



CREER...CREAR...CRECER

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y  
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DEL DESARROLLO PLACENTARIO, ANGIOGÉNESIS Y  
EXPRESIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS EN PLACENTAS DE  
CABRAS**

Méd. Vet. Diaz Tomás

DIRECTORA: Dra. Alicia Nélica Rolando

CO-DIRECTORA: Dra. Cecilia Inés Merkis

Río Cuarto, Diciembre de 2018

## COMISIÓN ASESORA

Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier.....Universidad Nacional de Córdoba

Dra. Nancy Rodríguez..... Universidad Nacional de Río Cuarto

PhD. Pablo Bosch.....Universidad Nacional de Río Cuarto

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha: Universidad Nacional de Río Cuarto:     de     de 2018.

Calificación:

## JURADO

Firma ..... Aclaración .....

Firma ..... Aclaración .....

Firma ..... Aclaración .....

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar quiero agradecer a mi directora de la carrera de doctorado, Dra. Alicia Rolando y a mi co-directora Dra. Cecilia Inés Merkis, quienes depositaron su confianza desde el primer día, enseñando y guiando este nuevo mundo de la investigación científica. A su vez, no quiero dejar de mencionar el más profundo agradecimiento a éstas dos personas que, como compañeros y más bien amigos, más allá de su lugar de directoras, hicieron el esfuerzo de escucharme y acompañarme en los momentos buenos y malos, transmitiendo vivencias y consejos.*

*Mis agradecimientos al profesor y amigo Dr. Jorge Tissera quien, con un compromiso constante y desinteresado me impulsó a iniciar el doctorado y la carrera docente abriendo las puertas de su cátedra.*

*No quiero dejar de agradecer a mis compañeros y amigos, M.V. Santiago Watson, Dr. Horacio Mouguelar, MSc. Valeria Coniglio, Lic. Débora Cots, Dra. Andrea Bozzo, Dra. Romina Belingeri, Dra. Natalia Pico, Lic. Damiana Borghi, Dra. María Cristina Romanini, Lic. Carolina Flores, Dra. Andrea Cristofolini, Dra. Gabriela Sanchis, Dra. Mariana Fiorimanti, que de una manera u otra hicieron posible que este proyecto de tesis se ejecutara y llegara a su fin.*

*También quiero agradecer al señor Martín Chávez, no docente del departamento de reproducción animal de nuestra FAV, UNRC, por colaborar desinteresadamente, desde un comienzo y en reiteradas oportunidades, en la realización de los diagnósticos ecográficos de gestación y el asesoramiento reproductivo de las cabras.*

*Finalmente quiero darles las gracias a los jurados de tesis, Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier, Dra. Nancy Rodriguez y PhD. Pablo Bosch, quienes de manera profesional y comprometida han dedicado su valioso tiempo a la revisión de los avances del proyecto de tesis y gracias a sus sugerencias y correcciones, me guiaron par concluir el trabajo final de doctorado.*

## DEDICATORIA

*La presente tesis está dedicada a mi compañera de vida Florencia Feros, quien eligió ser la persona que cada día me alimenta las ganas de transformar la realidad y pelear por una vida en paz y felicidad y ahora comenzar a tranquear una huella junto a nuestra hija Sofía.*

*A mis padres Coco Díaz y Graciela Torres por enseñarme los más fuertes valores éticos y morales, como así también por acompañarme y apoyarme en cada decisión que me toco enfrentar desde que me inicié en la carrera de Medicina Veterinaria.*

*A mis hermanos Paula, Joaquín y Hernán, mis cuñadas Vani y Caro y mis sobrinos Catalina y Facundo por el cariño incondicional que siempre he recibido.*

## RESUMEN

Un eficiente crecimiento fetal y un buen peso al nacimiento dependen principalmente de la estructura y el tamaño de la placenta. Ésta crea la interfaz para el intercambio de nutrientes y desechos entre la madre y el feto. A su vez, es una fuente de moléculas de señalización capaces de manipular la fisiología materna para mantener un ambiente propicio y lograr una preñez exitosa. Estas funciones son posibles gracias a la formación de una extensa red vascular desde el endometrio hacia la placenta, denominado angiogénesis. La placenta caprina es clasificada como sinepiteliocorial, cotiledonaria y adecidua. Posee áreas restringidas de interdigitación e intercambio de nutrientes entre el tejido materno y fetal, llamadas placentomas. El objetivo fue estudiar la morfología, el desarrollo vascular y la expresión de factores angiogénicos en placentomas de los dos últimos tercios de la gestación en cabras. Para ello se utilizaron 15 cabras mestizas alimentadas *ad libitum* y se obtuvieron los úteros gestantes de 50 días (n=5), 100 días (n=5) y 135 días (n=5) de gestación. Se midieron los parámetros morfométricos de los úteros y sus fetos. Las muestras de placentomas fueron destinadas al análisis estructural y ultraestructural, al estudio inmunohistoquímico de los principales factores angiogénicos, a la evaluación de la remodelación celular placentaria y al estudio de las variables morfométricas de los vasos sanguíneos. A medida que avanza la gestación se observaron mayores ramificaciones de las vellosidades trofoblásticas, disminución del estroma de los tabiques maternos, presencia de capilares “intraepiteliales”, que disminuyen la distancia interhemal, resultado de las modificaciones adaptativas generadas por las mayores demandas metabólicas de los *concepti*. Las células binucleadas fetales migran y se fusionan con el epitelio materno conformando los sincitios. Los elevados índices apoptóticos e índices de proliferación en el epitelio materno y fetal, respectivamente, demuestran que el epitelio trofoblástico debe generar la población celular encargada de migrar y formar parte del epitelio materno e influenciar su fisiología. La presencia en este órgano de los factores angiogénicos como VEGF, Ang-1, Ang-2 y su receptor Tie-2 indican que actuarían complementariamente en el desarrollo y maduración angiogénica y en la funcionalidad trofoblástica. El estudio histomorfométrico nos permitió identificar patrones de crecimiento vascular diferentes para el tejido cotiledonario, donde hacia el final de la gestación, los capilares disminuyen su tamaño debido a una mayor ramificación, en comparación con lo que sucede en el tejido caruncular, lo que asegurarían un transporte sanguíneo rápido y mejoraría el intercambio feto-materno. Las modificaciones estructurales y los diferentes patrones de crecimiento vasculares regulados por distintos factores angiogénicos identificados en la placenta, determinan una mayor eficiencia de intercambio transplacentario a lo largo de la gestación permitiendo el normal crecimiento fetal.

## ABSTRACT

An efficient fetal growth and a good birth weight depend mainly on the placenta structure and size. This creates the interface for the exchange of nutrients and waste between the mother and the fetus. In turn, the placenta is a source of signaling molecules capable of manipulating maternal physiology to maintain an enabling environment and achieve successful pregnancy. These functions are possible through the formation of an extensive vascular network from endometrium to placenta, term angiogenesis. The goat placenta is synepitheliochorial, cotyledonary and adeciduate. It has restricted areas of interdigitation and nutrient exchange between the maternal and fetal tissues known as placentomes. The objective was study the morphology, vascular development and the expression of angiogenic factors in placetomes of the last two thirds of pregnancy in goats. 15 crossbred goats fed *ad libitum* were used and the gravid uteri were obtained from 50 (n = 5), 100 (n = 5) and 135 days (n = 5) of gestation. Morphometric parameters of the uteri and their fetuses were measured. Structural and ultrastructural analysis, immunohistochemical methods of the main angiogenic factors, evaluation of placental cell remodeling and study of morphometric variables of blood vessels were performed over placental samples. As the pregnancy progresses, greater branched cotyledonary villi, decrease of the stroma of the maternal septa, presence of "intraepithelial" capillaries, diminished interhemal distance, result of the adaptive modifications generated by the greater metabolic demands of the concepts. The fetal binucleated cells migrate and fuse with the maternal epithelium, forming the syncytia plaques. The high apoptotic indexes and high proliferation indexes of in the maternal and fetal epithelium, respectively, evidence that the trophoblastic epithelium must generate the cellular population in charge of migrating and forming part of the maternal epithelium and influencing its physiology. The presence in this organ of the angiogenic factors such as VEGF, Ang-1, Ang-2 and its receptor Tie-2 indicate that they would act in addition in the development and angiogenic maturation and in the trophoblastic functionality. The histomorphometric study allowed us to identify different vascular growth patterns for the cotyledonary tissue, where towards the end of gestation decrease capillaries size due to a greater branching, in comparison with what happens in the caruncular tissue, which would ensure a rapid blood transport and improve fetomaternal exchange. The structural modifications and the different vascular growth patterns regulated by different angiogenic factors identified in the placenta, determine a greater efficiency of transplacental exchange throughout the gestation, supporting normal fetal growth.

## ÍNDICE

	Página
Agradecimientos y dedicatoria	ii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	viii
Abreviaturas	x
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO III: OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	7
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1. Toma de muestras	10
4.2. Procesamiento del útero grávido y medición de parámetros morfológicos	10
4.3. Análisis de estructura placentaria	11
4.3.1. Técnica histológica convencional para microscopía óptica	11
4.3.2. Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR)	11
4.4. Análisis de ultraestructura placentaria	12
4.4.1. Técnica para microscopía electrónica de transmisión (MET)	12
4.5. Detección de apoptosis <i>in situ</i> : ensayo TUNEL (TdT-mediated-dUtp Nick End Labeling)	12
4.6. Técnica inmunocitoquímica para la determinación del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)	14
4.7. Técnicas inmunohistoquímicas para la determinación de los factores angiogénicos	14
4.7.1. Determinación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	14
4.7.2. Determinación de Ang-1, Ang-2 y Tie-2	15
4.7.3. Semicuantificación de la inmunomarcación	15
4.8. Medición de variables morfométricas (área, perímetro y número) de los vasos sanguíneos	16
CAPÍTULO V: MARCO TEÓRICO	17
5.1. Producción caprina	18
5.2. Reproducción caprina	18
5.3. Placenta caprina	19
5.4. Apoptosis	21
5.5. Proliferación	25
5.5.1. Ciclo celular	25
5.5.2. Reguladores del ciclo celular	27

5.5.3. Control extracelular de la división celular	27
5.5.4. Antígeno nuclear de proliferación celular	29
5.6. Apoptosis y proliferación placentaria	30
5.7. Función placentaria	32
5.8. Angiogénesis placentaria	33
5.9. Factores angiogénicos	33
<b>CAPÍTULO VI: RESULTADOS</b>	<b>36</b>
6.1. Tractos reproductivos	37
6.2. Anatomía de los placentomas	38
6.3. Análisis estructural	40
6.4. Ultraestructura de los placentomas	45
6.5. Apoptosis	48
6.5.1. Análisis cualitativo	48
6.5.2. Análisis estadístico	51
6.6. Proliferación celular	52
6.6.1. Análisis cualitativo	52
6.6.2. Análisis estadístico	55
6.7. Inmunolocalización del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	56
6.8. Inmunolocalización de Angiopoyetina 1 (Ang-1)	58
6.9. Inmunolocalización de Angiopoyetina 2 (Ang-2)	61
6.10. Inmunolocalización de Tie-2	63
6.11. Estudio morfométrico de los vasos sanguíneos	65
6.11.1. Estudio de la densidad de área capilar (DAC)	66
6.11.2. Estudio de la densidad de perímetro capilar (DPC)	66
6.11.3. Estudio de la densidad de número capilar (DNC)	67
6.11.4. Estudio del perímetro capilar medio (PCM)	68
<b>CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
7.1. Discusión	70
7.2. Conclusiones	78
<b>CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>80</b>
8. Bibliografía	81

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Comparación del perímetro capilar medio ( $\mu\text{m}$ ) entre el tejido caruncular y cotiledonario y entre los diferentes tiempos de gestación estudiados.	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de un placentoma con tejido fetal y materno. Tomado de Reynolds <i>et. al.</i> ,(2005).	3
2	Útero grávido de 100 días de gestación donde se identifica desde el borde antimesometrial las diferentes regiones: cérvix, cuerpo y cuerno uterino.	11
3	Esquema de la unidad fetoplacentaria.	21
4	Características generales de las muertes celulares: apoptosis y necrosis.	22
5	Diagrama ilustrativo de las fases morfológicas del proceso de apoptosis. Adaptado de Kerr <i>et. al.</i> , 1972.	23
6	Representación esquemática de las fases del ciclo celular.	26
7	Diagrama de PCNA humano. Tomado de Humphrey <i>et. al.</i> , 1996.	29
8	Diagrama de la interacción entre PCNA y los reguladores del ciclo celular. Tomado de Maga y Hübscher, 2003.	30
9	Relación funcional entre el peso fetal y la edad gestacional.	37
10	Relación funcional entre la longitud cráneo-caudal y la edad gestacional.	38
11	Placentomas caprinos de 50, 100 y 135 días de gestación.	39
12	Microscopía óptica H/E, de placenta caprina de 50 días de gestación.	41
13	Microscopía óptica H/E, de placenta caprina de 100 días y 135 días de gestación.	43
14	Microscopía óptica de alta resolución (MOAR) de placentas caprinas de 50, 100 y 135 días de gestación.	44
15	Microscopía electrónica de transmisión de placentas caprinas de 50 días de gestación.	46

16	Microscopía electrónica de transmisión de placentas caprinas de 135 días de gestación mostrando la interfase materno fetal.	47
17	Microfotografía óptica de placentas 50, 100 y 135 días de gestación marcadas con la técnica de TUNEL.	49 y 50
18	Microfotografía óptica de tejido placentario fetal porcino tratado con la técnica de TUNEL.	50
19	Índice de células apoptóticas TUNEL (+) (IAp) en placentas caprinas de 50, 100 y 135 días de gestación en el tejido caruncular y en el cotiledonario.	51
20	Inmunohistoquímica de PCNA, de placenta caprina de 50, 100 y 135 días de gestación.	53 y 54
21	Microfotografía óptica de tejido placentario fetal porcino inmunomarcado con anticuerpos anti-PCNA.	54
22	Índice de proliferación celular de placentas caprinas a los 50, 100 y 135 días de gestación en el tejido caruncular y en el cotiledonario.	55
23	Inmunolocalización de VEGF en placentas caprinas de 50, 100 y 135 días de gestación.	56 y 57
24	Inmunolocalización de Ang-1 en placentas caprinas de 50, 100 y 135 días de gestación.	58 y 59
25	HSCORE de la intensidad de marcación de la inmunohistoquímica para Ang-1 en placentas de cabras a los 50, 100 y 135 días de gestación.	60
26	Inmunolocalización de Ang-2 en placentas caprinas de 50, 100 y 135 días de gestación.	61 y 62
27	Inmunolocalización de Tie-2 en placentas caprinas de 50, 100 y 135 días de gestación.	63 y 64
28	Microscopía óptica de placenta caprina de 50 días de gestación. H/E.	65
29	Densidad de área capilar	66
30	Densidad de perímetro capilar.	67
31	Densidad de número capilar	67

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANGs	Angiopoyetinas
Ang-1	Angiopoyetina 1
Ang-2	Angiopoyetina 2
ANOVA	Análisis de la varianza
CAR	Caruncular
CBN	Células binucleadas
CMN	Células mononucleadas
COT	Cotiledonario
CTB	Citotrofoblasto
DAC	Densidad de área capilar
DNC	Densidad de número capilar
DPC	Densidad de perímetro capilar
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
H/E	Hematoxilina y Eosina
IAp	Índice apoptótico
Ipr	Índice de proliferación celular
MOAR	Microscopía óptica de alta resolución
ONCCA	Oficina Nacional de Control Comercial Agropecuario
PBS	Buffer fosfato salino
PCM	Perímetro capilar medio
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
SENASA	Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Animal
STB	Sinciciotrofoblasto
Tie-2	Receptor de la túnica interna endotelial 2
TUNEL	TdT-mediated-dUtp Nick End Labeling
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

CAPÍTULO I  
INTRODUCCIÓN  
GENERAL

---

La producción caprina en la República Argentina se basa en la existencia de 4.863.894 cabezas caprinas distribuidas en 46.766 explotaciones ubicadas principalmente en las regiones áridas y semiáridas del país, según datos del año 2017 del Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Animal (SENASA). Los sistemas productivos predominantes son extensivos sobre pastizales naturales muy degradados por sobre pastoreo y tala indiscriminada. La problemática del sector caprino es integradora de limitantes sociales, productivas y ambientales, que al interactuar le confieren al sistema particularidades casi exclusivas (Chagra Dip y col., 2010; Dayenoff y col., 2015).

Estas explotaciones caprinas responden a una economía de subsistencia, de carácter familiar, con grandes carencias de registros técnicos y económicos, que se distribuyen en zonas marginales poco aptas para otras actividades (Bedotti y col., 2007).

La principal producción está orientada a la venta del cabrito lechal con una edad que ronda entre los 30 y 50 días de vida y con un peso faenado de 8 a 12 kg (ONCCA, 2012). Estos sistemas poseen muy bajos índices productivos de alrededor de 0,65 a 0,78 cabrito/cabra/año y una estacionalidad en la producción en los meses estivales. Estos factores sumados a la situación particular de los productores por la deficiente organización, problemas de comercialización, escasa transferencia de tecnología disponible para la producción de cabritos (Chagra Dip y col., 2010; Dayenoff y col., 2015), pone aún más vulnerable estos sistemas de producción.

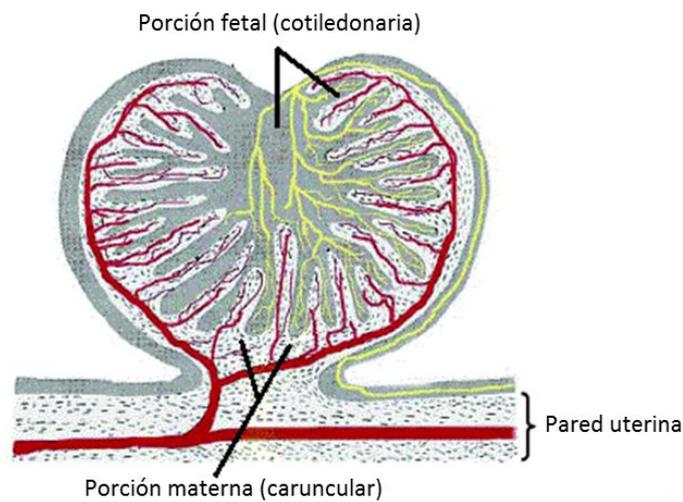
Es sabido que los beneficios en la cría de animales de granja dependen de la eficiencia en la producción, en el crecimiento y desarrollo después del nacimiento. Para optimizar esto es importante partir de un eficiente crecimiento fetal y un buen peso al momento del nacimiento (Greenwood *et. al*, 2010; Blair *et. al*, 2010).

La especie caprina es poliéstrica estacional de fotoperíodo negativo, con una estación reproductiva durante el fin del verano y el otoño. Debido a su período de gestación de 149 días aproximadamente, los partos se presentan en los meses de primavera, coincidente con el aumento de la oferta forrajera.

Uno de los órganos principalmente estudiados para mejorar la eficiencia productiva es la placenta. Esta es un órgano transitorio que se desarrolla durante la gestación y como lo definió Mossman en 1937 (Wooding y Burton, 2008), consiste en la aposición de tejidos maternos y fetales con la función de realizar el intercambio fisiológico. El tejido materno deriva del epitelio y del tejido conectivo del útero, mientras que el componente fetal proviene del epitelio trofoblástico que recubre la superficie del blastocisto. El epitelio junto

con las membranas internas y vasos sanguíneos del *conceptus* forma la estructura placentaria corioalantoidea o coriovitelina (Wooding y Burton, 2008).

La cabra posee una placenta sinepiteliocorial, cotiledonaria y adecidua (Wooding y Burton, 2008). Desde el punto de vista morfológico, es considerada cotiledonaria debido al desarrollo de áreas restringidas de interdigitación entre el tejido materno y fetal, conocidas como placentomas (Santos *et. al*, 1998; Vatnick *et. al*, 1991). Los mismos oscilan en número de 70 a 120 por gestación (Turiello, 2012; Cristofolini y col., 2012). Cada placentoma es el sitio de intercambio de nutrientes fetomaternos. Está compuesto por el tejido fetal cotiledonario que forma vellosidades que se corresponden con criptas maternas carunculares (Wooding y Burton, 2008) (Figura N°1).



**Figura N°1:** Esquema de un placentoma con tejido fetal y materno. Tomado de Reynolds *et. al*, (2005).

La placenta es el órgano que crea la interfaz para el intercambio de nutrientes y desechos entre la madre y el feto, además de minimizar el rechazo del sistema inmunológico materno. A su vez, es una fuente de moléculas de señalización capaces de manipular la fisiología materna para mantener un ambiente propicio y lograr una preñez exitosa (Wooding y Burton, 2008). Estas importantes funciones son posibles gracias a la formación de una extensa red vascular desde el endometrio hacia la placenta (Bairagi *et. al*, 2016).

El tamaño y estructura placentaria, así como la capacidad de ésta para transferir nutrientes, determina un buen desarrollo fetal y un óptimo peso al nacimiento. Estudios en animales han mostrado que la capacidad uterina influye marcadamente en el peso y en el tamaño al nacimiento (Sharma *et. al*, 2012). A su vez, estos parámetros influyen sobre aspectos productivos como la producción de leche, lana y característica de la carcasa

---

(Blair *et. al*, 2010). Por otro lado, la disminución del peso al nacimiento está asociado con incrementos en la mortalidad neonatal (Morel *et. al*, 2008), pobre productividad y alta morbilidad a largo plazo (Garite *et. al*, 2004; Sharma *et. al*, 2012; Kenyon *et. al*, 2013).

El normal desarrollo placentario comprende un importante crecimiento vascular, denominado angiogénesis, con el fin de soportar las demandas crecientes de gases y metabolitos del feto. En gestaciones comprometidas debido a factores de estrés materno tales como sobre o subnutrición, edad materna avanzada, alteración del índice de masa corporal o antecedentes genéticos dan como resultado un desarrollo vascular placentario alterado. Esto afecta negativamente el crecimiento y la función placentaria y, en última instancia, resulta en bajo desarrollo gestacional (Reynolds *et. al*, 2010; Bairagi *et. al*, 2016). El intercambio transplacentario de nutrientes depende del flujo sanguíneo uterino y umbilical los cuales son dependientes de una adecuada vascularización de la interfase materno-fetal (Espinosa, 2011). El crecimiento y desarrollo del lecho vascular es un componente crítico para el crecimiento de todo tejido, incluyendo la placenta y el mantenimiento de la preñez (Reynolds *et. al*, 2005, 2010; Arroyo y Winn, 2008). Si bien existen reportes actuales en cuanto al desarrollo vascular en placentas de especies de interés productivo como en ovinos, bovinos y cerdos, son escasos los antecedentes referidos a la angiogénesis placentaria caprina en sistemas productivos argentinos (Reynolds *et. al*, 2010; Sanchis y col., 2012).

Por lo anteriormente expuesto se plantea como objetivo general de esta Tesis **conocer la morfología, el desarrollo vascular y la expresión de factores angiogénicos en placentomas de los dos últimos tercios de la gestación en cabras.**

# CAPÍTULO II

## HIPÓTESIS

- La placenta caprina aumenta su eficiencia de intercambio en los últimos tercios de la preñez debido a una remodelación de su estructura y al mayor desarrollo vascular controlado principalmente por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las angiopoyetinas (ANGs).

**CAPÍTULO III**  
**OBJETIVOS GENERALES**  
**Y ESPECÍFICOS**

---

---

**Objetivo General**

Conocer la morfología, el desarrollo vascular y la expresión de factores angiogénicos en placentomas de los dos últimos tercios de la gestación en cabras.

**Objetivos Específicos planteados en el Plan de Actividades de la Tesis**

1. Determinar el número de cotiledones, peso placentario y densidad cotiledonaria a los 50, 100 y 135 días de preñez.
2. Describir la morfología y la ultraestructura por microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y por microscopía electrónica de transmisión (MET) respectivamente, en placentas de 50, 100 días de gestación y a término (135 días).
3. Determinar la remodelación celular placentaria por apoptosis a través de la visualización de la fragmentación del ADN mediante el ensayo TUNEL en los diferentes períodos gestacionales analizados.
4. Analizar la proliferación celular mediante la marcación inmunohistoquímica del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en las placentas estudiadas.
5. Determinar la localización del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), de angiopoyetina 1 y 2 (ANG1 y ANG2) y de su receptor tie 2 a través de técnicas inmunohistoquímicas en las placentas estudiadas.
6. Evaluar el desarrollo vascular placentario en los últimos dos tercios de la gestación mediante el estudio de variables morfométricas (área, perímetro y número) de los vasos sanguíneos.

CAPÍTULO IV  
MATERIALES Y  
MÉTODOS

---

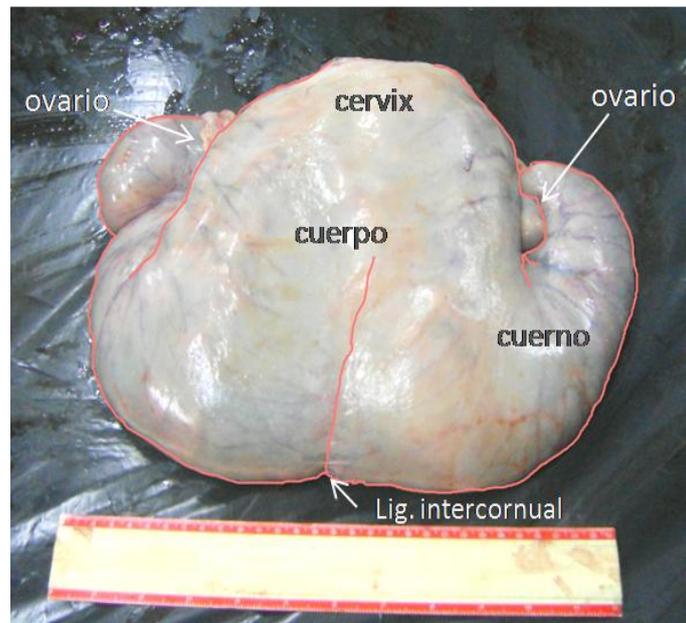
Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud de la Universidad Nacional de Río Cuarto según expediente 201/2016.

#### **4.1. Toma de muestras**

Se utilizaron 15 cabras mestizas adultas entre 2 y 4 años seleccionadas por cronología dentaria; controladas clínicamente y libre de enfermedades infecciosas, destinadas a faena, provenientes de un establecimiento ubicado a 10 km de la UNRC ( $33^{\circ}7' S, 64^{\circ},13' O$ ). El mismo cuenta con un sistema de cría semiextensivo donde los animales permanecieron la mayor parte del día a corral con agua y comida *ad libitum*. Se realizó la detección del celo 2 veces por día, a la mañana y a la tarde, por observación directa. Luego de comprobar la ciclicidad de las hembras se realizó el servicio por monta natural. El diagnóstico de gestación se realizó entre los 25-30 días posteriores al servicio, utilizando un ecógrafo Berger®, modo B, de tiempo completo, provisto de un transductor lineal transrectal de 7.5 Mhz. Se eutanasiaron 5 animales a los 50 días, 5 a los 100 días y 5 a los 135 días de gestación. Luego se procedió a incidir el abdomen por línea media y retirar el útero grávido. El mismo fue refrigerado y trasladado de inmediato al laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología Animal de la UNRC para su posterior procesamiento.

#### **4.2. Procesamiento del útero grávido y medición de parámetros morfológicos.**

Cada cuerno uterino se incidió a lo largo del borde antimesometrial (Figura N°2) y el o los fetos fueron removidos y pesados de manera individual. A su vez se midió la longitud cráneo-caudal de los fetos. Se contaron el número de placentomas por unidad feto-placentaria. Fueron extraídos diez placentomas al azar (tres de la región cercana al cérvix, cuatro del cuerpo y tres del cuerno) de cada uno de los úteros y fijados en solución de formol tamponado, pH 7,5 para las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas y en glutaraldehído para microscopía electrónica.



**Figura N°2:** Útero grávido de 100 días de gestación donde se identifica desde el borde antimesometrial las diferentes regiones: cérvix, cuerpo y cuerno uterino.

### **4.3. Análisis de estructura placentaria**

#### **4.3.1. Técnica histológica convencional para microscopía óptica**

Se tomaron porciones de 3 placentomas (1 por cada región) de 6 mm<sup>3</sup> aproximadamente y se fijaron en una solución de formol tamponado a pH 7,5. Posteriormente, se deshidrataron con baterías de alcoholes de graduación creciente, para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos de  $\pm 4 \mu\text{m}$  de espesor; parte de estos cortes se colorearon con Hematoxilina-Eosina para el reconocimiento de estructuras tisulares. El resto de los cortes fueron destinados para la técnica de inmunolocalización de VEGF, Ang-1, Ang-2, Tie-2 y PCNA y la detección de apoptosis *in situ* mediante el ensayo TUNEL.

#### **4.3.2. Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR)**

Para el estudio de la estructura placentaria por microscopía óptica de alta resolución, las muestras de tejido placentario se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en solución tampón fosfato de Sörensen (0,1 M, pH 7,4) durante 3 h a 4°C. Luego se lavaron dos veces con solución tampón fosfato y seguidamente se posfijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron dos veces en solución tampón fosfato y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona. Se procedió luego a la preinclusión en resina epoxi EMBED 812 1:1 en acetona 100% durante

---

toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente a una inclusión en resina epoxi 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 fueron colocados sobre portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina sobre una platina termostatizada, para permitir la entrada del colorante al tejido incluido en la resina.

En todos los casos, la observación se realizó en un microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) y se adquirieron las imágenes con una cámara Canon Powershot G6 7.1 megapixels (Canon, Japón) adosada al microscopio.

#### **4.4. Análisis de ultraestructura placentaria.**

##### **4.4.1. Técnica para microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Las muestras de tejido placentario se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en S-collidine (0,2M, pH 7,4) y se postfijaron en tetróxido de osmio al 1%, luego se deshidrataron en acetona. La inclusión se realizó en resina epoxi EMBED 812. Los cortes ultrafinos (20-60 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación de los cortes de tejido placentario se realizó con un microscopio electrónico de transmisión Elmiskop 101 (Siemens, Alemania). Las imágenes digitales fueron adquiridas en el microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EXII (Jeol, Japón).

##### **4.5. Detección de apoptosis *in situ*: ensayo TUNEL (TdT-mediated-dUtp Nick End Labeling)**

Para la detección *in situ* de apoptosis en las muestras placentarias caprinas de los diferentes períodos gestacionales seleccionados, se utilizó el equipo comercial ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis (Chemicon Internacional). Los cortes histológicos placentarios obtenidos fueron desparafinados mediante 2 pasajes por xilol de 15 minutos cada uno; posteriormente se rehidrataron con baterías de alcoholes de graduación decreciente de 5 minutos cada uno, se lavaron 2 veces en agua destilada (10 minutos cada uno) y 2 veces en PBS pH 7,2 (10 minutos cada uno). Luego se incubaron con proteinasa K (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con agua desionizada (2 minutos cada uno). Posteriormente se trataron con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 5 minutos y se lavaron 2 veces con PBS o agua deionizada (5 minutos cada uno). Luego se agregó sobre los cortes histológicos la solución tampón de equilibrio

durante 15 minutos, pasado el tiempo se eliminó el exceso y se incubaron con la enzima ADN-transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT) a 37°C durante 1 hora, en cámara húmeda. Se detuvo la reacción con el agregado de solución stop por 10 minutos y posteriormente se lavaron durante 3 minutos con PBS. Luego fueron incubados con el conjugado anti-digoxigenin-peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Posteriormente, se lavó 4 veces con PBS (2 minutos cada uno) e incubó con la solución cromógena DAB durante 10 minutos, se contrastó con hematoxilina de Mayer, se deshidrató con batería de alcoholes de concentración creciente y se montó en Entellan (Merck).

A través del ensayo TUNEL se determinó la presencia de células apoptóticas (núcleos amarronados) y de células viables (núcleos contrastados de azul), presentes en las muestras placentarias de los períodos gestacionales estudiados. Los cortes fueron observados con un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania), la adquisición de las imágenes se realizó con una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio y el procesamiento de las mismas a través del software AxioVision Release 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania).

A partir de los resultados obtenidos mediante el ensayo TUNEL, se contaron las células TUNEL positivas (+) de los epitelio trofoblástico y maternos, con respecto a las células totales para cada estructura placentaria. De la relación entre dichos valores se determinó el índice de células en apoptosis en los diferentes períodos de gestación seleccionados

$$I_{Ap} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células TUNEL (+)}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células totales}} \times 100$$

La cuantificación fue realizada por un único operador, sobre dos secciones de cada portaobjeto correspondiente a los diferentes estadios de preñez estudiados. Los valores fueron expresados en medias y desviaciones estándar. Se realizó un ANOVA y un test DGC para evaluar el efecto del día de gestación y el tejido sobre el IAp para cada estructura placentaria. Los resultados fueron analizados con la versión 2009 del software InfoStat (Di Rienzo y col., 2009) y se consideró estadísticamente significativo un  $p \leq 0.05$ . Como control positivo se utilizó un corte de tejido placentario de cerdo de 60 días de gestación.

---

---

#### **4.6. Técnica inmunohistoquímica para la determinación del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)**

Para la determinación de PCNA se realizó una técnica inmunohistoquímica utilizando anticuerpos comerciales específicos (Dako, Denmark).

Los cortes de tejidos fueron desparafinados y rehidratados y luego fueron inmersos en peróxido de hidrógeno al 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 30 min para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Se realizó el bloqueo de los anticuerpos inespecíficos con solución de Blotto (5 gr de leche descremada y 1 ml de Tritón en 100 ml de PBS), por 30 min para luego realizar la incubación con el anticuerpo primario (anti-PCNA dilución 1:50) en cámara húmeda durante toda la noche entre 4 y 8°C. Los anticuerpos fueron detectados con un equipo comercial Avidina-Biotina-Peroxidasa (Cell Marque, USA). Los cortes fueron lavados con PBS entre cada paso. Se realizó el revelado con una solución de 3,3'-diaminobenzidina (Cell Marque, USA) por 3 min o hasta la aparición de color marrón. Los cortes fueron contrastados con hematoxilina de Mayer por 50 seg y luego deshidratados y montados con Entellan (Merck, Alemania), para ser observados en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de las imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico.

La cuantificación de las células positivas y negativas se realizó sobre cinco campos seleccionados al azar (magnificación de 400x) por cada muestra. El índice de proliferación celular (Ipr) fue calculado como el porcentaje de células positivas en relación al total de células.

Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos, utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2009) y se consideró estadísticamente significativo un  $p \leq 0.05$ .

#### **4.7. Técnicas inmunohistoquímicas para la determinación de los factores angiogénicos**

##### **4.7.1.- Determinación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)**

Para la determinación de VEGF se realizó una técnica inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA). La técnica se realizó a temperatura ambiente, luego de desparafinar y rehidratar los cortes histológicos. Los portaobjetos conteniendo los cortes de tejido placentario fueron tratados previamente con 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno por 5 min y lavados con solución

---

salina tamponada (PBS pH 7,2). Fueron incubados con suero de caballo (1:100 PBS) durante 1 h. Luego fueron incubados con el anticuerpo primario anti-VEGF durante toda la noche refrigerado entre 4 y 8°C en cámara húmeda. Posteriormente fueron lavados con PBS (2 lavados de 10 min cada uno) e incubados durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo biotinilado. Fueron lavados con PBS (2 lavados de 10 min cada uno) y tratados con el complejo streptavidina-peroxidasa por 20 min. Luego del período de incubación, fueron lavados con PBS (2 lavados de 10 min cada uno) y tratados con la solución cromógena, diaminobencidina (DAB) hasta la aparición de color marrón o durante 3 min. Posteriormente, fueron contrastados con hematoxilina de Mayer por 50 seg, lavados con solución de hidróxido de amonio al 0,08 % por 30 seg, deshidratados en batería de alcoholes de graduación creciente y montados con Entellan (Merck, Alemania), para su observación en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de las imágenes se realizaron mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico.

#### **4.7.2.- Determinación Ang-1, Ang-2 y Tie-2**

Ang-1, Ang-2 y Tie-2 se determinaron inmunohistoquímicamente utilizando anticuerpos específicos Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA). La técnica se realizó a temperatura ambiente. Luego de desparafinar y rehidratar los cortes histológicos, se realizó el desenmascaramiento de los epítomos antigénicos para permitir el reconocimiento por los anticuerpos. Para la misma se colocaron los portaobjetos en coplin de plástico con solución tamponado de citrato 10 mM, pH 6 (dilución 1:10, Dako, Estados Unidos) y se los sometió a 10 minutos de hervor en el horno microondas a potencia de 600 watts. Después de dejarlos enfriar 20 minutos fueron tratados con 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno por 20 minutos y lavados con solución salina tamponada (PBS pH 7,2). Fueron incubados con suero de caballo (1:100 PBS) durante 1 h. Luego fueron incubados con el anticuerpo anti Ang-1, anti Ang-2 o anti Tie-2 (todos en dilución 1:50) en cámara húmeda durante toda la noche a 4-8°C. Posteriormente se continuó con el mismo protocolo descrito para la inmunomarcación de VEGF.

#### **4.7.3. Semicuantificación de la inmunomarcación**

Se evaluaron 5 campos al azar del tejido placentario por animal, con un microscopio a 200 X de magnificación. La intensidad de inmunomarcación para Ang-1 fue clasificada de la siguiente manera: (-): negativo, (+): débil, (++) : moderado, (+++) : intensa. Para cada tejido un valor de High Score (HSCORE) fue calculado a través de la sumatoria

---

de los porcentajes de tejido placentario marcados a cada nivel de intensidad y multiplicado por el ponderado para esa intensidad de marcación (Cristofolini y col., 2010) de la siguiente manera:  $HSCORE = \sum P_i (i+1)$ , donde  $i$  representa el valor de intensidad y  $P_i$  el porcentaje de células correspondientes. Los valores fueron determinados por dos investigadores a diferentes tiempos y su promedio fue calculado.

Se realizó un análisis de ANOVA comparando las medias de los diferentes períodos gestacionales usando el software InfoStat (Di Rienzo y col., 2009).

#### **4.8. Medición de variables morfométricas (área, perímetro y número) de los vasos sanguíneos:**

Se tomaron 3 cortes histológicos de cada placenta estudiada y se colorearon con hematoxilina-eosina. Para este estudio se tomaron fotografías de 10 campos al azar de cada una de las 15 placentas estudiadas (un total de 150 campos) con un aumento de 200x. La adquisición de las imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada a un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania).

Se midieron las variables morfométricas área, perímetro y número de los capilares, utilizando el software Axiovision Release 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania). Se calculó la densidad de área capilar (DAC: área capilar total como proporción del área de tejido), la densidad de perímetro capilar (DPC: perímetro capilar total como proporción del área de tejido), la densidad de número capilar (DNC: número de capilares totales como proporción del área del tejido) para el tejido caruncular y el cotiledonario por separado. Además de los anteriores parámetros, se calculó como medida del tamaño capilar, al perímetro capilar medio (PCM) para ambos tejidos en los diferentes períodos de gestación.

Se realizó un ANOVA para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos, utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2009) y se consideró estadísticamente significativo un  $p \leq 0.05$ .

# CAPÍTULO V

## MARCO TEÓRICO

---

---

### 5.1. Producción caprina

En Argentina, la producción de carne caprina no tiene un alto impacto económico a nivel nacional, siendo su importancia más visible en las economías regionales donde también se destaca su relevancia como factor social al permitir la subsistencia de los productores familiares (Zimmerman, 2013).

En los últimos años, la capricultura, en distintas regiones se han encaminado a la producción de leche, la que se comercializa en forma fluida o se emplea en la producción de quesos artesanales (Alonso y col., 2012). La leche de cabra debido a sus características particulares para la salud del consumidor, le otorga importantes ventajas con respecto a la de vaca (Salva y col., 2013).

En tercer lugar en orden de relevancia se encuentra la producción de fibra cashmere, la cual es una de las fibras textiles de origen animal más preciadas por su suavidad y finura. La potencialidad del mercado internacional de esta fibra caprina ha motivado el desarrollo de la misma en varios países (Lanari, 2013). La producción de cashmere en el país se encuentra en desarrollo en sistemas de producción tradicionales, utilizando animales de raza criolla descendientes de animales asiáticos productores de fibra (Lanari, 2004).

### 5.2. Reproducción caprina

La especie caprina es poliéstrica estacional, con estros que se presentan cada 19–21 días. Es frecuente que al comienzo de la época reproductiva y después de incorporados los machos, un porcentaje de cabras presenten estros infértiles y ciclos de corta duración (5-7 días). Se puede considerar al fotoperíodo, estrés, nutrición, factores feromonales y el medio social del hato como condicionantes de los factores reproductivos. Las hembras detectan estos cambios y condicionan su respuesta por medio de la variación de su actividad reproductiva (estación de estro y tasa de ovulación), de manera que se establece una “estrategia” que asegura el éxito de la concepción, preñez y lactación (Cueto y col., 2000).

En base a un período de gestación de 149 días (144 a 151), la estación reproductiva se presenta principalmente durante el fin del verano y el otoño (fotoperíodo negativo). En primavera se presentan estros que son de baja fertilidad (Cueto y col., 2000). Los mismos tienen una duración media de 18 a 36 horas que se manifiesta por hipersensibilidad, búsqueda del macho, movimiento de la cola, micción frecuente, edematización y enrojecimiento de la vulva e inmovilización frente al macho (De la Rosa, 2011).

---

La cabra, durante toda la preñez depende de la funcionalidad del cuerpo lúteo para mantener la gestación, en relación a la producción de progesterona (Igwebuike y Ezeasor, 2012). A diferencia, en la oveja, a partir del segundo tercio de la gestación, la placenta pasa a ser la fuente de progesterona. Esta característica en los caprinos se asocia a la presentación de abortos espontáneos tardíos, debido por ejemplo a estrés nutricional (Cueto y col., 2000).

Los beneficios en la cría de animales de granja dependen de la eficiencia en la producción, en el crecimiento y desarrollo después del nacimiento. Para optimizar esto es importante partir de un eficiente crecimiento fetal y buen peso al momento del nacimiento (Blair *et. al*, 2010; Greenwood *et. al*, 2010). El tamaño y estructura placentaria, así como la capacidad de ésta para transferir nutrientes, determina un buen desarrollo fetal y esto incide directamente sobre el peso al nacimiento. Estudios en animales han mostrado que la capacidad uterina influye marcadamente en el peso y tamaño al nacimiento (Sharma *et. al*, 2012). A su vez, estos parámetros influyen sobre la producción de leche, lana y la característica de la carcasa (Blair *et. al*, 2010). Por otro lado, la disminución del peso al nacimiento está asociado con incrementos en la mortalidad neonatal (Morel *et. al*, 2008), pobre productividad y alta morbilidad a largo plazo (Garite *et. al*, 2004; Sharma *et. al*, 2012; Kenyon *et. al*, 2013).

Diversos autores, (Gall *et. al*, 1994; Sanchis, 2013). para predecir el tiempo de gestación con fines científicos, evaluación patológica o manejo reproductivo han evaluado diferentes aspectos fetales como la longitud cráneo-caudal, la osificación esquelética y la longitud de la diáfisis de los huesos largos. Estas evaluaciones les permitieron desarrollar regresiones ecuacionales que posibilitan predecir la edad de gestación con suficiente agudeza.

### **5.3. Placenta caprina**

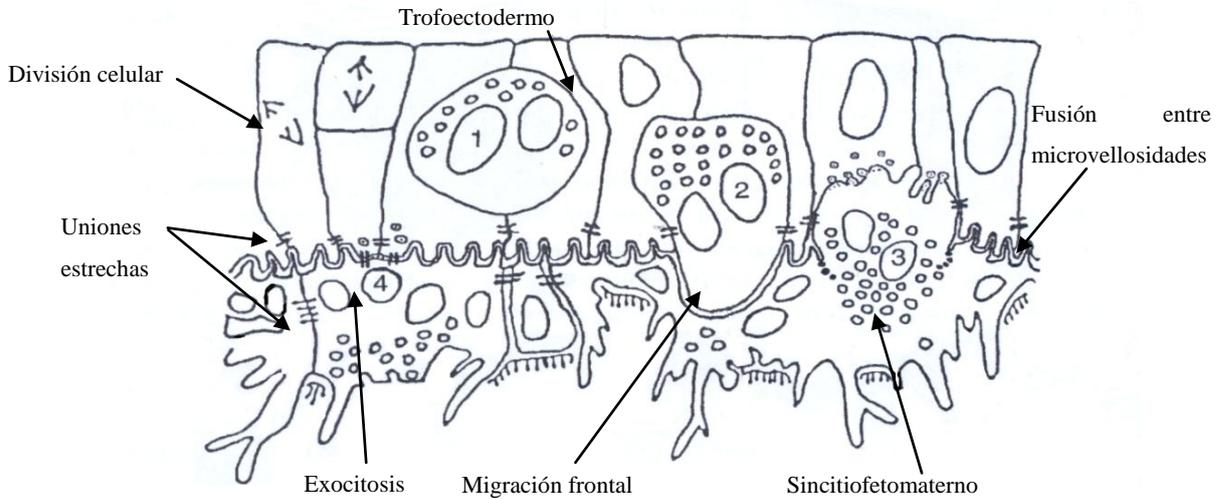
La placenta es un órgano transitorio que se desarrolla durante la gestación y consiste en la aposición de tejidos maternos y fetales con la función de intercambio de gases, nutrientes y desechos (Grazul-Bilska *et. al*, 2011). El tejido materno deriva del epitelio y del tejido conectivo del útero, mientras que el componente fetal proviene del epitelio trofoblástico que recubre la superficie del blastocisto. El epitelio junto con las membranas internas y vasos sanguíneos del concepto forma la estructura placentaria corioalantoidea o coriovitelina (Wooding y Burton, 2008).

La cabra posee una placenta cotiledonaria, sinepiteliocorial y adecidua (Wooding, 2008). Desde el punto de vista morfológico, es considerada cotiledonaria debido al desarrollo de áreas restringidas de interdigitación entre el tejido materno y fetal, conocidas como placentomas (Santos *et. al*, 1998). En ovinos y caprinos, estos últimos son principalmente de forma cóncava donde el tejido materno, caruncular, rodea una pequeña porción de tejido fetal, cotiledonario (Vatnick *et. al*, 1991; Hafez *et. al*, 2007; Vonnahme *et. al*, 2008 Igwebuike y Ezeasor 2013). Difieren marcadamente de los placentomas bovinos, los que son principalmente de forma convexa con el tejido cotiledonario rodeando por completo al tejido caruncular (Laven y Peters, 2001; Wooding y Burton, 2008). Los mismos oscilan en número de 70 a 120 por gestación (Wooding y Burton, 2008; Turiello, 2012; Igwebuike y Ezeasor 2013). Cada placentoma es el sitio de intercambio de nutrientes fetomaternos y está compuesto por el tejido fetal cotiledonario que forman vellosidades que se corresponde con criptas maternas carunculares. (Wooding y Burton, 2008; Sammin *et. al*, 2009; Igwebuike, 2009; Igwebuike y Ezeasor, 2013).

En los últimos años se ha demostrado por medio de numerosas técnicas, que el epitelio fetal está constituido por células mononucleadas intercaladas con células binucleadas. Estas últimas están ubicadas a diferentes niveles en el epitelio, dependiendo del grado de madurez de las mismas. Algunas células binucleadas se desprenden del epitelio, migran hacia el lado materno y se fusionan con las células del epitelio uterino formando sincitios fetomaternos (Dent en 1973; Wooding y Burton, 2008; Igwebuike y Ezeasor 2013). Por esta razón actualmente es aceptada la denominación para la placenta de la cabra y otros rumiantes como sinepiteliocorial (Figura N°3). En el interior de las células binucleadas se han descrito la presencia de gránulos con contenido glicoproteico (Klisch *et. al*, 2010; Igwebuike y Ezeasor, 2013), que al incorporarse al epitelio endometrial, ejercerían su acción en el epitelio glandular (Noel *et. al*, 2003).

Las células mononucleadas son las células predominantes del epitelio fetal. Son cúbicas o columnares altas, asientan sobre la membrana basal y se extienden hasta la zona de contacto materno-fetal. Su borde apical posee numerosas microvellosidades que participan en la íntima interdigitación con las microvellosidades del epitelio uterino. En estrecha relación con el epitelio trofoblástico, se encuentran pequeños capilares fetales en una posición “intraepitelial” en los cuales la lámina basal de los capilares se encuentra fusionada con la lámina basal del epitelio fetal (Lawn *et. al*, 1969; Hafez *et. al*, 2010). Esta característica particular parece disminuir la distancia interhemal entre la sangre

materna y la fetal, para aumentar el intercambio transplacentario (Wooding y Burton, 2008; Igwebuike y Ezearsor 2013).



**Figura N°3:** Esquema de la unidad fetoplacentaria. Se observa el trofoectodermo generado por división celular y formación del sincitiofetomaterno por migración de las células binucleadas (1-2), fusión apical (3) y derrame del contenido celular (3-4). Tomado y modificado de Wooding y Burton, 2008.

#### 5.4. Apoptosis

A partir del año 1972, los investigadores Kerr, Wyllie y Currie utilizaron el término “apoptosis” (*apo*: “fuera de o separación” y *ptosis*: “caída”) para describir una nueva forma de muerte celular fisiológica o suicidio celular programado involucrado en el recambio celular. Demostraron con sus estudios que dicho proceso desempeña un importante rol en la regulación del número celular en una variedad de tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

La apoptosis es un proceso biológico esencial, permanente, dinámico e interactivo que ocurre normalmente durante el desarrollo, el envejecimiento y como un mecanismo homeostático para mantener la población celular en los tejidos. Se produce como un mecanismo de defensa tal como en reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por agentes nocivos, a través de los cuales los organismos eliminan las células indeseables pero sin causar una respuesta inflamatoria (Angosto, 2003). Aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicas como patológicas, que la pueden desencadenar, no necesariamente todas las células se mueren en respuesta al mismo estímulo (Zinkel *et. al*, 2005; Elmore, 2007).

Se pueden distinguir diferentes tipos de muerte celular, entre las que podemos mencionar además de la apoptosis, la necrosis. Ambos procesos pueden ocurrir

independientemente, de forma secuencial, así como simultáneamente (Hirsch, 1997; Zeiss, 2003). En algunos casos es el tipo de estímulo y/o grado, el que determina la modalidad de muerte. De este modo, dosis bajas de una variedad de estímulos perjudiciales tales como calor, radiación, hipoxia y medicamentos citotóxicos contra el cáncer puede inducir apoptosis, pero estos mismos en dosis más altas pueden desencadenar la necrosis. Esta última, puede originarse por una lesión aguda, irreversible, derivada de una condición patológica que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y/o de resistencia. Puede ser disparada por diferentes factores como deficiencia en el aporte nutricional, respiratorio o circulatorio; eventos físicos como calor, frío, radiaciones, traumatismos, agentes biológicos (microorganismos) y agentes químicos (sustancias tóxicas). Estos factores alteran la permeabilidad de la membrana plasmática, debido a la falta de regulación en el paso de iones y agua. Como consecuencia se produce la liberación de enzimas lisosomales y la ruptura de las membranas, con la liberación de proteínas desnaturalizadas y fragmentos de ADN en el espacio intercelular, generando una respuesta inflamatoria local al atraer células del sistema inmune (Figura N°4).

APOPTOSIS	NECROSIS
Muerte fisiológica. Proceso muy regulado y controlado.	Muerte no fisiológica; muerte accidental traumática. Proceso no regulado.
Se produce durante el desarrollo, mantiene la homeostasis tisular y elimina células dañadas.	No se produce durante el desarrollo
Inducida por estímulos intracelulares o extracelulares.	Inducida por un daño celular o tisular.
Proceso energéticamente activo y que requiere la biosíntesis de proteínas.	Proceso energéticamente pasivo.
Sigue un orden específico de eventos. Condensación de la cromatina y fragmentación internucleosomal del DNA genómico. Mantenimiento estructural de orgánulos.	La célula se hincha, se lisan orgánulos subcelulares y se desintegra de forma desordenada.
Mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática. El contenido celular queda englobado en los cuerpos apoptóticos. No se produce la liberación del contenido celular. No se produce inflamación.	La ruptura de la membrana conduce a la liberación del contenido celular al espacio extracelular; asociada con inflamación.
Participación activa de componentes celulares. Degradación mediada por caspasas.	Proceso pasivo.
Fagocitosis de cuerpos apoptóticos.	Lisis celular, y daño a las células vecinas.

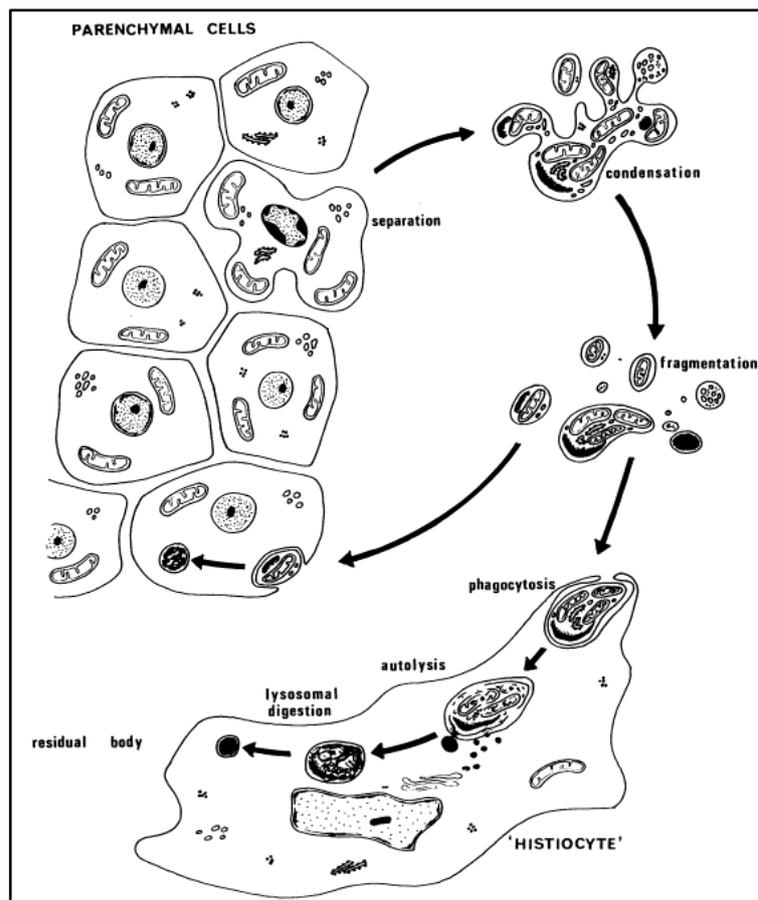
**Figura N°4:** Características generales de las muertes celulares: apoptosis y necrosis. Tomado de Iracheta, 2007.

“*In vivo*” la muerte celular programada puede ocurrir en células individuales dispersas en los tejidos (durante la muerte celular fisiológica) o en áreas continuas (después de una lesión). Las células apoptóticas son fagocitadas y digeridas por células

vecinas rápidamente (Kerr *et. al*, 1972; Ellis *et. al*, 1991) lo que dificulta el seguimiento de los cambios morfológicos “*in vivo*”. Sin embargo, los cambios inducidos por diversos agentes o insultos a una célula “*in vitro*” reflejan los eventos fisiológicos “*in vivo*” (Häcker, 2000).

A través de la microscopía óptica y electrónica se han identificado los distintos cambios morfológicos que se producen durante la apoptosis (Häcker, 2000). Algunos de ellos, pueden ser observados por microscopía óptica, a veces con la ayuda de colorantes específicos y otros, se pueden detectar únicamente por microscopía electrónica.

Al morir una célula por apoptosis, los primeros cambios implican la contracción celular y la picnosis. Con la contracción de las células, las mismas se tornan más pequeña con el citoplasma denso y los orgánulos más condensados. Esto también implica la separación de las células circundantes en el tejido y de la matriz extracelular debido a la pérdida de las uniones de las membranas y desorganización del citoesqueleto. Es por esto que las células se observan redondeadas al microscopio (Figura N°5).



**Figura N°5:** Diagrama ilustrativo de las fases morfológicas del proceso de apoptosis. Adaptado de Kerr *et. al*, 1972. (*Parenchymal cells*: células parenquimales; *Separation*: separación; *Condensation*: condensación; *Fragmentation*: fragmentación; *Phagocytosis*: fagocitosis; *Autolysis*: autólisis; *Lysosomal digestion*: digestión lisosomal; *Residual body*: cuerpos residuales; *Histiocyte*: histiocito).

---

La picnosis es el rasgo más característico de la apoptosis. Es el resultado de la condensación de la cromatina que comienza como una compactación en anillo a lo largo de la envoltura nuclear que se extiende para abarcar todo el núcleo. La célula se reorganiza en los llamadas “cuerpos apoptóticos”, un término acuñado por Kerr *et. al.*, (1972) para describir vesículas formadas por membrana plasmática que varían en tamaño y composición. Estos pueden contener la totalidad del contenido de la célula en varias combinaciones, tales como elementos citosólicos, organelas o parte del núcleo condensado. Posteriormente los mismos son fagocitados por macrófagos o células vecinas y digeridos a través de una vía lisosomal (Häcker, 2000).

Además de los cambios morfológicos observados por microscopía óptica, se han descrito por microscopía electrónica, en diferentes tejidos, alteraciones en la estructura de organelas y de la membrana plasmática. La mayoría de los estudios coinciden en que las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi mantienen su morfología normal al menos durante las primeras etapas de la apoptosis. Con el transcurrir del proceso se puede observar, según Elmore (2007), núcleo electrodenso, fragmentación nuclear, membrana celular intacta, desorganización de organelas citoplasmáticas, vacuolas claramente alargadas y protuberancias irregulares en la superficie celular la cual presenta circunvoluciones y adquiere una apariencia vesicular característica. Como resultado de estas grandes invaginaciones se forman los cuerpos apoptóticos. Desorganización del citoesqueleto con pérdida de la forma celular. También se puede revelar la pérdida de microvellosidades de células epiteliales y presencia de vacuolas citoplasmáticas y mitocondriales (Bozzo y col., 2013).

Según Elmore (2007) la apoptosis puede ser definida como: “un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de proteasas denominadas caspasas y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula”.

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas pero está conducido por dos clases de proteasas especializadas: las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas efectoras o ejecutoras son activadas por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera sea el estímulo (Fraser and Evan, 1996; Green, 2005).

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas que conducirán a la muerte de la célula. Se expresan señales

---

(fosfatidilserina) para inducir la fagocitosis y se activan proteínas específicas para preparar a la célula en el bloqueo de las funciones metabólicas (Ortega *et. al*, 2001).

## 5.5. Proliferación

La proliferación celular es el incremento del número de células por división celular. Es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o envejecidos. Es característica de cada tipo celular por lo que está controlada de forma muy específica. Asimismo cada tipo celular presenta una serie de receptores de factores de crecimiento característicos que también regulan la proliferación al controlar la respuesta a tales factores (Korgun *et. al*, 2006).

El control de la proliferación celular implica un delicado equilibrio entre los efectos de diferentes moléculas reguladoras, incluyendo hormonas y factores de crecimiento que proporcionan, en el entorno inmediato de la célula, señales para estimular o inhibir la replicación celular (Clarke y Sutherland, 1990).

### 5.5.1. Ciclo celular

Los tejidos con células en proliferación, se encuentran realizando un proceso denominado ciclo de división celular, que tiene como fin en células somáticas, la síntesis de dos células, en la cual cada una contiene cromosomas idénticos a los de la célula progenitora. El mismo está constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que conducen al crecimiento de la célula y su división.

Se compone de cuatro fases principales:

- Fase G1: es la primera fase del ciclo que transcurre entre el final de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. Durante este tiempo la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Se produce crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN.
- Fase S (síntesis): se produce la replicación o síntesis del ADN. Como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al comienzo del ciclo.

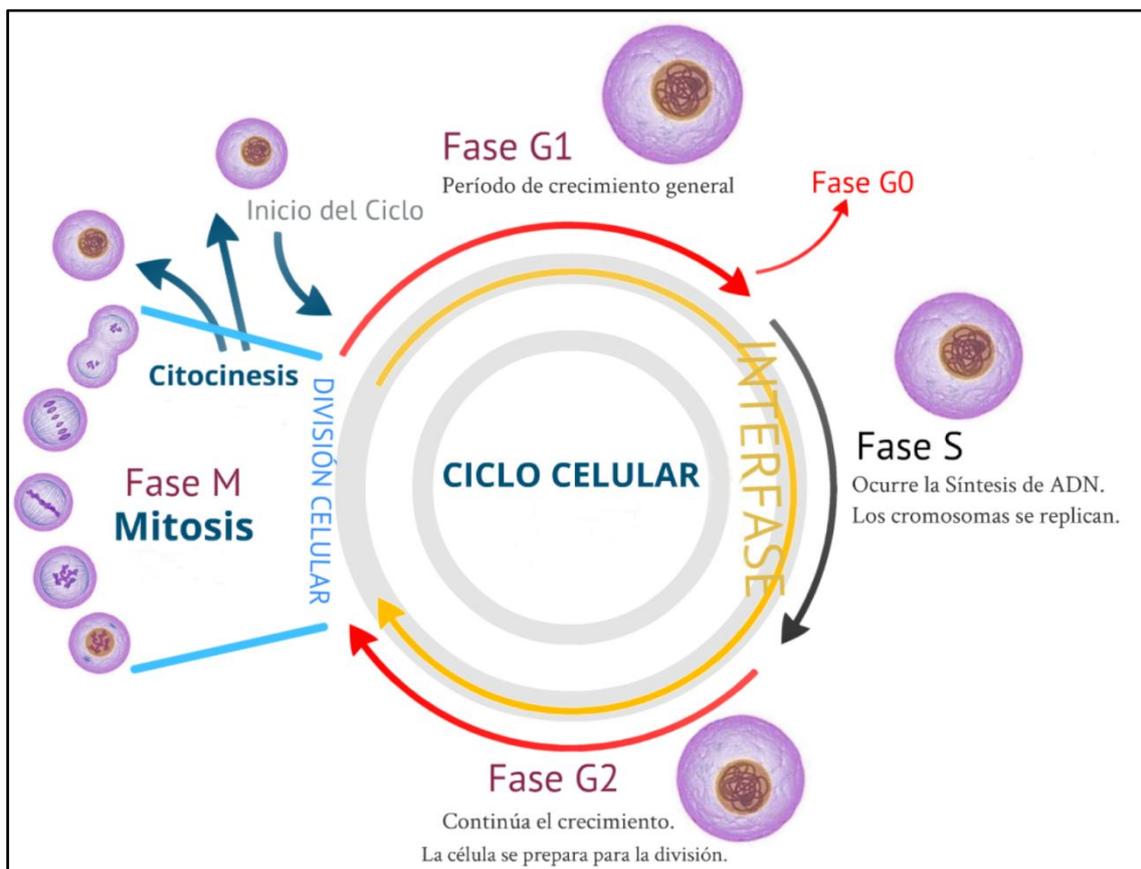
Fase G2: es la fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la síntesis de proteínas y ARN. Al final de este período se observan cambios en la estructura celular que

indican el principio de la división celular. Termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis, teniendo ahora cada cromosoma dos cromátidas.

- Fase M (mitosis y citocinesis): división celular en la que una célula progenitora (célula somática) se divide en dos células hijas idénticas. Esta fase incluye la mitosis, a su vez dividida en: profase, metafase, anafase, telofase; y la citocinesis, que se inicia ya en la telofase (Lodish *et. al*, 2005).

Cuando las células no están en actividad proliferante se dice que han salido del ciclo celular y se encuentran en estado de quiescencia o fase G0. El aumento en el número de células de un determinado tejido es inherente a la proliferación. Por el contrario, en estado de quiescencia la célula cumple con todas sus funciones específicas, al igual que en el caso anterior, pero sin duplicar su contenido genómico ni dividirse (Figura N°6).

Una instancia crucial del ciclo es el que ocurre en el punto R (restrictivo) de la fase G1, momento en el cual la célula decide si debe continuar en el ciclo celular dando otra ronda de división o, por el contrario, quedar en estado de quiescencia (Lodish *et. al*, 2005).



**Figura N°6:** Representación esquemática de las fases del ciclo celular

En células en estado G0 o en el punto de restricción de G1, los factores E2F se encuentran formando un complejo con una proteína con dominio “bolsillo” pRB (proteína

---

del retinoblastoma). Este complejo interacciona con sitios específicos en los promotores de los genes implicados en la síntesis de ADN y reprime su transcripción. Los complejos cdk-ciclina que se activan en la fase G1 fosforilan a las proteínas con “bolsillo”, las cuales se disocian del complejo, lo que favorece a E2F para estimular la transcripción (Vidal y Koff, 2000). Por consiguiente, la regulación de la expresión de los genes implicados en el control del ciclo celular está estrechamente coordinada con las señales extracelulares del medio. En ausencia de factores estimuladores de la transcripción, la célula permanece en G0 impidiendo la producción de componentes del ciclo celular. En respuesta a factores de crecimiento, la cascada de señales generada da lugar a la activación de una serie de genes de forma secuencial, lo que tendrá como respuesta biológica la inhibición del bloqueo del ciclo, la entrada en G1/S y la proliferación celular (Vidal y Koff, 2000).

Durante el desarrollo temprano, muy pocas células abandonan el ciclo celular, pero en estado adulto la mayoría de ellas se encuentran en estado quiescente. Principalmente células especializadas como las del sistema hematopoyético, el epitelio intestinal o hepáticas, mantienen una proliferación activa en el organismo adulto (Malumbres y Barbacid, 2005).

### **5.5.2. Reguladores del ciclo celular.**

Como ocurre en otros procesos celulares, para que el ciclo celular se ponga en marcha, es necesario la presencia de un estímulo que la célula sea capaz de interpretar, a través de sus receptores, para poder encender la maquinaria molecular del ciclo. Las proteínas, como por ejemplo los factores de crecimiento, constituyen el estímulo o señal extracelular que le indica a la célula proliferar. Estas desencadenan la transcripción de genes vitales para la activación de los complejos de control del ciclo celular (Sherr y Roberts, 1999).

Una vez que los factores de crecimiento interaccionan con sus receptores localizados en la membrana plasmática, se dispara una cascada de transducción de señales cuyo evento fundamental es la síntesis de ciclina D1 que interacciona con CDK4/6 y permite la entrada de la célula en la fase G1 del ciclo celular (Murray, 2004).

### **5.5.3. Control extracelular de la división celular.**

Las células de un organismo pluricelular deben ser controladas de manera que se dividan sólo y cuando el organismo necesite otras células, ya sea para permitir el crecimiento de los tejidos o reponer las células perdidas. En consecuencia, para que una

---

célula animal se divida, no es necesario únicamente nutrientes, sino también señales químicas provenientes de otras células (Lodish *et. al*, 2005).

La mayoría de las moléculas de señalización extracelular son proteínas solubles secretadas por otras células o proteínas unidas a la superficie de otras células o a la matriz extracelular. Muchas de ellas actúan positivamente para estimular determinados procesos, pero otras tienen una función inhibitoria.

Estas proteínas se dividen en tres grupos dependiendo de su función:

1-Mitógenos: son proteínas que estimulan la división celular contrarrestando los mecanismos intracelulares de freno que bloquean la progresión del ciclo. Por ejemplo: somatomedina, eritropoyetina, etc. Actúan uniéndose a receptores de la membrana en la fase G1 para permitir la entrada de la célula a la fase S. Esto desencadena una cascada de fosforilaciones, las cuales transmiten el estímulo a diversas moléculas efectoras de transcripción produciendo la transcripción de genes, entre los que destacan los que codifican a las ciclinas G1 (Canepa, 2007).

2- Factores de crecimiento: estimulan el crecimiento celular mediante la síntesis y la inhibición de proteínas y otras macromoléculas. Al igual que la mayoría de los mitógenos, los factores de crecimiento se unen a receptores de superficie celular que luego activan diversas vías de señalización intracelular, las cuales podrán inducir aumento de la síntesis proteica o bien una disminución de la degradación proteica. Todo ello conducirá al crecimiento celular. Ejemplos: factor de crecimiento transformante Beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Canepa, 2007).

3- Factores de supervivencia: promueven la supervivencia celular por supresión de los programas de muerte celular o apoptosis. Esta necesidad de señales de otras células para la supervivencia, contribuye a que las células sólo sobrevivan cuando y donde se las requiere. Al igual que los anteriores, suelen unirse a receptores de la membrana celular, lo cual activa vías de señalización intracelular que inhiben la muerte celular, en general mediante la regulación de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. Algunos factores de supervivencia son: IL-3, IGF-1 (Lodish *et. al*, 2005).

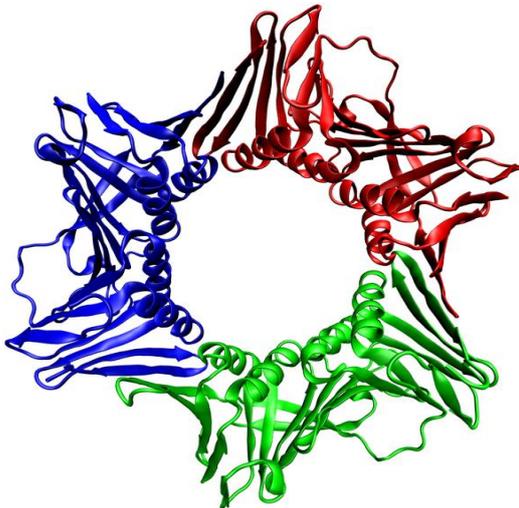
La matriz extracelular (MEC) es un complejo macromolecular dinámico que se sintetiza a nivel local, constituida principalmente por proteoglicanos, proteínas estructurales como el colágeno y las proteínas de adhesión como laminina y fibronectina (Lodish *et. al*, 2005). La MEC es imprescindible en la regulación del crecimiento, el movimiento y la diferenciación de las células que residen en ella. En el crecimiento y la

diferenciación celular intervienen al menos dos tipos de señales que actúan en conjunto. Una procede de moléculas solubles como los factores de crecimiento polipeptídicos y los inhibidores del crecimiento, y en la otra participan componentes insolubles de la MEC que interactúan con las integrinas celulares. La interacción entre la MEC y los factores de crecimiento pueden influir en el crecimiento, la movilidad, la diferenciación y la síntesis proteica celular (Lodish *et. al*, 2005). La MEC provee la estructura necesaria donde se asienta el lecho vascular placentario y provee integridad y elasticidad a los órganos en desarrollo

La perturbación de este equilibrio de interacciones célula-matriz puede provocar pérdida de la arquitectura tisular con varias consecuencias para el tejido, por ejemplo pérdida en los patrones de diferenciación, proliferación y muerte celular.

#### 5.5.4. Antígeno nuclear de proliferación celular

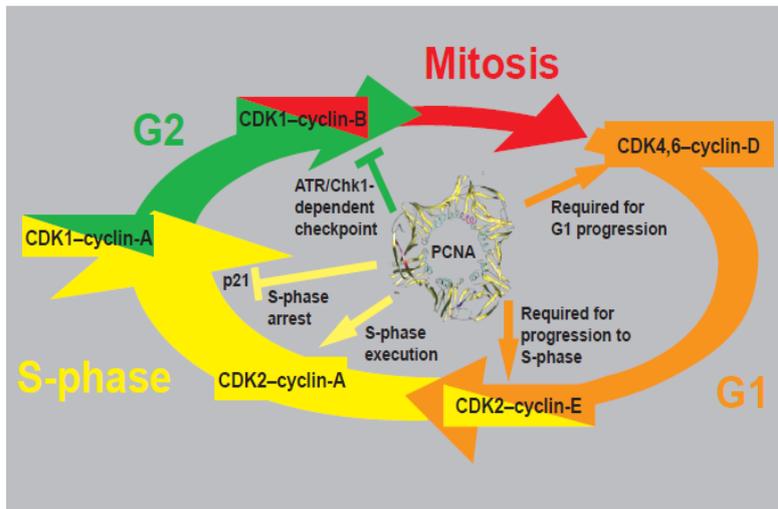
El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína de 36 kDa que forma parte de la familia de la ADN polimerasa. Es esencial en la vida de organismos unicelulares y también se convierte en una proteína crítica para la sobrevivencia de organismos multicelulares (Paunesku *et. al*, 2001). El PCNA forma un aro proteico deslizante constituido por 3 subunidades monoméricas que al combinarse forman una estructura en anillo (Figura N°7).



**Figura N°7:** Diagrama de PCNA humano. Es una proteína de abrazadera de ADN, deslizante que es parte del complejo de replicación del ADN y sirve como un factor de procesividad para la ADN polimerasa. Se muestran las tres cadenas de polipéptidos individuales que componen el trímero. Tomado de Humphrey *et. al*, (1996)

La principal función del PCNA es actuar como co-factor de la enzima ADN polimerasa en la replicación del ADN, al unirse a la enzima y no al ADN permitiendo el deslizamiento de la primera y la síntesis de una nueva hebra. Además de dicha función se han descrito otras como reparación del ADN (por escisión de nucleótidos, por escisión de bases y reparación

de genes) y control del ciclo celular por interacción con los complejos ciclina/CDK (Maga y Hübscher, 2003; Moldovan *et. al*, 2007; Figura N°8).



**Figura N°8:** Diagrama de la interacción entre PCNA y los reguladores del ciclo celular. Tomado de Maga, y Hübscher, (2003).

## 5.6. Apoptosis y proliferación placentaria

La placenta representa un tipo de órgano que expresa un alto rango de crecimiento en función de suplir las demandas metabólicas del feto en crecimiento (Reynolds *et. al*, 2010).

La homeostasis de los tejidos placentarios requiere un balance entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular, de esta manera, mitosis y apoptosis mantienen el equilibrio celular de los mismos. El mantenimiento de la integridad estructural y funcional del tejido placentario involucra recambio celular regulado, el cual es dependiente de un delicado balance entre los tres procesos antes mencionados (Benirschke y Kaufmann, 2000).

En la placenta humana, el crecimiento y la proliferación conducen a la formación de ramificaciones de las vellosidades coriónicas y al aumento de la superficie epitelial. El epitelio trofoblástico que recubre las vellosidades fetales está constituido principalmente por tres poblaciones celulares: el citotrofoblasto (CTB) que corresponde a la población de “stem cell”, de la que se diferencian los otros tipos de trofoblastos; el sinciotrofoblasto (STB) responsable del intercambio de gases y nutrientes, así como también de la secreción de hormonas y péptidos y el trofoblasto extravelositario. El STB se origina por fusión de células del citotrofoblasto y está representado por citoplasma con múltiples núcleos (Rodríguez *et. al*, 2011). Las células del STB no pueden replicarse, por lo tanto la mantención y expansión del sincicio dependerá de la incorporación continua de células

---

desde el CTB mediante fusión sincicial. De esta única forma, el STB se mantiene funcionalmente activo (Castellucci *et. al*, 2006). En el otro extremo de esta remodelación continua, el material celular envejecido y desechable es vertido desde la superficie apical del STB hacia la circulación materna envueltos en una membrana protectora. En este proceso, la fusión sincicial correspondería al estadio iniciador de la cascada apoptótica del CTB, mientras que la extrusión del material apoptótico desde el STB sería el resultado final del estadio efector. Una vez que se ha completado la fusión sincicial, el proceso de apoptosis presenta un bloqueo inhibitorio debido a que durante la fusión también se incorporan altas concentraciones de enzimas antiapoptóticas, tales como Bcl-2 (Huppertz *et. al*, 2006). De esta forma, la cascada sufre una detención, permaneciendo en un estado apoptótico latente por 3 o 4 semanas (Castellucci *et. al*, 2006). Luego el proceso se reinicia con la activación de caspasa efectora 3, conduciendo a la degradación de proteínas y ácidos nucleicos

Boos *et. al*, (2003) en placentas bovinas demostraron, a través de estudios histoquímicos, que tanto la proliferación y la apoptosis exhiben patrones que son específicos para cada etapa de la gestación, así como para los tipos individuales de células. La proliferación juega un papel importante en el crecimiento de la placenta y junto con la apoptosis, en la regeneración celular y la nutrición histotrófica del feto (Hoffmann y Schuler, 2002). Esta remodelación es necesaria para la regulación del intercambio materno/fetal, permitiendo un adecuado balance que asegure una preñez exitosa (Merkis y col., 2007). A su vez la apoptosis es esencial para la maduración de la placenta y la liberación adecuada de las membranas fetales (Boos *et. al*, 2003; Paździor *et. al*, 2012).

En placentas porcinas se ha determinado el modo en que varían los índices apoptóticos a lo largo de la gestación, demostrando una mayor actividad en períodos de reorganización tisular, como el comienzo de la gestación y en períodos cercanos al parto con la preparación de la placenta para su posterior liberación (Cristofolini y col., 2013). Otros estudios (Levy y Nelson, 2000; Boos *et. al*, 2003; Rudge *et. al*, 2012; Bozzo y col., 2013; Cristofolini y col., 2013) indican que los índices apoptóticos incrementan progresivamente durante la preñez, como parte del desarrollo placentario normal. Sin embargo, se ha visto que la apoptosis incrementa aun más en preñeces complicadas por algunas patologías como preeclamsia, diabetes y crecimiento fetal restringido (Levy *et. al*, 2002; Cobellis *et. al*, 2007).

En bovinos las carúnculas crecen durante toda la gestación pero el crecimiento de los cotiledones cesa y su masa puede incluso disminuir más allá de los 7 meses de

---

gestación (Prior y Laster, 1979; Reynolds *et. al.*, 1990; Ferrell, 1991). Este hallazgo es reflejado por las tasas reducidas de crecimiento de los cotiledones (Prior y Laster, 1979) y un cambio en la relación tisular materno/fetales dentro del placentoma. El aumento de la masa uterina se puede lograr mediante proliferación celular o hipertrofia. En este sentido estudios histológicos, histoquímico y bioquímicos de los placentomas y del tejido interplacentomal de rumiantes, señalan que este aumento se debe principalmente a la proliferación celular (Björkman, 1969; Reynolds *et. al.*, 1990; Wooding *et. al.*, 1993; Zheng *et. al.*, 1996).

En placentas bovinas se observó diferentes índices de proliferación entre los distintos tipos celulares. Las células en el epitelio caruncular tienen mayor actividad proliferativa que el resto de los tipos celulares, incluso al epitelio trofoblástico. Este último no muestra cambios en la proliferación a lo largo de la gestación lo que se refleja con su composición uniforme (Wooding y Wathes 1980).

Si bien varios estudios en diferentes especies de animales domésticos muestran la dinámica de crecimiento y regeneración celular, a nivel de los epitelios placentarios materno y fetal, no se encuentran datos que expresen lo propio en gestaciones normales en la especie caprina.

### **5.7. Función placentaria**

La placenta juega un rol fundamental en la provisión de metabolitos al feto. Este intercambio transplacentario de nutrientes depende del flujo sanguíneo uterino y umbilical los cuales son dependientes de una adecuada vascularización de la interface materno-fetal (Espinosa, 2011). El crecimiento y desarrollo del lecho vascular es un componente crítico para el crecimiento de todo tejido, incluyendo la placenta y el mantenimiento de la preñez (Reynolds *et. al.*, 2010; Arroyo y Winn, 2008). En este sentido, la importancia del desarrollo vascular en la función placentaria ha sido largamente reconocida. Se ha demostrado que el gran aumento del intercambio transplacentario, debido al crecimiento exponencial del feto durante la segunda mitad de la gestación, depende principalmente del crecimiento de los lechos vasculares placentarios y del aumento del flujo de sangre tanto uterina como umbilical (Reynolds *et. al.*, 2005; Vonnahme *et. al.*, 2006; Wooding y Burton, 2008; Bairagi *et. al.*, 2016). Por consiguiente, los factores que influyen en el aumento del intercambio, tendrán un importante impacto en el desarrollo y crecimiento fetal afectando la supervivencia y crecimiento neonatal (Reynolds *et. al.*, 2010).

---

El establecimiento de la circulación funcional materna y fetal, es uno de los primeros eventos que ocurren durante el desarrollo de la placenta y continúa durante toda la gestación (Reynolds y Redmer, 1995). La adecuada formación de una nueva red de vasos sanguíneos, angiogénesis, es acompañada por un marcado aumento en el flujo sanguíneo uterino y umbilical (Regnault *et. al*, 2003).

### **5.8. Angiogénesis placentaria**

La angiogénesis se define como el proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. Este proceso se realiza a través de múltiples pasos, el primero de ellos es la dilatación de vasos preexistentes, aumento de la permeabilidad vascular y degradación de la matriz extracelular. Posteriormente ocurre la proliferación y migración de células endoteliales. Estas células se organizan en forma lineal y forman los tubos endoteliales. Los nuevos vasos son cubiertos por células periendotheliales reconstituyendo la matriz extracelular y lámina basal (Reynolds y Redmer, 2001; Demir *et. al*, 2007; Bairagi *et. al*, 2016).

Se han desarrollado numerosos métodos morfométricos para investigar el patrón de desarrollo vascular a lo largo de la gestación, en placentas de ovejas y vacas (Borowicz *et. al*, 2007; Vonnahme *et. al*, 2008). Los mismos concluyeron que la vascularización, medida como densidad de área vascular (área vascular en relación al área del tejido), del tejido caruncular (CAR) se incrementa continuamente desde el día 50 de la gestación hasta el día 140 y la del tejido cotiledonario (COT) se incrementa el doble que ésta, durante el mismo período. El crecimiento en el tejido caruncular se acompaña por un pequeño aumento del número de capilares y gran incremento del diámetro capilar. Mientras que en el tejido cotiledonario hay un gran aumento del número de capilares con una disminución en el diámetro capilar (Borowicz *et. al*, 2007).

### **5.9. Factores angiogénicos**

Numerosos factores están implicados en la angiogénesis, siendo los principales reguladores de los procesos de angiogénesis el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y la familia de proteínas angiopoyetinas (ANGs), así como sus respectivos receptores, flk-1 yflt-1 receptores de VEGF y tie 2 receptor de Angiopoyetina (Regnault *et. al*, 2003; Reynolds *et. al*, 2010; Valdés y Corthorn, 2011).

---

VEGF es una glicoproteína homodimérica de aproximadamente 45 kDa con características de potente estimulador específico de la permeabilidad vascular, quimioatrayente de células endoteliales como así también tiene acción de promover el crecimiento de los vasos sanguíneos (Neufeld *et. al.*, 1999; Bogic *et. al.*, 2000). Estudios llevados a cabo en ratas (Rutland *et. al.*, 2007) y en placenta humana determinaron que VEGF es el regulador primario de la angiogénesis en procesos normales y patológicos, incluyendo el crecimiento vascular placentario. En humanos se lo ha encontrado también en las células del sincitiotrofoblasto como en las del citotrofoblasto (Ahmed *et. al.*, 1995; Shiraishi *et. al.*, 1996). VEGF y sus receptores (VEGFR) han sido localizados en placentas de muchas especies incluyendo placentas de cerdos, ovejas y humanas (Shore *et. al.*, 1997; Bogic *et. al.*, 2000; Reynolds y Redmer, 2001; Vohnname *et. al.*, 2008; Sanchis y col., 2012). En la placenta ovina VEGF es producido y almacenado en las células del citotrofoblasto y tendría un efecto parácrino sobre las células endoteliales para mediar la angiogénesis (Bogic *et. al.*, 2000). También se han descrito otras funciones biológicas para VEGF, entre ellas, la presencia de VEGF en las células del citotrofoblasto, indicarían que puede estar involucrado en el crecimiento y desarrollo de este tejido al final de la preñez cuando disminuye la angiogénesis (Bogic *et. al.*, 2000; Li *et. al.*, 2005; Kaczmarek *et. al.*, 2009).

El sistema angiopoyetina y el receptor de la túnica interna endotelial 2 (Tie-2) juega un papel crítico en la regulación de la supervivencia celular, maduración y estabilidad del endotelio vascular (Kappou *et. al.*, 2015). El sistema angiopoyetina incluye cuatro ligandos (Ang-1, Ang-2, Ang-3 y Ang-4), proteínas de 70 kDa aproximadamente, de los cuales los mejores caracterizados son Ang-1 y Ang-2, y sus receptores tirosin quinasa correspondientes (Tie-1 y Tie-2). Estos factores actúan complementariamente al VEGF contribuyendo en las últimas etapas de la angiogénesis (Rizov *et. al.*, 2017). Tanto Ang-1 como Ang-2 se unen a Tie-2, un receptor específico de células endoteliales con una afinidad similar. Sus actividades biológicas difieren significativamente, Ang-1 promueve la reorganización de las células endoteliales, la integridad estructural de los vasos sanguíneos mediante el reclutamiento y la interacción con las células peri-endoteliales (Reynolds y Redmer, 2001; Augustin *et. al.*, 2009). En contraste, Ang-2 actúa como un antagonista de Ang-1, interrumpiendo las conexiones entre las células endoteliales y perivasculares promoviendo la apoptosis y la regresión vascular, en presencia de bajos niveles de VEGF. Sin embargo, con niveles elevados del mismo, se ha demostrado que promueve la neovascularización (Scharpfenecker *et. al.*, 2005, Augustin *et. al.*, 2009).

---

Durante la gestación, las ANGs se producen principalmente en la placenta y desempeñan una función similar que en el resto de los tejidos (Kayisly *et. al*, 2006). Seval *et. al*, (2008) demostraron la localización de Ang-1 y su receptor Tie-2 en placentas humanas, con una marcación intensa en el sincitiotrofoblasto y de forma más débil en las células endoteliales dentro de las vellosidades placentarias, en concordancia con su papel en la promoción de la maduración vascular y estabilización. Asimismo, Ang-1 y Ang-2, están implicadas en la promoción del crecimiento y migración del trofoblasto *in vitro* (Dunk *et. al*, 2000). Además, Tie-2 también se expresa en el trofoblasto participando en la regulación de su comportamiento (Dunk *et. al*, 2000).

Estudios en placentas ovinas (Reynols *et. al*, 2005; Valdés y Corthorn, 2011; Bairagi *et. al*, 2016) remarcan la importancia de Ang-1 y 2 y su receptor Tie-2 que, actuando en conjunto con el VEGF y el FGF, permiten la remodelación, la organización microvascular y la sobrevivencia de las células endoteliales. Si bien existen algunos trabajos sobre el rol que desempeñan las ANGs y su receptor en las placentas de animales domésticos, actualmente no se encuentra bibliografía disponible respecto a su localización e importancia en placentas caprinas a lo largo de la gestación.

# CAPÍTULO VI

## RESULTADOS

## 6. Resultados

### 6.1. Tractos reproductivos

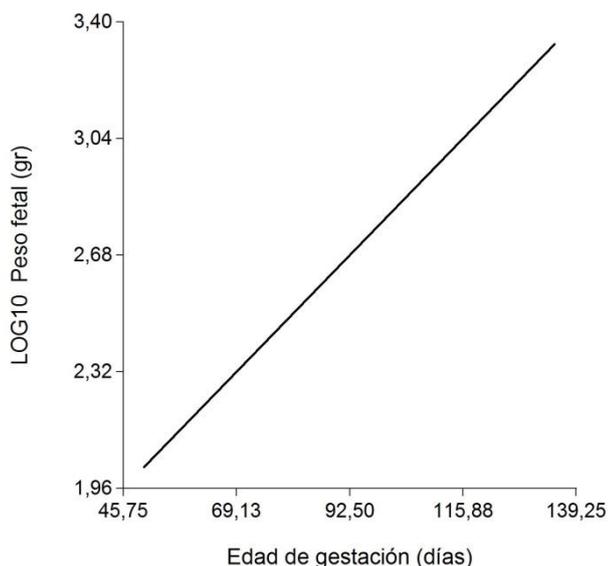
De los fetos obtenidos de las 15 placentas procesadas, se midió la longitud cráneo-caudal y se tomó el peso fetal. Con los datos obtenidos se realizaron regresiones lineales en busca de una fórmula que nos permita, en el futuro, estimar la edad de gestación de fetos caprinos mestizos a partir de las variables antes mencionadas. Para este propósito se utilizó el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et. al*, 2009).

Se realizó la siguiente regresión lineal mostrando como la variable “peso fetal” se relaciona funcionalmente con la variable “edad de gestación”. El estudio mostró una relación lineal entre peso fetal y edad gestacional ( $p < 0.0001$ ) y el diagrama, una relación positiva entre ambas variables (Figura N°9). A partir de los coeficientes de regresión se dedujo una ecuación del modelo ajustado, el que puede ser utilizado para fines predictivos:

$$y = a + bx$$

Función:  $y = 1.26 + 0.02x$

Donde “y” representa el logaritmo de base 10 del peso fetal (gr) y “x” la edad de gestación (días).



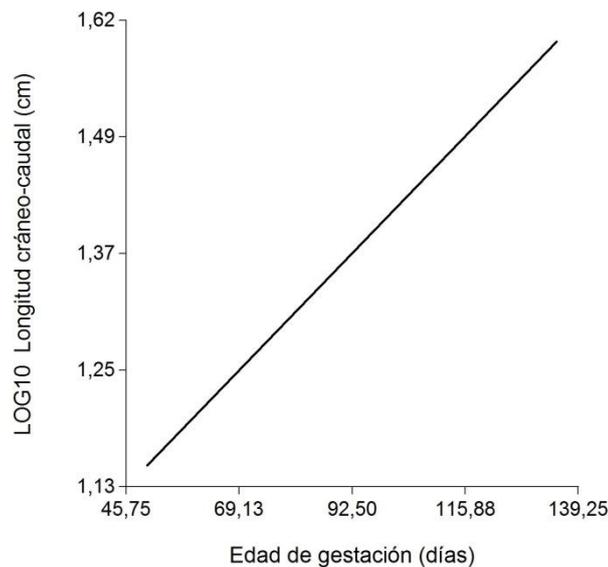
**Figura N°9** Relación funcional entre el peso fetal y la edad gestacional.  $F=264.23$ ,  $n=15$ ,  $gl=1$ ,  $p < 0.0001$  y  $R^2 = 0.95$ .

Relacionando funcionalmente la variable “longitud cráneo-caudal” con la “edad de gestación”, se pudo determinar que existe una relación lineal entre ambas variables

( $p < 0.0001$ ) y una relación positiva debido a la pendiente de la recta (Figura N°10). A partir de los coeficientes de regresión se calculó una ecuación del modelo ajustado:

Función:  $y = 0.89 + 0.01x$

Donde “y” representa el logaritmo de base 10 de la longitud cráneo caudal (cm) y “x” la edad de gestación (días).



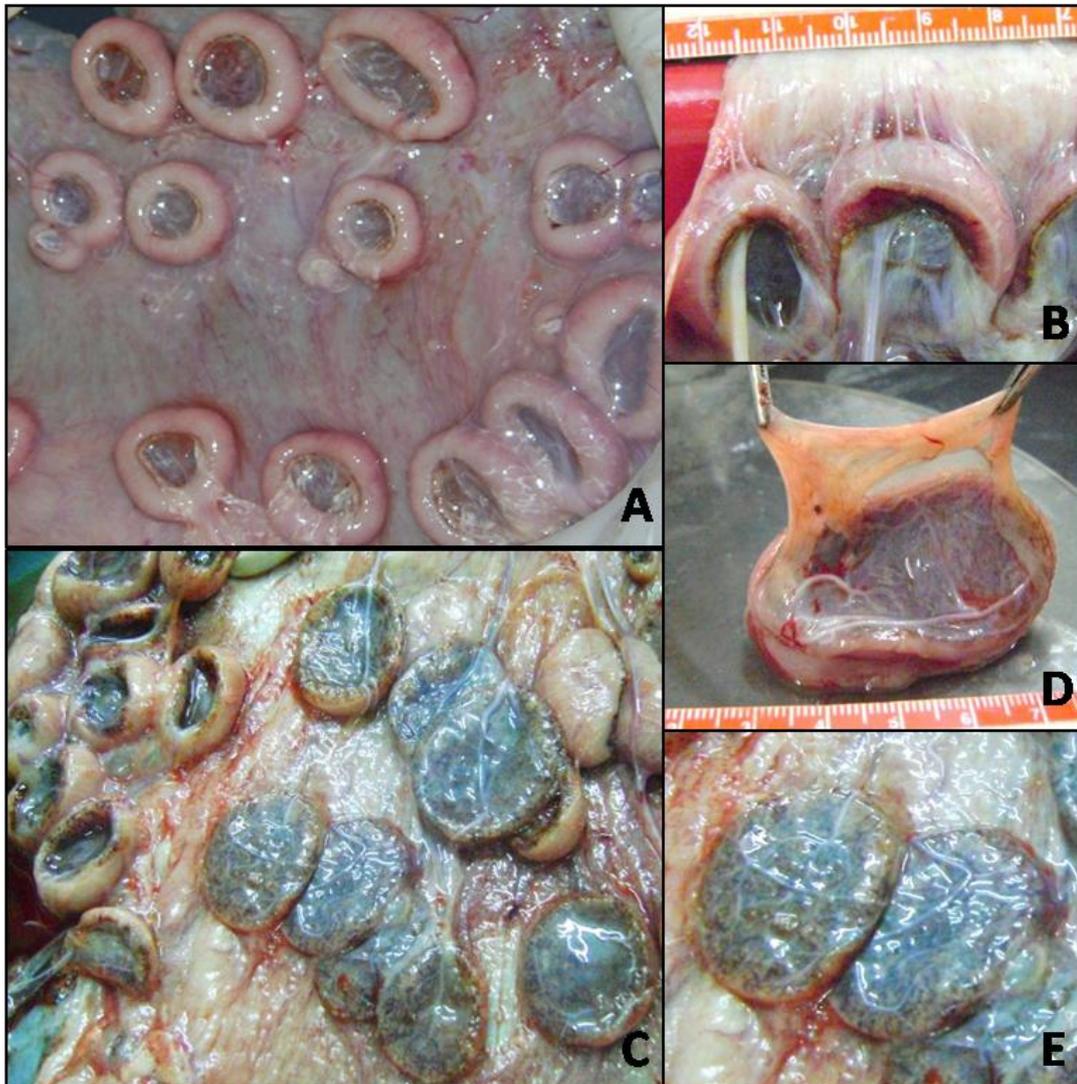
**Figura N°10:** Relación funcional entre la longitud cráneo-caudal y la edad gestacional.  $F=413.81$ ,  $n=15$ ,  $gl=1$ ,  $p < 0.0001$  y  $R^2 = 0.97$ .

La proximidad a 1 de los índices de regresión lineal,  $R^2$ , de la recta de regresión, indica la fuerte correlación entre ambas variables. Al tratarse de un valor positivo, es posible afirmar que a medida que aumenta una de las variables, la otra también aumenta (Berrocal Sánchez, 2001).

## 6.2. Anatomía de los placentomas

Las placentas de las cabras procesadas exhibieron las características propias de una placenta múltiple cotiledonaria con áreas estrechas de firme adhesión entre el tejido materno y el fetal, los llamados placentomas, separadas por una región interplacentomal sin unión entre ambos tejidos. Dichos placentomas se encontraban distribuidos sin ningún orden o distribución específica. En cuanto a su forma externa, fueron redondos u ovoides. A los 50 y 100 días de gestación, los mismos tuvieron la conformación típicamente

descrita para la placenta caprina donde la carúncula presentó una forma cóncava con su superficie de contacto rodeando completamente al tejido fetal. Hacia el final de la gestación algunos placentomas presentaron una forma diferente a la mencionada anteriormente, siendo de aspecto plano donde el tejido materno contacta con el fetal sin envolverlo (Figura N°11)



**Figura N°11:** Placentomas caprinos de 50, 100 y 135 días de gestación. **A y B:** placentas de 50 días de gestación con placentomas típicamente cóncavos. **C:** placenta de 135 días de gestación con placentomas de forma cóncava y planos. **E:** ampliación de placentomas planos. **D:** placentoma de 100 días de gestación de forma ovoide donde se observa el tejido caruncular rodeando al tejido cotiledonario.

El número de placentomas en los úteros grávidos procesados variaron entre 85 y 179. El tamaño de los mismos en los diferentes períodos de gestación estudiados fue entre 1,75 y 5,25 cm de diámetro promedio.

---

---

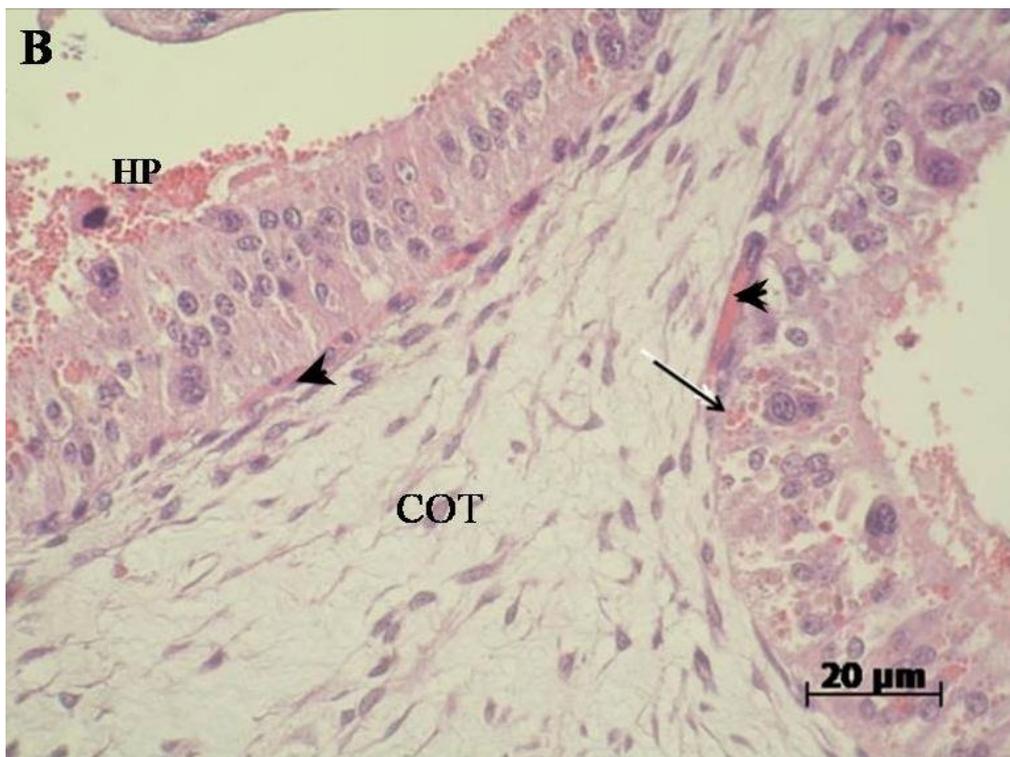
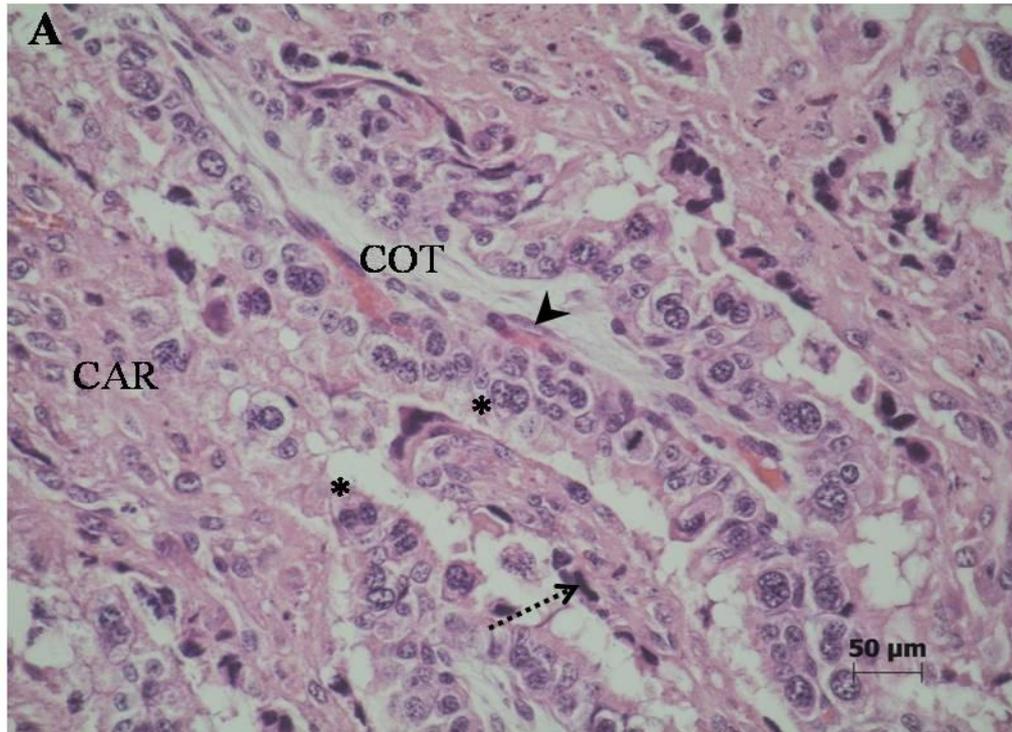
### 6.3. Análisis estructural

A través de la microscopía óptica y MOAR se estudió la estructura de los placentomas. El epitelio materno, caruncular, es delgado y está constituido por células mononucleadas, cúbicas, con un núcleo claro, intercaladas con células multinucleadas, planas. Estas últimas, también llamadas sincitios, son las células predominantes de este epitelio y tienen un número variado de núcleos con predominio de heterocromatina y escaso citoplasma. Este tejido se encuentra en íntimo contacto con el epitelio fetal. El tejido conectivo se muestra ricamente irrigado con vasos de muy diferentes tamaños.

El epitelio fetal, cotiledonario, tiene apariencia pseudoestratificada y está constituido principalmente por células mononucleadas (CMN) alternadas con células binucleadas (CBN) que están dispuestas a distinta altura y profundidad. Las CBN son grandes y redondeadas, poseen dos núcleos grandes y claros, con predominio de eucromatina. Su citoplasma se colorea más oscuro que el de las CMN adyacentes, además presenta estructuras redondeadas, sin colorear, semejantes a gránulos citoplasmáticos. Algunas de estas CBN se ubican en la profundidad del epitelio y no contactan con la membrana basal; otras, en cambio, se ubican más superficialmente y protruyen hacia el lado materno. También se observaron algunas CBN libres en la zona de unión materno-fetal. El interior de las CBN se presenta con variaciones en su coloración, siendo más claras las ubicadas en proximidad a la membrana basal del epitelio y más oscuras a medida que se van acercando al epitelio materno. Éstas fueron identificadas, tanto a los 50, 100 y 135 días de gestación (Figura N°12A).

Las CMN son las predominantes del epitelio fetal, siendo columnares altas en las bases de las vellosidades fetales (zona arcada) y cúbicas a lo largo del resto de la vellosidad. Poseen un solo núcleo grande con predominio de eucromatina y un citoplasma claro. La base de las mismas asienta sobre la membrana basal, mientras que su borde apical contacta con la zona de unión materno-fetal.

Se observan algunos capilares fetales como invaginados en la cara basal de dichas células. La membrana basal del endotelio capilar está fusionada con la membrana basal del epitelio trofoblástico. Además en el tejido conectivo se observaron pequeños capilares dispuestos muy cercanos al epitelio trofoblástico (Figura N°12B).



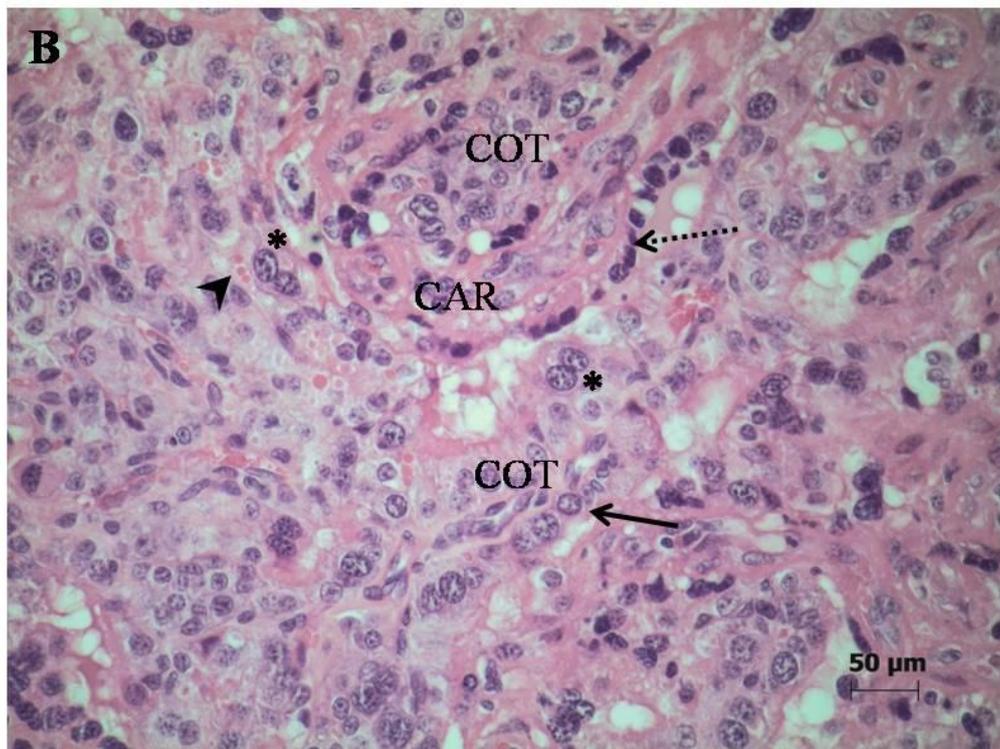
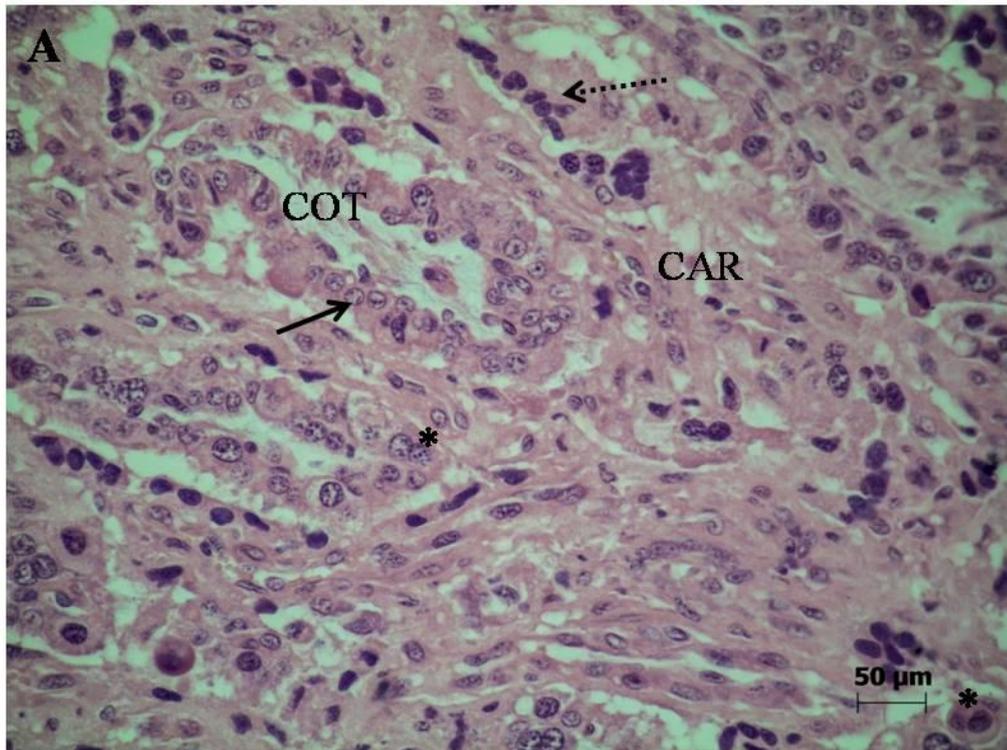
**Figura N°12:** Microscopía óptica H/E, de placenta caprina de 50 días de gestación. **A:** se observa la morfología placentaria, con vellosidades cotiledonarias interdigitadas en el tejido caruncular. **B:** se observa la base de una vellosidad fetal, zona arcada. COT: cotiledonario; CAR: caruncular. HP: hematoma placentario; asterisco: células binucleadas; flecha entrecortada: sincitios; cabeza de flecha: capilares fetales; flecha continua: hemafes citoplasmáticos.

---

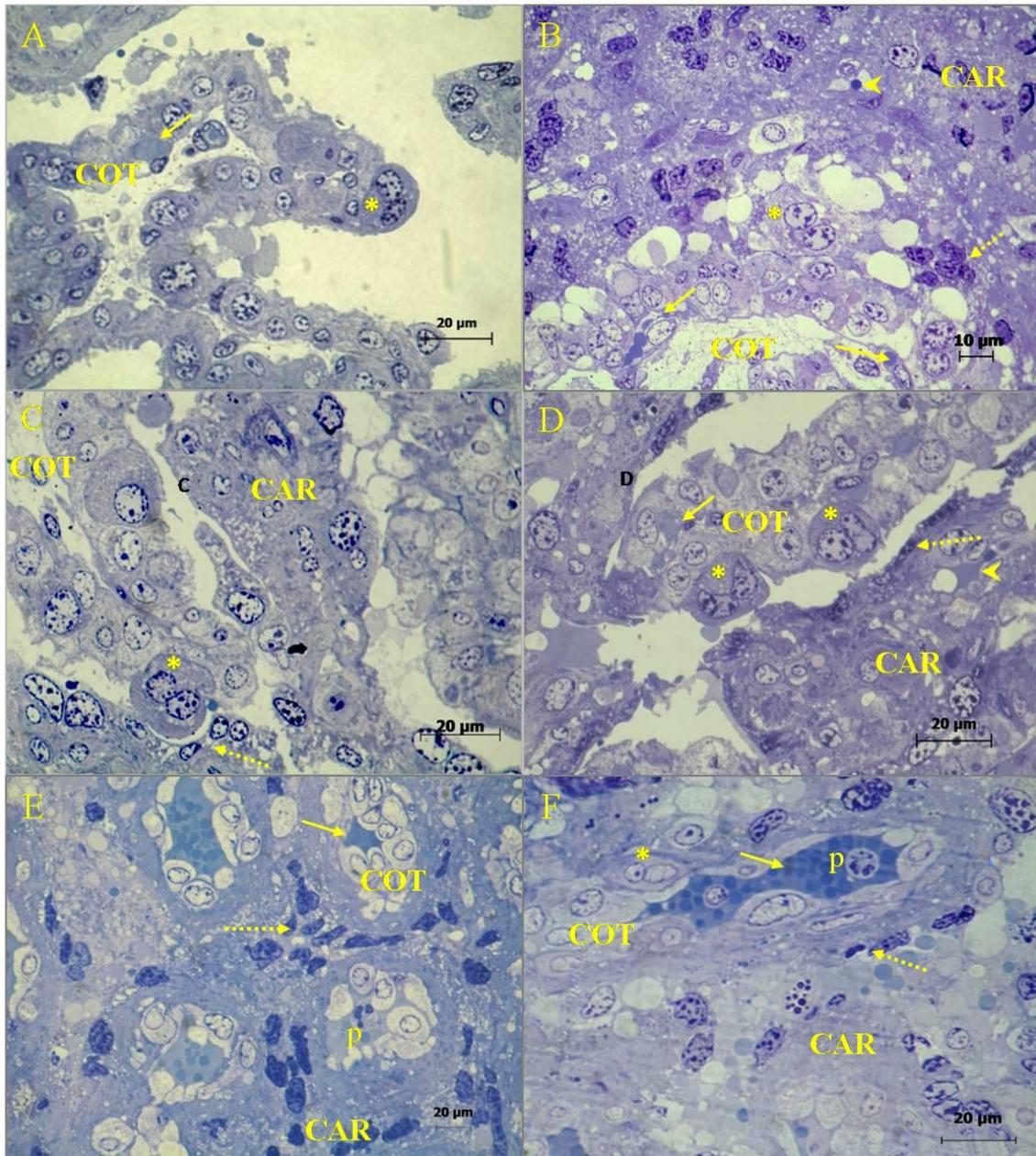
La zona arcada es la región desde donde crecen las vellosidades fetales y penetran las criptas maternas. En ella se observa la presencia de eritrocitos libres en la interfase materno-fetal (hematoma placentario) y en el interior del citoplasma de las CMN. El epitelio trofoblástico de dicha zona está constituido principalmente por CMN y muy escasa presencia de CBN. El epitelio materno de esta región se caracteriza por la escasa presencia de sincitios. En todos los placentomas evaluados, en regiones semejantes, se encontró la mencionada estructura (Figura N°12B).

Las placentas de 135 días de gestación mostraron una estructura más compleja y desarrollada, comparado con las placentas de 50 y 100 días. El tejido cotiledonario, desde la zona arcada emite vellosidades primarias que rápidamente se ramifican en secundarias y terciarias penetrando las criptas carunculares con las que se entrelazan formando una malla interdigitada entre el tejido materno en íntimo contacto con el fetal. En el origen de las vellosidades el tejido conectivo en el interior de las mismas, es laxo con presencia de vasos sanguíneos de gran calibre. En las vellosidades secundarias y terciarias dicho tejido disminuye hasta aparentemente desaparecer y los vasos sanguíneos reducen drásticamente su diámetro para formar pequeños capilares que se ubican en íntimo contacto con la membrana basal.

En los placentomas de los tres períodos gestacionales estudiados, el tejido caruncular emite tabiques, que al proyectarse hacia el tejido fetal forma criptas invadidas por las vellosidades fetales. Estos tabiques se ramifican ampliamente, aumentando la superficie de contacto con el tejido cotiledonario. Hacia el final de la gestación, en placentas de 135 días, los tabiques maternos son más finos, con escaso tejido conectivo por donde circulan los vasos sanguíneos (Figura N°13 y 14).



**Figura N°13:** Microscopía óptica H/E, de placenta caprina de **A:** 100 días y **B:** 135 días de gestación. Se observa la morfología placentaria, con vellosidades cotiledonarias interdigitadas con los tabiques carunculares. COT: cotiledonario; CAR: caruncular; flecha continua: epitelio trofoblástico; asterisco: células binucleadas; flecha entrecortada: sincitios; cabeza de flecha: capilares fetales.



**Figura N°14:** Microscopía óptica de alta resolución (MOAR) de placentas caprinas de **A y B:** 50, **C y D:** 100, **E y F:** 135 días de gestación. Se observan las vellosidades fetales conteniendo capilares en íntimo contacto con el epitelio trofoblástico que se interdigitan en la profundidad de las criptas maternas. COT: cotiledón; CAR: carúncula; \*: CBN; flecha entrecortada: sincitios maternos; flecha continua: capilares fetales; cabeza de flecha: capilares maternos p: células polimorfonucleares fetales.

---

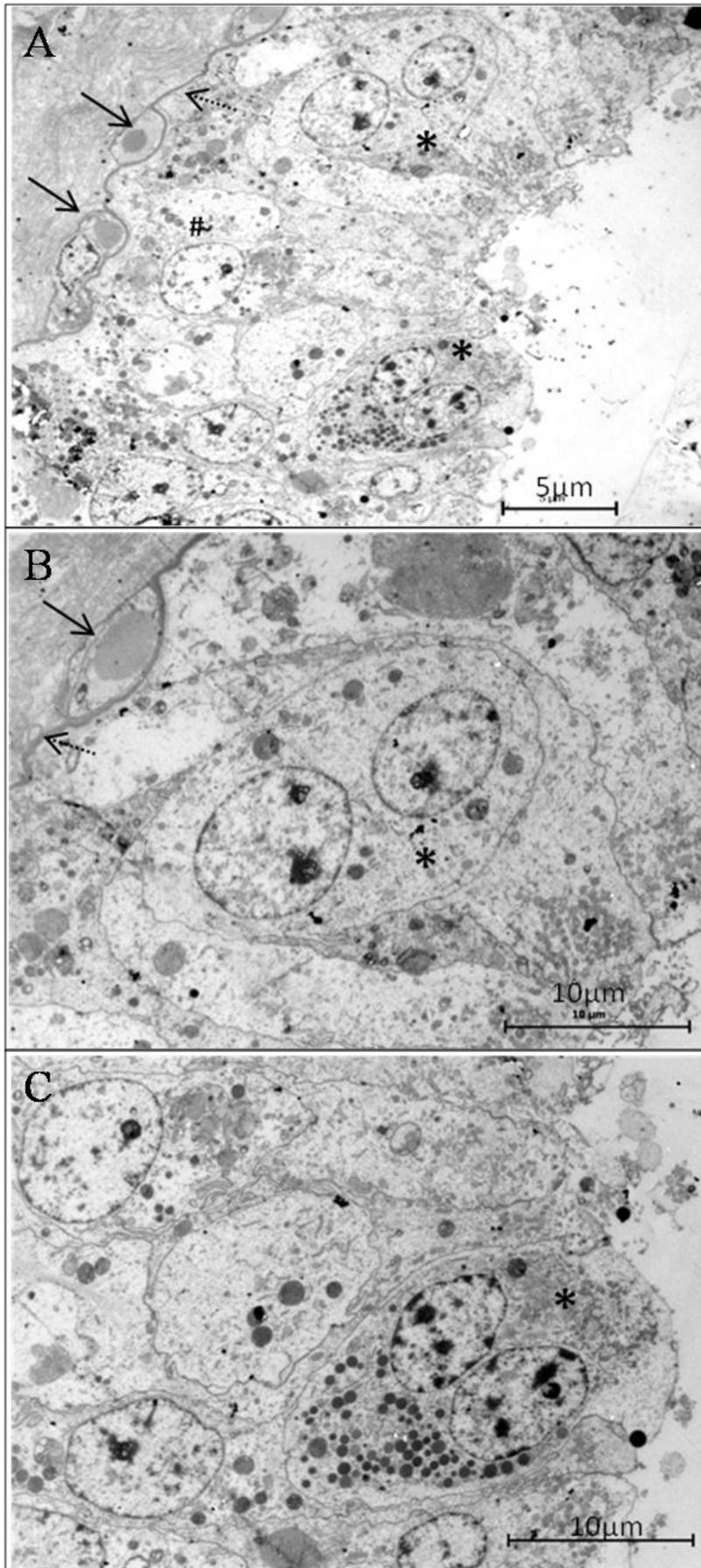
---

#### 6.4. Ultraestructura de los placentomas

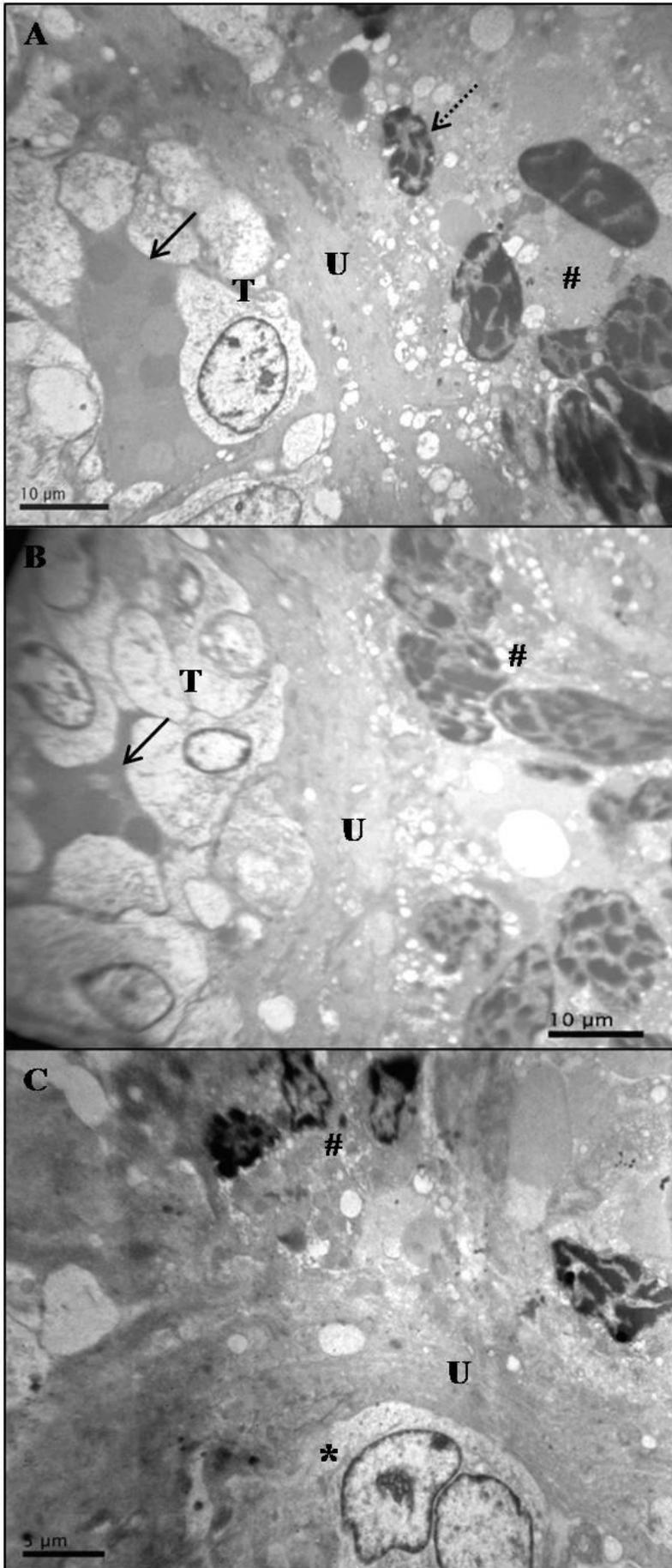
A través de microscopía electrónica de transmisión se estudiaron en detalle los componentes celulares de los epitelios trofoblástico y materno. Las CBN pudieron ser localizadas a diferente altura dentro del epitelio trofoblástico sin contactar con la membrana basal del epitelio. Las mismas tienen forma redondeada y sus núcleos son claros con nucléolos prominentes. En el citoplasma se visualizaron gránulos de distintos tamaños con material de baja y alta electrodensidad, dentro de una misma célula. Estos gránulos son más abundantes en las CBN ubicadas en la superficie del epitelio. Las CMN del epitelio trofoblástico, de forma cuboidal, tienen núcleos claros, redondeados con gran cantidad de eucromatina y ubicados en la región basal de las mismas. Su citoplasma presenta numerosas mitocondrias y organoides celulares, pero no se visualizan gránulos intracitoplasmáticos. Estas CMN contactan, por su cara basal, con la membrana basal del epitelio y su cara apical, provista de microvellosidades, se encuentra en la interfase materno fetal. Se observaron gran cantidad de pequeños capilares en estrecho contacto con el epitelio trofoblástico. La membrana basal del endotelio capilar se ve fusionada a la membrana basal del epitelio fetal (Figura N°15).

En placentas próximas a concluir la gestación (135 días) se pudo visualizar en detalle la estructura del epitelio fetal y materno, además de la zona de unión entre ambos. El tejido es más complejo y ramificado que en períodos anteriores. El epitelio trofoblástico se dispone como pseudoestratificado constituido por algunas CBN y principalmente por CMN. En el centro de las vellosidades se ubican capilares fetales que se encuentran invadiendo los espacios entre las células del epitelio.

El tejido materno está compuesto por un epitelio con abundantes sincitios y células mononucleadas que asientan sobre un tejido conectivo denso. Es de remarcar que en las placentas del último tercio de gestación los tabiques maternos son delgados con escaso tejido conectivo por donde discurren los vasos maternos. Las células sincitiales están compuestas por un número variable de núcleos de diferente morfología pero todos con gran cantidad de heterocromatina. Algunos de estos núcleos son pequeños con una superficie irregular, con presencia de material nuclear electrodensito (gránulos de heterocromatina condensados) y disrupción de la membrana nuclear. En su citoplasma se observan vesículas de baja electrodensidad. Estos cambios morfológicos son típicos del proceso de apoptosis (Figura N°16).



**Figura N°15:** Microscopía electrónica de transmisión de placentas caprinas de 50 días de gestación. **A** (1300 x) epitelio trofoblástico. **B** (2800x) amplificación de **A** con CBN inmadura cercana a la membrana basal. **C** (2800x) amplificación de **A** con CBN madura rica en gránulos citoplasmáticos sobre el lado apical del epitelio. \*: CBN; #: CMN; flecha continua: capilares fetales; flecha entrecortada: membrana basal.



**Figura N°16:** Microscopía electrónica de transmisión de placentas caprinas de 135 días de gestación mostrando la interfase materno fetal. **A** (4000 x), **B** (3000 x) y **C** (6000 x): T: epitelio trofoblástico; U: zona de unión materno fetal; #: sincitio materno; flecha continua: capilares fetales; flecha entrecortada: núcleo de célula sincitial apoptótico; \*: CBN.

---

---

## 6.5. Apoptosis

### 6.5.1. Análisis cualitativo

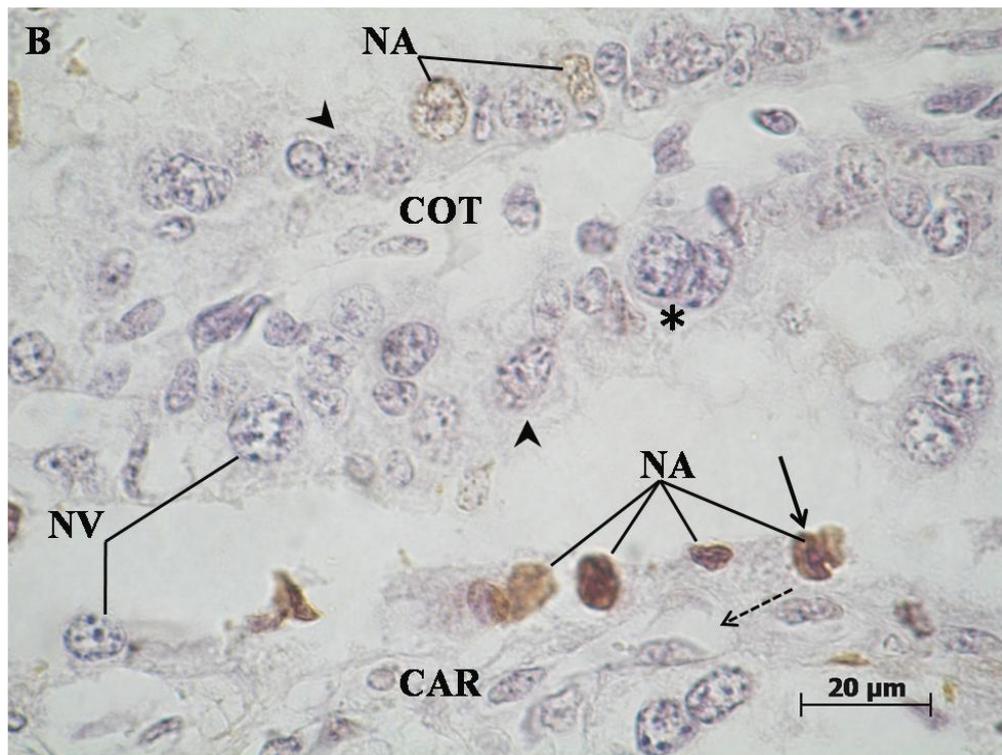
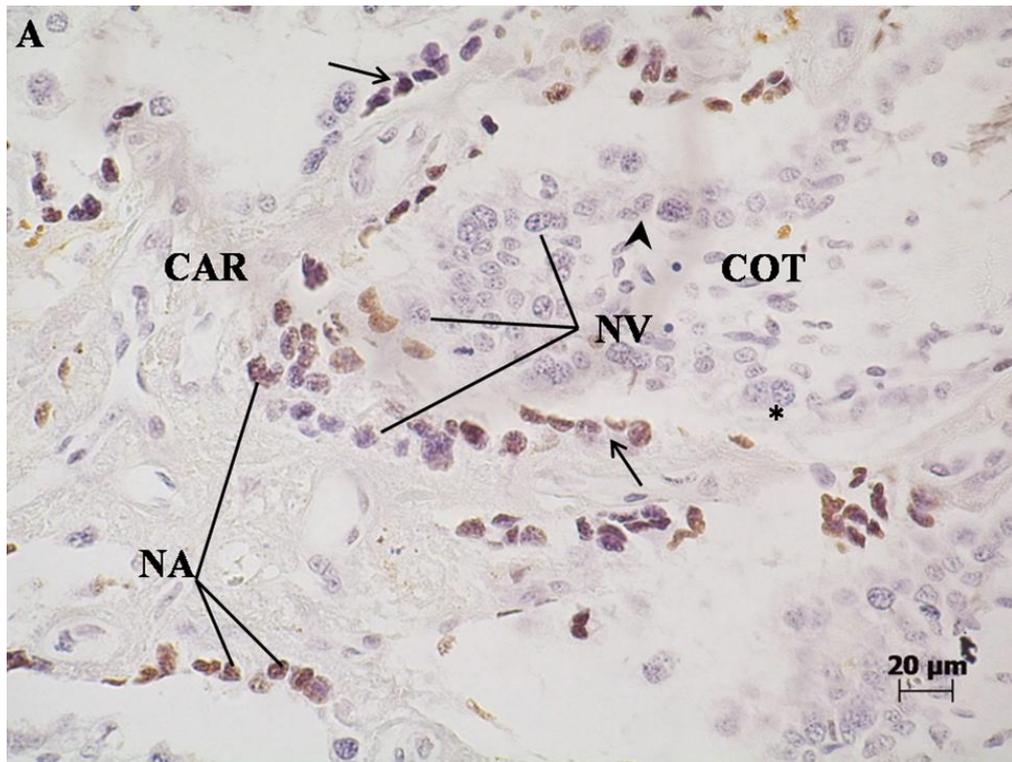
Se determinó las células apoptóticas del tejido placentario por la técnica de TUNEL. La misma detecta la fragmentación del ADN, característico del proceso de apoptosis, incluso aquellos núcleos que se encuentran en estadios muy iniciales de muerte celular programada.

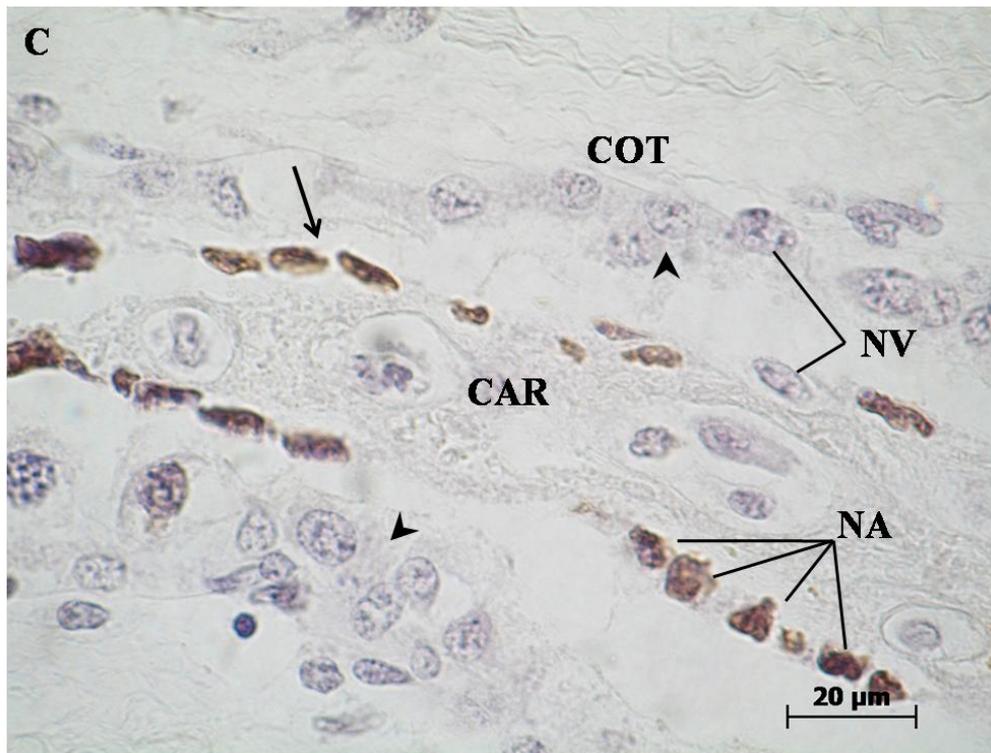
La observación de los preparados en el microscopio óptico, evidenció núcleos inmunomarcados coloreados de marrón y núcleos negativos a la técnica de color azul, distribuidos tanto en el tejido caruncular como en el cotiledonario.

En placentas de 50 días de gestación se observó una gran concentración e intensidad de células inmunomarcadas principalmente en el tejido materno y dentro del mismo, en el epitelio. Las células sincitiales fueron las principales que reaccionaron a la técnica, mostrando sus núcleos un color marrón intenso. Algunas células mononucleares también resultaron marcadas. Dentro del tejido conectivo materno se visualizaron escasa cantidad de núcleos inmunopositivos. En el epitelio trofoblástico de la misma edad gestacional la inmunomarcación mostró diferencias evidentes en comparación con el materno, en cuanto a la cantidad como así también a la intensidad de células reactivas a la técnica. Es así como se inmunomarcaron solo algunas células mononucleadas, no pudiendo observarse células binucleadas coloreadas de marrón. En el tejido conectivo de la vellosidad fetal se observó escasa presencia de núcleos reactivos a la técnica.

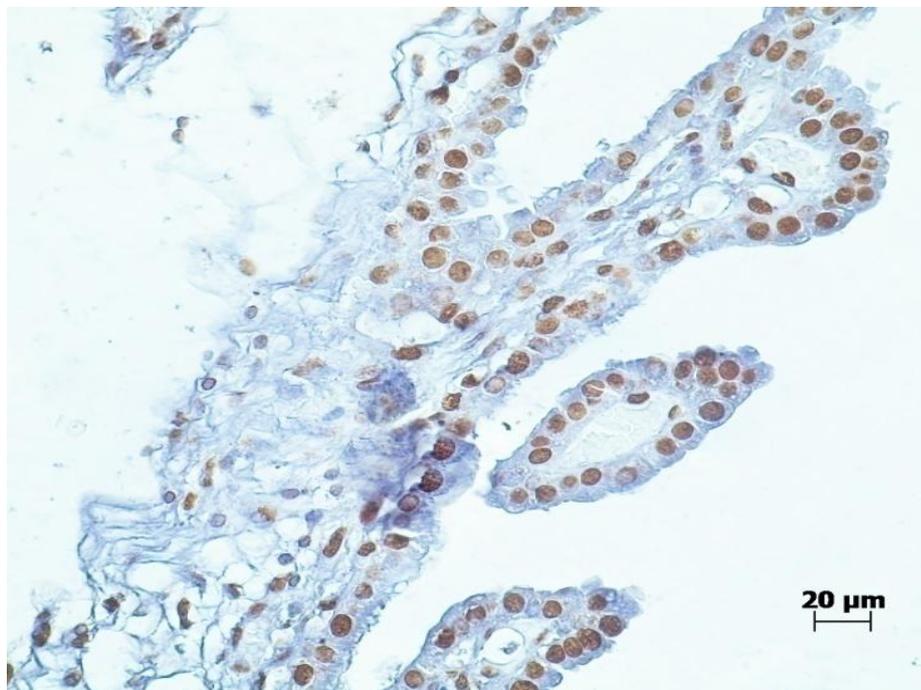
En los tejidos placentarios caprinos de 100 y 135 días de gestación el patrón de marcación fue similar a los de 50 días. Se observó una intensa marcación en los sincitios maternos comparado con la escasa coloración marrón de células del epitelio trofoblástico (Figura N°17).

El control positivo fue realizado sobre tejido placentario fetal de cerdos mostrando intensa inmunomarcación nuclear de células trofoblásticas (Figura N°18).





**Figura N°17:** Microfotografía óptica de placentas **A:** 50 días de gestación, **B:** 100 días de gestación y **C:** 135 días de gestación marcadas con la técnica de TUNEL. COT: tejido cotiledonario; CAR: tejido caruncular; \*: célula binucleada; cabeza de flecha: epitelio trofoblástico; flecha continua: sincitio materno; NA: núcleos apoptóticos, NV: núcleos viables (400x).

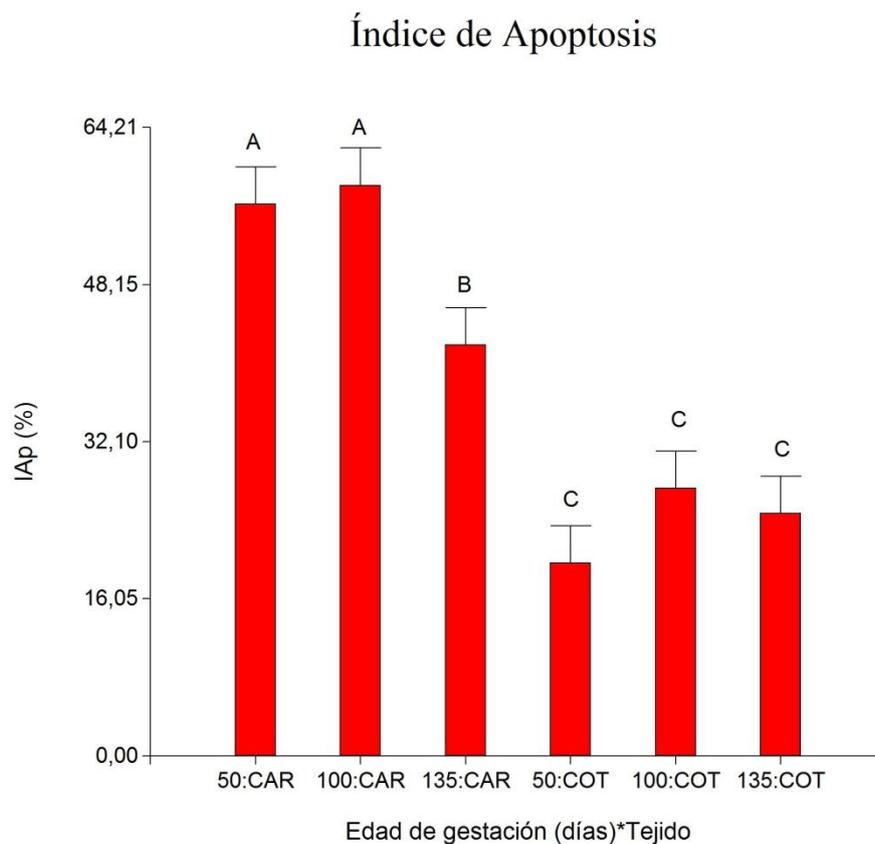


**Figura N°18:** Microfotografía óptica de tejido placentario fetal porcino tratado con la técnica de TUNEL (400x).

### 6.5.2. Análisis estadístico

A partir del recuento de células inmunomarcadas y de células negativas a la técnica se determinó el índice de apoptosis (IAp). El análisis estadístico (ANOVA) reveló interacción del IAp entre los días de gestación y los tejidos analizados. El estudio indicó que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ) entre las diferentes interacciones. A través del test DGC no se observó diferencias significativas en el IAp en el tejido COT en los diferentes tiempos gestacionales, pero si con todos los tiempos del tejido CAR. A su vez los IAp del tejido CAR para los días 50 y 100 de gestación fueron mayores que para el correspondiente de 135 días.

(Figura N°19).



**Figura N°19:** Índice de células apoptóticas TUNEL (+) (IAp) en placentas caprinas de 50, 100 y 135 días de gestación en el tejido caruncular (CAR) y en el cotiledonario (COT). Las columnas representan la media  $\pm$  EE. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas con un  $p < 0.0001$ ,  $F=19.19$ ,  $n=30$  y  $gl=5$ .

---

---

## 6.6. Proliferación celular

### 6.6.1. Análisis cualitativo

La proliferación celular se evaluó por la técnica inmunohistoquímica determinando la distribución témporo-espacial del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) a lo largo de la gestación y cuantificando las células inmunomarcadas para determinar el Índice de proliferación celular (Ipr).

Los cortes histológicos se inmunomarcaron con anticuerpos anti-PCNA en ambas porciones placentarias, caruncular y cotiledonaria, lo que se evidenció con una coloración marrón en los núcleos positivos.

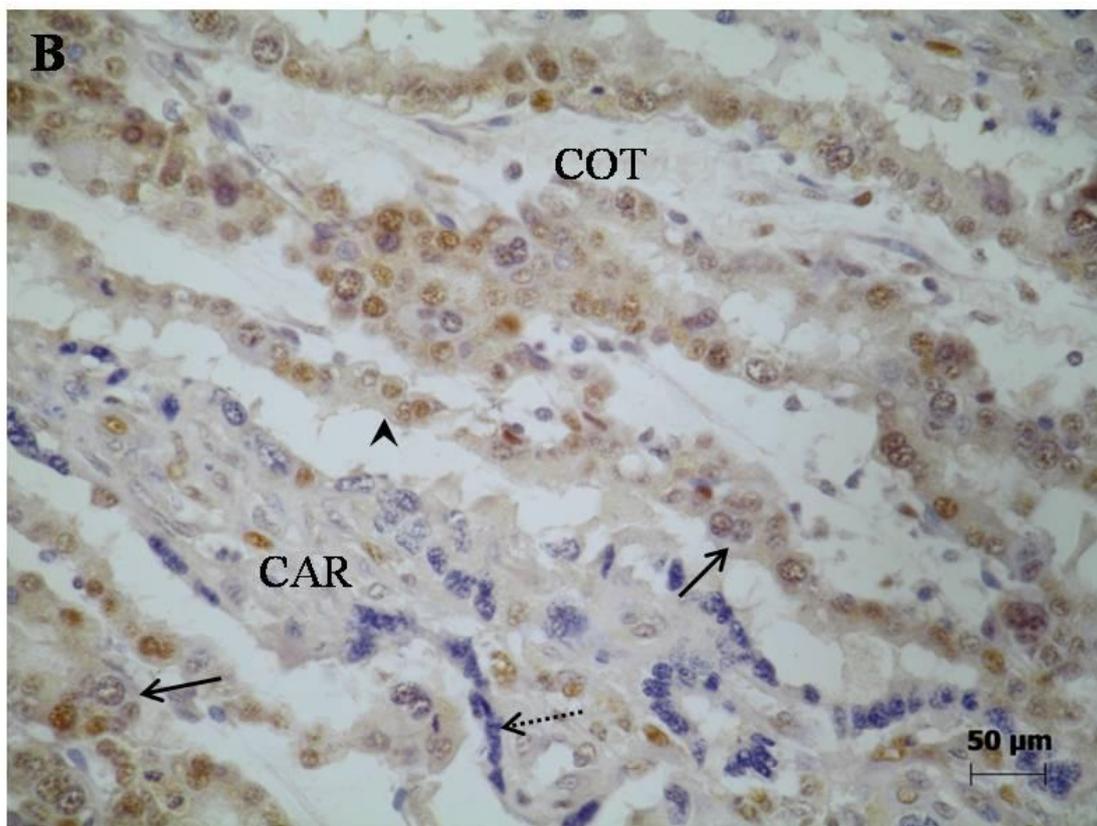
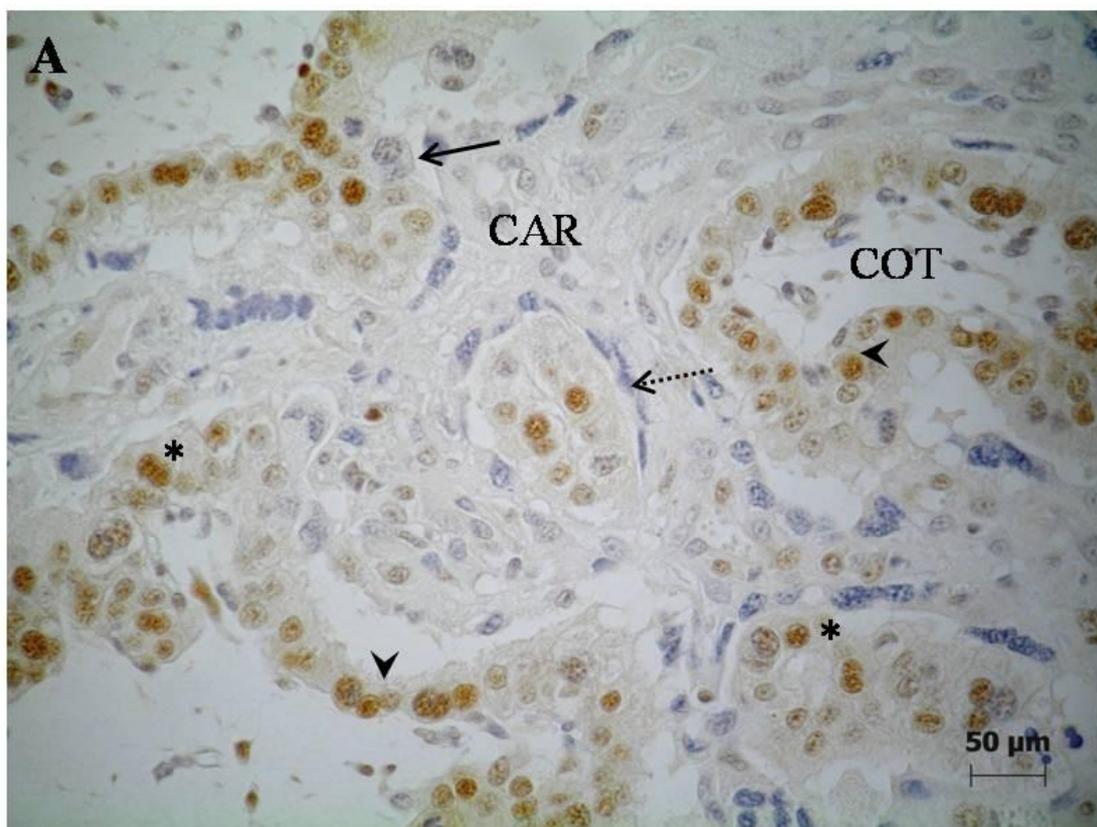
A la observación se advirtió principalmente marcación de las células mononucleadas del epitelio trofoblástico. Asimismo las células binucleadas, típicas de dicho epitelio con capacidad de migrar, resultaron negativas a la inmunohistoquímica.

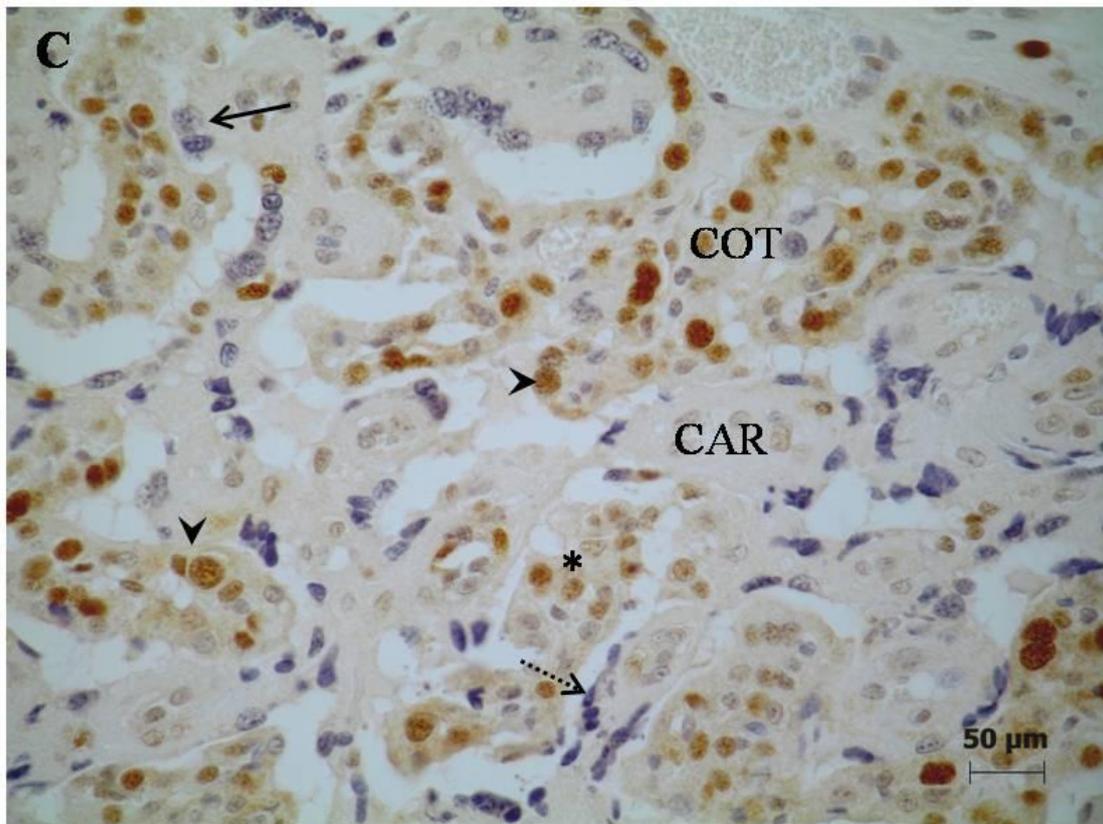
En el epitelio materno solo algunas células monucleadas intercaladas entre los sincitios presentaron marcación para PCNA. Sin embargo, no se observó innumeración en las células sincitiales.

Además algunas células del tejido conectivo materno, fetal y algunas células endoteliales resultaron con marcación nuclear.

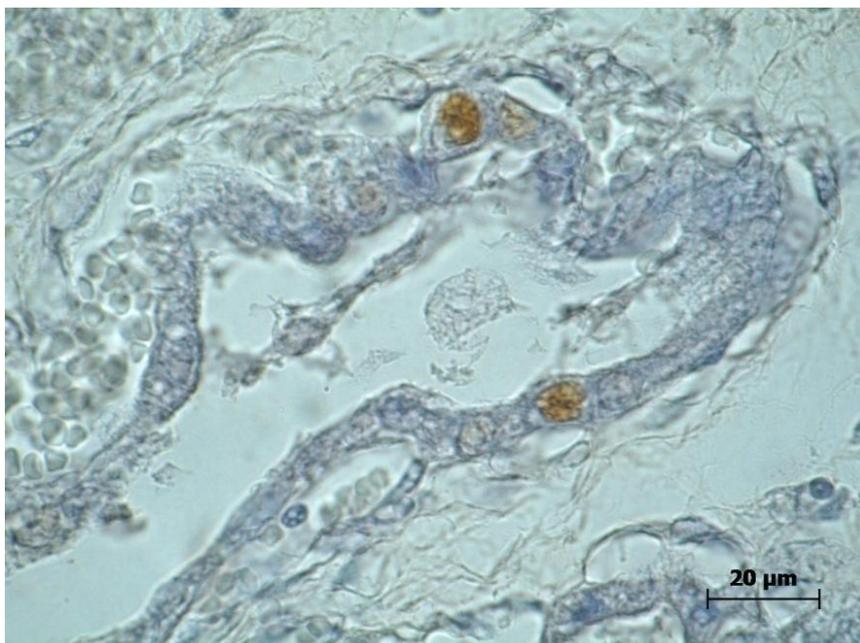
En todos los tiempos gestacionales estudiados se muestra el mismo patrón de inmunolocalización de PCNA (Figura N°20).

El control positivo de la técnica inmunohistoquímica para la marcación de PCNA fue realizado sobre tejido placentario fetal de cerdos, en donde se inmunodetectaron los núcleos de las células trofoblásticas (Figura N°21)





**Figura N°20:** Inmunohistoquímica de PCNA, de placenta caprina, **A:** 50 días de gestación, **B:** 100 días de gestación y **C:** 135 días de gestación (400 x). COT: cotiledonario; CAR: caruncular; flecha sólidas: células binucleadas; flechas entrecortadas: sincitios maternos; \*: células inmunomarcadas; cabezas de flechas: epitelio trofoblástico.



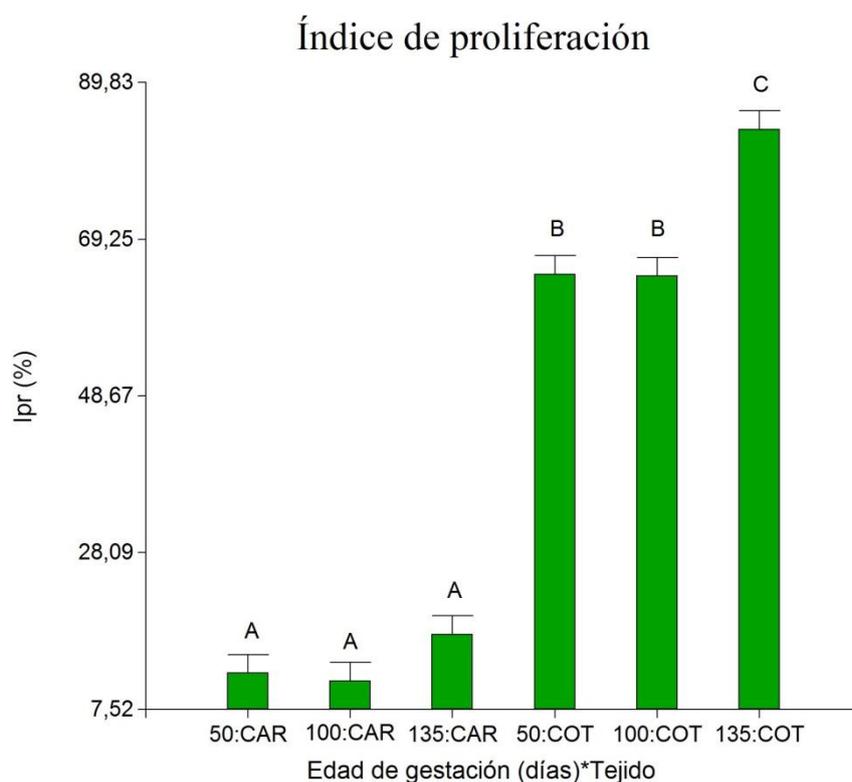
**Figura N°21:** Microfotografía óptica de tejido placentario fetal porcino inmunomarcado con anticuerpos anti-PCNA (1000x).

### 6.6.2. Análisis estadístico

A partir de la cuantificación de las células positivas y negativas a la inmunomarcación se calculó el índice de proliferación celular (Ipr) y se realizó un estudio estadístico para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas en el índice entre los epitelios maternos y fetales y los diferentes tiempos gestacionales.

En primer lugar el análisis de la varianza reveló que había interacción en el Ipr entre ambos tejidos (caruncular y cotiledonario) y el tiempo de gestación.

Se realizó un estudio no paramétrico de Kruskal Wallis el que mostró que había diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ). El Ipr fue significativamente menor para el tejido caruncular en relación al tejido cotiledonario. En este último tejido, a los 135 días de gestación, se observó un Ipr mayor estadísticamente significativo al de los períodos gestacionales previos (Figura N°22).



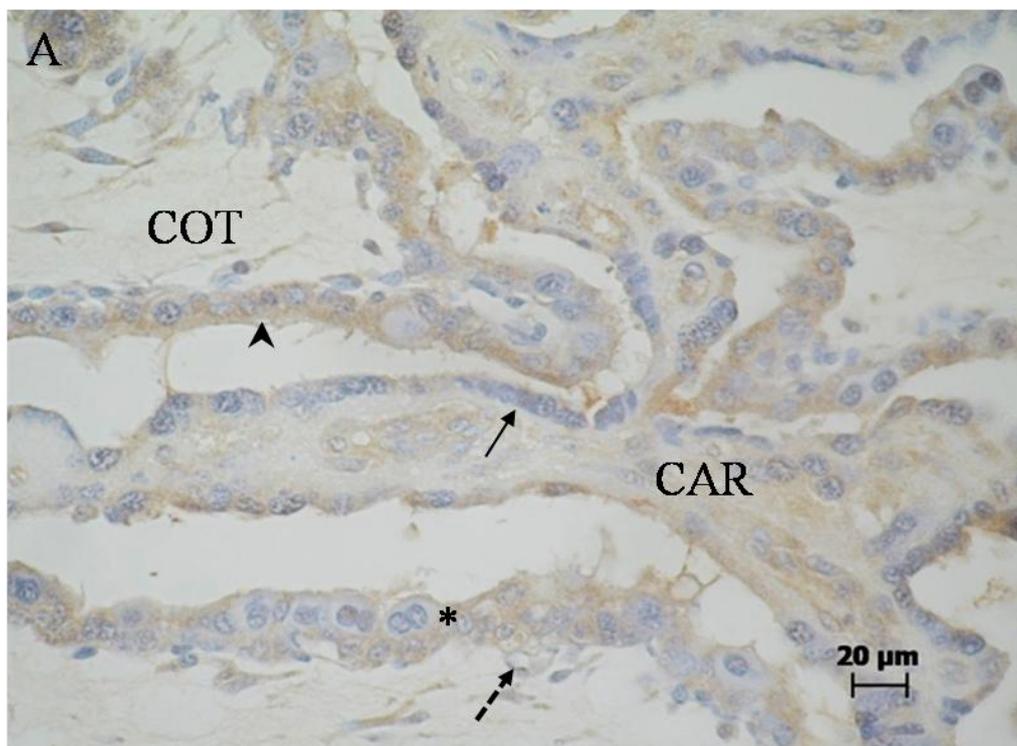
**Figura N°22:** Índice de proliferación celular de placentas caprinas a los 50, 100 y 135 días de gestación en el tejido caruncular (CAR) y en el cotiledonario (COT). Las columnas representan la media  $\pm$  EE. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas con un  $p < 0,0001$ ,  $n=30$  y  $gl=5$ .

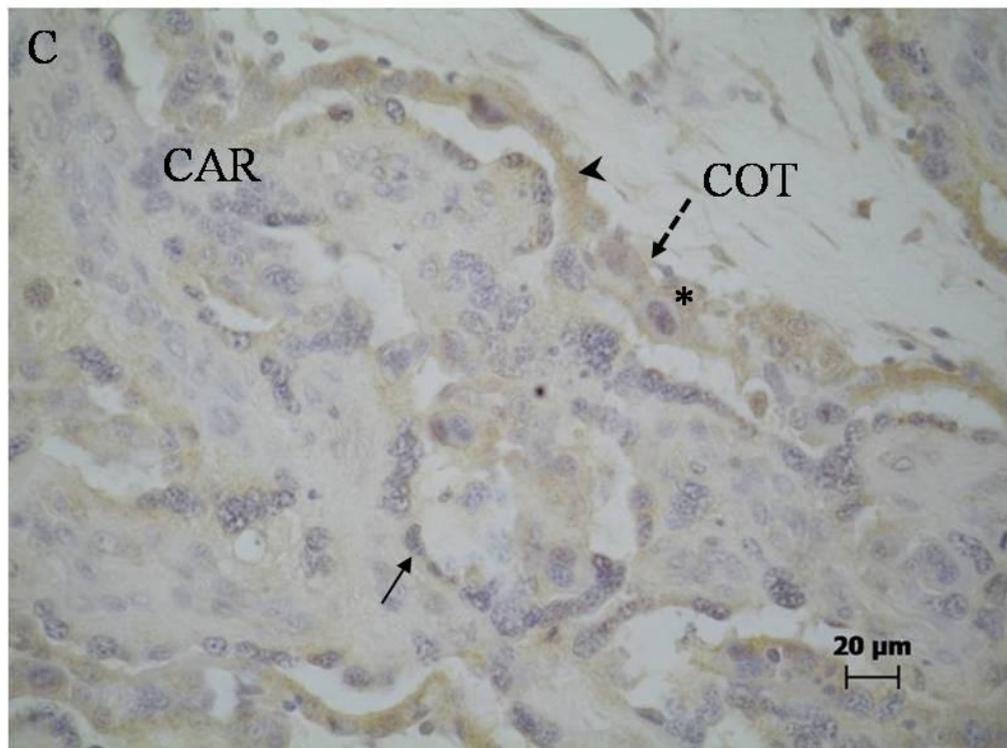
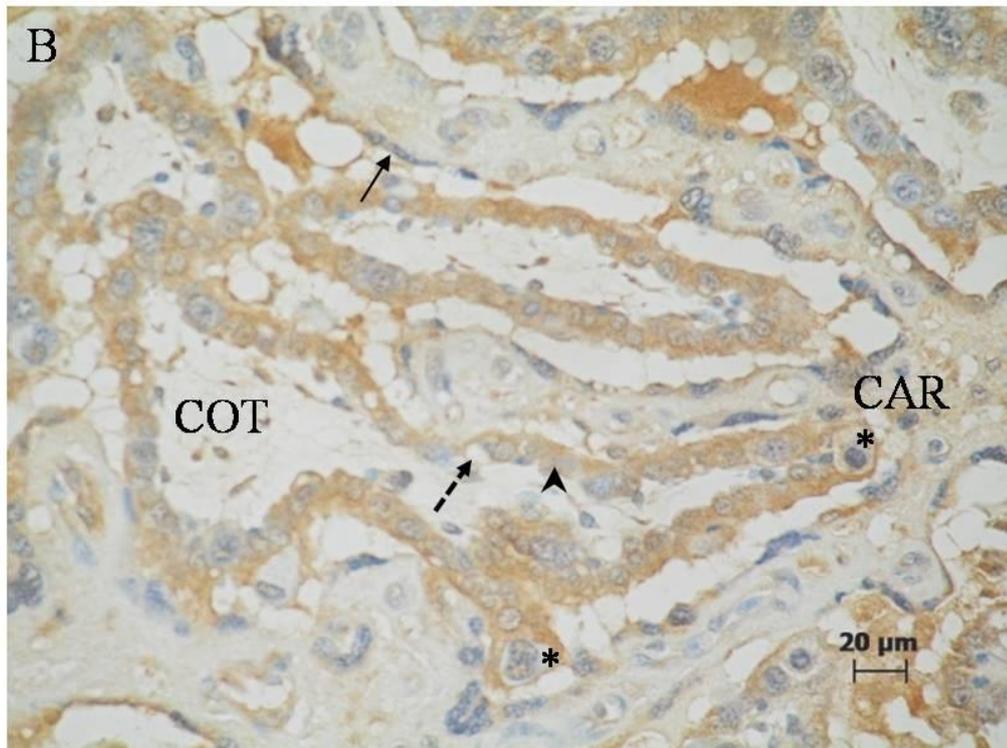
### 6.7. Inmunolocalización del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

El VEGF se inmunolocalizó en el citoplasma de las células tanto del tejidos maternos como fetales, durante los períodos gestacionales estudiados.

En la región COT de placentas de 50 y 100 días de gestación, se inmunomarcaron intensamente las células endoteliales de los vasos sanguíneos y las células del epitelio trofoblástico que rodean a las vellosidades fetales, principalmente las células mononucleadas y algunas células binucleadas. Las células del tejido conectivo del estroma de las vellosidades placentarias no revelaron inmunoreacción. El epitelio trofoblástico de placentomas de 135 días presentó intensa marcación a excepción de las células binucleadas que no inmunoreaccionaron.

En la región CAR de placentomas de 50 y 100 días de gestación, las células epiteliales, endoteliales y del estroma se inmunomarcaron débilmente. A diferencia de lo anterior, en placentomas de 135 días, las células epiteliales se inmunomarcaron moderadamente pero no se observó reacción en las células del estroma ni en las endoteliales (Figura N°23).



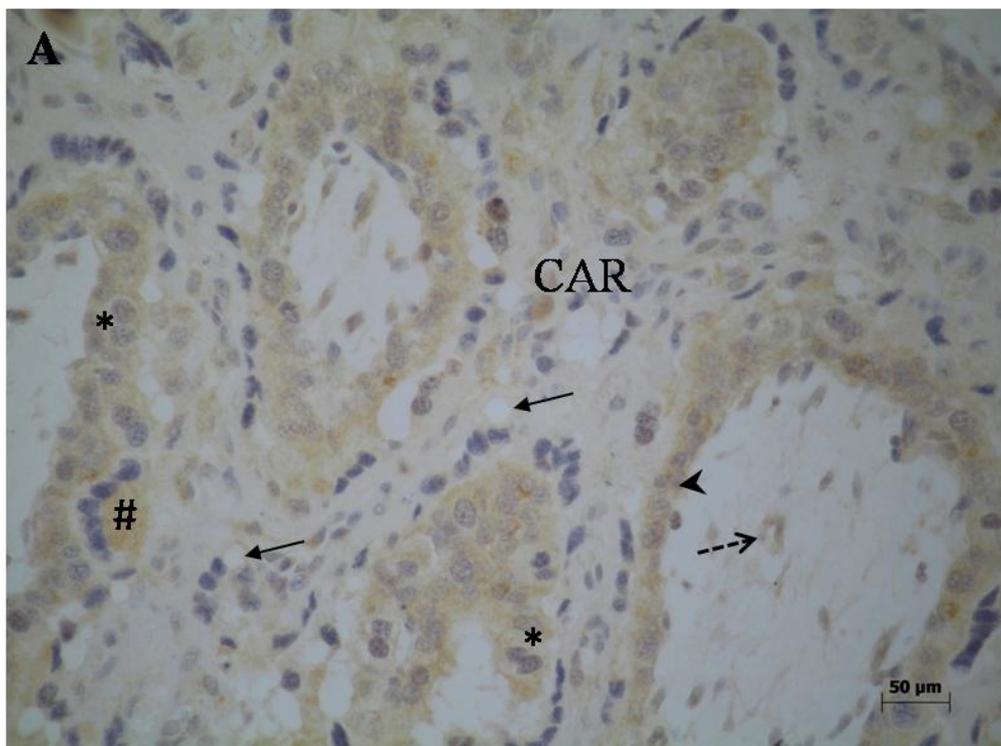


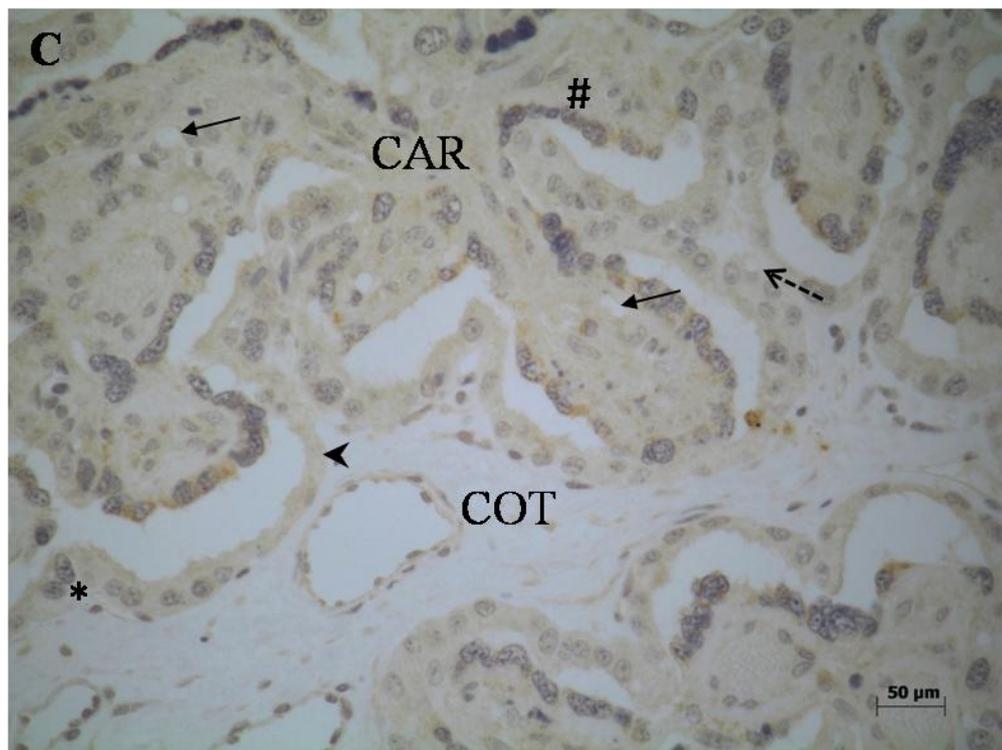
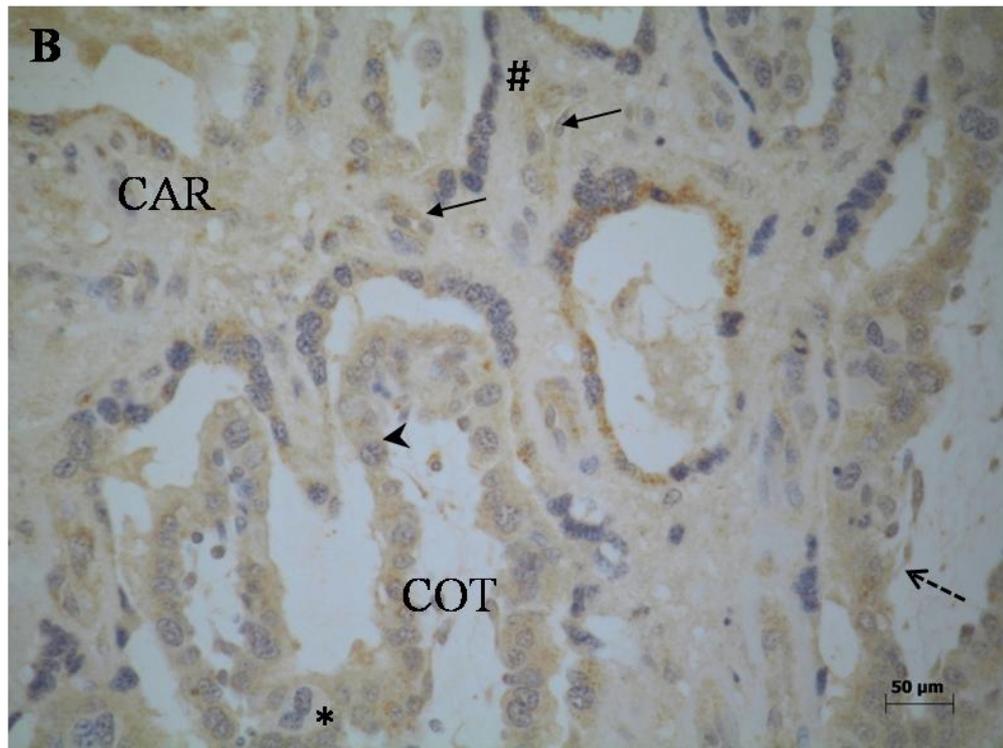
**Figura N°23:** Inmunolocalización de VEGF en placentas caprinas, **A:** 50 días de gestación, **B:** 100 días de gestación y **C:** 135 días de gestación (400 x). COT: cotiledón; CAR: carúncula; flecha continua: sincitio materno; cabeza de flecha: epitelio trofoblástico; flecha entrecortada: capilares fetales; \*: CBN.

### 6.8. Inmunolocalización de angiopoyetina 1 (Ang-1)

En todas las muestras procesadas la inmunomarcación de la proteína Ang-1 fue citoplasmática. En placentas de 50 días de gestación, el epitelio trofoblástico se inmunomarcó intensamente, mientras que fue débil en las placas sincitiales del epitelio materno. Las células binucleadas mostraron menor intensidad de coloración en comparación al resto del epitelio fetal. Se observó moderada inmunoreacción en el endotelio de los capilares fetales y maternos. A los 100 días de gestación la técnica inmunohistoquímica demostró gran similitud con lo observado en el período anterior.

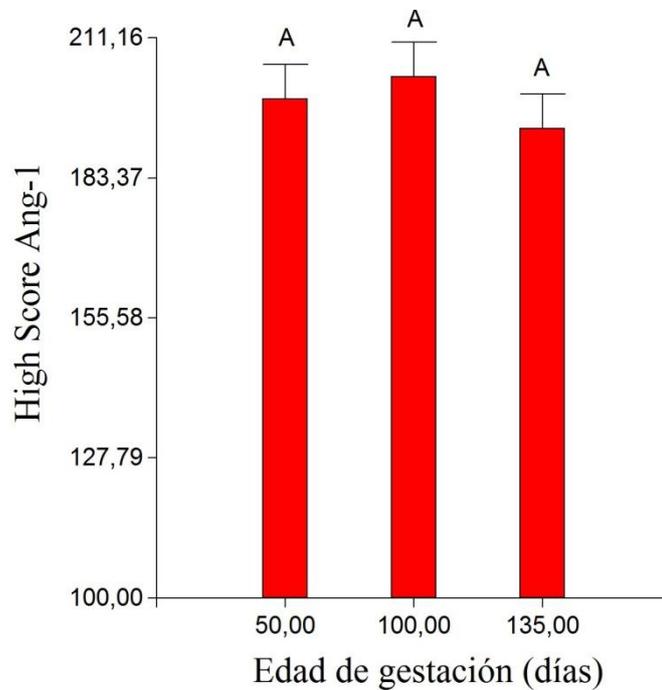
Diferente a lo descrito para los dos primeros tercios de gestación, a los 135 días se identificó que a medida que las vellosidades maduran y se ramifican en el tejido materno, la inmunoreacción del epitelio trofoblástico disminuyó su intensidad hasta desaparecer, conservando una intensa coloración en la base de las vellosidades y las células endoteliales no se inmunomarcaron. En el tejido materno se inmunomarcó intensamente el citoplasma de las placas sincitiales y de las células mononucleadas sin observarse en las células endoteliales inmunoreacción a la proteína Ang-1 (Figura N°24).





**Figura N°24:** Inmunolocalización de Ang-1 en placentas caprinas. **A:** 50 días, **B:** 100 y **C:** 135 días de gestación. COT: cotiledón; CAR: carúncula; cabeza de flecha: epitelio trofoblástico; flecha continua: capilar materno; flecha entrecortada: capilares fetales; #: sincitio materno \*: CBN.

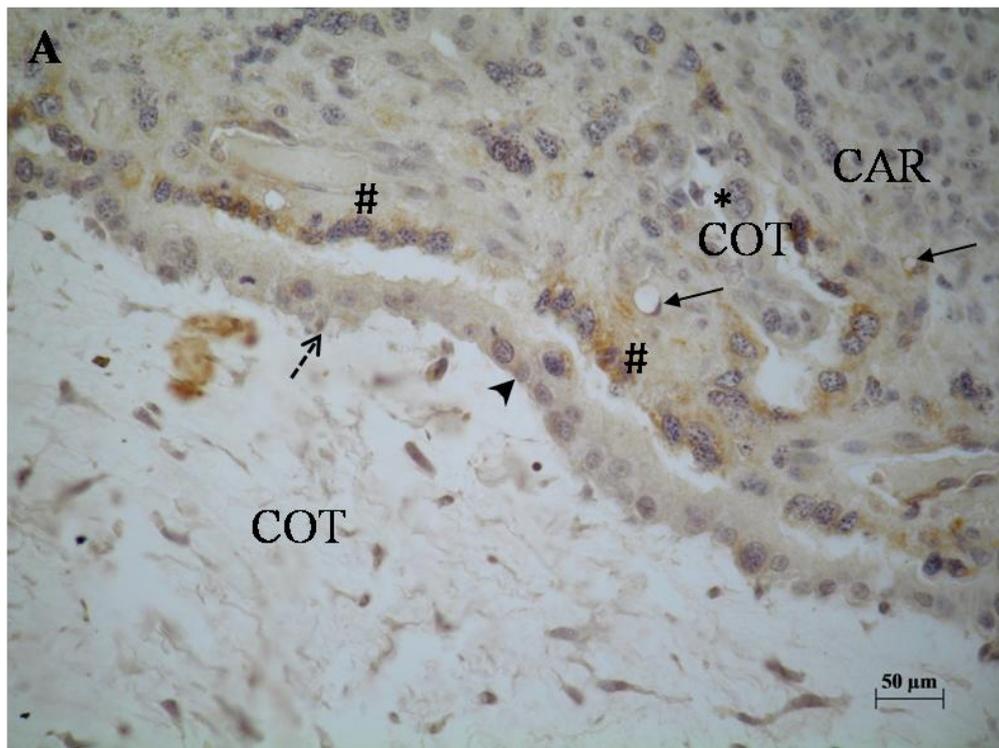
El ANOVA y el test DGC, realizado para comparar HSCORE de la inmunohistoquímica para Ang-1 de cada período estudiado, no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.5892$ ) entre los diferentes tiempos gestacionales (Figura N°25)

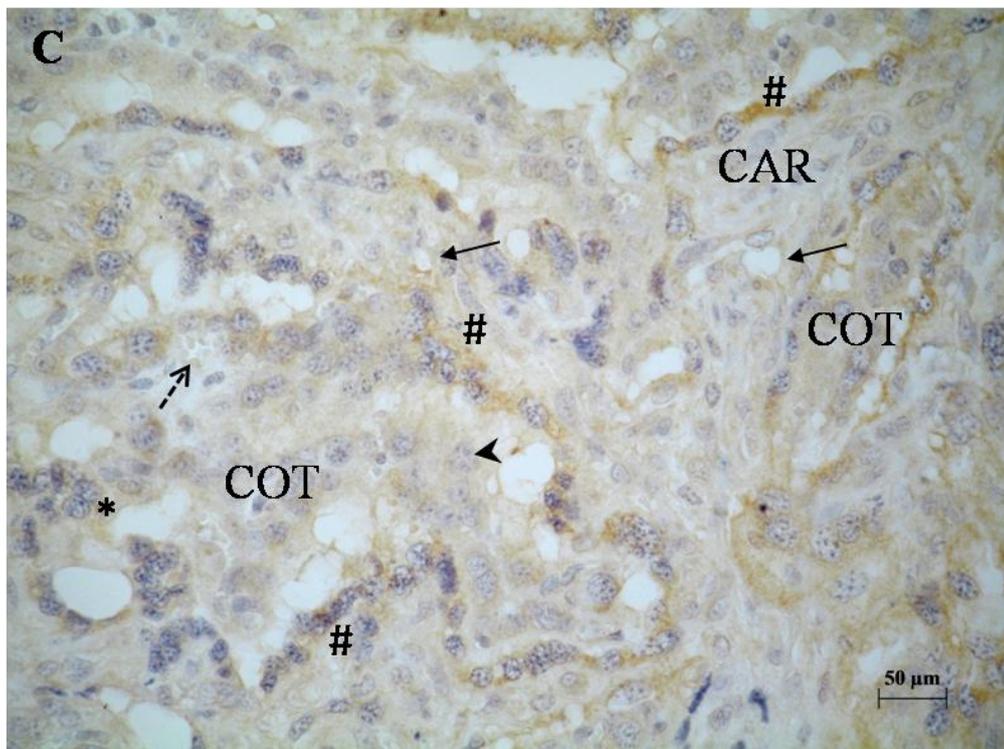
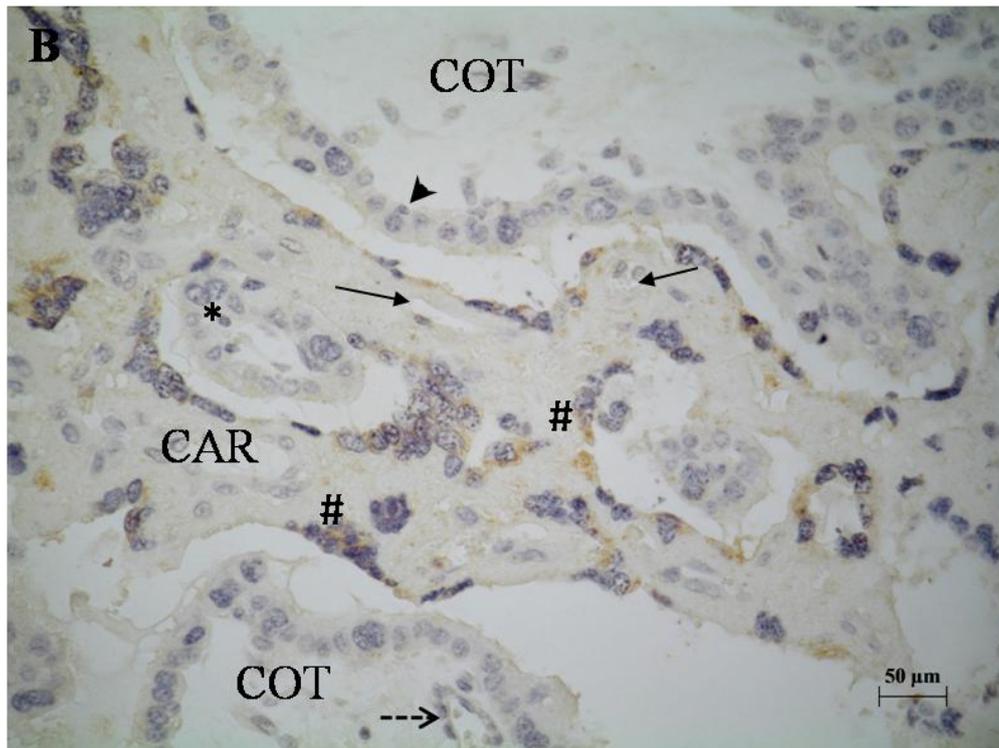


**Figura N°25:** HSCORE de la intensidad de marcación de la inmunohistoquímica para Ang-1 en placentas de cabras a los 50, 100 y 135 días de gestación. Las columnas representan la media +/- EE. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre 50, 100 y 135 días de gestación.  $p=0.5892$ ,  $F=0.55$ ,  $n=15$  y  $gl=2$ .

### 6.9. Inmunolocalización de angiopoyetina 2 (Ang-2)

Se determinó la localización de Ang-2 a través de inmunohistoquímica donde la inmunomarcación fue citoplasmática en todas las placentas caprinas de los períodos gestacionales estudiados. Se observó a lo largo de la gestación en el tejido materno una intensa marcación en las células mononucleadas y las placas sincitiales del epitelio materno y moderada en el endotelio de los capilares. A diferencia, en el tejido fetal el epitelio trofoblástico no mostró inmunoreacción a la técnica en ninguno de los períodos analizados (Figura N°26).

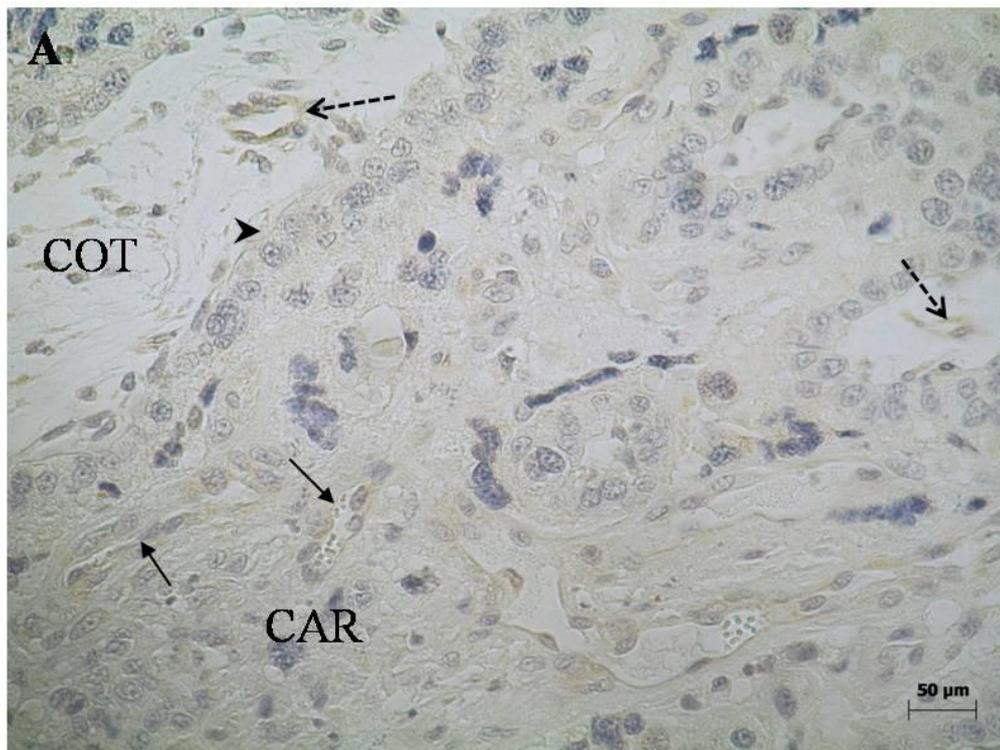


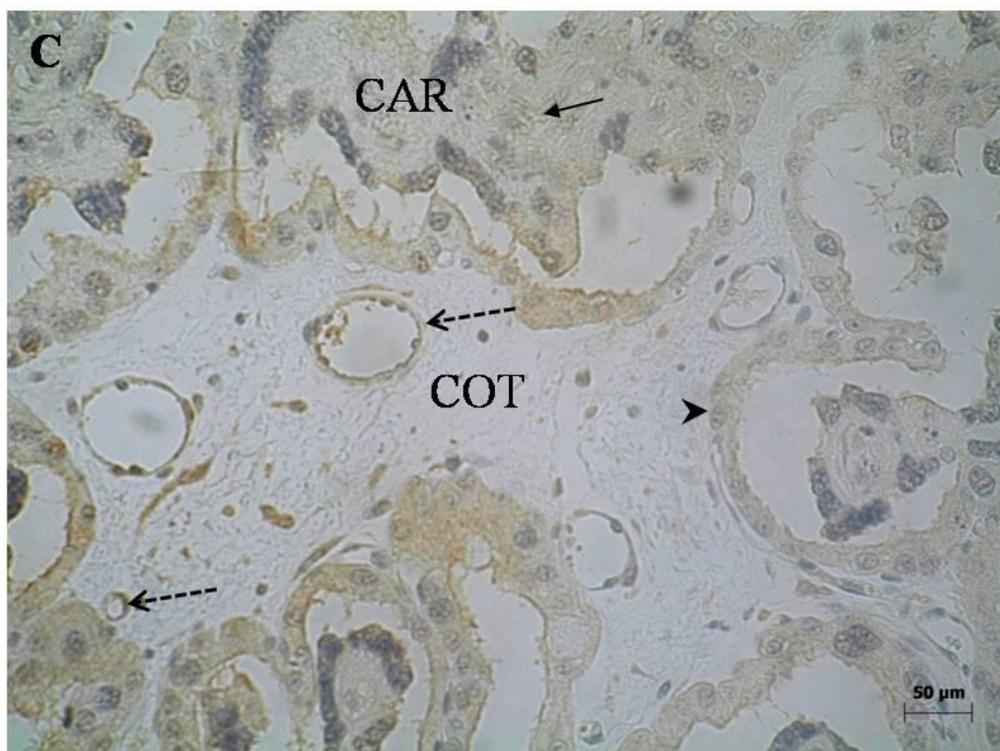
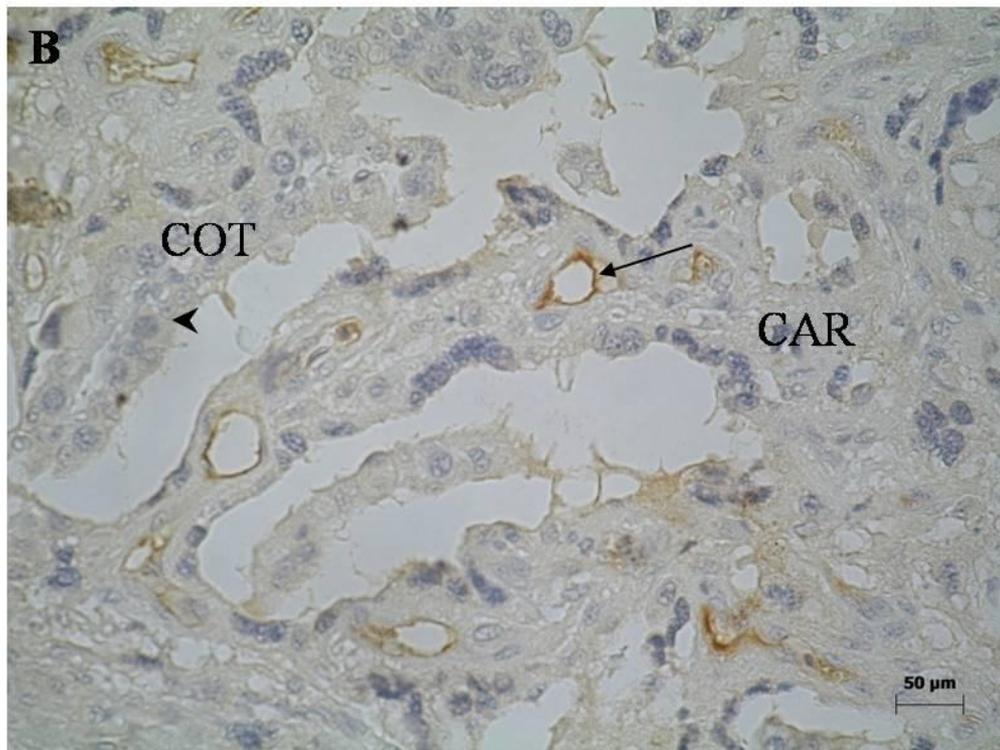


**Figura N°26:** Inmunolocalización de Ang-2 en placentas caprinas. **A:** 50 días, **B:** 100 y **C:** 135 días de gestación. COT: cotiledón; CAR: carúncula; cabeza de flecha: epitelio trofoblástico; flecha continua: capilar materno; flecha entrecortada: capilares fetales; #: sincitio materno \*: CBN..

### 6.10. Inmunolocalización de Tie-2

En las placentas estudiadas, la inmunohistoquímica del receptor Tie-2 exhibió un patrón de marcación citoplasmático. En todos los períodos analizados se observó en las células endoteliales de capilares maternos y fetales una moderada inmunomarcación. A su vez, a los 135 días de gestación, se detectó moderada inmunoreacción en las células del epitelio trofoblástico y débil en el epitelio endometrial (Figura N°27).

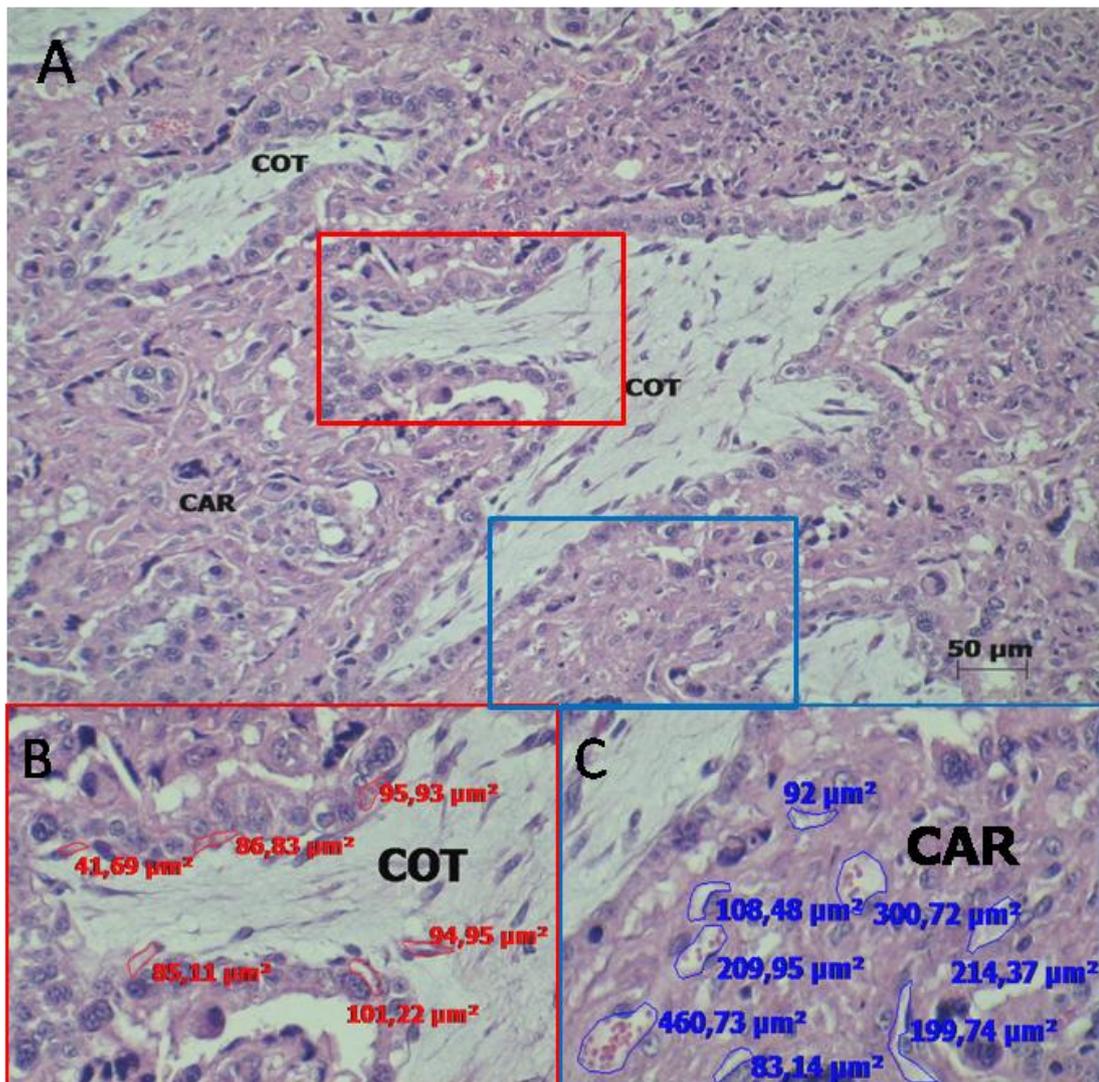




**Figura N°27:** Inmunolocalización de Tie-2 en placentas caprinas. **A:** 50 días, **B:** 100 y **C:** 135 días de gestación. COT: cotiledón; CAR: carúncula; cabeza de flecha: epitelio trofoblástico; flecha continua: capilar materno; flecha entrecortada: capilares fetales.

### 6.11. Estudio morfométrico de los vasos sanguíneos

La metodología de fijación y coloración empleada nos permitió visualizar y medir de manera satisfactoria los vasos sanguíneos del tejido placentario. Los capilares conservaron su histología y su diámetro promedio. Se observó una distribución desigual de los vasos entre ambos tejidos (CAR y COT) dentro de un placentoma y pequeños capilares en estrecho contacto a la zona de unión materno fetal (Figura N°28).

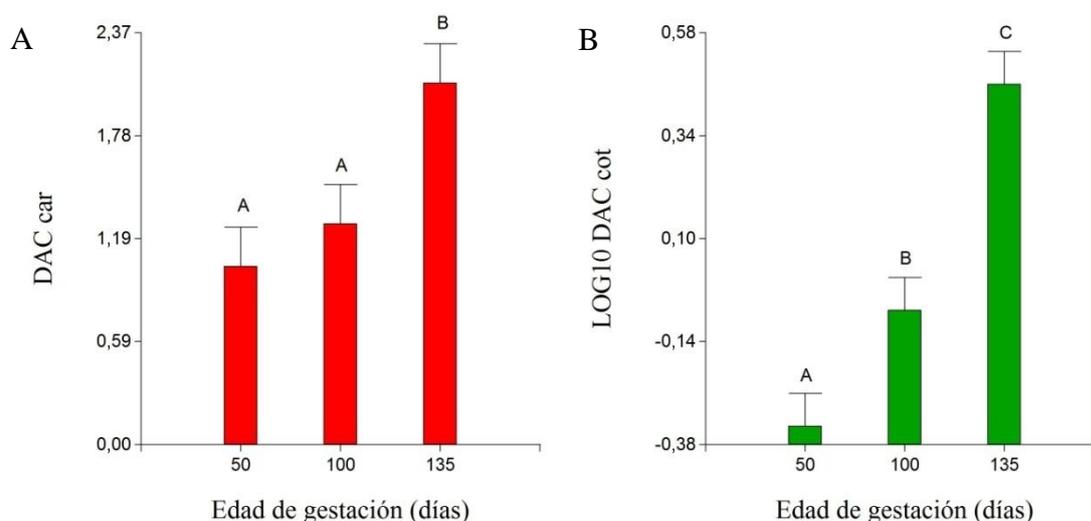


**Figura N°28:** Microscopía óptica de placenta caprina de 50 días de gestación. H/E. **A:** se observa la morfología y vasos sanguíneos placentarios. **B:** área de vasos sanguíneos cotiledonarios. **C:** área de vasos sanguíneos carunculares.

### 6.11.1. Estudio de la densidad de área capilar (DAC)

La DAC para el tejido caruncular mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0159$ ), siendo mayor a los 135 días de gestación en comparación a los tiempos anteriores estudiados. No se observaron diferencias entre 50 y 100 días de gestación para el mismo tejido (Figura N°29A).

En el tejido cotiledonario el test de DGC mostró que la DAC aumentó a medida que avanzó la gestación ( $p<0.001$ ) observándose diferencias estadísticamente significativas entre todos los tiempos estudiados (Figura N°29B).

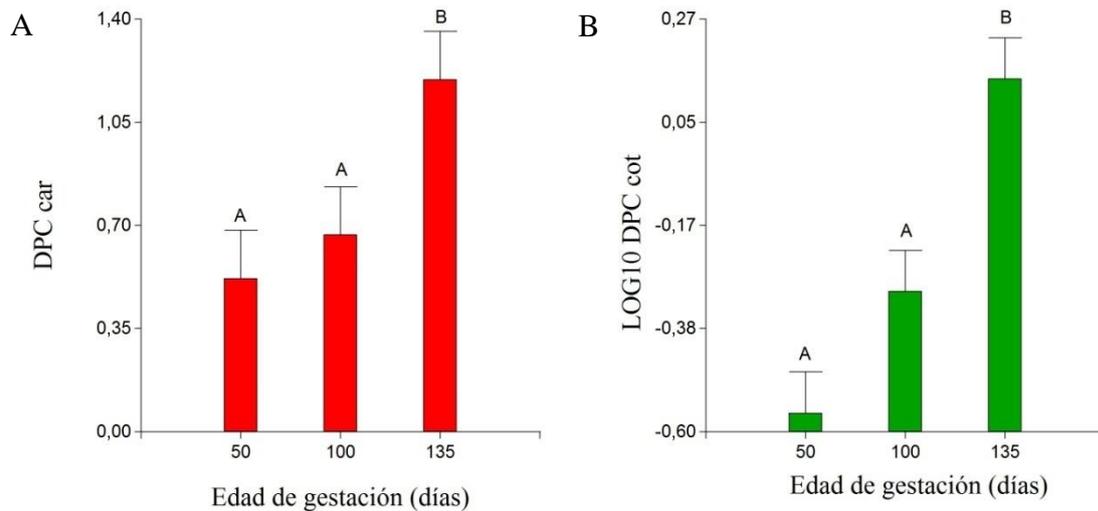


**Figura N°29:** Densidad de área capilar. Las columnas representan las medias  $\pm$  EE. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. **A:** DAC caruncular,  $p=0.0159$ ,  $n=15$   $gl=2$  y  $F=5.97$ . **B:** DAC cotiledonaria,  $p<0.0001$ ,  $n=15$ ,  $gl=2$  y  $F=28.37$ .

### 6.11.2. Estudio de la densidad de perímetro capilar (DPC)

La DPC en el tejido caruncular reveló diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0312$ ) entre los tiempos gestacionales estudiados. Al igual que con lo sucedido para la DAC, este parámetro fue mayor a los 135 días en comparación con 50 y 100 de gestación. Entre estos dos últimos tiempos no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura N°30A).

En el tejido cotiledonario también se observó diferencias estadísticamente significativas para la DPC, siendo mayor a los 135 días en comparación con los tiempos gestacionales anteriores. Entre 50 y 100 días de gestación no se observaron diferencias significativas (Figura N°30B).

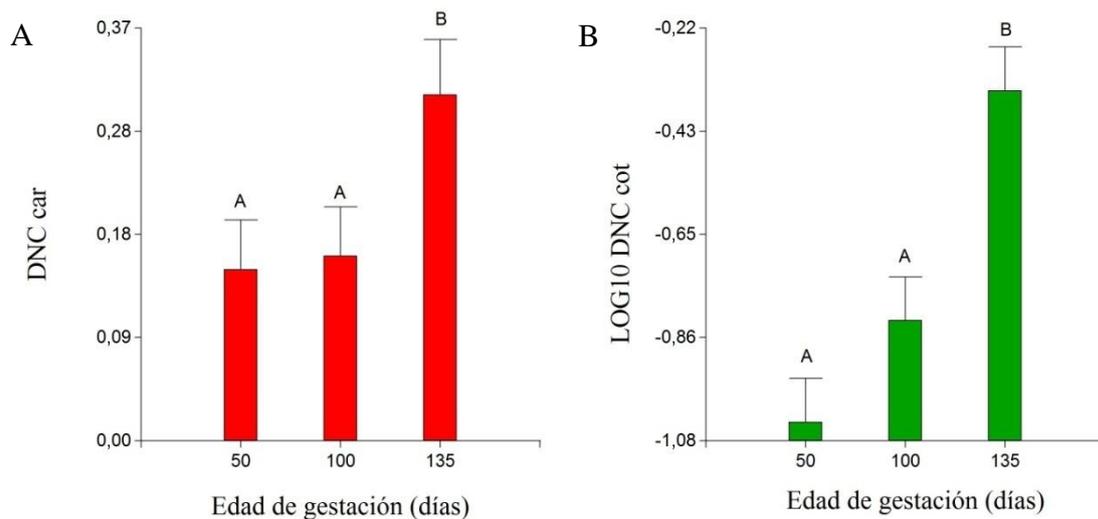


**Figura N°30:** Densidad de perímetro capilar. Las columnas representan las medias +/- EE. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. **A:** DPC caruncular,  $p=0.0312$ ,  $n=15$ ,  $gl=2$  y  $F=4.70$ . **B:** DPC cotiledonaria,  $p=0.0003$ ,  $n=15$ ,  $gl=2$  y  $F=16.86$ .

### 6.11.3. Estudio de la densidad de número capilar (DNC)

En cuanto a la DNC para el tejido caruncular, el test DGC mostró un aumento significativo al final de la gestación ( $p=0.0431$ ) no habiendo diferencias entre 50 y 100 días de gestación (Figura N°31A).

En el tejido cotiledonario se observó, similar a lo ocurrido para el tejido materno, un aumento estadísticamente significativo a los 135 días de gestación ( $p=0.0005$ ), sin observarse diferencias significativas entre 50 y 100 días (Figura N°31B).



**Figura N°31:** Densidad de número capilar. Las columnas representan las medias +/- EE. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. **A:** DNC caruncular,  $p=0.0431$ ,  $n=15$   $gl=2$  y  $F=4.13$ . **B:** DNC cotiledonaria,  $p=0.0005$ ,  $n=15$ ,  $gl=2$  y  $F=15.15$ .

#### 6.11.4. Estudio del perímetro capilar medio (PCM)

Para comparar el PCM como medida del tamaño capilar, se realizó un ANOVA para cada tejido comparando los diferentes tiempos gestacionales. En el tejido CAR no se observó diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos gestacionales estudiados ( $p=0.404$ ). En cambio en el tejido COT se evidenció una disminución estadísticamente significativa del PCM a los 135 días de gestación.

Con el objetivo de comparar el tejido CAR con el COT para cada tiempo de gestación estudiado, se realizó un test t-student. En todos los tiempos gestacionales analizados se observó un menor PCM en el tejido COT (Tabla N°1).

Perímetro capilar medio en el tejido CAR y COT ( $\mu\text{m}$ ).

Tejido	Días de gestación			E.E.	valor p
	50 días	100 días	135 días		
CAR	36,72	41,26	36,44	2,73	0,404
COT	31,99 <sup>a</sup>	33,14 <sup>a</sup>	28,73 <sup>b</sup>	1,09	0,036
valor p	0,0229	0,0019	0,0637		

**Tabla N°1:** Comparación del perímetro capilar medio ( $\mu\text{m}$ ) entre el tejido caruncular y cotiledonario y entre los diferentes tiempos de gestación estudiados.  $p \leq 0.05$  significa diferencias estadísticamente significativa. Diferentes letras significan diferencias estadísticamente significativas.

CAPÍTULO VII  
DISCUSIÓN Y  
CONCLUSIONES

---

---

### 7.1. Discusión

En busca de un parámetro fetal que permita predecir el tiempo de gestación con fines científicos, evaluación patológica o manejo reproductivo, siendo la fecha de servicio y concepción desconocida, numerosos autores evaluaron diferentes aspectos como la longitud cráneo-caudal, la osificación esquelética y la longitud de la diáfisis de los huesos largos (Gall *et. al*, 1994; Sanchis, 2013). Gall *et. al*, (1994) estudiaron la relación existente entre la longitud cráneo-caudal y el tiempo de gestación a partir de fetos caprinos obtenidos de hembras abortadas o eutanasiadas de la raza alpina. A partir de sus datos calcularon una regresión lineal semejante a la obtenida por otros autores. En nuestro trabajo, habiendo relacionado las variables peso fetal con respecto a edad gestacional y longitud cráneo caudal en relación a edad gestacional de todos los fetos procesados, nos permitió obtener dos fórmulas de regresión que estiman, con suficiente agudeza, el tiempo de gestación de fetos caprinos de raza criolla. Este es un aporte significativo para los veterinarios, investigadores y criadores de ésta raza caprina, ofreciéndoles una herramienta que no existía hasta el momento

Varios autores estudiaron las diferentes morfologías que adoptan los placentomas en bovinos y ovinos a lo largo de la gestación y su relación con la vascularidad y la transferencia de nutrientes (Vatnick *et. al*, 1991; Reynolds *et. al*, 2005; Hafez *et. al*, 2007; Vonnahme *et. al*, 2008). Estudios realizados en ovinos por Reynolds *et. al*, (2005) afirman que una pequeña proporción de los placentomas, hacia el último tercio de la gestación, se transforman a convexos y sus formas intermedias. Este cambio desde la forma cóncava puede estar influenciado por el estrés materno (desbalance nutricional, inyecciones de cortisol, altas temperaturas, etc.) donde el tipo convexo pareciera ser más eficiente debido a que tienen mayor desarrollo vascular materno y fetal por gramo de tejido. En contraste Vonnahme *et. al*, (2008) concluyen que el aumento de la funcionalidad vascular, medida como la densidad capilar y la concentración de factores angiogénicos, no varía debido a la morfología de los placentomas, pero si a causa de su tamaño. Los resultados de nuestra observación macroscópica muestran que los placentomas en las cabras son en su mayoría de forma cóncava, similar a los descritos en ovinos (Vatnick *et. al*, 1991; Vonnahme *et. al*, 2008) y difieren marcadamente a los observados en bovinos debido a su forma convexa (Laven y Peters, 2001; Wooding y Burton, 2008). A los 135 días de gestación algunos placentomas presentaron una forma plana semejante a los clasificados como tipo “C” en ovinos, clasificación basada en la forma de la placa coriónica (Vatnick *et. al*, 1991; Hafez

---

*et. al.*, 2007; Vonnahme *et. al.*, 2008). Esta observación fue similar a lo descrito por Igwebuike y Ezeasor en 2013 en cabras de raza West African Dwarf. El cambio de forma cóncava a plana de algunos placentomas podría estar influenciado por las mayores demandas metabólicas del feto en su último tercio de gestación y la necesidad, por parte de la placenta, de aumentar la eficiencia de intercambio.

En los rumiantes, la última etapa del desarrollo embrionario antes de la implantación implica la elongación del blastocisto desde una esfera de 1 mm de diámetro hasta una estructura filamentosa de más de 10 cm de longitud. Los placentomas se forman durante la implantación, el cual es el proceso que resulta de la fijación del *conceptus* al endometrio materno, llevando al establecimiento de las estructuras placentarias. La implantación se inicia sobre las proyecciones aglandulares elevadas de la pared uterina llamadas carúnculas. El epitelio coriónico que recubre las mismas se vuelve focalmente engrosado formando los cotiledones, que desarrollan pliegues paralelos interdigitándose en las ranuras correspondientes sobre las criptas de la superficie caruncular (Sammin *et. al.*, 2009). Este proceso comienza a los 15-16 días de gestación y culmina a los 56 días de la misma en ovinos (Igwebuike, 2009), quedando establecido el número final de placentomas. En las placentas de cabras se determinó que el número de placentomas varió entre individuos desde 85 a 179, semejante a lo encontrado por otros autores para la especie (Wooding y Burton, 2008; Turiello, 2012; Igwebuike y Ezeasor 2013). La mayor demanda nutricional al final de la gestación es compensada no por el aumento en el número de placentomas, sino por el tamaño de los mismo, tal lo demostrado por Igwebuike and Ezeasor (2013) quienes establecieron una relación lineal positiva entre el tamaño de los placentomas y la edad gestacional.

A lo largo de la gestación no solo se modifica el tamaño y la forma de los placentomas, sino también su estructura histológica. La sobrevivencia, desarrollo y crecimiento del *conceptus* depende en gran medida de las modificaciones histológicas de la placenta para suplir las demandas crecientes del feto. Durante la preñez temprana, la totalidad del epitelio uterino es caracterizado por poseer células columnares altas que asientan sobre una fina membrana basal. Dichas células epiteliales son mononucleadas, tal lo observado por Dent en 1973. Durante la implantación, el epitelio caruncular desarrolla profundas criptas, que son penetradas por vellosidades coriónicas largas y fuertemente ramificadas. Las criptas carunculares y las vellosidades coriales asociadas sirven como un fuerte anclaje del *conceptus* a la superficie endometrial. Además, esta disposición, permite un gran aumento del área de superficie entre el tejido materno y el fetal en los placentomas

---

(Igwebuike, 2009). A través del análisis estructural y ultraestructural de las placentas de 50 y 100 días de gestación, se ha podido corroborar las características descritas para placentas caprinas. En el epitelio trofoblástico, las células mononucleadas son mayoritarias, poseen microvellosidades en su parte apical lo que indica su función de absorción de materiales, por lo tanto serían las encargadas principalmente del intercambio materno fetal, tal lo demostrado por Igwebuike (2009) y Wooding y Burton (2008). Las células binucleadas, se disponen intercaladas entre las mononucleadas y en menor número que éstas, dando al epitelio un aspecto de pseudoestratificado. En su estadio de reciente formación se ubican profundamente en el epitelio trofoblástico y a medida que van madurando se van haciendo superficiales, hasta desprenderse del mismo. En el citoplasma de las células binucleadas maduras se observan gránulos electrodensos, considerados de secreción, que fueron descritos anteriormente por Igwebuike y Ezearsor (2013) donde se observaron positivos a la reacción del ácido periódico de Schiff indicando su contenido glicoproteico. Se ha determinado que dichos gránulos contienen lactógeno placentario (Klisch *et. al*, 2010), hormona glicoproteica que tiene sus receptores en el epitelio glandular endometrial (Noel *et. al*, 2003), donde juega un importante rol en la morfogénesis de las glándulas endometriales, en el incremento de la producción de proteínas de la leche uterina y osteopontina durante la gestación caprina. Además del lactógeno placentario, se piensa que las células binucleadas producen proteína 1 asociada a la prolactina (PRP-1) y glicoproteínas asociadas a la preñez (PAGs) (Green *et. al*, 2000). Los gránulos de las células binucleadas liberan su contenido a las placas sincitiales maternas una vez que dichas células han migrado hacia el epitelio materno y se han fusionado a dichas células (Wooding, 1992; Igwebuike y Ezearsor, 2013). La formación de células híbridas materno-fetales y el transporte y liberación de moléculas de origen fetal nos indican que el concepto tiene la capacidad de influenciar la fisiología materna para su propio beneficio.

En el epitelio trofoblástico de la zona arcada se observaron células mononucleadas (CMN) con presencia de eritrocitos en su citoplasma. Esto nos sugiere que las CMN poseen una gran capacidad para fagocitar glóbulos rojos desde el acúmulo de sangre extravasada ubicado en la interfase materno fetal (hematoma placentario). La eritrofagocitosis, también descrita en bovinos y ovinos es, tal vez, un importante mecanismo de transferencia de hierro de la madre al feto (Santos *et. al*, 1996; Cazerta *et. al*, 2007). Por otra parte se observaron escasas CBN en dicha zona, las mismas no

---

---

contenían células hemáticas en su interior, indicando que no están implicadas en dicha función

En los placentomas de rumiantes, el intercambio hemotrófico entre la sangre materna y la fetal, debe sortear seis capas de tejido: el endotelio de los capilares fetales, el tejido conectivo fetal, el epitelio trofoblástico, el epitelio endometrial, el tejido conectivo materno y el endotelio materno. Se ha considerado a la placenta epiteliocorial como menos eficiente que otras, debido al mayor grosor de la barrera placentaria y por ende la mayor distancia interhemal. Sin embargo, este concepto puede ser erróneo teniendo en cuenta que hay otros factores como el grado de permeabilidad de sus capas, el grosor de los epitelios y la disposición del sistema vascular, que pueden aumentar la eficiencia fisiológica del transporte placentario. En el presente estudio se observó la presencia de capilares fetales fusionados a la membrana basal del epitelio trofoblástico e invaginados en dicho epitelio, a los que Igwebuike and Ezeasor (2013) denominó “capilares intraepiteliales”. A su vez, el epitelio materno es modificado por la formación de placas sincitiales planas, que también disminuyen la distancia de intercambio. Estas adaptaciones morfológicas disminuyen considerablemente la distancia interhemal existente entre la sangre fetal y la materna, favoreciendo el intercambio transplacentario de nutrientes.

La placenta caprina de 135 días presentó similitudes con la descrita en los 50 y 100 días de gestación, pero con ciertas modificaciones adaptativas en concordancia con las mayores demandas metabólicas de la gestación en el último trimestre. El continuo crecimiento y desarrollo de los placentomas, generan estructuras histológicas más complejas y entrelazadas entre el tejido caruncular y cotiledonario. Las vellosidades se ramifican ampliamente invadiendo cada vez más el tejido materno. Tal lo observado por Santos *et. al*, (1998) en el último tercio de gestación, junto con la mayor ramificación de las vellosidades se encuentra una disminución en el tejido conectivo. De esta manera los vasos sanguíneos que se ubican en su interior toman íntimo contacto con el epitelio trofoblástico. Es de destacar, como se observa a través de MOAR y MET que los capilares fetales parecieran penetrar los surcos entre las células del epitelio como fue descrito por Lawn *et. al*, (1969) similar a los capilares sinusoides descrito por Hafez *et. al*, (2010) en placentas ovinas y caprinas. Esta disposición de los capilares reduce la distancia entre la sangre materna y fetal. Por otro lado, al final de la gestación los tabiques maternos son delgados con escaso tejido conectivo lo que favorece la aproximación de los vasos al epitelio endometrial. Los tabiques maternos, además forman criptas cada vez más

---

---

ramificadas aumentando la superficie de difusión con el tejido de las vellosidades cotiledonarias.

A medida que avanza la gestación y aumentan las demandas nutricionales, debido al continuo crecimiento y desarrollo del concepto, la placenta experimenta un proceso continuo de remodelación. Esto es necesario para la regulación del intercambio materno fetal y así asegurar el éxito de la preñez (Boos *et. al*, 2003; Cobellis *et. al*, 2007). Esta remodelación involucra un crecimiento placentario gobernado por la proliferación celular y una reorganización estructural coordinada principalmente por el proceso de apoptosis. Es así que ambos procesos han sido estudiados en diferentes especies de placentados para cada etapa de la gestación, como así también la relación existente con diferentes entidades patológicas (Boos *et. al*, 2003; Rodriguez, 2011; Rudge, 2012; Cristofolini y col., 2013a, 2013b).

Particularmente en la placenta caprina observamos una evidente remodelación de los tejidos materno y fetal, determinado por los índices de apoptosis y de proliferación celular. En las muestras de tejido placentario estudiadas, la localización más frecuente de las células inmunopositivas a la técnica de TUNEL fue en el epitelio materno, correspondiendo a las células multinucleadas, identificadas y definidas por Wooding (2008) como placas sincitiales feto-maternas. Las mismas presentaron núcleos picnóticos, con la cromatina altamente condensada, características de células con escasa actividad transcripcional o en vías de comenzar el proceso de muerte celular programada (Häcker, 2000). Dichos sincitios representan aproximadamente el 90% de la superficie del epitelio materno y se postula que derivan de la migración de las CBN del epitelio fetal y su posterior fusión con células mononucleadas del epitelio materno (Wooding and Burton, 2008). El mencionado proceso ocurre de manera similar a la formación del sincitiotrofoblasto fetal de las placentas humanas. Si bien en la placenta caprina los sincitios corresponden al epitelio materno y en las placentas humanas al fetal, ambos participan del intercambio transplacentario. En humanos, una vez formados los sincitios son incapaces de dividirse y se desencadena inevitablemente, el proceso de apoptosis (Rodriguez *et. al*, 2011). Esto explicaría la inmunolocalización de células TUNEL positivas encontradas en el epitelio materno de las placentas estudiadas.

Los índices de apoptosis aumentan paulatinamente a lo largo de la gestación con un importante incremento en los días previos al parto, como mecanismo fundamental para la eliminación de las membranas fetales (Boos *et. al*, 2003; Paździor *et. al*, 2012). A diferencia de lo que postulan estos autores, en nuestro trabajo no se observaron diferencias

---

significativas entre los 50 y 100 días de gestación en el tejido caruncular, pero si una disminución a los 135 días. Por el contrario, en el tejido cotiledonario no se detectaron diferencias en el IAp a lo largo de la gestación.

Por otra parte, se observó un mayor índice apoptótico en el tejido caruncular en relación al cotiledonario para todos los tiempos gestacionales. Esto puede deberse a que los sincitios al poco tiempo de formados entran en apoptosis (Huppertz *et. al*, 2006; Rodriguez y col., 2011) representando gran parte del epitelio materno, corroborado a través de la microscopía electrónica. En el epitelio fetal se encuentran las células binucleadas que resultaron TUNEL negativas.

La detección del antígeno nuclear de proliferación celular nos permitió observar claramente que son las células del epitelio trofoblástico las que presentan una mayor actividad proliferativa, en comparación con las células epiteliales maternas. Las células binucleadas no mostraron inmunomarcación. Según Wooding y Burton (2008), en ovinos y caprinos, estas células se podrían originar a partir de la división de células mononucleadas sin citocinesis que comienzan a migrar al epitelio endometrial a partir del día 22 después de la fecundación. Este último punto remarca la necesidad de una alta actividad proliferativa por parte de las células mononucleadas, ya que además de mantener el epitelio y su continuo crecimiento para aumentar la superficie de las vellosidades, deben generar la población celular encargada de migrar y formar parte del epitelio materno. La ausencia de inmunomarcación en las células sincitiales indicaría la falta de actividad proliferativa. En contraste, Boos *et. al*, (2003) han demostrado en placentomas bovinos que en los dos primeros trimestres de gestación hay una activa proliferación la cual decae en el último trimestre. Este proceso de proliferación siempre es mayor en el epitelio materno que en el corion fetal.

Además de la proliferación celular el crecimiento de la placenta dependen de una red vascular apropiada, la cual surge de la vasculogénesis y angiogénesis. Numerosos trabajos realizados en placentas de ovejas indican que el desarrollo vascular de los tejidos placentarios, tanto en la porción caruncular como en la cotiledonaria, comienzan en la preñez temprana y continúan durante toda la gestación (Reynolds y Redmer, 2001; Reynolds *et. al*, 2004; Vonnahme *et. al*, 2008). La formación de la red vascular desde vasos sanguíneos preexistentes o nuevos es un proceso de múltiples etapas y es regulado por numerosos factores de crecimiento de los cuales VEGF es ampliamente estudiado (Reynolds and Redmer, 2001; Regnault *et. al*, 2003; Bairagi *et. al*, 2016). En las placentas de cabras, de 50, 100 y 135 días de gestación, VEGF se inmunomarcó

---

fuertemente en el epitelio trofoblástico, a excepción de las CBN y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos fetales. En el tejido materno VEGF se inmunomarcó débilmente tanto en el epitelio como en las células endoteliales. Estos resultados son coincidentes con lo encontrados en placentas de cerdos, ovejas y humanos donde la principal localización del VEGF fue en el epitelio trofoblástico de las vellosidades (Shore *et. al.*, 1997; Bogic *et. al.*, 2000; Reynolds and Redmer, 2001; Vohnname *et al.*, 2008; Sanchis y col., 2012). Basado en estudios realizados en placentas humanas y en placentas de ovejas (Bogic *et al.*, 2000) se sugiere que VEGF, expresado en las células del trofoblasto, actúa en forma paracrina sobre las células endoteliales para mediar el crecimiento de los vasos sanguíneos vellosos. Además VEGF puede regular la proliferación trofoblástica actuando como un mitógeno autocrino, y este efecto podría estar mediado por el receptor Flt-1 de las células trofoblásticas (Ahmed *et. al.*, 1995; Li *et. al.*, 2005; Kaczmarek *et. al.*, 2009). Al final de la preñez cuando disminuye la angiogénesis, la presencia de VEGF en las células del trofoblasto sugiere que estaría involucrado en el crecimiento y desarrollo de este tejido (Bogic *et. al.*, 2000).

En las últimas etapas de la angiogénesis el sistema Ang y su receptor Tie-2 actúan complementariamente al VEGF, siendo factores fundamentales para la funcionalidad vascular (Rizov *et. al.*, 2017). La inmunomarcación de Ang-1 a los 50 y 100 días de gestación fue similar al observado para VEGF con marcación moderada de los epitelios maternos y fetales, en concordancia con lo descrito por Seval *et. al.*, (2008) en placentas humanas del primer tercio de gestación. Hacia el final de la preñez el patrón inmunohistoquímico fue diferente, observándose una intensa marcación en el sincitio materno y ausencia en el epitelio trofoblástico y en las células endoteliales maternas y fetales. Estas observaciones no coinciden con lo descrito por Dunk *et. al.*, (2000) en placentas humanas donde Ang-1 fue localizado en el endotelio de los vasos vellosos. La Ang-2 presentó una intensa marcación en el epitelio materno a lo largo de la gestación. El receptor Tie-2 se localizó principalmente en el endotelio de los vasos maternos y fetales y también en el epitelio fetal. La localización endotelial del sistema Ang-1-Tie-2 es consistente con su papel en la promoción de la maduración y estabilización vascular. Además la presencia tanto de Ang-1 como de su receptor Tie-2 en el trofoblasto indicarían que están implicados en la promoción del crecimiento y migración del mismo (Dunk *et. al.*, 2000).

Durante el período gestacional estudiado y por acción de los factores de crecimiento, la red vascular se fue modificando. En nuestro estudio histomorfométrico

---

observamos que la DAC y DPC en el tejido CAR aumentó significativamente hacia el final de la gestación, coincidente con lo observado en placentas ovinas por Borowicz *et. al*, (2007). El aumento en la vasculatura materna se debió a un aumento en la DNC ya que el tamaño de los capilares, medido como el PCM, no mostró diferencias significativas entre los tiempos estudiados. Con respecto al tejido cotiledonario se observó igualmente un aumento en la DAC con diferencias significativas en cada tiempo de gestación estudiado. En este caso, el incremento en DAC se debió a un aumento en la DNC y no al tamaño de los capilares. Este último disminuyó, hacia los 135 días de gestación. La disminución en el tamaño de los capilares se puede deber a la gran ramificación, observado en nuestro trabajo, en las vellosidades y en la red vascular en las placentas al final de la gestación. Estos resultados acuerdan con los observados en placentas de otras especies como en ovejas (Borowicz *et. al*, 2007) y en humanos (Ramsey, 1982).

En nuestro estudio la arquitectura microvascular del tejido cotiledonario observada, compuesta de abundantes capilares pequeños asegurarían un transporte sanguíneo rápido, lo que mejoraría el intercambio feto-materno (Reynolds and Redmer 2001; Reynolds, 2005; Bairagi *et. al*, 2016).

---

---

## 7.2. Conclusiones

- ✓ Relacionado las variables peso fetal vs edad gestacional y longitud cráneo caudal vs edad gestacional de todos los fetos procesados, nos permitió obtener dos fórmulas de regresión que estiman, con suficiente agudeza, el tiempo de gestación de fetos caprinos de raza criolla.
- ✓ El uso de microscopía óptica y tinciones simples permitió la visualización de diversas estructuras placentarias típicas de la placenta caprina. El empleo de M.O.A.R. (Microscopía Óptica de Alta Resolución) dadas las características de fijación, inclusión y espesor de los cortes, posibilitó la visualización de las características de las células placentarias fetales y maternas y de los capilares sanguíneos correspondientes, con una mayor definición y resolución que con las técnicas convencionales de microscopía óptica.
- ✓ La utilización de MET (Microscopía Electrónica de Transmisión) debido a su alto poder de resolución, facilitó la diferenciación de células monucleadas (CMN) de células binucleadas (CBN) y estas últimas entre inmaduras y maduras. A su vez nos permitió la observación de los pequeños capilares fetales “intraepiteliales” que disminuyen la distancia interhemal.
- ✓ Los estudios de la estructura y de la ultraestructura de la placenta caprina nos permitió identificar las modificaciones adaptativas como la migración de las células binucleadas, presencia de capilares fetales fusionados con la membrana basal del epitelio trofoblástico, a medida que progresa la gestación, en concordancia con el aumento de las demandas metabólicas del feto en desarrollo.
- ✓ Analizando los resultados de túnel, PCNA y el estudio estructural y ultraestructural podríamos concluir que el crecimiento placentario en todos tiempos gestacionales estudiados, se produce a expensas de la proliferación de las células mononucleadas del trofoblasto. Estas últimas, además de mantener el epitelio y su continuo crecimiento para aumentar la superficie de las vellosidades, deben generar la población celular encargada de migrar y formar parte del epitelio materno.

- ✓ La localización de los factores angiogénicos como VEGF, Ang-1, Ang-2 y su receptor Tie-2 actuarían complementariamente en el desarrollo y maduración angiogénica y en la funcionalidad trofoblástica.
  
- ✓ El estudio histomorfométrico nos permitió identificar patrones de crecimiento vascular diferentes para el tejido cotiledonario, donde hacia el final de la gestación, los capilares disminuyen su tamaño debido a una mayor ramificación, en comparación con lo que sucede en el tejido caruncular.

# CAPÍTULO VIII

## BIBLIOGRAFÍA

---

---

## 8. Bibliografía

- Ahmed A, Li X, Dunk C, Whittle M, Rushton D, Rollason T. (1995). Colocalization of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors*: 12(3):235-43.
- Alonso N, Rodriguez V, Menajovsky J, Misiunas S y Carcedo J. (2012). Producción de leche caprina con suplementación en época de sequía en el noroeste de Córdoba, Argentina. *Revista Electrónica de Veterinaria*: 13 (8):1-10.
- Angosto M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69: 36–64.
- Arroyo J y Winn V. (2008). Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta. *Seminars in Perinatology*: 32 172–177.
- Augustin H, Koh G, Thurston G y Alitalo K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*: 10: 165-177.
- Bairagi S, Quinn K, Crane A, Ashley R, Borowicz P, Caton J y Reynolds L. (2016). Maternal environment and placental vascularization in small ruminants. *Theriogenology*: 86(1), 288-305.
- Bedotti D, Gómez A, García A, Sánchez M, Perea J y Rodríguez V. (2007). Estructura productiva de las explotaciones caprinas del oeste pampeano (Argentina) *Archivos de Zootecnia*: 56, 213, 91-94, Universidad de Córdoba España.
- Benirschke K y Kaufmann P. (2000). *Pathology of the human placenta, 4th ed.* New York: Springer.
- Berrocal Sánchez C (2001) Distribuciones bidimensionales. Regresión y correlación. Descartes. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. En: [http://w3.cnice.mec.es/Dcartes/Estadistica/Correlacion/regresion recta regresion/correlacion y regresion.htm](http://w3.cnice.mec.es/Dcartes/Estadistica/Correlacion/regresion%20recta/regresion/correlacion%20y%20regresion.htm)
- Blair H, Jenkinson C, Peterson S, Kenyon P, Van Der Linden D, Davenport L, Mackenzie D, Morris S y Firth E. (2010). Dam and granddam feeding during pregnancy in sheep affects milk supply in offspring and reproductive performance in grand offspring. *Journal of Animal Science*: 88, 40–50.
- Bogic L, Brace R y Cheung C. (2000). Cellular Localization of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovine Placenta and Fetal Membranes. *Placenta*: 21, 203–209.
- Boos A, Janssen V y Mulling C. (2003). Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction*: 126, 469–480.
- Borowicz P, Arnold D, Johnson M, Grazul-Bilska A, Redmer D y Reynolds L. (2007). Placental growth throughout the last two thirds of pregnancy in sheep: vascular development an angiogenic factor expression. *Biology of Reproduction*: 76, 259-267.
- Bozzo A, Soñez C, Monedero Cobeta I, Rolando A, Romanini MC, Cots D, Lazarte MA, Gauna H y Mugnaini MT. (2013). Chronic stress and its effects on adrenal cortex apoptosis in pregnant rats. *Biotechnic&Histochemistry*: 89(4), 296-303.
- Björkman N. (1969). Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. *Anatomical Record*: 163, 17–30.
- Canepa, E. (2007). Proliferación o quiescencia: una difícil decisión celular. *Química Viva*: 1(6):17-27.
- Castellucci M, Kaufmann P y Baergen R. (2006). Basic structure of the villous trees. In: Bernischke K, Kaufman P (eds.). *Pathology of the Human Placenta*. Springer, p 50-120.
- Cazerta S, Miglino M, Marques R, Vulcano M y Pereira F. (2007). Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*: 27(6):229-235.
- Chagra Dip E, Leguiza H, Cortéz S, Aguilar G y Varas M. (2010). Evaluación de los pesos al nacimiento, el crecimiento y consumo de leche de cabritos criollos en un sistema de manejo intensivo. *Revista Argentina de Producción Animal*: 2: 131 - 132.

- Clarke C y Sutherland R. (1990). Progesterone regulation of cellular proliferation. *Endocrine Reviews*: 11(2), 266-301.
- Cobellis L, De Falco M, Torella M, Trabucco E, Caprio F y Federico E. (2007). Modulation of Bax expression in physiological and pathological human placentas throughout pregnancy. *In Vivo*: 21(5): 777-83.
- Cristofolini A. (2010). *Estudio de la remodelación celular durante la placentación porcina*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
- Cristofolini A, Turiello M, Sanchis E, Cufre G y Merkis C. (2012). Effect of feed restriction and realimentation with monensin supplementation on placental structure and ultrastructure in anglo-nubian goats. *Veterinary science*: 2012.
- Cristofolini A, Sanchis G, Moliva M, Alonso L, Chanique A, Koncurat M y Merkis C. (2013). Cellular remodelling by apoptosis during porcine placentation. *Reproduction in Domestic Animals*: 48(4), 584-590.
- Cristofolini A, Merkis A, Barroso F, Vaquer Balmaceda V, Allende F, Chanique A y Koncurat M. (2013). Determinación de apoptosis por TUNEL e inmunoreactividad de las proteínas BCL-2 y BAX durante la placentación porcina. Comunicación. *Revista argentina de producción animal*: 30(1), 43-49.
- Cueto M, Gibbons A y Abbad M. (2000). *Reproducción en caprinos*. INTA, EEA Bariloche. Centro Regional Patagonia Norte, Argentina.
- De la Rosa Carbajal S. (2011). *Manual de producción caprina*. 1ª ed. Formosa, Argentina. ISBN 978-987-33-0421-7.
- Dayenoff P, Pizarro Castaño JM, Accorinti C y Morales (2015). Industria de la carne caprina en la Argentina. *II Congreso Argentino de Producción Caprina*. 277-281
- Demir R, Seval Y y Huppertz B. (2007). Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta histochemica*: 109(4), 257-265.
- Dent J. (1973). Ultrastructural changes in the intercotyledonary placenta of the goat during early pregnancy. *Journal of anatomy*: 114(Pt 2), 245.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzales L, Tablada M y Robledo C. (2009). *Grupo InfoStat*. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B y Ahmed A. (2000). Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol*: 156: 2185-2199.
- Ellis R, Yuan J y Horvitz H. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*: 7:663-698.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*: 35(4):495-516.
- Espinosa C. (2011). Angiogénesis en la placenta de los animales domésticos. *Revista Veterinaria*. 22: 2, 131-138.
- Ferrell C. (1991). Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *Journal of Animal Science*: 69 1945-1953.
- Fraser A y Evan G. (1996). A license to kill. *Cell*: 85:781-784.
- Gall C, Stier C y Frahm K. (1994). Age estimation of goat fetus. *Small Ruminant Research*: 14(1), 91-94.
- Garite T, Clark R y Thorp J. (2004). Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*: 191:481-487.
- Grazul-Bilska A, Johnson M, Borowicz P, Minten M, Bilski J, Wroblewski R, ... y Reynolds L. (2011). Placental development during early pregnancy in sheep: cell proliferation, global methylation, and

- angiogenesis in the fetal placenta. *Reproduction*:141(4), 529-540.
- Green J, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, y Roberts R. (2000). Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biology of Reproduction*: 62(6), 1624-1631.
- Green D. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121:671–674.
- Greenwood P, Thompson A y Ford S. (2010). Postnatal consequences of the maternal environment and of growth during prenatal life for productivity of ruminants. managing the prenatal environment to enhance livestock productivity. *Journal of Animal Science*: 90:1338-1348.
- Häcker G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research*: 301(1), 5-17.
- Hafez S, Caceci T, Freeman L y Panter K. (2007). Angiogenesis in the caprine caruncles in non pregnant and pregnant normal and swainsonine treated does. *The Anatomical Record*: 290(7), 761-769.
- Hafez, S, Borowicz, P, Reynolds, L, y Redmer, D. (2010). Maternal and fetal microvasculature in sheep placenta at several stages of gestation. *Journal of anatomy*, 216(3), 292-300.
- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I y Kroemer G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*: 15(13), 1573-1581.
- Hoffmann B y Schuler G. (2002). The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domestic Animal Endocrinology*: 23 309–320
- Humphrey W, Dalke A y Schulten K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*: 14(1), 33-38.
- Huppertz B, Kadyrov M y Kigdom JC. (2006). Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol*: 195, 29-39.
- Igwebuike U. (2009). A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Animal reproduction science*: 112(1), 1-7.
- Igwebuike U y Ezeasor D. (2012). Morphological assessment of placentomal trophoblastic epithelium in the placenta of West African Dwarf goats: A light and electron microscopic study. *Animal Reproduction Science*: 136: 61-68.
- Igwebuike U y Ezeasor D. (2013). The morphology of placentomes and formation of chorionic villous trees in West African Dwarf goats (*Capra hircus*). *Veterinarski arhiv*: 83(3), 313-321.
- Iracheta M, (2007). El suicidio y la muerte celular. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*: 101(2), 419-454.
- Kaczmarek M, Kiewisz J, Schams D y Ziecik A. (2009). Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology*: 71:8, 1298-1306.
- Kappou D, Sifakis S, Konstantinidou A, Papantoniou N y Spandidos D. (2015). Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy. *Experimental and therapeutic medicine*: 9(4), 1091-1096.
- Kayisli UA, Cayli S, Seval Y, Tertemiz F, Huppertz B y Demir R. (2006). Spatial and temporal distribution of Tie-1 and Tie-2 during very early development of the human placenta. *Placenta*: 27(6), 648-659.
- Kenyon P y Blair H. (2013). Foetal programming in sheep. Effects on production. *Small Ruminant Research*. 118:116-30.
- Kerr J, Wyllie A y Currie A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*: 26:239–57.
- Klisch K, Wooding F y Jones C. (2010). The glycosylation pattern of secretory granules in binucleate trophoblast cells is highly conserved in ruminants. *Placenta*: 31: 11–17.
- Korgun E, Celik-Ozenci C, Acar N, Cayli S, Desoye G y Demir R, (2006). Location of cell cycle regulators

- cyclin B1, cyclin A, PCNA, Ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas. *Histochemistry and cell biology*: 125(6), 615-624.
- Lanari M. (2004). Variación y diferenciación genética y fenotípica de la Cabra Criolla Neuquina en relación con su sistema rural campesino. *Tesis Doctoral*. Fac. Biología. Centro Regional Universitario Bariloche. Univ. Nacional del Comahue, Argentina.
- Lanari M. (2013). Producción de fibra cashemere en Argentina. *Primer Congreso Argentino de Producción Caprina*. 53-58.
- Laven R y Peters A. (2001). Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. *Reproduction in Domestic Animals*: 36(6), 289-296.
- Lawn A, Chiquoine A y Amoroso E. (1969). The development of the placenta in the sheep and goat: an electron microscope study. *Journal of anatomy*, 105(Pt 3), 557.
- Levy R y Nelson D. (2000). To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. *Placenta*: 21: 1-13.
- Levy R, Smith S, Yusuf K, Huettner P, Kraus F y Sadovsky Y. (2002). Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. *Am J Obstet Gynecol*: 186: 1056-61.
- Li H, Gu B, Zhang Y, Lewis D y Wang Y. (2005). Hypoxia-induced Increase in Soluble Flt-1 Production Correlates with Enhanced Oxidative Stress in Trophoblast Cells from the Human Placenta. *Placenta*: 26, 210-217.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S y Darnell J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. 5ta Ed. Bs. As. Ed Médica Panamericana.
- Maga G, y Hübscher U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science*: 116(15), 3051-3060.
- Malumbres M y Barbacid M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*: 30(11):630-641.
- Merkis C, Cristofolini A y Koncurat M, (2007). Apoptotic phenomena during porcine placentation. *REDVET*. Available: [www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html).
- Moldovan G, Pfander B, y Jentsch S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*: 129(4), 665-679.
- Morel P, Morris S y Kenyon P. (2008). Effect of birthweight on survival in triplet-born lambs. *Australian Journal of Experimental Agriculture*: 48:984-987.
- Murray A. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*: 116:221-234.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S y Poltorak Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal*:13:9-22.
- Noel S, Herman A, Johnson G, Gray C, Stewart M, Bazer F y Spencer T.. (2003). Ovine placental lactogen specifically binds to endometrial glands of the ovine uterus. *Biology of reproduction*: 68(3), 772-780.
- Ortega C, Díaz M, Ávalos A, Vergara M y Rosales A. (2001). La apoptosis y su importancia biomédica. *Gac Med Mex*: 137:563-577.
- Paunesku T, Mittal S, Protić M, Oryhon J, Korolev S y Joachimiak A. (2001). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol*: 77(10): 1007-21.
- Paździor K, Rapacz A, Rotkiewicz T y Raś A. (2012). Proliferation and apoptosis in fetal membranes and endometrium during placental retention in heavy draft mares. *Journal of Equine Veterinary Science*: 32(2), 80-84.
- Prior R y Laster D. (1979). Development of the bovine fetus. *Journal of Animal Science*: 48 1546-1553.

- Regnault T, Vrijer B, Galan H, Davidsen M, Trembler K, Battaglia F, Wilkening R y Anthony R. (2003). The relationship between transplacental O<sub>2</sub> diffusion and placental expression of PlGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. *Journal of Physiology*: 550.2:641–656.
- Reynolds L, Millaway D, Kirsch J, Infeld J y Redmer D. (1990). Growth and in vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation. *Journal of Reproduction and Fertility*: 89 213–222.
- Reynolds L y Redmer D. (1995). Utero-placental development and placental function. *Journal of Animal Science*: 73:1839-1851.
- Reynolds L y Redmer D. (2001). Angiogenesis in the Placenta. *Biology of Reproduction*: 64:1033–1040.
- Reynolds L, Borowicz P, Vonnahme K, Johnson M, Grazul-Bilska A, Wallace J, Caton J y Redmer D. (2005). Animal models of placental angiogenesis. *Placenta*: 26: 689-708.
- Reynolds L, Borowicz P, Vonnahme K, Johnson M, Grazul-Bilska A, Redmer D y Caton J. (2005). Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *Journal of Physiology*: 565.1: 43–58.
- Reynolds L, Borowicz P, Caton J, Vonnahme K, Luther J, Buchanan D y Redmer D. (2010). Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *International Journal of Developmental Biology*: 54(2-3), 355-365.
- Rizov M, Andreeva, P y Dimova I. (2017). Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*: 56(2), 127-132.
- Rodríguez M, Couve C, Egaña G y Chamy V. (2011). Apoptosis placentaria: mecanismos moleculares en la génesis de la preclampsia. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*: 76(6), 431-438.
- Rudge M, Costa E, Barbisan L, Damasceno D, Bueno A, Saito F y Rodrigues M. (2012). Evaluation of cell proliferation and apoptosis in placentas of rats with severe diabetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*: 55(2), 243-250.
- Rutland C, Latunde-Dada A, Thorpe A, Plant R, Langley-Evans S y Leach L. (2007). Effect of Gestational Nutrition on Vascular Integrity in the Murine Placenta. *Placenta*: 28: 734 -742.
- Sanchis E. (2013). *Estudio de neovascularización durante la placentación porcina*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
- Salva S, Villena J, Alvarez S, Font G y Nuñez M. (2013). La leche caprina y sus potencialidades como alimento funcional. Primer Congreso Argentino de Producción Caprina: 60-68.
- Sammin D, Markey B, Bassett H y Buxton D. (2009). The ovine placenta and placentitis, a review. *Veterinary microbiology*: 135(1), 90-97.
- Sanchis E, Cristofolini A y Merkis C. (2012). Matriz extracelular y vascularización en la placenta porcina. OPN, Fg, colágeno y VEGF EAE, Editorial Académica Española. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG. ISSN 978-3-659-00805-4. Saarbrücken, Alemania.
- Santos R , Barreto Filho J, Marques A y Andrade J. (1996). Erythrophagocytosis in the Caprine Trophoblast. *Theriogenology*: 46:1077-1083.
- Santos R, Barreto Filho J, Marques A y Andrade J. (1998). Volumetric proportions of the goat placenta structural components throughout gestation. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*: 35 (4): 156-160.
- Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y y Augustin H. (2005). The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci*: 118: 771-780.
- Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O y Demir R. (2008). The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta*: 29: 809-815.

- Sharma R, Blair H, Jenkinson C, Kenyon P, Cockrem J, Parkinson T. (2012). Uterine environment as a regulator of birth weight and body dimensions of newborn lambs. *Journal of Animal Science*: 90:1338-1348.
- Shiraishi S, Nakagawa K, Kinukawa N, Nakano H y Sueishi K. (1996). Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. *Placenta*: 17, 2-3, 111-121.
- Shore V, Wang T, Wang C, Torry R, Caudle M y Torry D. (1997). Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta*: 18:8, 657-665.
- Turiello P. (2012). Incidencia del nivel nutricional sobre el estado metabólico y hormonal en cabrillonas y su repercusión sobre la eficiencia reproductiva. *Tesis Doctoral*. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Valdés G y Corthorn J. (2011). Review: The angiogenic and vasodilatory utero-placental network. *Placenta*: 32, 2, 170-175.
- Vatnick I, Scholknecht R, Darrigrand R y Bell A. (1991). Growth and metabolism of the placenta after unilateral fetectomy in twin pregnant ewes. *J Dev Physiol*: 15.
- Vidal A y Koff A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*: 247:1-15.
- Vonnahme K, Arndt W, Johnson M, Borowicz P y Reynolds L. (2008). Effect of morphology on placentome size, vascularity, and vasoreactivity in late pregnant sheep. *Biology of Reproduction*: 79: 976-982.
- Wooding F y Wathes D, (1980). Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J Reprod Fertil*: 59, 425-430.
- Wooding F, Hobbs T, Morgan G, Heap R y Flint A. (1993). Cellular dynamics of growth in sheep and goat synepitheliochorial placentomes: an autoradiographic study. *Journal of Reproduction and Fertility*: 98 275-283.
- Wooding F y Burton G. (2008). Comparative placentation: structure, functions and evolution. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg: 1-291.
- Zeiss C. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*: 40:481-95. PubMed: 12949404]
- Zheng J, Johnson M, Redmer D y Reynolds L. (1996). Estrogen and progesterone receptors, cell proliferation and c-fos expression in the ovine uterus during early pregnancy. *Endocrinology*: 137 340-348
- Zimmerman M. (2013). Carne Caprina Argentina. *Primer Congreso Argentino de Producción Caprina*. 116-125.
- Zinkel S, Hurov K, Ong C, Abtahi F, Gross A, Korsmeyer S. (2005). A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell*: 122, 579-591.