enfrentado con PHA-E.	53
38 Valores de HS de PHA-E en función de los días de gestación.	54
39 A) y B) Tejido placentario de \pm 30 días de gestación, enfrentado con PSA.	54
40 Tejido placentario de \pm 114 días de gestación, enfrentado con PSA.	54
41 Valores de HS de PSA en función de los días de gestación.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I Lectinas empleadas y algunas de sus propiedades: acrónimo, nombre, fuente y especificidad.	32
II Número de vasos sanguíneos por período de gestación, inmunomarcado con CD31.	44
III Área vascular por periodo de gestación, inmunomarcado con CD31.	45
IV Marcación de lectina en el endotelio y contenido de los vasos sanguíneos fetales placentarios a lo largo de la gestación porcina.	47
V Marcación de lectinas en el endotelio y contenido de los vasos sanguíneos maternos a lo largo de la gestación.	47

RESUMEN

Una de las principales características de la placenta porcina es que en ella se forma una extensa red de vasos sanguíneos, por diferentes mecanismos angiogénicos y vasculogénicos, que permiten el continuo intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos. Factores tales como VEGF, angiopoyetinas, osteopontina, fibrinógeno y proteína CD31 intervienen para crear una vasculatura que cumpla eficazmente sus funciones. El objetivo fue estudiar la estructura vascular placentaria, a través de tinciones diferenciales, inmunohistoquímica y lectinhistoquímica a los 30, 60 y 114 días de gestación. Además se realizó microscopía óptica convencional y Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) para observar con detenimiento la histología placentaria. CD31 fue revelado por inmunohistoquímica, y las lectinas *Ulex europaeus* (UEA), *Artocarpus integrifolia* (AIA), *Concanavalin-A* (Con-A), *Maackia amurensis* (MAA), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) y *Pisum sativum* (PSA) fueron estudiadas utilizando patrones de glicosilación. Se detectó que los vasos sanguíneos de la placenta fetal y materna cambian a lo largo de la gestación, disponiéndose cerca de los epitelios de ambas partes. MOAR permitió visualizar detalles mínimos de las células constituyentes. Por otra parte, CD31 inmunomarcó con exactitud la pared de los vasos sanguíneos y así se pudo diferenciar del tejido conectivo que los rodea. A través de UEA se marcaron células endoteliales, sanguíneas y demás constituyentes del tejido placentario. Las lectinas se han unido a sus glúcidos afines y así, han servido para saber dónde y en qué cantidad se encuentran dispuestos en la placenta porcina, cumpliendo diferentes funciones y modificando su cantidad conforme avanza la gestación. Los glúcidos han aumentado en los vasos fetales hacia el fin de la misma. El número y el área vascular mostraron cambios que responden a las demandas, aumentando hacia el final de la preñez.

SUMMARY

One of the main characteristics of porcine placenta is that it forms an extensive network of blood vessels, by different angiogenic and vasculogenic mechanisms, which allow the continuous exchange of nutrients, oxygen and debris. Factors such as VEGF, angiopoietins, osteopontin, fibrinogen and CD31 protein intervene to create a vasculature that effectively fulfills its functions. The objective was to study the placental vascular structure, through differential staining, immunohistochemistry and lectin histochemistry at 30, 60 and 114 days of gestation. In addition, conventional optical microscopy and High Resolution Optical Microscopy (MOAR) were performed to closely observe the placental histology. CD31 was revealed by immunohistochemistry, and lectins *Ulex europaeus* (UEA), *Artocarpus integrifolia* (AIA), *Concanavalin-A* (Con-A), *Maackia amurensis* (MAA), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) and *Pisum sativum* (PSA) were studied using glycosylation patterns. It was detected that the blood vessels of the fetal and maternal placenta change throughout gestation, being arranged close to the epithelia of both parts. MOAR allowed to visualize minimum details of the constituent cells. On the other hand, CD31 accurately immunostained the wall of blood vessels and thus could be differentiated from the connective tissue that surrounds them. Through UEA endothelial cells, blood and other constituents of the placental tissue were marked. The lectins have been linked to their related carbohydrates and thus, have served to know where and in what amount they are arranged in the porcine placenta, fulfilling different functions and modifying its amount as the pregnancy progresses. The carbohydrates have increased in the fetal vessels towards the end of it. The number and vascular area showed changes that respond to the demands, increasing toward the end of pregnancy.

INTRODUCCIÓN

1. Cerdas

1.1 Producción de carne porcina

La carne roja de mayor consumo mundial es la de cerdo, cuya demanda en las últimas décadas ha experimentado un fuerte incremento. Así, Argentina duplicó su consumo en el transcurso de los últimos 7 años (Confederación Intercooperativa Agropecuaria Limitada-CONINAGRO, 2018). Ello se ha debido a los cambios en los patrones de consumo derivados del aumento de ingresos en los países en desarrollo, con economías de rápido crecimiento. Junto con el de las aves de corral, el porcino es el subsector pecuario de mayor crecimiento, con un número de animales que alcanzó los mil millones en 2015 (el doble que en la década del '70). Las tendencias en los mercados mundiales demuestran una creciente diversificación en el consumo de proteínas cárnicas, con el 43,2 % del consumo de carne correspondiente a la de cerdo, contra el 32,8 % de carne aviar, y el 24,2 % de carne bovina (Organización de las Naciones Unidas-FAO, 2018).

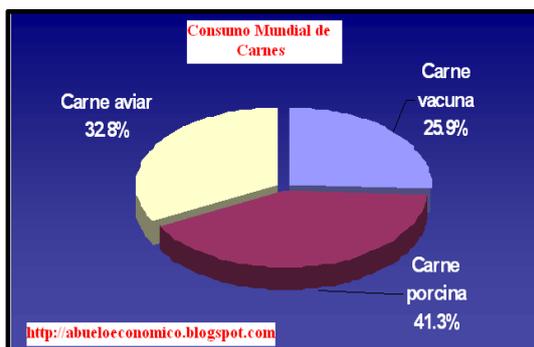


Figura N° 1: Consumo de carne a nivel mundial. Abuelo económico. 2006. El consumo de carnes: ¿hacemos un lechón?

<http://abueloeconomico.blogspot.com/2006/10/el-consumo-de-carnes-hacemos-un-lechn.html>

De acuerdo a lo anunciado por el Ministerio de Agroindustria (2019), el consumo de carne alcanzó los 15,21 kg/hab/año en el último semestre de 2018, reflejándose que el consumo pasó de 15.87 kg/hab/año en el mes de junio a 14.07 kg/hab/año en febrero del 2019.

La ubicación territorial de los establecimientos porcinos marca su mayor concentración en el norte de la provincia de Buenos Aires, sur de Santa Fé y centro de Córdoba, más allá de su distribución dispersa en todo el territorio nacional (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria-SENASA, 2018).

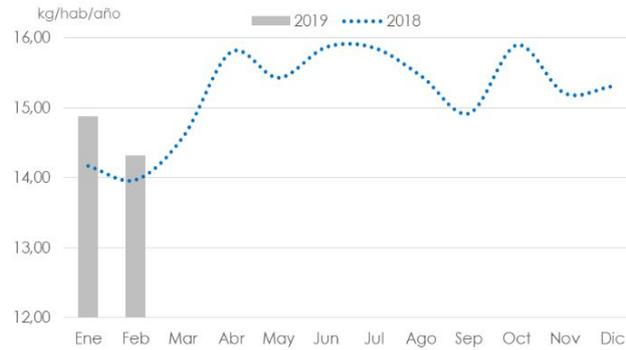


Figura N° 2: Consumo de carne porcina en Kg/hab/año. Fuente: Ministerio de Agroindustria. Boletín Porcino. (2019).

https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/porcinos/estadistica/archivos/000000_Bolet%C3%ADn%20Porcino/000000_Bolet%C3%ADn%20Porcino%202018.pdf

El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, 2017) ha proyectado que el consumo interno llegaría a los 25 kg por persona en la próxima década, siempre y cuando se logren cubrir los objetivos y demandas del mercado.

1.2 Reproducción porcina

La cerda es un animal poliéstrico, que en condiciones favorables manifiesta celo a lo largo de todo el año. La pubertad en la hembra joven ocurre alrededor de los 6 a 7 meses de edad, cuando alcanza un peso corporal de 100 a 110 Kg, siendo el resultado de la interacción de factores internos (genotipo, raza, control neuroendócrino) y externos (nutrición, salud, medio ambiente, manejo). Su ciclo estral dura aproximadamente 21 días, con un rango de 18 a 24 (Trollet, 2005).

El ciclo estral de la cerda se divide en 4 etapas, la primera: el proestro, con crecimiento folicular por acción de la hormona FSH (folículo estimulante) y LH (luteinizante), teniendo una duración de 48 horas. Se continúa con el celo o estro, con comienzo de receptividad sexual por parte de la hembra, por los altos niveles de estrógeno, durando 2 o 3 días (56 horas en promedio) en cerdas adultas, y 1 o 2 días (47 horas) en cachorras. Aquí se produce la ovulación por acción de la LH, alrededor de 36 a 42 horas después del celo. El metaestro es la etapa siguiente, dónde se comienza a formar el cuerpo lúteo (CL), que produce PG (progesterona), hormona que mantiene la gestación y controla la duración del ciclo estral. Por último, el diestro es la etapa donde el CL tiene su máxima actividad y predomina la acción de la PG. En hembras no gestantes, 2 o 3 días antes del nuevo celo, el CL involucre por la PGF2 alfa (prostaglandina F2 α) que se produce en el útero (Fiorimanti, 2018).

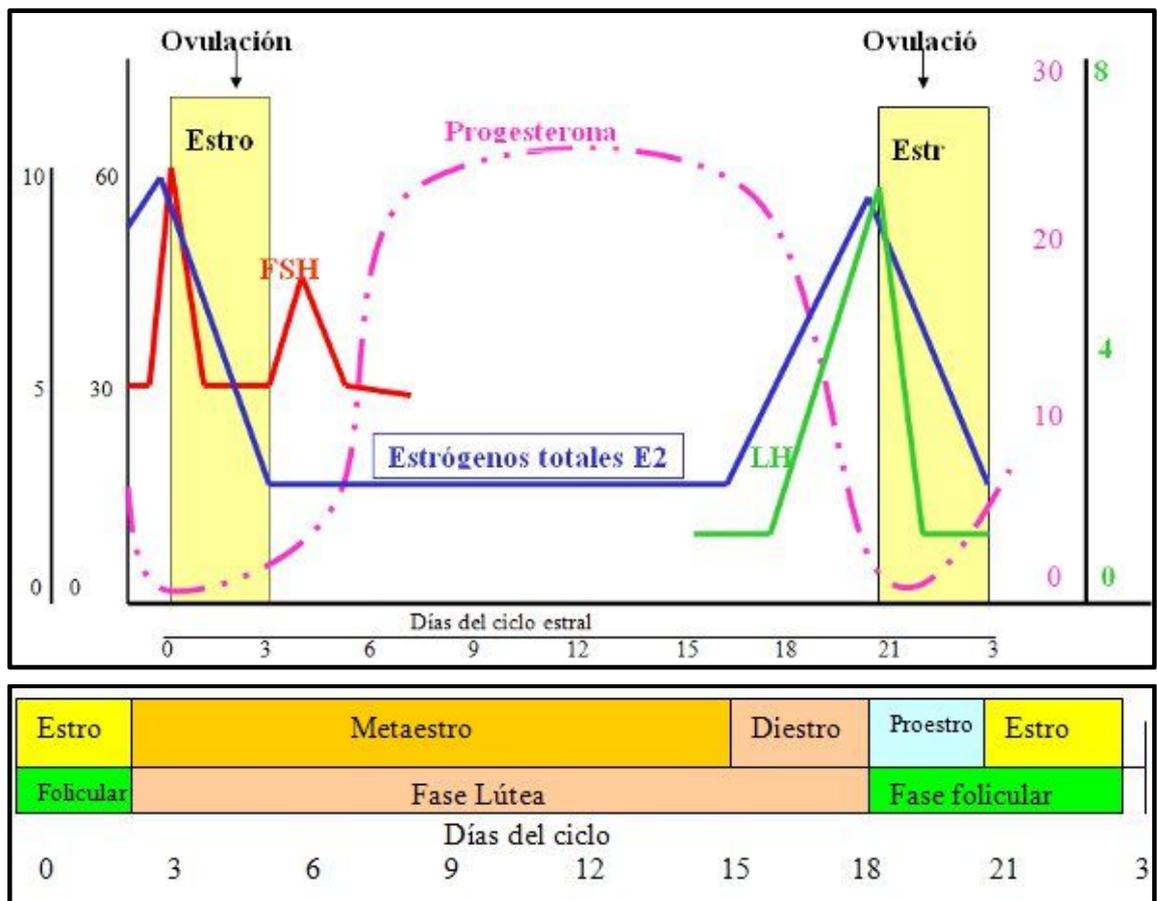


Figura N° 3: Esquema de las etapas del ciclo estral de la cerda y comportamiento hormonal a lo largo del mismo. Fuente: PORCICULTURA, 2012. <https://www.porcicultura.com/destacados/articulos>

2. Placenta

Una de las principales características del desarrollo temprano en los mamíferos es la existencia de un aporte de nutrientes a través de la placenta. Esta es una aposición o fusión de membranas fetales al endometrio materno, que permite el intercambio fisiológico entre ambas partes. Es un órgano sumamente peculiar y diferente de los restantes, se origina debido a diversas interacciones materno-fetales, y se comunica con el embrión a través de un cordón de vasos sanguíneos. Para el feto, la placenta es una estructura donde se combinan muchas funciones de las que será independiente en la vida adulta (Hafez y Hafez, 2002).

2.1 Desarrollo placentario

La formación de la placenta depende del tipo de membranas fetales existentes, ya que de acuerdo a como éstas se combinen van a formar tres tipos: coriónica, corionalantoidea (presente en animales domésticos) y vitelina. La corionalantoidea tiene la característica de

que en ella se encuentran fusionados el corion y el alantoides, con el objetivo de aumentar la superficie de contacto entre el feto y la madre. Dicho contacto se realiza a través de vellosidades coriónicas (conos mesenquimatosos vasculares, rodeados por células trofoblásticas cuboides), que penetran en el endometrio y que poseen la función de llevar vasos sanguíneos fetales (alantóicos) a los vasos sanguíneos maternos (Hafez y Hafez, 2002).

Una vez implantado el embrión porcino (10-20 días post-coito), comienza el crecimiento placentario, alcanzando su máximo el día 60 a 70 de gestación (Soraci, 2012). Durante y después de dicha implantación, se origina en el embrioblasto una prolongación del mesodermo extraembrionario que migra entre el trofoectodermo y el endodermo. Esta capa mesodérmica se separa y se combina con el trofoectodermo para formar el saco vitelino. El mesodermo también contribuye a la formación del amnios y alantoides, que se forman como una prolongación de la parte caudal del intestino del embrión. El amnios se forma sobre el embrión conforme éste cae adentro de la vesícula y el corion se dobla y se fusiona sobre la parte de arriba. El saco vitelino sufre regresión entre la segunda y la tercera semana de la preñez, mientras que el alantoides se expande para fusionarse con el corion (Hafez y Hafez, 2002).

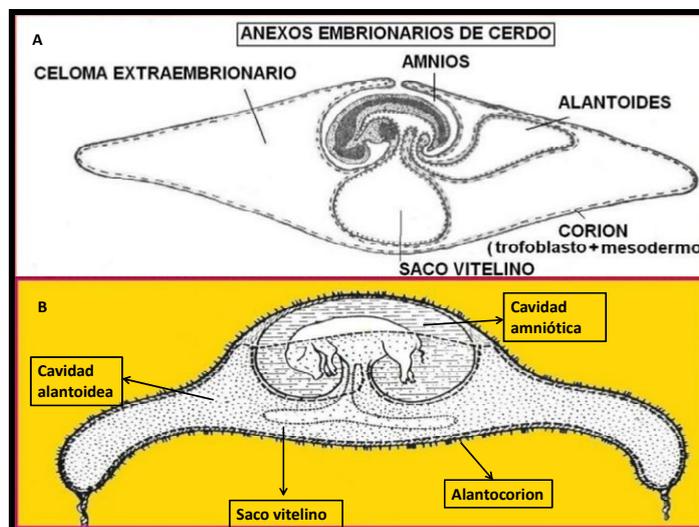


Figura N° 4; A) y B): Esquema que representa la morfogénesis de las membranas fetales durante el desarrollo embrionario temprano (A) y cómo evoluciona en etapas más avanzadas de la misma (B), donde es posible diferenciar el feto y las estructuras placentarias anexas. Adaptado de: Embriología. Placenta.2008. Cátedra de histología y embriología, Facultad de Ciencia Agrarias y Veterinarias, Universidad Católica de Salta <https://es.slideshare.net/PthithCamachoTorres/embriologia-32008-8004527>.

La estructura básica de la placenta corionalantoidea porcina comprende, por el lado de la madre, vasos sanguíneos, tejido conectivo y epitelio, y por el lado del feto, epitelio coriónico, tejido conectivo y vasos sanguíneos (Hafez y Hafez, 2002). Esto la convierte en

una placenta epiteliocorial, es decir, constituida por seis capas de tejido, no invasiva, difusa, plegada y adecidua (Amoroso, 1952; Leiser and Kaufmann, 1994). El término no invasiva implica que el corion y el revestimiento uterino se encuentran próximos entre sí, pero siendo posible separarlos e impidiendo que los *concepti* erosionen la superficie uterina (Hafez y Hafez, 2002). El concepto de adecidua se refiere a que dicha separación ocurre sin lesión del epitelio uterino, y el término difusa hace referencia a la disposición de sus vellosidades (las que se ramifican en vellosidades secundarias y terciarias) (Pond and Houpt, 1981). Contiene pliegues coriónicos primarios, secundarios y terciarios que se entrelazan con pliegues endometriales, incrementando a su vez, el área de contacto materno-fetal por microvellosidades que se interdigitan entre el trofoblasto y el epitelio materno (Dantzer *et. al.*, 1981), estando esta interfase, altamente glicosilada (Dantzer and Leiser, 1993; Jones *et. al.*, 1995).

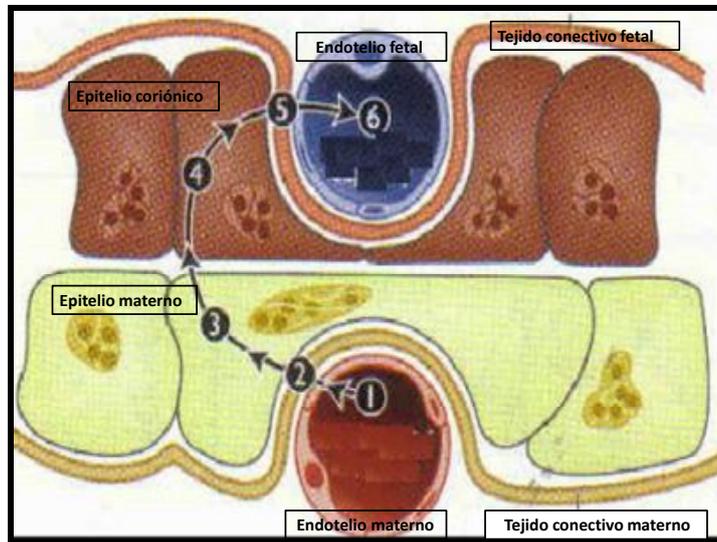


Figura N° 5: Esquema de la placentación epiteliocorial, constituida por seis capas histológicas, donde el epitelio uterino intacto se pone en contacto con el corion intacto. Adaptado de: Mellisho E., 2006.

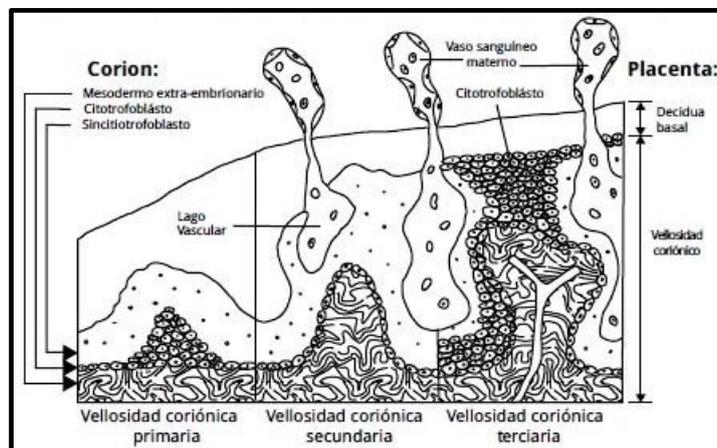


Figura N° 6: Esquema de las vellosidades primarias, secundarias y terciarias, que se van desarrollando conforme avanza la gestación. Tomado de: Apaza Valencia (2014).

Por otra parte, la presencia de células placentarias con características ultraestructurales apoptóticas (muerte programada una vez culminado su ciclo de vida) (Kerr *et al.*, 1972), permiten determinar que la remodelación celular en vellosidades placentarias del inicio, mitad y final de la preñez, acontece por fenómenos de apoptosis. Dichos procesos permiten mantener el equilibrio fisiológico en la interfase, redundando en beneficios nutricionales para los *concepti* y facilitando los mecanismos desencadenantes del parto (Cristofolini, 2013).

2.2 Funciones placentarias

La placenta realiza muchas funciones y sustituye al tubo digestivo, los pulmones, riñones, hígado y glándulas endócrinas del adulto. Además, separa los organismos materno y fetal, asegurando por tanto, el desarrollo independiente del feto. Con respecto al transporte de gases, existen muchas similitudes entre su intercambio a través de la placenta y el que ocurre en los pulmones. Sin embargo, la principal diferencia radica en que la placenta actúa como un sistema líquido-líquido, mientras que en los pulmones se trata de un sistema gas-líquido. Las arterias umbilicales llevan la sangre no oxigenada del feto a la placenta, mientras que las venas umbilicales llevan sangre oxigenada en la dirección opuesta. El dióxido de carbono se difunde libremente de la circulación fetal a la materna (Hafez y Hafez, 2002).

2.3 Nutrición placentaria

La placenta permite el transporte de azúcares, aminoácidos, vitaminas y minerales como sustratos para el crecimiento del feto, a través del flujo neto desde la madre o en la dirección opuesta, que puede producirse por diferencia de concentración, o realizarse por transporte unidireccional mediado por portadores. Muchos nutrientes, como glucosa, aminoácidos, electrolitos y vitaminas son transportados por sistemas portadores localizados en el trofoblasto (Hafez y Hafez, 2002). Numerosas glándulas se encuentran dispuestas en el estroma uterino, secretando su contenido activamente a lo largo de la preñez (Bazer y First, 1983). La absorción del contenido glandular, denominado histiotrofo, por parte del embrión, se realiza a través de las células fagocíticas especializadas que forman las areolas. Estas últimas se forman por expansión fetal alrededor de las bocas glandulares, distinguiéndose a partir del día 15 de gestación (Leiser y Dantzer, 1994). Así la unidad glándula-areola, se observa macroscópicamente a medida que avanza el desarrollo placentario (Johansson *et al.*, 2001).

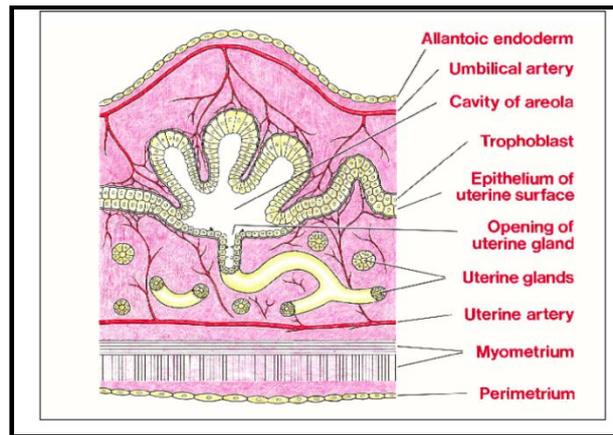


Figura N° 7: Esquema de una sección de la placenta y pared uterina de la cerda mostrando una areola. (**Umbilical artery:** arteria umbilical; **Cavity of areola:** cavidad de la areola; **Trophoblast:** trofoblasto; **Opening of uterine gland:** apertura de la glándula uterina; **Uterine glands:** glándulas uterinas; **Uterine artery:** arteria uterina; **Myometrium:** miometrio; **Perimetrium:** perimetrio). Tomado de: Mc Carthy (2001). www.ucd.ie/vetanat/images/34.gif

2.4 Circulación placentaria

El sistema vascular sanguíneo placentario está compuesto por arteriolas, capilares, venas y vénulas. Las arteriolas son los vasos sanguíneos que evacuan sangre desde arterias cardíacas de mayor calibre, mientras que las venas y vénulas realizan una circulación contraria, devolviendo los desechos a eliminar. Ambas estructuras se encuentran unidas por los capilares. El sistema nervioso actúa sobre la pared de estos vasos para regular el flujo sanguíneo. Las arteriolas miden entre 20 y 120 μm (micrómetros) de diámetro y poseen una capa en contacto con el fluido sanguíneo, denominada túnica íntima. Dicha túnica soporta al conjunto de células que componen el endotelio. La capa continua es denominada túnica media, que según el calibre del vaso, posee entre 3 y 30 capas concéntricas de células musculares lisas. Por último, la capa más externa de los vasos sanguíneos, llamada adventicia, contiene fibrocitos, fibras elásticas y colágenas (Sobotta Welsch, 2009).

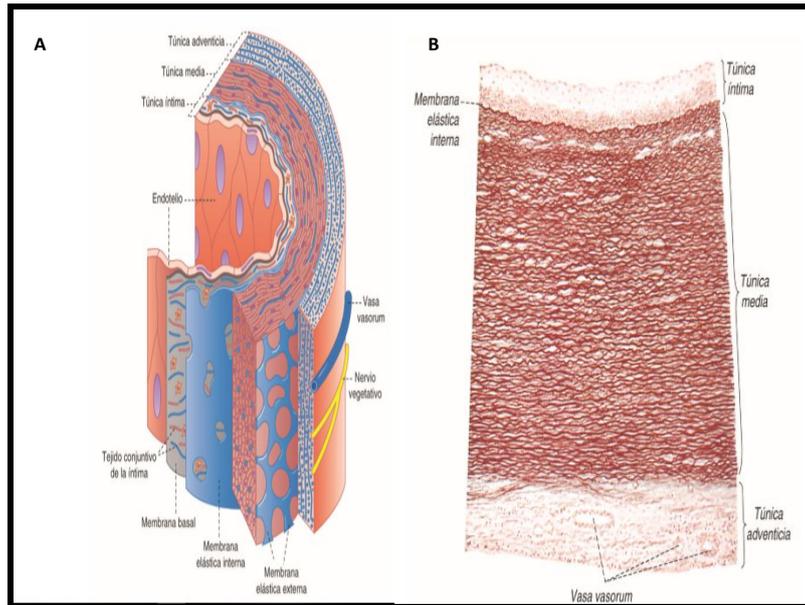


Figura N° 8; A) y B): Representación esquemática de la pared de una arteria. Adaptado de Sobotta Welsch (2009).

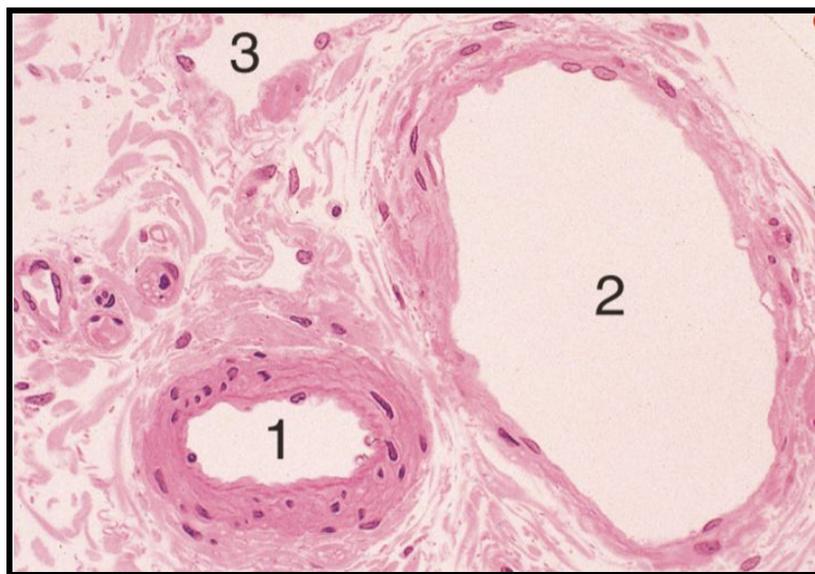


Figura N° 9: Arteriola (1), vénula acompañante (2) y vaso linfático. La pared arteriolar consiste en unas pocas capas de células musculares y un endotelio. En cambio, la pared de la vénula, de un diámetro visiblemente mayor, es más delgada y tiene una estructura más laxa (Sobotta Welsch, 2009).

En la placenta existen dos circulaciones paralelas que son la fetal y la materna, no entrando nunca en contacto. El suministro de sangre materna a la placenta se deriva de arterias y venas uterinas. Las arterias umbilicales llevan sangre del feto a la placenta, y las venas umbilicales la llevan en sentido opuesto (Hafez y Hafez, 2002).

El crecimiento exponencial de los fetos durante la última mitad de la gestación, depende principalmente del aumento de la vascularización placentaria (Espinoza, 2011), influenciada por el tamaño de la camada, el desarrollo vascular y la capacidad uterina

(Wright *et. al.*, 2016). La angiogénesis y vasculogénesis son acciones consecutivas y fundamentales para un adecuado flujo sanguíneo materno-fetal, que asegure el correcto aporte de nutrientes (Soraci, 2012). La vasculogénesis implica la formación de vasos sanguíneos de células precursoras derivadas mesodérmicamente (Charnock-Jones *et. al.*, 2004), donde se establecen nuevos vasos sanguíneos mediante la diferenciación y migración de las células progenitoras endoteliales para formar capilares de interconexión. Las células endoteliales y hematopoyéticas comparten un progenitor común: el hemangioblasto. Estas células forman agregados en el saco vitelino en desarrollo (llamadas islas de sangre). Las señales que regulan la migración y organización de estas células en tubos son complejas y se han identificado factores de crecimiento involucrados en ello (Espinoza, 2011). Por otro lado la angiogénesis implica la creación de nuevos vasos a partir de los preexistentes, para lo cual se requiere la migración de angioblastos, proliferación de células endoteliales, formación de un tubo vascular a partir de otro, e incremento de la permeabilidad, esto lográndose mediante una variedad de procesos. Existen dos mecanismos de angiogénesis, por un lado el de **brotación**, donde células endoteliales migran hacia un estímulo angiogénico en porciones de tejidos previamente desprovista de vasos. Por otro lado, puede ocurrir angiogénesis por **intususcepción**, ello implica la formación de vasos sanguíneos por un proceso en el que la pared del vaso se expande, las células endoteliales se reorganizan y se produce la división del vaso original, dando como resultado dos nuevas estructuras vasculares (Adair y Montani, 2010). Aunque el resultado final (un aumento en el número y/o longitud de los segmentos capilares) puede ser el mismo, puede requerirse un examen cuidadoso de la red capilar usando metodologías morfológicas y estereológicas para hacer el análisis vascular. (Charnock-Jones *et. al.*, 2004, Espinoza, 2011).

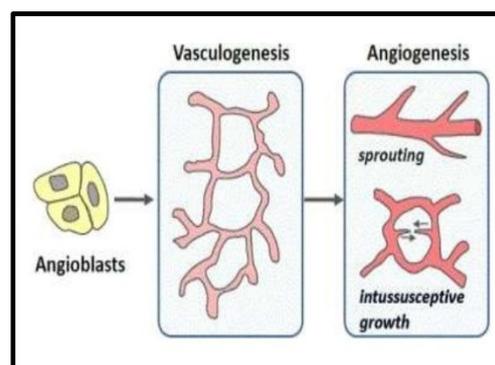


Figura N° 10: Clasificación de los procesos de desarrollo de los vasos sanguíneos, Vasculogénesis y Angiogénesis. Tipos de angiogénesis, por **brotación** (sprouting) o por **intususcepción** (intussusceptive growth). (**Angioblast:** angioblastos; **Vasculogenesis:** vasculogénesis; **Angiogenesis:** angiogénesis; **Sprouting:** brotación; **Intussusceptive growth:** crecimiento por intususcepción). Adaptado de: Carmeliet y Collen, 2000.

2.5 Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF)

El factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), así como sus respectivos receptores, es clave EN la angiogénesis y en la vasodilatación. Es un importante mitógeno y factor de sobrevivencia para aquellas células endoteliales que han demostrado ser iniciadoras de vasculogénesis y angiogénesis, por inducir migración, proliferación y crecimiento de dichas células, y promoverlas a que den lugar a estructuras en forma de tubo. El VEGF es el mayor modulador del crecimiento y remodelación vascular que provoca el incremento de la permeabilidad en el endometrio. La implantación y subsecuente placentación no son posibles si previamente VEGF no torna receptivo al endometrio para el desarrollo del embrión (Espinoza, 2011). Particularmente en la cerda, tanto VEGF como sus receptores se encuentran en las células epiteliales coriónicas y adyacentes al útero, así como en los vasos sanguíneos desde la gestación temprana a la tardía (Charnock-Jones *et. al.*, 2001; Vonnahme y Ford, 2004).

2.6 Angiopoyetinas

Las angiopoyetinas son una familia de factores de crecimiento en la que están incluidas Ang-1 y Ang-2. Estas moléculas poseen dos receptores, Tie-1 y Tie-2, respectivamente, y a su vez, Tie-2 es un receptor común para ambas. Se expresan casi exclusivamente en células endoteliales, promueven el mantenimiento y la estabilización de los vasos sanguíneos maduros, mediante la interacción entre células endoteliales y la membrana basal (Espinoza, 2011). Tanto Ang-1 como Ang-2 fueron inmunomarcadas en la zona perivascular de los vasos sanguíneos y en células del epitelio uterino y trofoblástico (Fiorimanti, 2018).

Estos factores permiten que el lecho vascular materno crezca a través del aumento de tamaño de los capilares, con sólo pequeños aumentos en el número de los mismos, mientras que la microvasculatura de la placenta fetal se desarrolla al aumentar la cantidad de vasos y por lo tanto, su superficie (Reynols *et al.*, 2001). Esto ayuda a explicar el mayor flujo de sangre umbilical y de entrega de nutrientes al feto que se produce durante la última mitad de la gestación (Reynols y Redmer., 2001). La eficiencia del transporte sanguíneo placentario dependerá no sólo del número de vasos por unidad de área, sino también del acercamiento de los capilares para disminuir la distancia de difusión hemotrófica (Fiorimanti, 2018). Así, en placentas de cerdas a término se ha demostrado una distancia de difusión tan pequeña como 0,18 μm (Cristofolini y col., 2017).

El crecimiento placentario hace que aumente el número de areolas y disminuya la distancia intercapilar (Merkis y col., 2006), dado que con este tipo de placentación la comunicación entre los tejidos maternos y fetales dependen en gran medida de interacciones precisas célula-célula y con la matriz extracelular (MEC) (Sanchis y col., 2012).

Se ha establecido que dicha matriz desempeña un papel clave en la arquitectura placentaria, estando constituida por osteopontina (OPN), una glicoproteína que se une a varios receptores, y el fibrinógeno, también glicoproteína pero del plasma sanguíneo, precursor de la fibrina. Es aquí donde se determinó que en ausencia de fibrinógeno, se produce una separación de la unidad feto-placentaria de la pared uterina que causa la pérdida completa de la integridad de la placenta y una hemorragia fatal, ya que la presencia de fibrinógeno en el endometrio y en el mesénquima fetal estaría relacionado a procesos de reestructuración y de neovascularización (Cristofolini A., 2010).

Otra macromolécula de la MEC placentaria, es el sistema del colágeno, con diferente localización en los tejidos embrio-maternos. Es producido por los fibroblastos, jugando un rol vital en el mantenimiento de la integridad estructural y en la determinación de la función del tejido, participando en la composición de la placenta. Aumenta durante la gestación, relacionándose esto con la remodelación estructural y la maduración fisiológica de la placenta. La abundancia de sus fibras de diferente grosor en tejido conjuntivo y miometrio, es una clara evidencia de su importancia en el soporte del sistema vascular y del sistema areola-glándula. Tanto la OPN como el fibrinógeno contribuyen en los cambios embrionarios para favorecer la adhesión al útero durante la placentación. Poseen un papel importante para equilibrar los procesos angiogénicos y mantener la disposición del tejido que asegure una preñez exitosa. Aunque las tres moléculas nombradas poseen estructuras diferentes, y por lo tanto, funciones diferentes, se ha concluido que su presencia en el embarazo resulta esencial para mantener la integridad de la placenta y permitir una nutrición adecuada de los embriones (Sanchis y col., 2012).

2.7 Proteína CD31

La proteína integral de membrana CD31 se encuentra en la superficie de plaquetas, leucocitos y en las uniones intercelulares de las células endoteliales. Dicha molécula también es conocida como PECAM-1 (molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas) y está implicada en el proceso de angiogénesis *in vivo* (Fiorimanti, 2018), teniendo una participación crítica en la neovascularización, estimulando la motilidad de la CE (célula endotelial) y estableciendo contactos de unión intercelular y de adhesión con la MEC (Cao *et. al.*, 2002; Kondo *et. al.*, 2007).

Se expresa en todos los endotelios continuos, incluidos arterias, arteriolas, venas, vénulas y capilares no sinusoidales, y es un excelente marcador de células endoteliales para la determinación de la microvasculatura placentaria porcina, permitiendo complementar los estudios de vascularización (Fiorimanti y col., 2018). Se ha establecido como el más efectivo para la detección de la micro vascularización por inmunohistoquímica en tumores mamarios de caninos (Clemente, 2010), así como también en placenta de ovinos sobrealimentados

(Carr *et. al.*, 2016). Además de facilitar la diapédesis y transmitir señales de supervivencia en la célula (Paddock *et. al.*, 2016), permite delimitar con exactitud el perímetro de los vasos sanguíneos y así, delimitar el área vascular (Fiorimanti, 2018).

De esta manera, el volumen del lecho capilar aumentará a un régimen constante de angiogénesis en la membrana alantoidea, permitiendo que el crecimiento placentario alcance su máximo al día 60 de gestación, mientras que el crecimiento fetal se producirá más rápidamente a partir del día 50 de preñez (Soraci, 2012; Bazer y Johnson., 2014).

Todos los factores antes detallados, así como sus respectivos agentes proangiogénicos resultan fundamentales en el establecimiento adecuado de una red vascular para el desarrollo y supervivencia de los fetos (Pereyra, 2015).

3. Glicobiología

La biología actual puede explicar las bases moleculares de múltiples procesos biológicos y la herramienta para estudiar todos ellos proviene de la variedad de carbohidratos de superficie que interviene en el reconocimiento entre células. Se reconoce entonces, la importancia de los *glicoconjugados*, compuestos formados por la unión entre mono, oligo o polisacáridos por un lado, y lípidos y proteínas por otro, logrando ser una gran fuente de información biológica (Gimeno y Barbeito, 2004).

Durante el desarrollo de la placenta, la composición estructural de los carbohidratos de las superficies celulares cambia drásticamente, sirviendo esto para su reconocimiento y adhesión celular (Gimeno y Barbeito, 2004; Ambrosi *et. al.*, 2005). La presencia de estos residuos de carbohidratos en la interfase materno-fetal porcina es de fundamental importancia, ya que permiten las interacciones entre los componentes fetales y maternos, dando el tipo de placenta epiteliocorial (Sanchis *et. al.*, 2005). Todos los complejos de carbohidratos presentes en el tejido placentario pueden ser reconocidos mediante lectinas, dado que son proteínas con capacidad de unirse con cierta especificidad a ellos, en forma semejante a como las inmunoglobulinas se unen a los antígenos, pero sin que medie para ello una reacción antígeno-anticuerpo (no poseen un origen inmune) (Sharon y Lis, 1989).

El término lectina, propuesto por Mendoza W. (2007), deriva del latín *legere* (seleccionado, escogido) y se refiere a la capacidad de unión selectiva que poseen azúcares particulares. Este término fue generalizado desde 1972 para todas aquellas proteínas ligadoras de azúcares y aglutinadoras de células que son encontradas en animales, vegetales y microorganismos (Sharon y Lis, 1989). Las semillas de leguminosas son particularmente fuentes ricas de lectinas (Carlini y Grossi-de-Sá, 2002).

Si bien las lectinas pueden ser glicoproteínas, la porción que une al carbohidrato es siempre peptídica. Poseen dominios especiales llamados CRD (dominio de reconocimiento de carbohidrato) con capacidad de unirse a ciertos azúcares mediante interacciones no

covalentes como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Hernandez Cruz y col., 2005).

3.1 Aplicaciones de las lectinas

Las lectinas han aportado importante información para la identificación de diferentes glicoconjugados en diversas estructuras, sean normales o patológicas (Koncurat y col., 2004), por lo cual se utilizan en técnicas bioquímicas para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática.

En histología y patología las lectinas son utilizadas para identificar oligosacáridos presentes en las glicoproteínas y glicolípidos de membranas y constituyentes celulares. En biología se han utilizado lectinas conjugadas con marcadores fluorescentes como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), para localizar y caracterizar glicoconjugados en condiciones normales y patológicas en varios tejidos (Dallar *et al.*, 2001). Permiten también detectar aglutinación de glóbulos rojos, linfocitos y células tumorales, estimular la proliferación y diferenciación linfocítica y caracterizar carbohidratos, en cortes de tejidos para microscopia óptica y electrónica, en *frotis* e improntas y de determinación cromatográfica (Gimeno y Barbeito, 2004).

Las lectinas pueden identificarse y usarse para hallar células que son difíciles de discriminar con técnicas convencionales. En casos, reemplazan a técnicas más costosas, como la inmunohistoquímica (Gimeno y Barbeito, 2004). Además, las lectinas poseen un nivel de especificidad mayor al de otras técnicas utilizadas para marcar carbohidratos, como la reacción de Schiff ácido periódico (PAS), comparable a la de aquellas técnicas basadas en uniones Ag-Ac y enzima-sustrato (Gabiús y Gabiús, 1993).

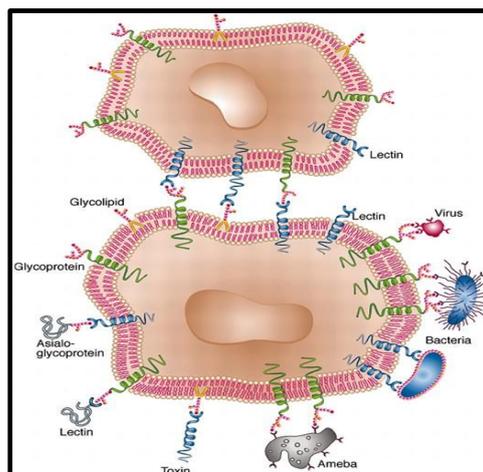


Figura N° 11: Esquema de las interacciones entre lectinas y carbohidratos en la superficie celular. Las lectinas sirven como adherentes de diferentes tipos de células, incluso virus, a otras células vía carbohidratos de la superficie celular. En algunos casos, lectinas de la superficie celular unen glicoproteínas particulares, mientras que en otros casos, carbohidratos constituyentes de glicoproteínas o glicolípidos sirven como sitios de unión para

moléculas biológicamente activas que son las lectinas. Tomado de: Sharon y Lis (2004). <https://academic.oup.com/glycob/article/14/11/53R/627369>

3.2 Tipos de lectinas

AIA (*Artocarpus integrifolia*): posee una estructura tetramérica de dos cadenas que consta de 4 protómeros idénticos, con un peso molecular de 66.000 *Da* (*daltons*). Se considera lectina específica de galactosa. (FUENTE: Laboratorio Glicomatrix. 2018 www.Glicomatrix.com).

Con-A (*Concanavalin A*): reconoce manosa con enlace α (alfa) presente como parte de un oligosacárido de 4 subunidades idénticas. Se disocia en dímeros de 52 *kDa* (*kilodaltons*). Requiere de iones Ca (calcio) y Mn (manganeso) en cada uno de sus 4 sitios de unión a sacáridos (Fuente: laboratorio VECTOR, 2018).

MAA (*Maackia amurensis*): los ácidos siálicos son de ocurrencia generalizada como componentes de las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas y glicolípidos presentes en las células y tejidos animales. Las lectinas que reconocen al ácido siálico son reactivos valiosos para la detección, el aislamiento y la caracterización de glicoconjugados que contienen azúcar (Irwin y Goldstein, 1997). MAA consiste en 2 especies moleculares, una hemaglutinina fuertemente hemoaglutinante (MAH) y una hemaglutinina fuertemente mitógena (MAL), ambas unidas por puentes disulfuro. MAA interactúa con el glicoconjugado que contiene ácido siálico y puede ser útil para el fraccionamiento de oligosacáridos sialicilados, tiene un peso de 140.000 *Da* y se une a glicoconjugados que tienen estructuras de galactosil (b1, 4) N-acetil glucosamina. (Fuente: Laboratorio MyBioSurce 2018. www.MyBioSurce.com).

PHA-E (*Phaseolus vulgaris*): nombre que se le atribuye a una familia de lectinas, cada una de las cuáles consta de 4 subunidades. Hay 2 tipos diferentes de subunidades, una parece estar involucrada principalmente en la aglutinación de glóbulos rojos y ha sido designada como subunidad “E” (para la eritroglutinina). El otro tipo está involucrado en aglutinación de linfocitos y en la actividad mitógena y se ha determinado como subunidad “L” (para la leucoaglutinina). Estas subunidades se combinan para producir 5 isolectinas. PHA-E posee una fuerte afinidad hemoaglutinante pero es un mitógeno pobre (Fuente: laboratorio VECTOR, 2018).

PSA (*Pisum sativum*): lectina con especificidad por los oligosacáridos que contiene manosa con enlace α , con un residuo de α -fucosa unido a acetilquitobiosa incluido en el

sector del receptor. Se utiliza para fraccionar células, para aislar glicoproteínas y glicolípidos, distinguir entre células normales y viralmente transformadas (Fuente: Laboratorio VECTOR, 2018).

Ulex europaeus (UEA): aglutinina que reacciona con las proteínas séricas, útil para el marcaje de endotelios vasculares. Tiene especificidad de grupos sanguíneos y existen dos tipos: UEA-I que tiene especificidad por L-fucosa con enlace α y UEA-II que tiene afinidad por la N-acetilquitobiosa (Fuente: Laboratorio VECTOR, 2018).

HIPÓTESIS

Dado el tipo de placenta que poseen los porcinos, el estudio de los vasos sanguíneos placentarios y la remodelación celular placentaria durante el inicio, la mitad y el fin de la gestación, permitirá comprender y evaluar el rol de la angiogénesis a lo largo de la placentación porcina, proceso indispensable para el correcto intercambio metabólico materno-embriionario, permitiendo el crecimiento fetal y placentario.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este plan es estudiar la estructura vascular placentaria, a través de tinciones diferenciales, inmunohistoquímica y lectinhistoquímica a lo largo de la gestación en porcinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la morfología tisular y vascular por microscopía óptica convencional y microscopía óptica de alta resolución (MOAR), en cortes de placentas provenientes de gestaciones de 30, 60 y 114 días.
- Inmunomarcas las células endoteliales a través de la localización de CD31 en los períodos gestacionales seleccionados.
- Marcar las células endoteliales con *Ulex europaeus* a los 30, 60 y 114 días de gestación, por lectinhistoquímica.
- Analizar por morfometría, el número y el área vascular en los períodos gestacionales estudiados.
- Determinar el patrón de glicosilación en los vasos sanguíneos placentarios, a través de la marcación con AIA, Con-A, MAA, PHA-E y PSA por lectinhistoquímica, en los diferentes estadios seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Obtención de tractos reproductivos y placentas

Las placentas de 30, 60 y 114 días de preñez (n=5 de cada período) fueron obtenidas de cerdas mestizas destinadas a faena de frigoríficos y criaderos porcinos de la zona de Río Cuarto. En todos los casos, el tracto reproductivo se removió inmediatamente después de la muerte del animal y se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco, USA), conteniendo 10.000 U/mL de penicilina G sódica, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina y 2,5 µg/mL de fungizona (Gibco, USA), manteniéndolo a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Se detectó la ubicación de los embriones/fetos y se realizó una incisión por el borde anti-mesometrial de los cuernos uterinos, para observar el sitio de implantación y recoger muestras del tejido mesometrial endometrial y placentario fetal, en formol tamponado al 10 % y en glutaraldehído al 2,5 %. Se estimó la edad gestacional de las placentas de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los embriones y/o fetos obtenidos de cada cerda gestante (Marrable, 1971).

B. Análisis de estructura

B.1 Técnicas utilizadas para el procesamiento de placentas

B.1.1 Técnica de histología convencional para microscopía óptica.

Se tomaron porciones de tejido placentario de 6 mm³ aproximadamente, y se fijaron con formol salino tamponado al 10 %. Posteriormente, se deshidrataron con baterías de alcoholes de graduación creciente atemperado a 38-40 °C (3 veces por alcohol 96 % y 2 veces por alcohol absoluto, 15 minutos cada uno de los lavados), para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 4-5 µm, parte de los mismos se tiñeron con hematoxilina eosina y tricrómica de Gallego para el reconocimiento de estructuras tisulares. El resto de los cortes se destinaron para los ensayos de inmunohistoquímica y lectinhistoquímica.

B.1.2 Preparación de solución tamponada fosfato de Sörensen (PBS)

0,1 M pH 7,4.

Para la obtención de formol tamponado al 10 % y para la rehidratación del tejido placentario antes de las respectivas tinciones, se utilizó la solución PBS de Sörensen, preparada de la siguiente manera:

Solución A: Na₂HPO₄·H₂O. 35,61g/1000 mL

Solución B: NaH₂PO₄.H₂O 27,60g/1000 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.

B.1.3 Tratamiento para tejidos incluidos en parafina.

Los cortes histológicos de 4-5 μ m fueron montados de a 3-4 cortes sobre portaobjetos de vidrio. Previo al montaje, los cortes fueron pasados por un recipiente con agua destilada a 45 °C durante 10 minutos, para evitar plegamientos de los mismos. Los portaobjetos con los cortes se colocaron sobre una plancha termostatzada a 40 °C durante 15 hs y se guardaron toda la noche a 37 °C en estufa, para lograr el secado completo de los mismos. Previo a las diferentes coloraciones, los tejidos fueron desparafinados y rehidratados mediante el siguiente protocolo:

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

B.1.4 Tinción de Hematoxilina Eosina (Clark, 1981)

a) Se prepararon las siguientes soluciones:

a.1) Soluciones stock para preparar hematoxilina

- Hematoxilina al 10 % en etanol 95 % o etanol absoluto.
- Alumbre de sodio, de potasio o de amonio al 4 %.
- IO₃Na al 0,1 %.

a.2) Solución de trabajo de hematoxilina

- Hematoxilina al 10 %: 1 mL.
- Alumbre de sodio, de potasio o de amonio al 4 %: 40 mL.
- IO₃Na al 0,1 %: 4.5 mL.
- Agua destilada: 100 mL.

Una vez mezcladas las soluciones, se dejó reposar y luego se filtró.

b.1) Solución stock para preparar eosina

- Eosina: 1g.
- Etanol al 70 %: 99 mL.

b.2) Solución de trabajo de eosina

- Solución stock: 1 mL.
- Agua destilada 15 mL.

Una vez mezcladas las soluciones, se dejó reposar y luego se filtró.

Los cortes histológicos obtenidos en el punto B.1.1 fueron desparafinados en 2 pasajes por xilol de 15 minutos cada uno, posteriormente se rehidrataron con batería de alcoholes de graduación decreciente de 5 minutos cada uno, luego se lavaron 2 veces en agua destilada (10 minutos cada uno) y 2 veces en tampón fosfato salino (PBS) (10 minutos cada uno). Posteriormente se coloreó con la solución de trabajo de hematoxilina de 2 a 3 minutos y se lavó durante 5 minutos con agua corriente. Luego se coloreó con la solución de hematoxilina-eosina de 2-3 minutos y se lavó, nuevamente, 5 minutos con agua corriente. Finalmente, los cortes de tejidos placentarios fueron deshidratados y montados en Entellan (Merk, Alemania). La observación se realizó a través de un microscopio electrónico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania), las imágenes se adquirieron mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón), adosada al microscopio.

La hematoxilina es un colorante catiónico y la eosina es un colorante aniónico, ambos pertenecen a la familia de los xantenos (compuestos heterocíclicos formado por tres anillos aromáticos). Con la tinción de hematoxilina-eosina se observa la cromatina nuclear y los compuestos basófilos teñidos de azul, mientras que, el citoplasma, el colágeno y los componentes acidófilos se tiñen de fucsia; los glóbulos rojos se observan en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

B.1.5 Tinción tricrómica de Gallego

En esta tinción se agregó la solución de trabajo de hematoxilina férrica de Weigert recién preparada sobre los cortes histológicos durante 6 minutos y luego de ese tiempo, se lavó con agua corriente. Seguidamente, se colocó el mordiente por 30 segundos y se enjuagó con agua. Luego se tiñó con una solución de trabajo recién preparada de carbol-fucsina por 5 minutos y se enjuagó nuevamente con agua. Se colocó nuevamente un mordiente por 2 minutos y se volvió a enjuagar con agua. A continuación, se tiñó con solución de azul de anilina-ácido pícrico por 1 minuto. Posteriormente, se procedió a enjuagar en solución de ácido acético 0,1 %. Finalmente, los cortes fueron deshidratados y montados.

A través de esta tinción el colágeno y las fibras reticulares adquieren una coloración azul profundo. El tejido muscular se torna de verdoso a anaranjado amarillento, mientras que el tejido cartilaginoso, se colorea de púrpura a violeta. Por otro lado, el tejido conectivo se

tiñe de azul violeta. El citoplasma, toma un color verde oliva a marrón y las fibras elásticas, se tiñen de púrpura a rojo (Bartholomew *et. al.*, 1981).

La deshidratación final de los portaobjetos se realizó mediante pasajes en alcoholes de graduación creciente (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) y dos pasajes en xilol 100 % durante 5 minutos cada uno. Luego se procedió al montaje con medio Entellan (Merk, Alemania) y se colocaron en cubreobjetos. Finalmente las imágenes fueron adquiridas con una cámara Canon Powershot G6 7.1 megapixels (Canon, Japón) adosada a un microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania).

B.2. Técnica para Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR)

Las muestras de tejido placentario fijadas en glutaraldehído al 2,5 % en solución salina tamponada (PBS) (0,1 M, pH 7,4), fueron procesadas para el estudio de la estructura placentaria por microscopía óptica de alta resolución (MOAR). Luego de la fijación durante 3 horas a 4 °C, las muestras se lavaron dos veces con PBS, 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 (1 pasaje en acetona 30 %, 50 %, 70 % y 90 % durante 15 minutos cada uno) y 3 pasajes en acetona 100 % durante 15 minutos. Se procedió 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 ($\pm 0,25 \mu\text{m}$) los que se colocaron sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con azul de toluidina sobre una platina termostaticada, para permitir la entrada del colorante al tejido incluido en la resina. Los cortes semifinos se montaron con Entellan (Merck, Alemania) para ser observados con un microscopio Axiophot (Zeiss, Alemania), la adquisición de imágenes se realizó a través de la cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón), adosada al microscopio.

B.3. Estudio de vasos sanguíneos

B.3.1. Inmunohistoquímica para la marcación de células endoteliales mediante CD31.

Los portaobjetos se colocaron en coplin de plástico, llenos con solución tamponada de citrato 10 mM, pH 6, para la recuperación antigénica en microondas durante 15 minutos. Los cortes se trataron con peróxido de hidrógeno al 3 % en PBS durante 20 minutos. Los anticuerpos inespecíficos se bloquearon con suero de caballo (1/1000 PBS: 50 μL de suero

puro + 5 mL PBS), durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el primer anticuerpo anti-CD31, diluido 1/100 (ab28364, Abcam, Reino Unido) *over-night* en cámara húmeda a 4 °C. Posteriormente, como anticuerpo secundario se empleó el equipo comercial Polivalent Biotinylated Link YELLOW- pool de segundos anticuerpos-biotinilados anti-rabbit, anti-mouse, (HiDef Detection TM HRP Polymer System Cell Marque, USA). Se incubaron con solución cromógena (diaminobenzidina: DAB) (DAB Cell Marque, USA) y se tiñeron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y montaron con Entellan (Merck, Alemania) para ser observados con un microscopio Axiophot (Zeiss, Alemania). La adquisición de imágenes se realizó a través de la cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón), adosada al microscopio, y el análisis digital de las mismas, mediante el software AxioVision Release 4.6.3 (Zeiss, Alemania).

B.3.2. Lectinohistoquímica para la marcación de células endoteliales mediante la lectina *Ulex europaeus* (UEA).

La marcación del residuo glicosilado L-fucosa se realizó sobre los cortes placentarios obtenidos en el punto *B.1*, a través de una lectinohistoquímica por fluorescencia directa. Se utilizó la lectina *Ulex europaeus* conjugada con FITC, dilución de trabajo 1/50 (Laboratory film –American National TM, USA), incubando en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se realizaron dos lavados con abundante PBS a temperatura ambiente, manteniéndolos en oscuridad. Se observaron con un microscopio epifluorescente Axiophot (Zeiss, Alemania), la adquisición de imágenes se realizó a través de la cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón), adosada al microscopio y el análisis digital de las mismas, mediante el software AxioVision Release 4.6.3 (Zeiss, Alemania).

B.3.3. Análisis morfométrico de los vasos sanguíneos

Para el análisis vascular por morfometría se adquirieron imágenes mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss), provenientes de la inmunohistoquímica para CD31 y de la lectinohistoquímica de UEA. Se evaluaron 5 imágenes al azar de cada placenta por período gestacional estudiado. El análisis de las variables morfométricas, como el área total de tejido (AT) y número de vasos por unidad de área (NVA) se determinaron a través de la utilización del software Axiovision Release 4.6.3 (Zeiss, Alemania).

B.3.4. Lectinohistoquímica para la determinación del patrón de glicosilación en vasos sanguíneos mediante las lectinas AIA, MAA, Con-A, PHA-E y PSA.

Para la determinación del patrón de glicosilación en la placenta porcina durante la gestación, se utilizó una lectinohistoquímica por fluorescencia directa utilizando el siguiente panel de 5 lectinas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (EY Laboratories®, USA y SIGMA®, USA): Artocarpus integrifolia (AIA), Concanavalin-A (Con- A), Maackia amurensis (MAA), Pisum sativum (PSA) y Phaseolus vulgaris (PHA-E).

Tabla I: Lectinas empleadas y algunas de sus propiedades: acrónimo, nombre, fuente y especificidad de unión.

Acrónimo	Nombre	Fuente	Especificidad
AIA	Artocarpus integrifolia	Semillas de A. integrifolia	α -Galactosa
Con-A	Concanavalin-A	Semillas de Canavalia ensiformis	α -Manosa, α -Glucosa
MAA	Maackia amurensis	Semillas de M. amurensis	Ácido siálico
PHA-E	Phaseolus vulgaris (eritroglutinina)	Judías	Oligosacáridos
PSA	Pisum sativum	Guisantes	α -Manosa

Las lectinas empleadas pertenecen a dos marcas diferentes: EY Laboratories (MAA, PHA-E y AIA) y SIGMA (PSA y Con-A), ambas procedentes de USA. Las lectinas fluoresceinadas se diluyeron a 1 mg/mL de agua destilada. Se alicuotaron de a 100 μ L en ependorf y se mantuvieron a -20 °C, envueltas en papel de aluminio para preservarlas de la luz. La concentración de trabajo elegida fue de 100 μ g/mL. El tejido placentario fue incubado en cámara húmeda colocando 100 μ L de la lectina conjugada con FITC sobre el tejido y cubriendo los mismos con parafilm “M” (Laboratory film-American National, USA) para que no quedaran burbujas y lograr la homogeneización de la lectina sobre el corte. La humedad requerida en la cámara se consiguió mediante colocación en la misma de papel de filtro embebido en PBS. Se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, para evitar la pérdida de fluorescencia debido al estímulo de la luz. Los cortes fueron lavados con abundante PBS a temperatura ambiente, manteniéndolos en oscuridad.

B.3.5 Semicuantificación

La observación de los ensayos lectinohistoquímicos se efectuó a través de un microscopio epifluorescente Axiophot (Zeiss, Alemania), adquiriendo las imágenes mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón), adosada al mismo.

Los resultados de la técnica de marcación con glicoconjugados se expresaron en forma semicualitativa en función de una escala elegida por la intensidad de la fluoresceína detectada, determinando que: 3 (+++) fluorescencia cuantiosa, 2 (++) fluorescencia abundante, 1 (+) fluorescencia positiva y 0 (-) fluorescencia negativa. Además, se determinó la distribución de la intensidad de marcación de las moléculas, a través del valor de High Score (Sanchis *et. al.*, 2015). Se definió High Score como:

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

Dónde:

i: intensidad de marcación.

P_i: porcentaje de células para cada intensidad de marcación.

C. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el software estadístico InfoStat versión 2018e (Di Rienzo y col, 2018), para evaluar la dependencia de las moléculas analizadas con respecto a los estadios gestacionales estudiados. Se realizó un ANOVA y una comparación *a posteriori* con el test LSD Fisher. Cuando los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza no se cumplían, un test *a posteriori* no paramétrico Kruskal Wallis fue utilizado. El mismo método fue aplicado para analizar estadísticamente el número de vasos por unidad de área y el área vascular de acuerdo al periodo gestacional evaluado.

RESULTADOS

A. Análisis de la estructura placentaria

A.1 Estudio macroscópico

A continuación se muestra la imagen de un tracto reproductivo, correspondiente a una cerda gestante de ± 30 días de preñez (Figura N° 12). En el mismo se observan los ovarios y cuernos uterinos.

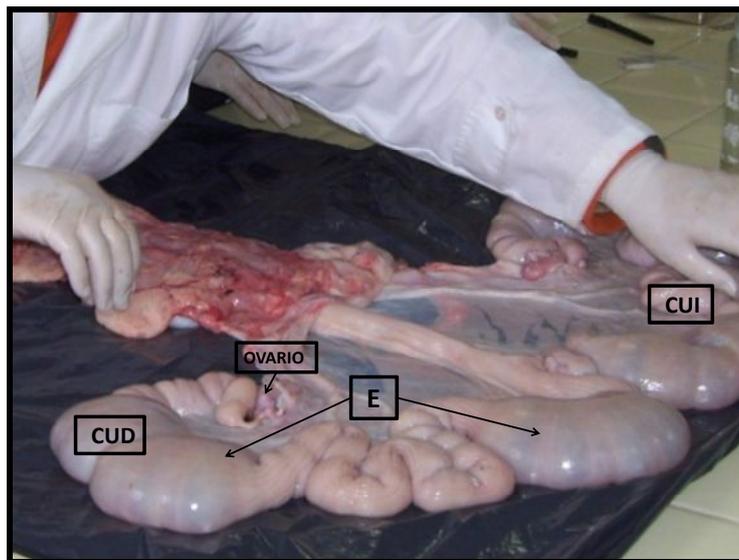


Figura N° 12: Tracto reproductivo de una cerda de ± 30 días de gestación. Se observan embriones (E), ovarios (O), y cuernos uterinos derecho (CUD) e izquierdo (CUI).

En la Figura N° 13 se aprecia un *conceptus* porcino de 29,7 cm de longitud céfalo-caudal, coincidente con una gestación de alrededor de 30 días. El mismo se encuentra contenido en el saco amniótico y rodeado por la membrana corionlantoidea. Posee una extensa red vascular que proporciona nutrición hemotrófica al feto a través de numerosos vasos sanguíneos, que se desarrollan desde y hacia el interior del saco amniótico.

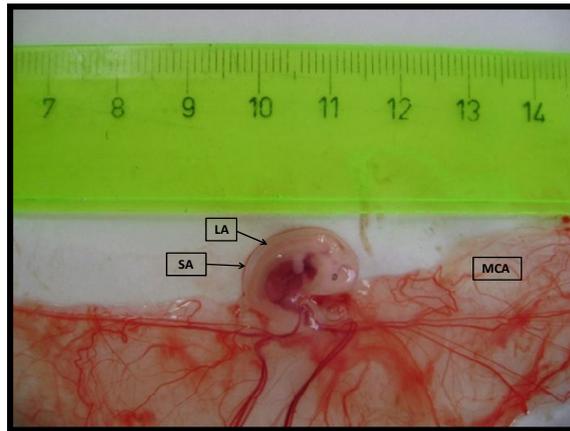


Figura N° 13: *Conceptus* de \pm 30 días de gestación. **MCA:** membrana corionlantoidea; **SA:** saco amniótico; **LA:** líquido amniótico.

A.2 Estudio microscópico

A través del empleo de tinciones diferenciales, como hematoxilina-eosina y tricrómica de Gallego, fue posible analizar las estructuras de tejidos placentarios porcinos de los diferentes estadios gestacionales. El protocolo que se utilizó se detalla en el punto B.1 de Materiales y Métodos.

A.3 Estudio con tinción de hematoxilina-eosina

A continuación, se muestra la figura N° 14 (A y B), la cual corresponde a una placenta de 30 días de gestación aproximadamente, coloreada con hematoxilina-eosina.

En dicho preparado se puede observar el endometrio cargado de glándulas y vasos sanguíneos. En la imagen inferior, y con mayor aumento, se logra obtener el detalle de uno de dichos vasos, siendo éste una arteriola, caracterizada por poseer una pared conformada por el endotelio que contacta con el contenido (sangre), una capa media, conformado por fibras musculares lisas, y una capa externa, adventicia, compuesta por fibras colágenas, elásticas y fibroblastos.

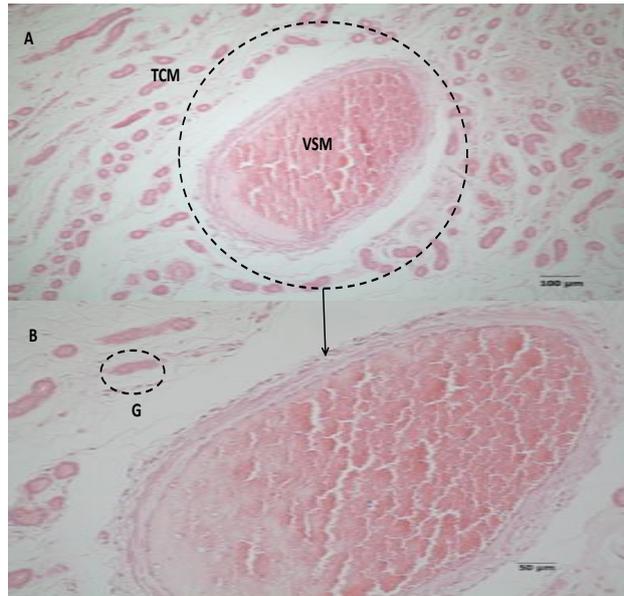


Figura N° 14 A) y B): Corte histológico de una placenta porcina de \pm 30 días de gestación, coloreada con hematoxilina eosina A): 100x; B): 200x. **VSM:** vaso sanguíneo materno (vénula). **TCM:** tejido conectivo materno. **G:** glándula.

En la Figura N° 15 se observa un corte de una placenta de 60 días de gestación aproximadamente, coloreada con la tinción de hematoxilina-eosina. En dicho tejido se pueden observar los pliegues de la membrana corionalantoidea que se interdigitan con los pliegues uterinos, conformando las vellosidades placentarias como parte de la interfase materno-fetal.

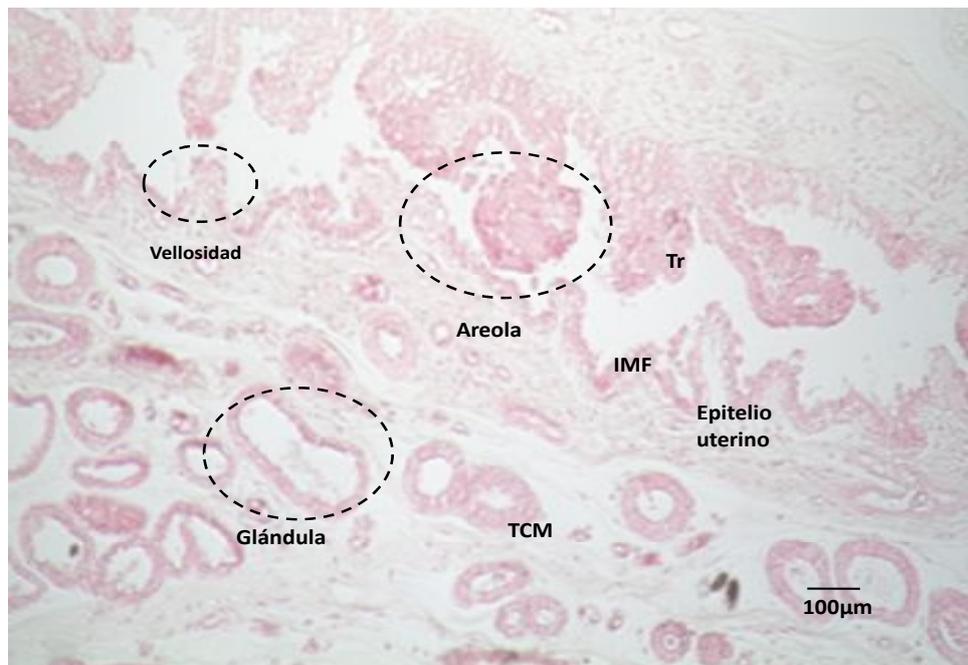


Figura N° 15: Corte histológico de una placenta porcina de \pm 60 días de gestación, coloreada con hematoxilina-eosina (200x). **IMF:** interfase materno-fetal; **Tr:** trofoblasto; **TCM:** tejido conectivo materno.

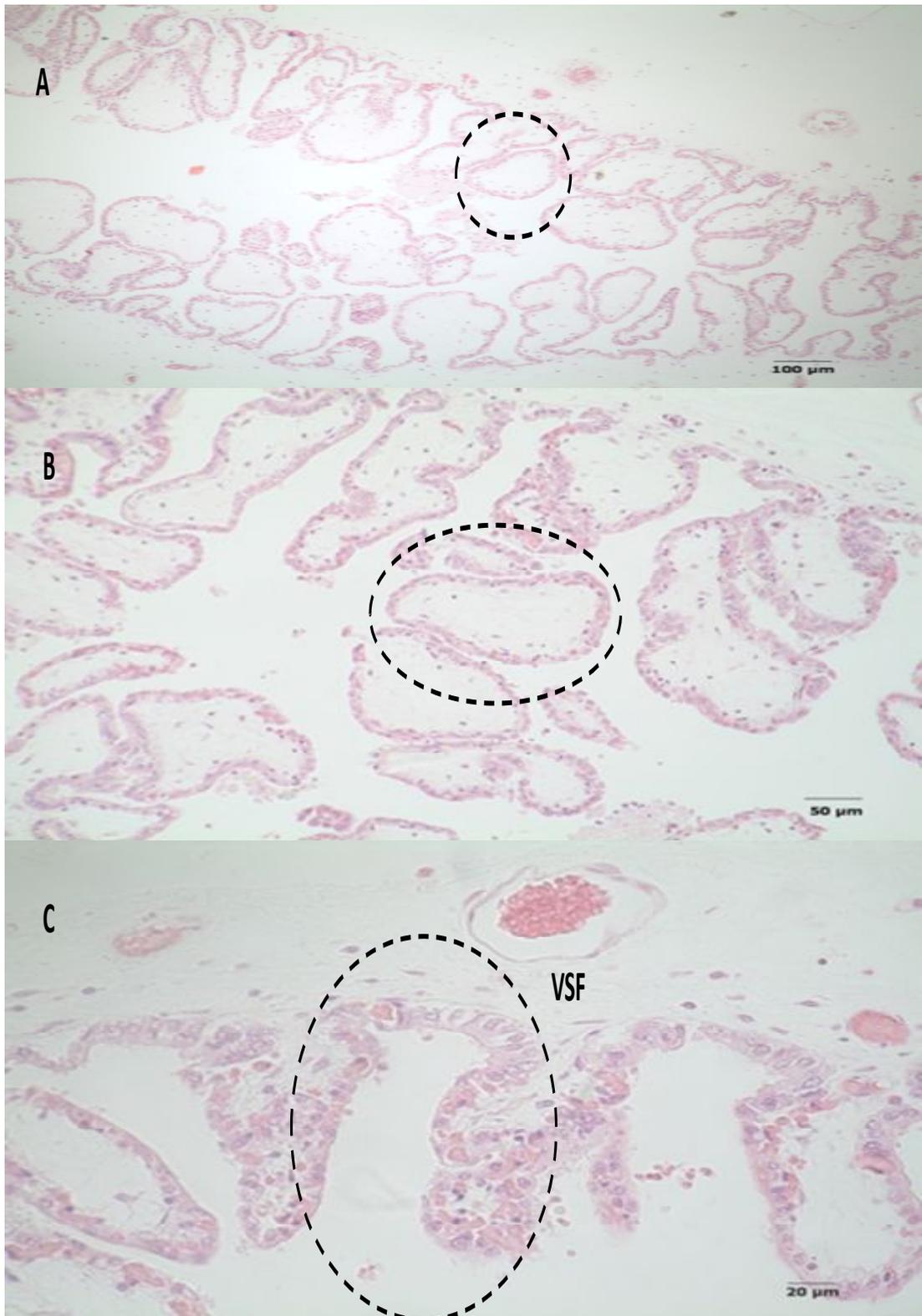


Figura N° 16 A), B) y C): Corte transversal de vellosidades en placenta de 114 días de gestación.
A) 100x, B) 200x y C) 400x. **VSF:** vaso sanguíneo fetal.

A.4 Estudio con tinción tricrómica de Gallego

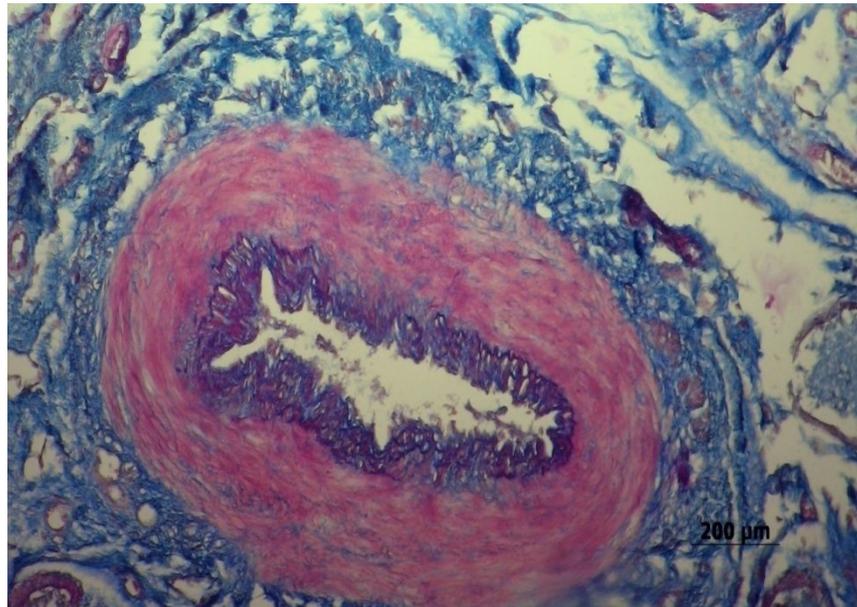


Figura N° 17: Imagen de tejido placentario porcino a los 60 días de gestación, coloreado con tinción tricrómica de Gallego. Se observa un vaso sanguíneo (arteriola) a un aumento de 100x, con sus capas correspondientes: interna (endotelio), media (muscular), y externa (adventicia).

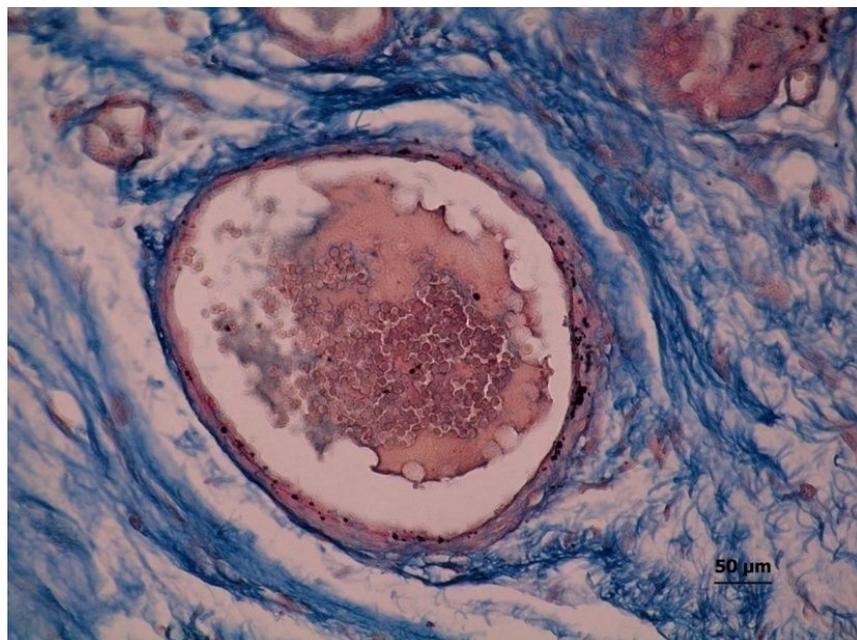


Figura N° 18: Imagen de tejido placentario porcino a los 114 días de gestación, coloreado con tinción tricrómica de Gallego. Se observa un vaso sanguíneo (vénula) a un aumento de 400x, con sus capas correspondientes: interna (endotelio), media (muscular), y externa (adventicia).

A.5 Estudio por microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

Se utilizaron cortes semifinos para el estudio de la estructura de la placenta por microscopía óptica de alta resolución, que permitió la visualización con mayor detalle de diversas estructuras celulares placentarias.

En la Figura N° 19 se observan vasos sanguíneos en un corte de 30 días de gestación aproximadamente, con contenido eritrocitario abundante y bien marcado. En el epitelio trofoblástico se observan células grandes, con marcados nucléolos. Se evidencian gran cantidad de gránulos citoplasmáticos en la cara apical de las células del epitelio uterino, mostrando una gran actividad lisosomal.

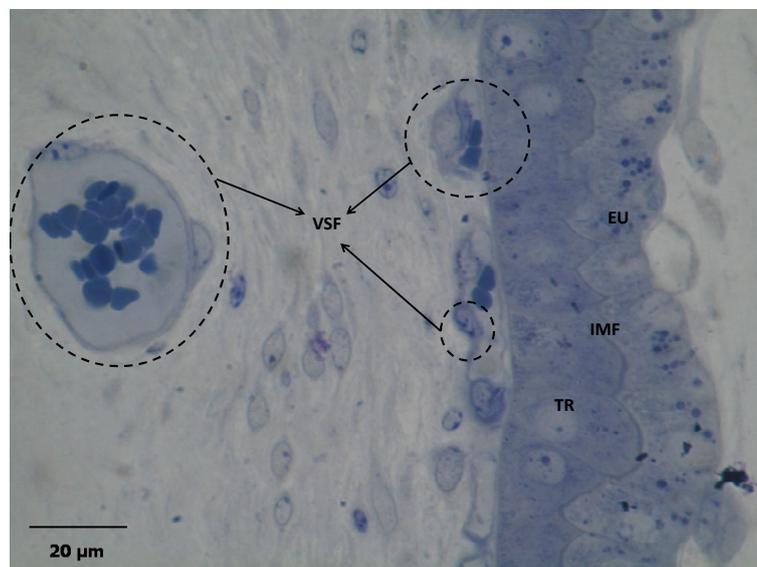


Figura N° 19: Imagen de corte semifino de tejido placentario porcino de \pm 30 días de gestación, observado por MOAR (1000x). **IMF:** interfase materno-fetal; **EU:** epitelio uterino; **VSF:** vasos sanguíneos fetales; **TR:** trofoblasto.

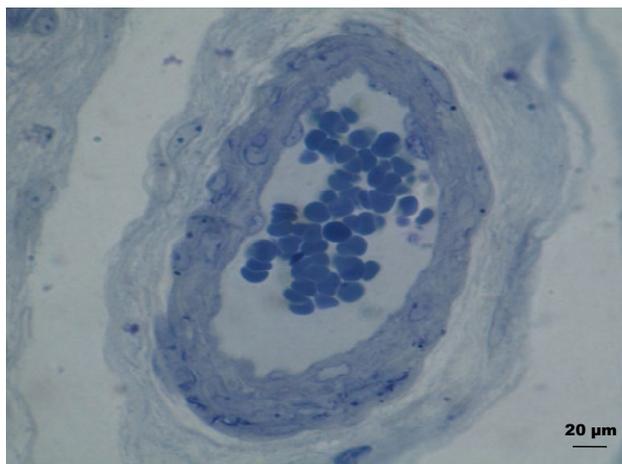


Figura N° 20: Imagen de tejido placentario de \pm 60 días de gestación, observado por MOAR (1000x). Se detectó un vaso sanguíneo fetal, con su pared y contenido.

En la Figura N°21 A y B, se muestra un tejido placentario de \pm 114 días de gestación. Debe tenerse en cuenta que estas muestras pertenecen a cerdas paridas, por lo que solo se cuenta con el componente fetal.

A medida que avanza la preñez, los vasos sanguíneos fetales aumentan tanto en tamaño como en número, disponiéndose muy cerca del epitelio para disminuir la distancia con los vasos sanguíneos maternos. Es posible visualizar el contenido eritrocitario en el interior de ellos.

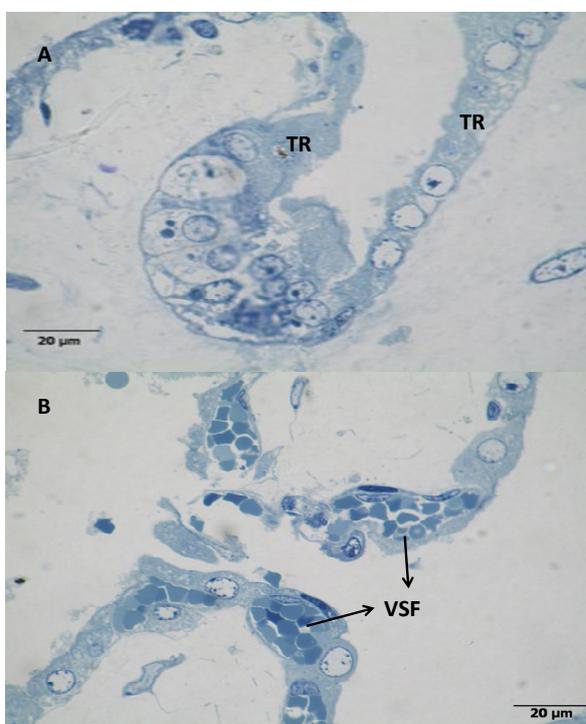


Figura N° 21 A) y B): Cortes semifinos de tejido placentario de \pm 114 días de gestación, correspondiente al tejido fetal, observada por MOAR (1000x). Se aprecia la proximidad de los vasos sanguíneos al epitelio trofoblástico. **TR:** trofoblasto; **VSF:** vasos sanguíneos fetales.

A.6 Determinación inmunohistoquímica de CD31

Para poder visualizar con mayor detalle el endotelio de los vasos sanguíneos, y así determinar el área y número vascular en el tejido placentario a través del software AxioVision Release 4.6.3., se realizó la inmunomarcación de CD31 (Figura N° 22).

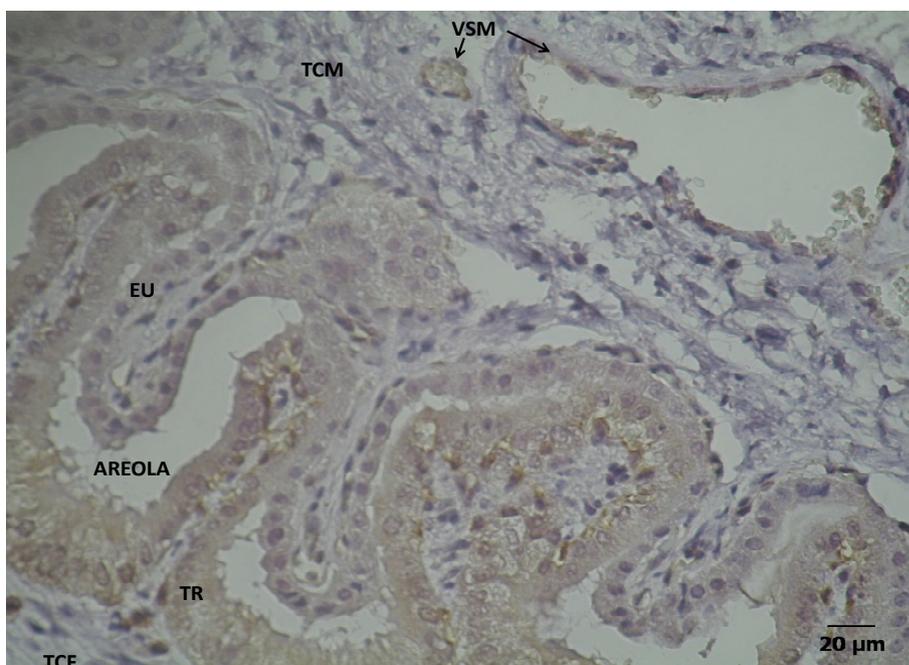


Figura N° 22: Inmunomarcación de CD31 en tejido placentario de 30 días de gestación, contrastado con hematoxilina-eosina (400x). EU: epitelio uterino; TR: trofoblasto; TCF: tejido conectivo fetal; TCM: tejido conectivo materno; VSM: vasos sanguíneos maternos. Se pudieron observar vasos de diferente calibre, los más pequeños son arteriolas, vénulas y capilares, y los más grandes, venas y arterias.

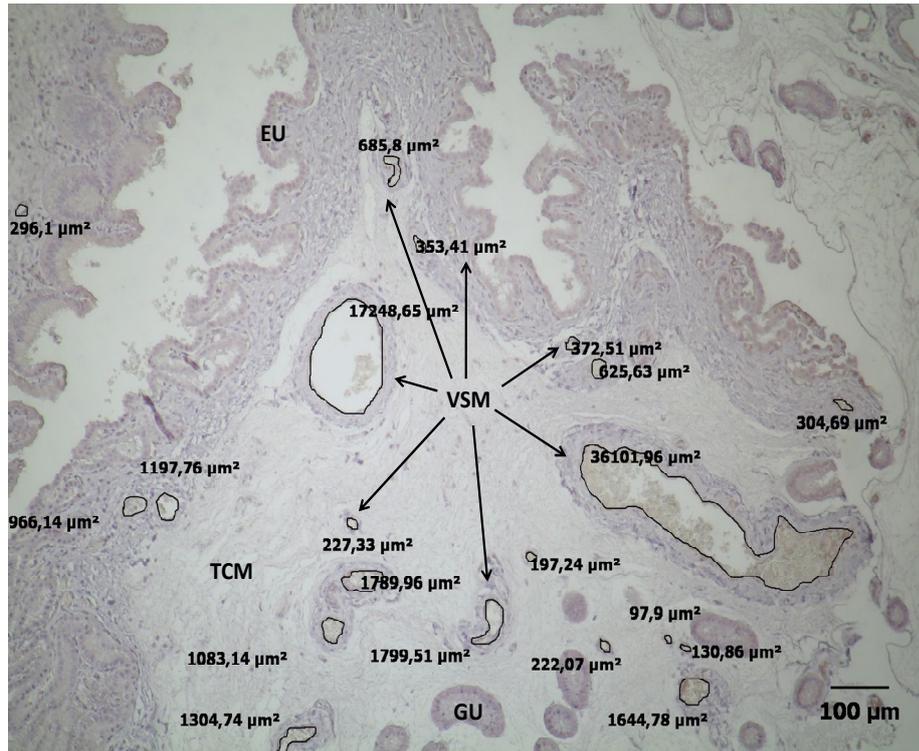


Figura N° 23: Localización de vasos sanguíneos en tejido placentario de 30 días de gestación, a través de inmunomarcación con CD31 (100x). Se aplicó el análisis histomorfométrico realizado a través del Software Axiovision Release 4.6.3.

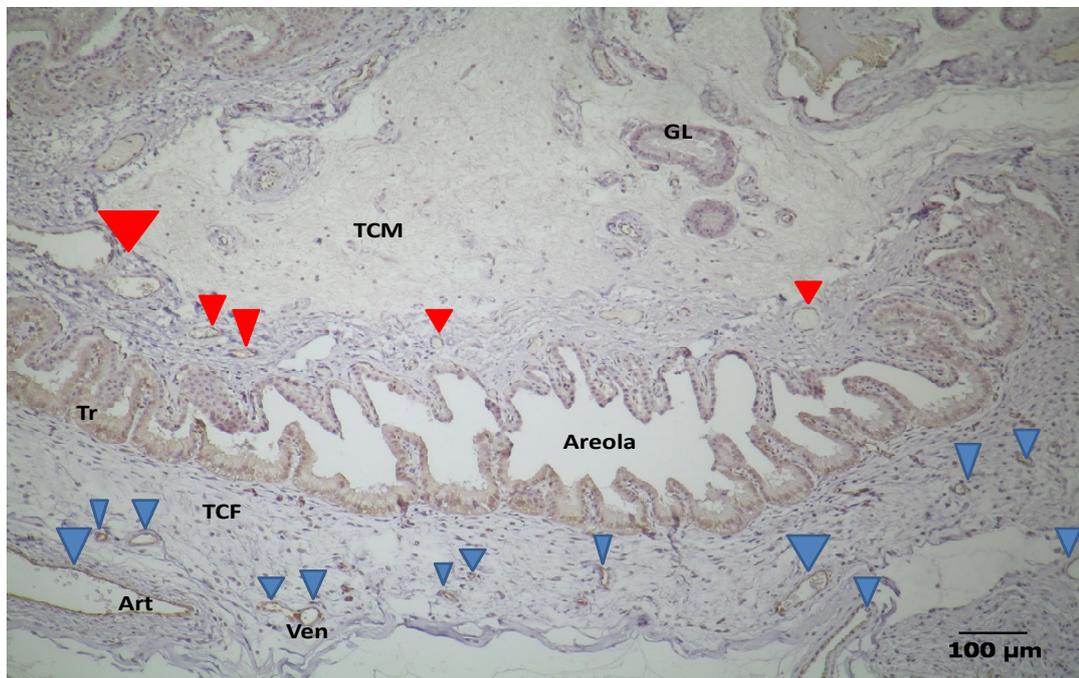


Figura N° 24: Inmunomarcación de CD31 en tejido placentario de 30 días de gestación, revelado con la tinción de hematoxilina-eosina (100x). **TCM:** tejido conectivo materno; **GL:** glándulas uterinas; **Tr:** trofoblasto; **TCF:** tejido conectivo fetal; **Art:** arteriola; **Ven:** vénula. Se puede observar cómo los vasos sanguíneos pequeños se disponen cerca del epitelio trofoblástico (flechas azules), e inmediatamente después del epitelio uterino (flechas rojas).

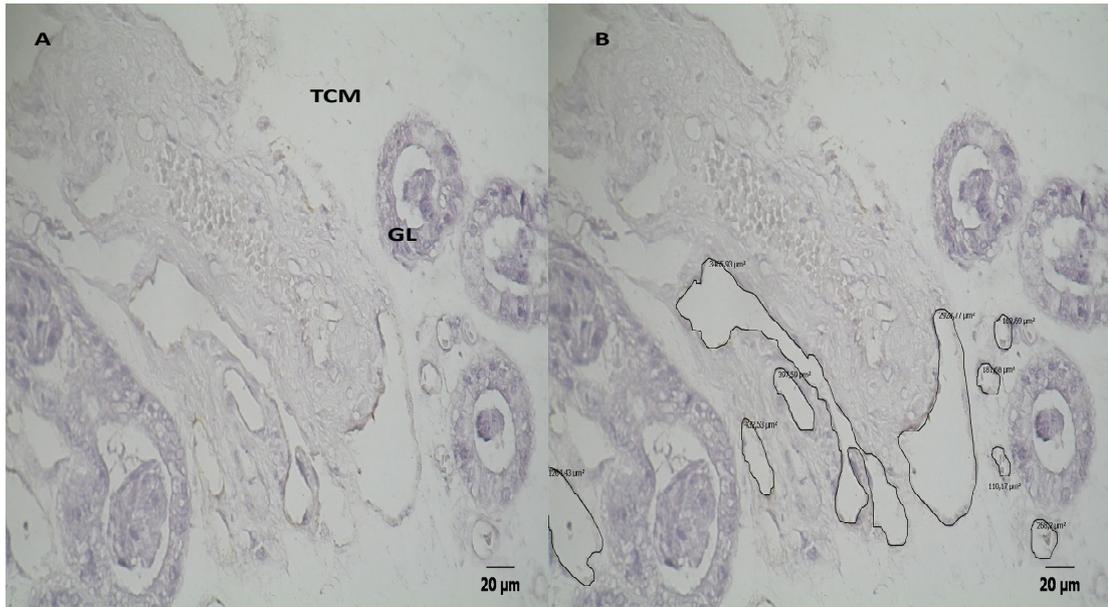


Figura N° 25 A) y B): Inmunomarcación de CD31 en tejido placentario de 60 días de gestación (400x). **TCM:** tejido conectivo materno; **GL:** glándula uterina. **A):** tinción con CD31; **B):** análisis histomorfométrico del tejido placentario

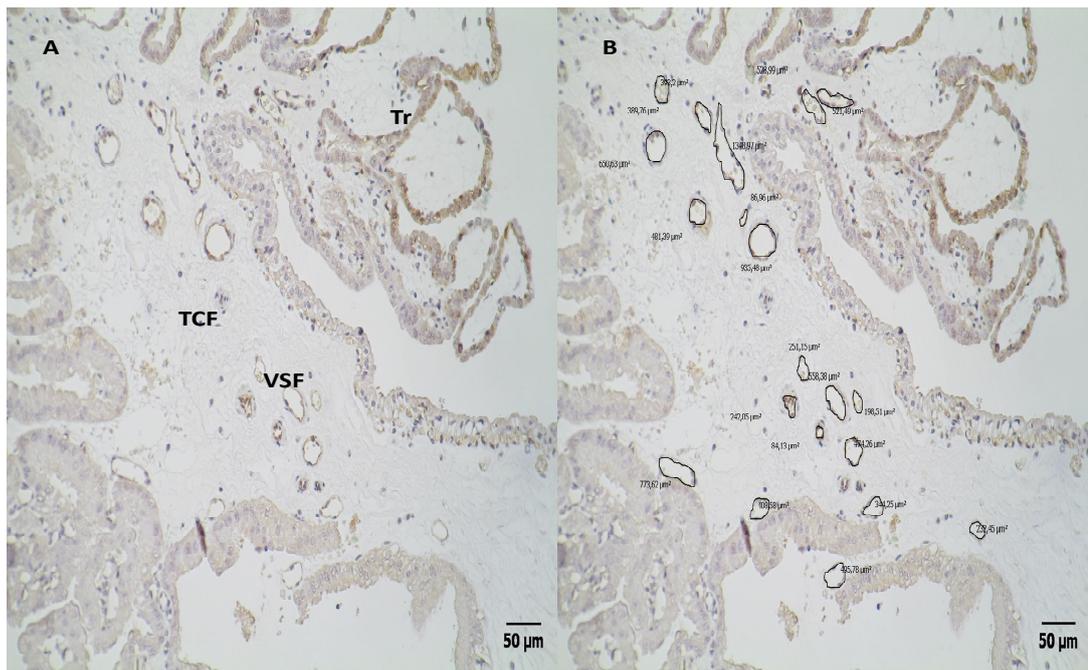


Figura N° 26 A) y B): Inmunomarcación de CD31 (200x). **A)** tejido placentario de 114 días de gestación. **B)** análisis histomorfométrico de los vasos sanguíneos.

A través de la inmunomarcación con CD31 se pudo realizar análisis morfométrico de los vasos sanguíneos de la misma forma que con las tinciones diferenciales de hematoxilina-eosina y tricrómica de Gallego, obteniendo grandes diferencias con estas últimas técnicas, especialmente al inicio y al final del período gestacional.

El Software AxioVision Release 4.6.3 permitió hacer el conteo y medición del área de los vasos sanguíneos. El número de vasos sanguíneos detectados por CD31 para el período temprano de 30 días de gestación presentó una media de 50,60 y de 17,80 para el último período.

Tabla II. Número de vasos sanguíneos por periodo de gestación inmunomarcado con CD31.

N° de vasos/período de gestación	Media	DE	Mín.	Máx.
Temprano (30 días)	50,60	3,36	47,00	54,00
Medio (60 días)	17,00	9,11	8,00	29,00
Tardío (114 días)	17,80	5,81	11,00	27,00

DE: desvío estándar.

Del área vascular determinada con CD31, la mayor media se obtuvo para el período final de la gestación, con un valor de $1397,17 \mu\text{m}^2$, pero no mostrando demasiada diferencia con los dos períodos anteriores. El valor mínimo de área de vasos sanguíneos también se detectó a los 114 días, con una medida de $73,08 \mu\text{m}^2$, y el mayor valor, a los 60 días, con $88.80 \mu\text{m}^2$. Dichos resultados se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Área vascular por periodo de gestación, inmunomarcado con CD31.

Área vascular/ período de gestación	Media	DE	Mín.	Máx.
Temprano (30 días)	$1230,75 \mu^2$	$3554,77\mu^2$	$88,80\mu^2$	$23297,71\mu^2$
Medio (60 días)	$980,04 \mu^2$	$4784,35\mu^2$	$77,98\mu^2$	$42752,46\mu^2$
Tardío (114 días)	$1397,17\mu^2$	$4677,37\mu^2$	$73,08\mu^2$	$37461,14\mu^2$

La gran utilidad que presenta la inmunomarcación de CD31, es que permite delimitar vasculatura mucho más pequeña de manera más precisa. Así, la molécula CD31 se convirtió en una de las herramientas más útiles para el análisis morfométrico, ya que comparándola con las tinciones convencionales, los desvíos estándares con CD31 en la

mayoría de los casos fueron menores, demostrando lo eficaz de la técnica para delimitar las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

A.7 *Ulex europaeus* (UEA)

Los vasos sanguíneos de la placenta fetal, presentaron una marcación endotelial negativa (0) para Ulex a los 40 días de gestación, pero positiva (1) a los 60 y 114 días. Por parte del contenido de éstos, no se observó marcación (0) en los dos primeros períodos, pero sí fue positiva a abundante (1/2) hacia el final de la preñez.

Los vasos sanguíneos de la placenta materna presentaron un endotelio marcado positivamente (1) con esta lectina en el primer y segundo período estudiado. El contenido vascular se mostró positivo a abundante (1) en el primer período y positivo (1) en el período medio de gestación.

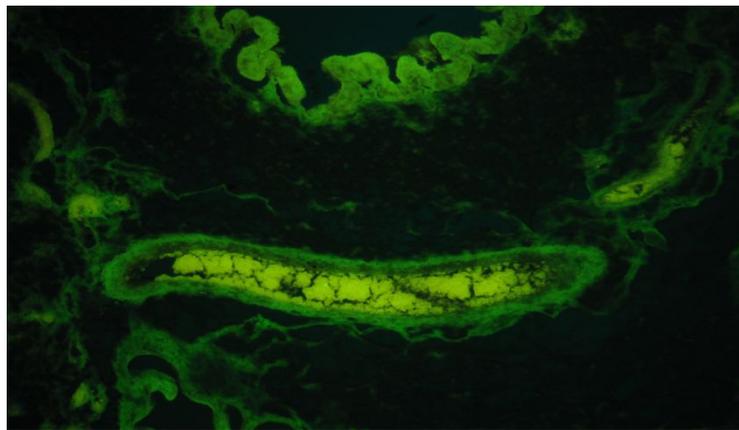


Figura N° 27: Tejido placentario de \pm 30 días de gestación enfrentado con UEA (100 x).

De acuerdo al análisis estadístico, se observó un descenso en los niveles de High Score (HS) para UEA desde el inicio hacia el final de la gestación, encontrándose una disminución estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre el día 30 y 114 días de preñez (Figura N° 28).

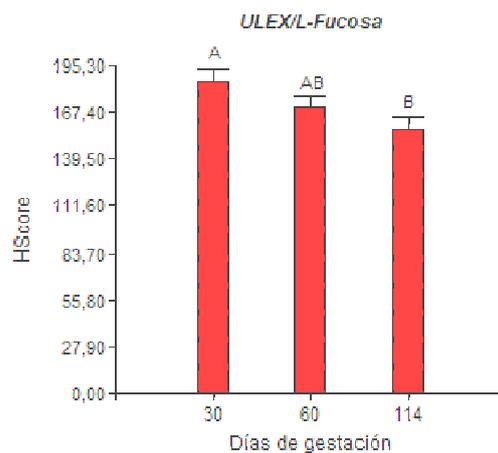


Figura N° 28: Valores de HS de UEA en función de los días de gestación. Letras diferentes (A y B) muestran diferencias estadísticamente significativas (30, 60 y 114 días de gestación).

A.8 Lectinohistoquímica para la determinación del patrón de glicosilación en vasos sanguíneos

Se determinó la presencia de residuos glicosilados sobre cortes de tejido placentario provenientes de distintos estadios gestacionales, mediante fluorescencia directa, utilizando un panel de lectinas conjugadas con FITC (Isotiocianato de Fluoresceína).

Tabla IV. Marcación de lectinas en el endotelio y contenido de los vasos sanguíneos fetales placentarios a lo largo de la gestación porcina.

VASOS SANGUINEOS FETALES							
		ENDOTELIO			CONTENIDO		
Lectina	Residuo	30	60	114	30	60	114
AIA	α -Galactosa	0	1	1	0	2	1/2
Con-A	α -Manosa α -Galactosa	1	0	0	0	0	1/2
MAA	Ac. Siálico	1/2	0	0	1	2	1/2
PHA-E	Oligosacáridos	2	1	1/2	0	2	2
PSA	α -Manosa	1	1	1	0	0	1

Tabla V. Marcación de lectinas en el endotelio y contenido de los vasos sanguíneos maternos a lo largo de la gestación.

VASOS SANGUINEOS MATERNOS							
		ENDOTELIO			CONTENIDO		
Lectina	Residuo	30	60	114	30	60	114
AIA	α -Galactosa	1	1	ND	1	2	ND
Con-A	α -Manosa α -Galactosa	1	1	ND	2	1/2	ND
MAA	Ac. Siálico	0/1	2	ND	2	1/2	ND
PHA-E	Oligosacáridos	2	1	ND	0	1/2	ND
PSA	α -Manosa	1	1	ND	1	1	ND

ND: no determinado. En los vasos sanguíneos maternos no se ha considerado la última fase gestacional, teniendo en cuenta que con las cerdas paridas, solo se cuenta con la parte fetal de la placenta.

A.8.1 AIA (*Artocarpus integrifolia*: reconoce α -galactosa)

Se observó que el endotelio de los vasos sanguíneos de la placenta del lado fetal presentó una fluorescencia negativa (0) a AIA a los 40 días, pero positiva (1) a los 60 y 114 días de gestación. En cuanto al contenido vascular, no ha presentado marcación con esta lectina en el primer período estudiado, pero sí, y de manera abundante (2) en la mitad y positiva a abundante (1/2) en el final de la gestación.

Por parte de los vasos sanguíneos de la placenta materna, el endotelio presentó fluorescencia positiva (1) para la lectina en cuestión a los 40 y 60 días de preñez. El contenido vascular presentó marcación positiva (1) a los 40 días y abundante (2) a los 60 días de gestación.

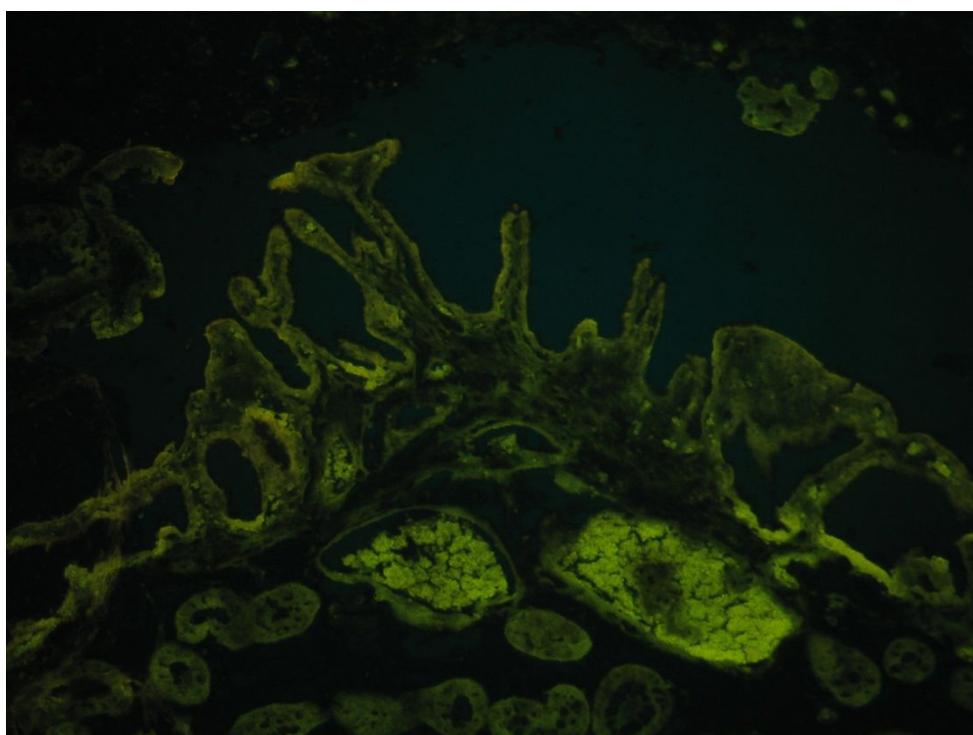


Figura N° 29: Tejido placentario de \pm 60 días de gestación enfrentado con AIA (100 x).

En lo que refiere al análisis estadístico, a partir de los valores de HS para AIA, se observó que hubo una tendencia al aumento hacia mitad de la gestación, pero no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tres períodos gestacionales estudiados. Obsérvese en la Figura N° 30.

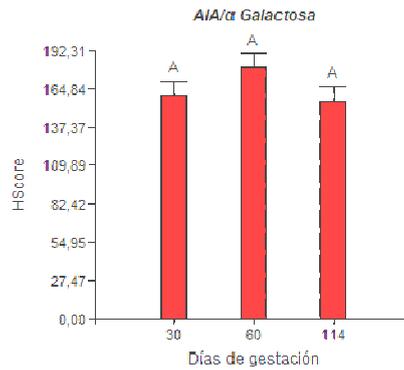


Figura N° 30: Valores de HS de AIA en función de los días de gestación. Letras iguales (A) demuestran que no hay diferencias estadísticamente significativas.

A.8.2 Con-A (*Concanavalin-A*: reconoce α -manosa, α -glucosa)

La marcación fluorescente con la lectina Con-A en los vasos de la placenta fetal fue positiva (1) a los 40 días, y negativa (0) en los dos períodos gestacionales posteriores estudiados. El contenido vascular no mostró (0) fluorescencia a los 40 y 60 días de gestación, mientras que sí lo hizo de forma positiva a abundante (1/2) a los 114 días.

Por el lado materno, el endotelio vascular placentario tuvo fluorescencia positiva (1) en los dos primeros períodos de preñez considerados. El contenido de estas estructuras mostró fluorescencia abundante (2) a los 40 días y positiva a abundante (1/2) a los 60 días de gestación.

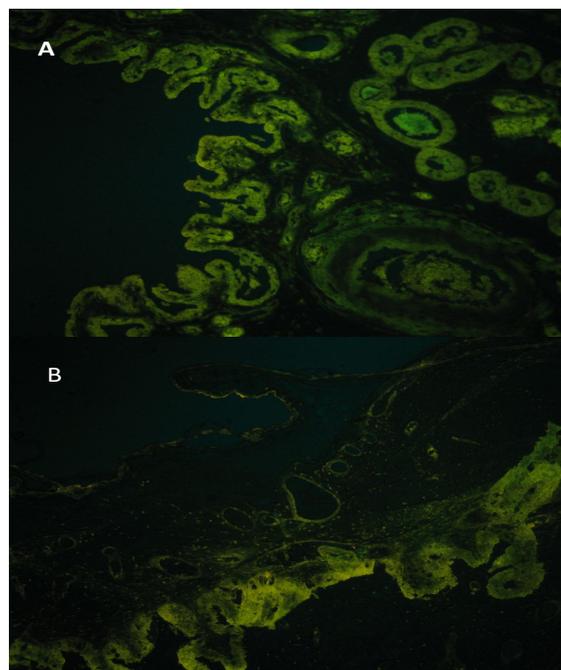


Figura N° 31: Tejido placentario de \pm 60 días de gestación, enfrentado con Con-A (100 x).

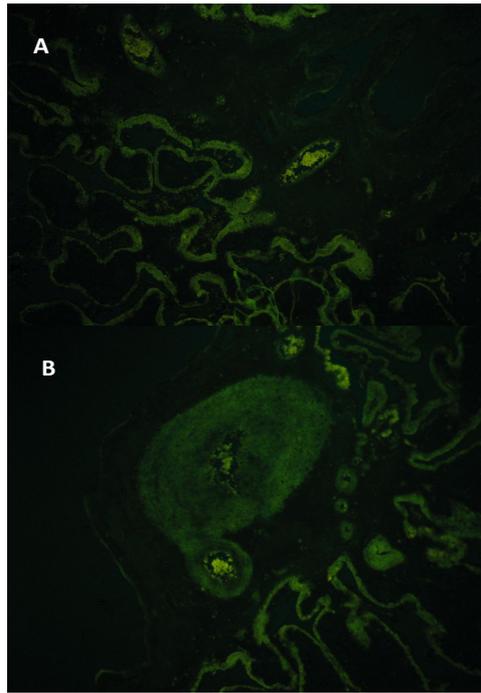


Figura N° 32: Tejido placentario de \pm 114 días de gestación, enfrentado con Con-A (100 x).

En lo que respecta al análisis estadístico para Con-A, a partir de los niveles de HS se observó un aumento en la expresión hacia mediados de la gestación, seguido de un descenso más marcado hacia el período final. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre el primer período con los demás, pero sí entre el segundo y el último.

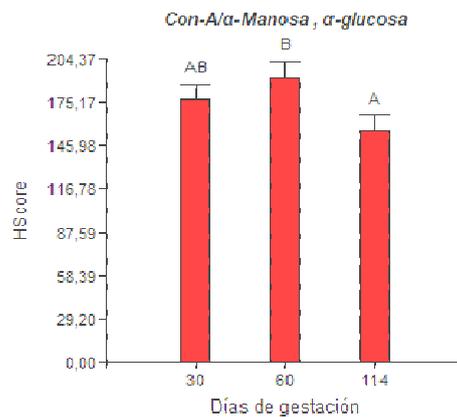


Figura N° 33: Valores de HS de Con-A en función de los días de gestación. Letras diferentes (A y B) muestran diferencias estadísticamente significativas.

A.8.3 MAA (*Maackia amurensis*: reconoce ácido siálico)

La lectina MAA presentó fluorescencia de negativa a débil (0/1) en el endotelio de los vasos sanguíneos fetales a los 40 días, y negativa (0) a los 60 y 114 días de gestación, mientras que en el contenido de estas estructuras, la marcación fue positiva (1) a los 40 días,

abundante (2) a los 60, y positiva a abundante (1/2) a los 114 días de preñez.

Por el lado materno, el endotelio de los vasos placentarios marca fluorescencia negativa a débil (0/1) a MAA en el primer estadio de gestación estudiado y abundante (2) en el segundo. En cuanto al contenido vascular, la marcación se presenta abundante (2) en el primer período gestacional estudiado y positivo a abundante (1/2) en el segundo.

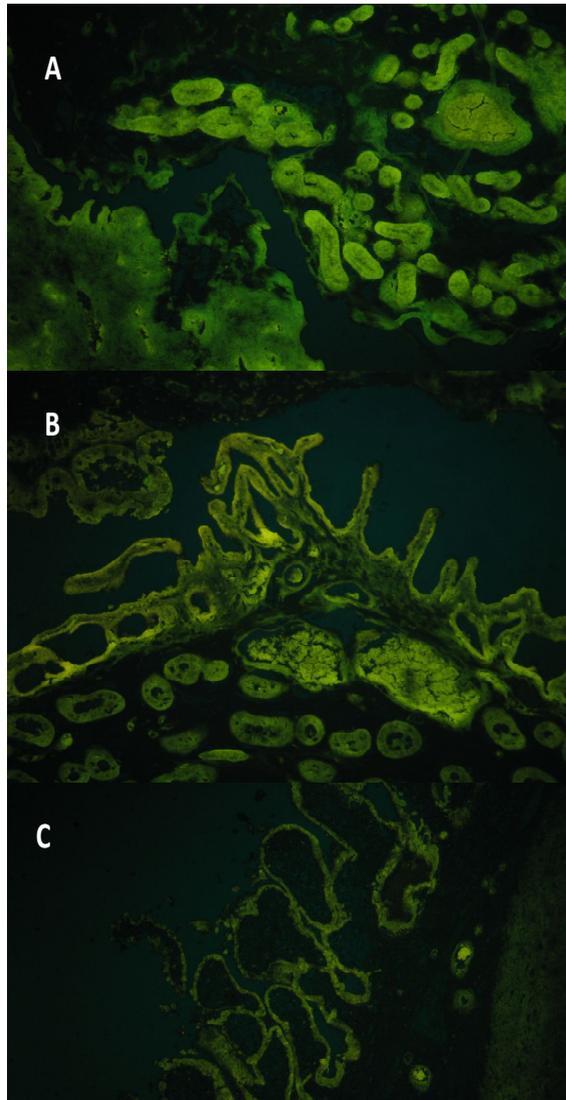


Figura N° 34 A, B) y C): Tejidos placentarios de \pm 30 días (A), \pm 60 días (B) y \pm 114 días (C) de gestación enfrentado con MAA (100 x).

A partir del análisis estadístico de MAA, se reflejó un aumento en sus niveles de HS desde el primer hacia el segundo estadio gestacional, marcándose una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre los días 30 y 60 de gestación.

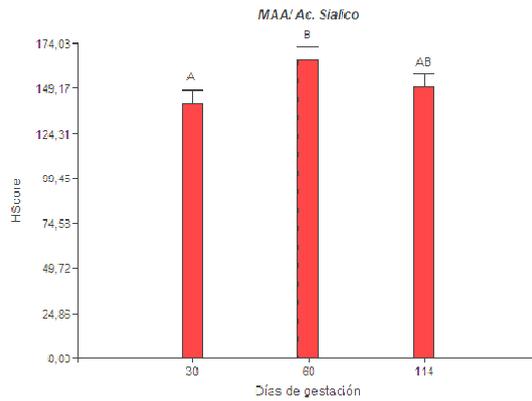


Figura N° 35: Valores de HS de MAA en función de los días de gestación. Letras diferentes (A y B) muestran diferencias estadísticamente significativas.

A.8.4 PHA-E (*Phaseolus vulgaris*: reconoce oligosacáridos).

En los vasos fetales, la marcación fluorescente a través de PHA-E fue abundante (2) en el primer período de gestación estudiado, positiva (1) en el segundo y positiva a abundante (1/2) en el tercero. El contenido no se marcó a los 40 días de preñez, pero sí y de forma abundante (2) a los 60 y 114 días.

Por el lado de la placenta materna, el epitelio vascular presentó marcación abundante (2) a los 40 y positiva (1) a los 60 días de preñez. El contenido vascular no tuvo marcación en el primer período (0), pero sí, y de forma positiva a abundante (1/2) en el segundo.

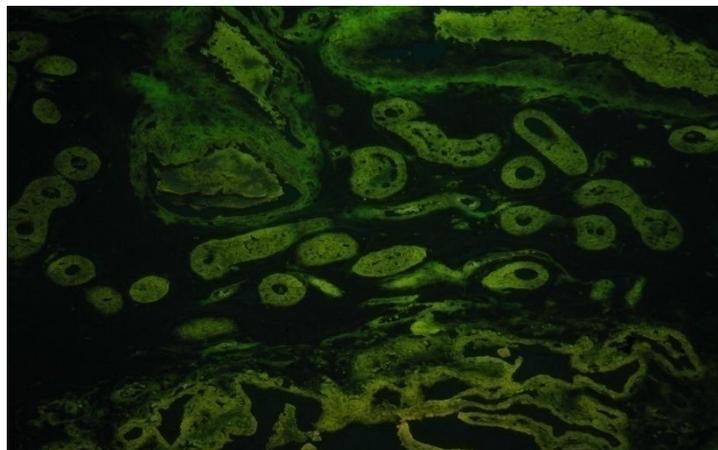


Figura N° 36: Tejido placentario de \pm 60 días de gestación, enfrentado con PHA-E (100 x).

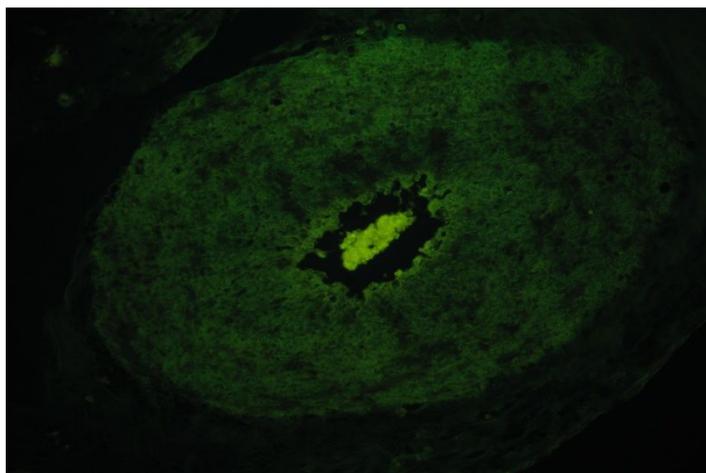


Figura N° 37: Tejido placentario de \pm 114 días de gestación, enfrentado con PHA-E (200 x).

Por otro lado, la interpretación estadística arrojó un HS para PHA-E sin cambios a lo largo de todo el período gestacional. La Figura N° 38, muestra que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tres momentos estudiados.

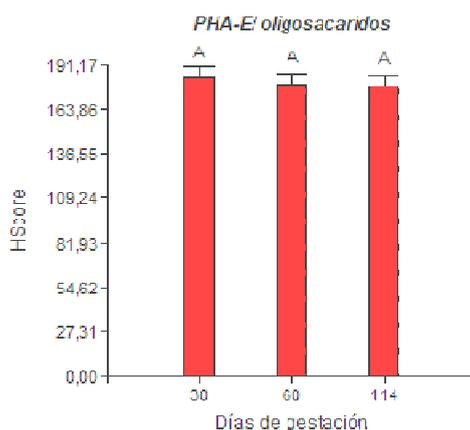


Figura N° 38: Valores de HS de PHA-E en función de los días de gestación. Letras iguales (A) no muestran diferencias estadísticamente significativas.

A.8.5 PSA (*Pisum sativum*: reconoce α -manosa)

Los vasos sanguíneos de la placenta fetal, presentan marcación por fluorescencia con PSA positiva (1) en su endotelio en los tres estadios gestacionales presentados. El contenido de estas estructuras se presenta sin marcación (0) en el primer y segundo período, pero con fluorescencia positiva (1) en el último.

Los vasos sanguíneos de la placenta materna, poseen un endotelio con marcación positiva (1) a los 40 y 60 días de gestación, mientras que el contenido vascular se presenta positivo (1) a los 40 días y positivo a abundante (1/2) a los 60 días.

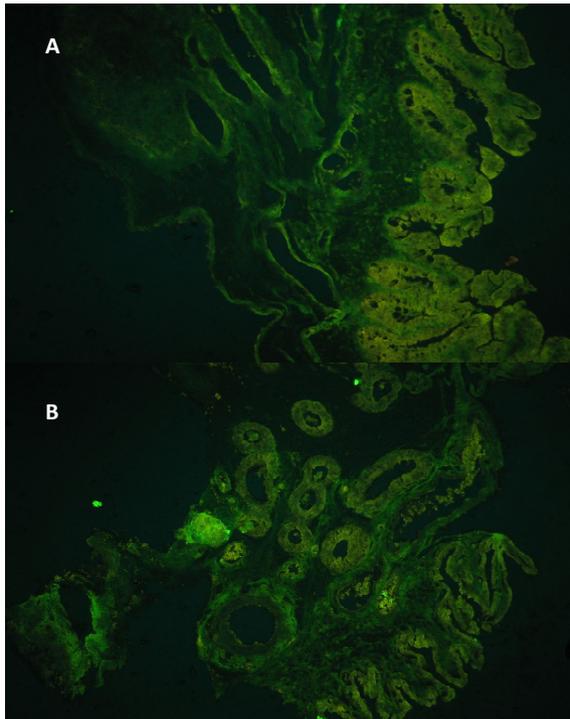


Figura N° 39 A) y B): Tejidos placentarios de \pm 30 días de gestación, enfrentado con PSA (100 x).

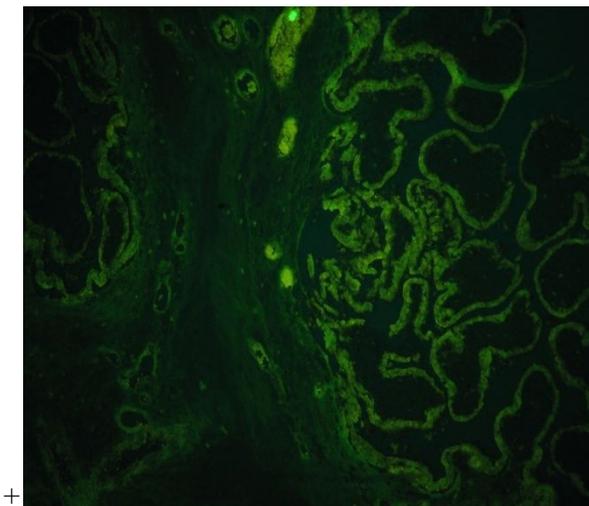


Figura N° 40: Tejido placentario de \pm 114 días de gestación, enfrentado con PSA (100 x).

En lo que respecta al análisis estadístico para PSA, su HS mostró que no hay cambios a lo largo de la gestación. No existen diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) dentro de ésta.

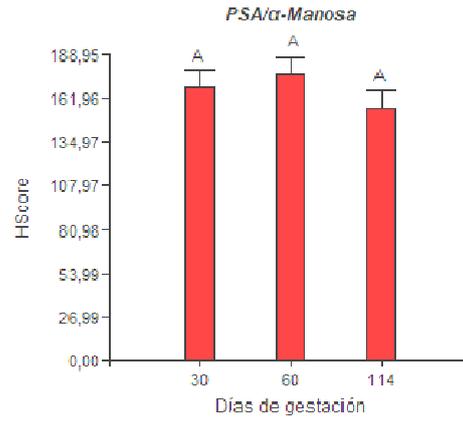


Figura N° 41: Valores de HS de PSA en función de los días de gestación. Letras iguales (A) no muestran diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

La preñez es un proceso fisiológico delicado pero complejo que requiere de la interrelación precisa de muchos elementos como hormonas y factores de crecimiento, entre la madre y los *concepti* (Kridli *et. al.*, 2016). La placenta los aportará y así regulará la difusión de los productos del metabolismo fetal, actuando como un verdadero órgano endócrino.

A través del estudio anatómico e histológico de la placenta porcina, y con el apoyo de diferentes técnicas, se determinaron los cambios que ocurren en su vasculatura a lo largo de la preñez. En el presente trabajo se llevó a cabo el análisis de los vasos sanguíneos que se forman y crecen de manera dinámica en la placenta, para asegurar la mantención exitosa de la gestación.

En aquellos tejidos coloreados con hematoxilina/eosina se observó que las vellosidades placentarias se disponen como verdaderas ramificaciones aumentando su superficie de absorción y contacto entre el componente materno y fetal. Esto se pudo evidenciar a través de las imágenes obtenidas, coincidiendo con lo sugerido por Dantzer *et. al.*, (1981). Las afirmaciones de Bazer y First (1983) se lograron constatar, mostrando como los vasos sanguíneos se entremezclan con las glándulas uterinas de la placenta materna, formando una estructura soportada por el tejido conectivo. La gran cantidad de vasos sanguíneos responden a lo propuesto por Soraci (2012), quien demostró que la irrigación sanguínea desde la madre debe aumentar desde la concepción, y por ende el tamaño vascular, para responder a las demandas de los embriones primero, y fetos más tarde.

Se destacó la presencia de las areolas, que receptan el contenido proveniente de las glándulas.

Según lo propuesto por Cristofolini y col. (2017), y con la utilización de tinciones tricrómicas como la de Gallego, se pudo determinar que vasos de distinto calibre, como vénulas, arteriolas y capilares, se disponen muy cercanos al epitelio trofoblástico. A través de microscopía óptica de alta resolución (MOAR), se observó de forma más detallada la estructura tisular y se constató que en los tres períodos en estudio (30, 60 y 114 días de gestación), los vasos sanguíneos se forman y crecen cerca de los epitelios, teniendo como función principal la entrega de nutrientes. Por MOAR se pudo observar también, hasta la presencia de nucléolos en células del epitelio trofoblástico, en coincidencia con Fiorimanti (2018) y confirmando lo propuesto por la misma autora, que la actividad celular aumenta conforme transcurre la preñez.

Coincidiendo con lo descrito por Soraci (2012) y Espinoza (2011), los procesos angiogénicos se producen continuamente y desde bien temprana la gestación. El estudio morfométrico del endotelio vascular se ha realizado por inmunohistoquímica a través del

marcador CD31. De acuerdo a lo planteado por Sobotta Welsch (2009) el endotelio se conforma por una capa de células planas delgadas, tapizando la pared interna de los vasos sanguíneos. El endotelio fue muy bien localizado y marcado por el CD31, en comparación con las tinciones diferenciales previamente descritas. Dentro de este trabajo, se ha constatado lo propuesto por Clemente (2010) y Carr *et. al.*, (2016), donde además de los vasos sanguíneos se pudieron apreciar las células constituyentes de la pared vascular al inicio, mitad y final de gestación y diferenciar el límite entre los vasos sanguíneos y el tejido conectivo que los rodea.

El Software AxioVision 4.6.3 proporcionó información relevante y precisa en cuanto al número de vasos sanguíneos presentes en la placenta. Se estableció que existe un aumento en la presencia de los mismos en el inicio de la preñez, habiendo entonces, una relación directa entre el proceso angiogénico y la cantidad de vasos. Esto se confirma por lo establecido por Fiorimanti (2018) quien reveló que existe un incremento en el conteo desde el día 30 al 60 de gestación. En cuanto al área vascular, se determinó que las mayores variaciones se detectan en el período medio de la preñez. Coincidiendo con Merkis (2006), indicamos que esto puede deberse a que el crecimiento placentario disminuye para permitir el desarrollo de los fetos, y que luego se retomaría para nutrir la mayor necesidad de nutrientes en el período parto.

Las lectinas son moléculas que derivan de compuestos vegetales y poseen afinidad por diferentes glúcidos presentes en células de distintos tejidos. Dichas lectinas han servido para determinar qué azúcar predomina en cada período de gestación y qué papel cumpliría su presencia. Para revelarlas es necesario utilizar marcadores fluorescentes como es el isotiocianato de fluoresceína que se acopla a estas moléculas.

Ulex europaeus aglutinina 1 (UEA 1), es una lectina obtenida de la planta del mismo nombre, que muestran tener afinidad específica por ciertos tipos de fucosa, uniéndose a células endoteliales humanas y animales. Se ha demostrado que UEA presenta marcación tanto en los endotelios fetales como en los maternos. Sin embargo, se ha utilizado corrientemente para el estudio y comparación de células normales y neoplásicas y no solo en los vasos sanguíneos, sino también en otros tejidos. Así lo plantea Miettinen *et. al.*, (1983), afirmando que además es capaz de acoplarse a células epiteliales malignas y benignas, coincidiendo con lo hallado en nuestros estudios de laboratorio, donde se encontró marcación para UEA también en sangre y en epitelio y contenido glandular. En concordancia con Holthöfer *et. al.*, (1982), quien determinó que UEA es de baja especificidad, es decir puede unirse solo a L-fucosa, pero de diferentes tejidos.

Debido a que el reconocimiento de que las diferentes superficies celulares están glicosiladas y que los azúcares juegan un rol importante a una amplia gama de mecanismos

biológicos, se ha desarrollado un gran interés en los sacáridos de las superficies celulares (Jones *et. al.*, 1999).

Artocarpus integrifolia (AIA), posee afinidad por α - galactosa, azúcar implicada en procesos morfogénicos en distintos órganos y tejidos, incluida la placenta. Se determinó que está presente en cantidades altas en todos los estadios, excepto al principio de la preñez, coincidiendo con Sanchis (2007). La galactosa es necesaria para la síntesis placentaria a medida que aumentan las demandas nutricionales del feto.

Concanavalin-A (Con-A), lectina con afinidad hacia α -manosa y α -galactosa, está presente cerca de la preñez a término. Así lo hemos determinado, con marcación en vasos sanguíneos fetales en el primer período, pero negativizándose luego, mientras en la placenta materna estuvo siempre presente, coincidiendo con Jones *et. al.* (2000, 2004).

Otra lectina con afinidad a manosa y galactosa es *Pisum sativum* (PSA), la hemos podido reconocer tanto en el endotelio vascular materno como en el fetal a los 60 días de preñez, en contraposición a Sanchis (2007), quien no la detectó en arterias y venas desde los 55 días de gestación en adelante. Sin embargo, estudios más recientes de la misma autora, confirman que el endotelio se vuelve negativo hacia el final, coincidiendo con el patrón de Jones *et. al.*, (1999) en placentas equinas.

Maackia amurensis (MAA) mostró pobre marcación en endotelio, pero abundante en el contenido fetal. El ácido siálico, molécula afín a MAA, estaría involucrado en procesos de reconocimiento celular, por lo que podría aseverarse lo planteado por Sanchis (2007), de que disminuye una vez llevada a cabo esta tarea.

La lectina encargada de unirse a oligosacáridos fue *Phaseolus vulgaris* (PHA-E), presente en toda la gestación en cantidades abundantes, tanto para el epitelio como para el contenido vascular. No se ha concordado con Sanchis (2007), quien no ha encontrado PHA-E en estadios tempranos.

Finalmente, cabe destacar que a los 114 días todas las lectinas determinadas se encuentran en valores altos, a causa principalmente de los altos requerimientos metabólicos fetales en el último tercio de gestación y momentos previos al parto.

CONCLUSIÓN

La vasculatura materna y fetal se modifican, tanto morfológica como estructuralmente a lo largo de la gestación, la microscopia óptica convencional y de alta resolución, al igual que las tinciones diferenciales utilizadas para ellas, facilitaron la observación de la placenta en su conjunto.

Los vasos sanguíneos de diferente calibre como arteriolas, vénulas y capilares se establecen y distribuyen de tal manera que aseguren una nutrición continua, próximos a la interfase materno-fetal, aumentando su número desde el período temprano de preñez. El área vascular también aumenta pero hacia el periodo final de la gestación, disminuyendo al mínimo la distancia hemotrófica y logrando un intercambio fluido en ambas direcciones. La irrigación sanguínea materna debe aumentar así como el tamaño vascular, para responder a las demandas fetales crecientes.

La inmunomarcación con CD31 es la forma más eficaz para identificar al endotelio de los vasos sanguíneos, logrando con éxito distinguirlos del tejido conectivo que los rodea, medirlos y cuantificarlos.

Ulex europaeus (UEA), resulta ser también una herramienta para visualizar células endoteliales, sin embargo UEA no marca exclusivamente paredes vasculares, sino que su enfoque se distribuye también a otras células como las constituyentes de epitelios, glándulas uterinas y tejido sanguíneo.

La existencia de glúcidos en la pared vascular ha servido para determinar sus variaciones, demostrando con un patrón heterogéneo, como aumentan o disminuyen en función de los procesos biológicos que acontecen en la placenta.

Las lectinas se encargan de mostrar este activo patrón de glicosilación. Altos niveles de PHA-E durante toda la preñez representan como los oligosacáridos y N-acetil galactosamina son siempre necesarios. Otra lectina perteneciente al mismo grupo como AIA, muestra que no hay demanda de galactosa desde los vasos sanguíneos fetales en los inicios de la gestación, pero sí en los maternos. A los 60 días de gestación, los vasos maternos evidencian que los niveles de α -galactosa, α -manosa, α -glucosa, ácido siálico y oligosacáridos comienzan a aumentar. Por otra parte, en los vasos fetales la abundante expresión de estos glúcidos en el período final refleja que previo al parto los requerimientos fetales son mayores.

BIBLIOGRAFÍA

ABUELO ECONÓMICO. 2006. El consumo de carnes: ¿hacemos un lechón?
<http://abueloeconomico.blogspot.com/2006/10/el-consumo-de-carnes-hacemos-un-lechn.html>

ADAIR T., MONTANI J. 2010. ANGIOGÉNESIS. SAN RAFAEL (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. Capítulo 1. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238/>

AMBROSI M., CAMERON NR., DAVIS BG. 2005. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem*, 3: 1593-1608.

AMOROSO, E. 1952. Placentation. In: Marshall's Physiology of Reproduction. Ed. Parkes AS, Vol 2, pp 127-311. London: Longmans Green.

APAZA VALENCIA J. 2014. Desarrollo placentario temprano: aspectos fisiopatológicos. *Rev. Perú. Ginecol. Obstet.* vol.60 no.2 Lima abr.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322014000200006

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 118-120.

BAZER, F., FIRST, N. 1983. Pregnancy and parturition. En: Wooding P. and Burton G. Comparative placentation. Structures, functions and evolution. Editado por Wooding P. and Burton G. Cambridge (UK): Springer-Verlag Berlín Heidelberg, 2008, Cap. 5, pp. 107. ISBN 978-3-540-78796-9.

BAZER F., JOHNSON G. 2014. Pig blastocyst–uterine interactions. *Differentiation*: 87:52-65.

CAO G., O'BRIEN CD., ZHOU Z., SANDERS SM., GREENBAUM JN., MAKRIGIANNAKIS A., DELISSER HM. 2002. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282:C1181–C1190.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40 (11):1515-39.

CARMELIET P, COLLEN D. (2000) Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci*: 902:249-264.

CARR D., DAVID A., AITKEN R., MILNE J., BOROWICZ P., WALLACE J., REDMER D. 2016. Placental vascularity and markers of angiogenesis in relation to prenatal growth status in overnourished adolescent ewes. *Placenta*: 46: 79-86.

CHARNOCK-JONES D., KAUFFMAN P., MAYHEW TM. 2004. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta*. Feb-Mar; 25(2-3):103-13

CLARK G. 1981. Methods for general tissue. In: Staining procedures. Fourth edition. pp 105-112, Williams and Wilkins USA.

CLEMENTE M. 2010. Estudio histológico e inmunohistoquímico diferencial de inmunofenotipo, angiogénesis y patrón de metástasis en el cáncer inflamatorio mamario canino con respecto a otros tumores mamarios malignos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.

CONFEDERACIÓN INTERCOOPERATIVA AGROPECUARIA LIMITADA (CONINAGRO) 2018. Economías regionales: Porcinos. <http://www.coninagro.org.ar/DocsVarios/Informes/2018-01-Porcinos.pdf>

CRISTOFOLINI A., FIORIMANTI M., CAMPOS M., SANCHIS E., DIAZ T., MOSCHETTI E., MERKIS C. 2017. Morphometric study of the porcine placental vascularization. *Reprod Dom Anim*: 53: 217-225.

CRISTOFOLINI A., SANCHIS G., MOLIVA M., ALONSO L., CHANIQUE A., KONCURAT M., MERKIS C. 2013. Cellular remodelling by apoptosis during porcine placentation. *Reprod Dom Anim* 48(4): 584-590.

CRISTOFOLINI A. 2010. Estudio de la remodelación celular durante la placentación porcina. Tesis Doctoral. Biblioteca Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

DALLAR BE., ROMANO G., LORENTE JA., LAMAS H. y ORTEGA HH. 2001. Estudio lectinhistoquímico y morfométrico de la glándula mamaria de llama (*Lama glama*) durante el período de lactancia. *Rev. chil. anat.*, 19 (1): 11-16. ISSN 0716- 9868.

DANTZER V., BJÖRKMAN N., HASSELAGER E. 1981. An electron microscopic study of histiotrophe in the interareolar part of the porcine placenta. *Placenta* 2: 19-28.

DANTZER, V., LEISER R. 1993. Initial vascularization in the pig placenta: I. Demostration of non-glandular areas by histology and corrosion casts. *Anat Rec.* 238: 177-190.

DI RIENZO, J., CASANOVES, A., BALZARINI, M., GONZALEZ, L., TABLADA, M., ROBLEDO, C. 2018. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.

EMBRIOLOGÍA. PLACENTA. 2008. Cátedra de histología y embriología, Facultad de Ciencia Agrarias y Veterinarias, Universidad Católica de Salta.

<https://es.slideshare.net/PthithCamachoTorres/embriologia-32008-8004527>

ESPINOZA C. 2011. Angiogénesis en la placenta de los animales domésticos. Sitio argentino de producción animal.

FIORIMANTI, M. 2018. Incidencia de los factores angiogénicos y antiangiogénicos en el desarrollo vascular placentario en porcinos. Tesis de Doctorado. Fac, de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

GABIUS S., GABIUS HJ. 1993 In: *Lectins and Glycobiology*. Ed. Springer-Verlag. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-77944-2>

GIMENO EJ., BARBEITO CG. 2004. Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la biología y de la patología. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria LVIII*, 58:6-34.

HAFEZ, E. y HAFEZ B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed McGraw-Hill.

HERNÁNDEZ CRUZ P., PÉREZ CAMPOS E., MARTÍNEZ MARTÍNEZ L., ORTIZ B., MARTÍNEZ G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio en las interacciones proteína- carbohidrato. *REB* 24 (1): 21-27.

HOLTHOFER H., VIRTANEN I., KARINIEMI A-L., HORMIA M., LINDER E., MIETTINEN A. 1982. Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest* 1982; 47:60-66

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (INTA). 2017. Mercado porcino: un sector con perspectivas de expansión. <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=39331>

IRWIN J., GOLDSTEIN PH. 1997. Glicoproteins II in *New Comprehensive Biochemistry*.

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.

JONES CJP., DANZTER V., STODDART RW. 1995. Changes in glycan distribution within the porcine interhaemal barrier during gestation. *Cell Tissue Res*, 279: 551-564.

JONES CJP., ENDERS AC., WOODING FBP., DANTZER V., LEISER R., STODDART RW. 1999. Equine placental cup cells show glycan expression distinct from that of both chorionic girdle progenitor cells and early allantochorionic trophoblast of the placenta. *Placenta*, 20: 347-360.

JONES CJP., WOODING FBP., ABD-ELNAEIM MM., LEISER R., DANTZER V., STODDART RW. 2000. Glycosylation in the near-term epitheliochorial placenta of the horse, donkey and camel: a comparative study of interbreeding and non-interbreeding species. *J Reprod Fertil*, 118: 397-405.

JONES CJP., SANTOS TC., ABD-ELNAEIM M., DANTZER V., MIGLINO MA. 2004. Placental glycosylation in Peccary species and its relation to that of Swine and Dromedary. *Placenta*, 25: 649-657.

KERR J. 1972. Apoptosis: A basic Biological Phenomenom with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2008650/>

KONCURAT M., MERKIS C., ZUBELDÍA D., CHANIQUE A., CRISTOFOLINI A., FRANCHINO M., ABATE CANO L., SANCHIS G., VIVAS A. 2004. Identification of glycoconjugates in the porcine placenta. *Biocell (Mendoza)*, ISSN 0327-9545, 28(2): 176.

KONDO S., SCHEEF EA., SHEIBANI N., SORENSON CM. 2007. PECAM-1 isoform-specific regulation of kidney endothelial cell migration and capillary morphogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292:C2070–C2083.

KRIDLI R., KHALAJ K., BIDARIMATH M., TAYADE C. 2016. Placentation, maternal–fetal interface, and conceptus loss in swine. *Theriogenology*: 85:135–144.

LABORATORIO VECTOR. 2018. <https://vectorlabs.com/>

LABORATORIO GLYCOMATRIX. 2018. <https://www.glycomatrix.com/>

LABORATORIO MYBIOSOURCE. 2018. <https://www.mybiosource.com/>

LEISER R., DANTZER V. 1994. Initial vascularisation in the pig placenta: II. Demonstration of gland and areola-gland subunits by histology and corrosion casts. *Anat Rec*, 238: 326-334.

LEISER R., KAUFMANN P. 1994. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol*, 102: 122-134.

MARRABLE A. 1971. *The embryonic pig: a chronological account*. Ed. Exeter, Pitman Medical, London. pp: 30-51.

MELLISHO E. 2006. Desarrollo fetal. En: *Curso de Reproduccion Animal*. Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Perú).

https://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/Reproduccion_archivos/Practica%206-desafetal.pdf.

MENDOZA W. 2007. Estudios estructura y función de una lectina aislada de semillas de caesalpinia spinosa kuntze (tara) https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292007000200006

MERKIS C., CRISTOFOLINI A., FRANCHINO M., SANCHIS E., MOSCHETTI, KONCURAT M. 2006. Angiogenesis placentaria durante la gestación porcina. Redvet: 7 (4): 1-4.

MIETTINEN MARKKU, M.D., HOLTHOFER HARRY., M.D., VELI-PEKKA LEHTO, M.D., AARO MIETTINEN, M.D., ISMO VIRTANEN, M.D. 1983.

Ulex europaeus / Lectin as a Marker for Tumors Derived from Endothelial Cells.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6401381>

MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2019. Boletín Porcino. https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/porcinos/estadistica/_archivos//000000_Bolet%C3%ADn%20Porcino/000000_Bolet%C3%ADn%20Porcino%202019.pdf

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN (FAO). 2016. Cerdos y... <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/home.html>

PADDOCK C., ZHOU D., LERTKIATMONGKOL P., NEWMAN P., ZHU J. 2016. Structural basis for PECAM-1 homophilic binding. Blood: 127(8):1052-1061.

PEREYRA R., DE LONG N., WANG R., YAZDI F., HOLLOWAY A., RAHA S. 2015. Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling. Biomed Res Int: 2015: 814543.

POND WG., HOUPPT KA. 1981. En: Biología del cerdo. Ed. Acribia, Zaragoza.

PORCICULTURA. 2012. Uso de altrenogest, sincronización de nulíparas y síndrome de 2do. parto con apoyo hormonal. <https://www.porcicultura.com/micrositio/Virbac-de-M%C3%A9xico/Uso-de-altrenogest%2C-sincronizaci%C3%B3n-de-nul%C3%ADparas-y-s%C3%ADndrome-de-2do.-parto-con-apoyo-hormonal>

REYNOLS L., REDMER D. 2001. Minireview: angiogenesis in the placenta. Biol Reprod: 64: 1033-1040.

SANCHIS E., CRISTOFOLINI A., MERKIS C. 2012. Moléculas de matriz extracelular y vascularización en la placenta porcina. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH& Co. KG (pp. 10-12) Saarbrücken, Alemania: Editorial Académica Española.

SANCHIS E., CRISTOFOLINI A., MERKIS C. 2015. Porcine placental immunoexpression of vascular endothelial growth factor, placenta growth factor, Flt-1 and Flk-1. Biotech Histochem: 90 (7):486-94. 2.

SANCHIS G. 2007. Detección de glicoconjugados de la placenta porcina en diferentes estadios gestacionales.

SANCHIS G., MERKIS C., CRISTOFOLINI A., FRANCHINO M., ZUBELDÍA, D., KONCURAT M. 2005. Study of glycoconjugates during porcine placentation. Biocell (Mendoza), ISSN 0327-9545, 29 (2): 235.

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. (SENASA). 2018. Porcinos. <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/porcinos>

SHARON N., LIS H. 1989. Lectins as cells recognition molecules. In: <http://www.sciencemag.org/cgi/reprint/246/4927/227.pdf?ijkey=71fda390315bad406cbfa7dda81c34e2408ec3aa>.

SHARON N., LIS H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology, 14(11):53-62.

SOBOTTA WELSCH. 2009. Atlas de Histología 2da Edición. file:///E:/Sobotta%20Histologia_booksmedicos.org.pdf

SORACI A. 2012. Importancia práctica de los cambios fisiológicos en la alimentación del lechón. Conferencia extraída de Memorias del XI Congreso Nacional de Producción Porcina. Salta. Argentina.

TROLLIET J. 2005. Productividad numérica de la cerda factores y componentes que la afectan. El sitio de producción animal. www.produccion-animal.com.ar

VONNAHME K., FORD S. 2004. Placental vascular endothelial growth factor receptor system mRNA expression in pigs selected for placental efficiency. *J. Physiol*: 554 (1):194-201.

WRIGHT E., MILES J., LENTS C., REMPEL L. 2016. Uterine and placenta characteristics during early vascular development in the pig from day 22 to 42 of gestation. *AnimReprodSci*: 164:14-22.