

**"MORFOLOGÍA, REMODELACIÓN TISULAR Y
ANGIOGÉNESIS EN PLACENTAS DE YEGUAS
MESTIZAS"**



**Méd. Vet.
Stefani Rosario
Gregori**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Tesis para acceder al título de Doctor
en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria

**“MORFOLOGÍA, REMODELACIÓN TISULAR Y ANGIOGÉNESIS EN
PLACENTAS DE YEGUAS MESTIZAS”**

Méd. Vet. Stefani Rosario Gregori

DIRECTORA: Dra. María Cristina Romanini

CO-DIRECTORA: Dra. Nancy Rodríguez

CO-DIRECTOR: Dr. Fernando Queroiz de Almeida

Río Cuarto, 1 de agosto de 2022

COMISIÓN ASESORA y JURADO

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha

Calificación.....

*A ese Ser que estuvo, esta y estará
incondicionalmente siempre conmigo...*

Y a mi bella niña Huayra

AGRADECIMIENTOS

Agradecer significa frenar y poner una pausa... Recordar a cada ser y situación que nos llevó a este lugar. Hoy doy Gracias a

- ❖ *Dios por haberme permitido contar con la sabiduría, el coraje y la osadía de emprender este sendero, por haberme guiado y dado la fortaleza para culminar este proyecto.*
- ❖ *Gracias a mi directora de tesis Kity por abrir esa puerta aquel día que humildemente la golpee buscando quien me recibiera para hacer investigación en caballos, por haberme guiado profesional y emocionalmente en este camino.*
- ❖ *Gracias a Nancy mi codirectora y a Cecilia por su ayuda.*
- ❖ *Gracias a Vivian por haberme inculcado el camino de la ciencia y el porque de las cosas gracias a sus “preguntas de la vida”.*
- ❖ *Agradezco infinitamente a mis compañeros y amigos de la cátedra de Biología celular y Embriología general: Caro, Dami, Nati, Andrea, Romi, Colo, Debo, Agus y a Pato por ayudarme en cada “pasito agigantado” dado en este andar.*
- ❖ *Agradezco a los operarios y personal técnico del Frigorífico de Equinos General Pico S.R.L (Ex Frigorífico Aimar S.A), quienes me brindaron la posibilidad de obtener las muestras de las placentas equinas y utilizar las instalaciones de la planta.*
- ❖ *A mi universidad y a CONICET por darme la posibilidad de convertirme en un ser profesional y pensante en lo que tanto me apasiona.*
- ❖ *Gracias inmensas a Graciela por ser la persona que me inculco el “poema” que es lograr un corte histológico manual. Gracias por enseñarme y haber hecho posibles juntas tan bellas imágenes microscópicas.*
- ❖ *Al Área de Microscopía Electrónica por haberme brindado sus conocimientos y equipamientos para lograr culminar mi tesis.*
- ❖ *A los miembros asesores de tesis: Dra. Cecilia Merkis, PhD. Marcelo Miragaya y PhD. José Javier Aguilar, quienes de manera profesional y comprometida han dedicado parte de su tiempo en la revisión y supervisión de las distintas etapas de esta tesis.*
- ❖ *A Claudio y Francisco por su desinteresada ayuda, conocimientos y recursos en el área de histología e inmunohistoquímica.*
- ❖ *Al PhD. “Twink” Allen y PhD. Sandra Wilsher por contestarme aquel mail que nunca pensé llegaría a destino, por su generosa ayuda y su animo a seguir.*
- ❖ *Gracias a todos los colegas de Brasil, el equipo de LadEq y ClinEq por haberme brindado sus recursos, instalaciones y acompañamiento, en especial a Fernando mi codirector de tesis, por su calidez como ser humano.*
- ❖ *Un enorme gracias a la pasión que me persigue desde niña: Los Caballos.*
- ❖ *A la mejor creación de Dios sobre la tierra y la razón de mi “Ser Veterinaria”: Los Animales.*
- ❖ *A las imágenes y los colores, mi otra pasión que me ayudó en este proceso.*
- ❖ *A mis niñas Huayra, Mishifuz y a la memoria de Nala, por las incontables horas moviendo sus colas y regalándome esas miradas que silenciosas pero incondicionales me decían: “vamos que vos podes”*
- ❖ *A mi familia y amigos por ser el motor que me impulsó a seguir y por estar siempre a mi lado.*
- ❖ *A mi compañero de vida Leo por alentarme incansablemente, ayudarme, incentivarme e inspirarme a aprender sobre mi profesión, sobre los animales y sobre la vida misma.*

RESUMEN

La placenta forma la interfase entre el feto y la madre, siendo un factor determinante y una fuente de moléculas de señalización 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 equina se clasifica histológicamente como epiteliocorial microcotiledonaria difusa y adecidua. El objetivo de este estudio fue describir la morfología placentaria, desarrollo tisular y expresión de factores angiogénicos en yeguas. Para ello se utilizaron 15 yeguas mestizas sanas de la región central Argentina y se obtuvieron los úteros gestantes. Los tercios de preñez se determinaron como primer tercio (0 al 120 día de gestación), segundo tercio (120 a los 240 días) y tercer tercio (240 días al parto). Las muestras de interfase materno fetal y copas endometriales fueron destinadas al análisis estructural y ultraestructural, estudio inmunohistoquímico de los principales factores angiogénicos y hormona gonadotrofina coriónica equina, evaluación de la remodelación celular placentaria y estudio histomorfométrico de los vasos sanguíneos. En la gestación temprana el epitelio luminal del endometrio se encontró formado por células cúbicas con formación de pliegues endometriales poco profundos y glándulas en la superficie apical del endometrio materno. A medida que avanza la gestación, se van formando surcos endometriales más profundos que se corresponden físicamente con las proyecciones coriónicas desarrolladas del lado fetal. A partir del día 60 continúa el proceso de plegamiento en vellosidades secundarias y terciarias hasta la formación de microcotiledones organizados (unidad primaria de intercambio hemotrófico) desde el día 100 hasta el día 240 de gestación. A partir del segundo tercio de preñez la capa de células coriónicas de las vellosidades se halló más delgada, permitiendo el reconocimiento de abundantes capilares inmersos en el escaso tejido conectivo que los sostiene, inmediatamente debajo de los epitelios coriónico y endometrial, confirmado por MOAR y por TEM. Los resultados de apoptosis celular junto con una importante actividad mitótica durante el periodo temprano de la preñez, evidencian una activa remodelación tisular, proceso indispensable en la gestación equina, ya que antes de la implantación y previo a la formación de los microcotiledones la nutrición del embrión es histotrófica. La presencia en este órgano de los factores angiogénicos como VEGF, Ang-2 y sus receptores Flk-1 y Tie-2 indican que actuarían complementariamente en el desarrollo vascular, ejercerían su acción en sinergismo y serían una parte esencial de las vías de señalización celular paracrina y autocrina sobre las células endoteliales de los capilares, favoreciendo su crecimiento y estrecha ubicación hacia la superficie epitelial, disminuyendo la distancia interhemal. El estudio histomorfométrico nos permitió identificar que el aumento del área y perímetro vascular de la placenta sumado a la ausencia de inmunomarcación del sistema VEGF/Ang y sus receptores en los endotelios al final de la gestación evidencia que no hay nueva formación de vasos durante este periodo y sumado a un mantenimiento de la inmunomarcación moderada de los factores angiogénicos en las glándulas endometriales, afirma el protagonismo de las mismas en asumir el dominio en la conducción del desarrollo y crecimiento capilar tanto fetal como materno, que se daría en las etapas finales de la gestación. Se determinó que existe muerte por apoptosis en las células trofoblásticas especializadas de las copas endometriales durante todo su desarrollo y cabe resaltar que es el primer estudio en describir y profundizar la angiogénesis en placentas equinas.

ABSTRACT

The placenta forms the interface between the embryo/fetus and the mother, being a determining factor and a source of signaling molecules to maintain a favorable environment and achieve a successful pregnancy. These functions are possible through the formation of an extensive vascular network from endometrium to placenta, term angiogenesis. The equine placenta is classified histologically as diffuse and adeciduate microcotyledonary epitheliochorial. The aim of this study was to describe the placental morphology, tissue development and expression of angiogenic factors in mares. 15 healthy crossbreed mares from the central Argentina region were used and the pregnant uterus were obtained. Pregnancy thirds were determined as first third (0 to 120 days of gestation), second third (120 to 240 days) and third third (240 days to delivery). The samples from the maternal-fetal interface and endometrial cups were used for structural and ultrastructural analysis, immunohistochemical study of the main angiogenic factors and equine chorionic gonadotrophin hormone (eCG), evaluation of placental cell remodeling, and histomorphometric study of blood vessels. In early gestation, the luminal epithelium of the endometrium was found to be formed by cuboidal cells with the formation of shallow endometrial folds and glands on the apical surface of the maternal endometrium. As the pregnancy progresses, deeper endometrial sulci form that physically correspond to the developed chorionic projections on the fetal side. From day 60, the folding process in secondary and tertiary villi continues until the formation of organized microcotyledons (primary unit of hemotrophic exchange) from day 100 to day 240 of gestation. From the second third of pregnancy, the chorionic cell layer of the villi was found to be thinner, allowing the recognition of abundant capillaries immersed in the scarce connective tissue that supports them, immediately below the chorionic and endometrial epithelia, confirmed by MOAR and by TEM. The results of cell apoptosis together with an important mitotic activity during the early period of pregnancy, show an active tissue remodeling, an essential process in equine gestation, since before implantation and prior to the formation of microcotyledons, the nutrition of the embryo it is histotrophic. The presence in this organ of angiogenic factors such as VEGF, Ang-2 and their Flk-1 and Tie-2 receptors indicate that they would act complementary in vascular development, would exert their action in synergy and they would be an essential part of the paracrine and autocrine cell signaling pathways on the endothelial cells of the capillaries, favoring their growth and close location towards the epithelial surface, reducing the interhemal distance. The histomorphometric study allowed us to identify that the increase in the vascular area and perimeter of the placenta, added to the absence of immunostaining of the VEGF/Ang system and its receptors in the endothelium at the end of gestation, shows that there is no new formation of vessels during this period and added to a maintenance of the moderate immunostaining of the angiogenic factors in the endometrial glands, affirms the protagonism of the same in assuming dominance in the conduction of both fetal and maternal capillary development and growth, which would occur in the final stages of gestation. It was determined that there is death by apoptosis in the specialized trophoblastic cells of the endometrial cups throughout their development and it should be noted that this is the first study to describe and deepen angiogenesis in equine placentas.

ÍNDICE

	Página
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
2.1 HIPÓTESIS	7
2.2 OBJETIVOS	7
2.2.1 Objetivo General	7
2.2.1 Objetivos Específicos.....	7
MARCO TEÓRICO	8
3.1 Producción equina.....	9
3.2 Fisiología reproductiva equina	10
3.3 Gestación equina.....	12
3.3.1 Movilidad embrionaria y reconocimiento materno.....	13
3.3.2 Desarrollo de microcotiledones	14
3.3.3 Formación de copas endometriales.....	15
3.3.4 Placentación equina	16
3.4 Ultraestructura placentaria.....	19
3.5 Angiogénesis placentaria	20
3.5.1 Factores de crecimiento angiogénicos.....	21
3.5.2 Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y sus receptores.....	22
3.5.3 Angiopoyetinas (ANG) y sus receptores.....	23
3.6 Apoptosis y Proliferación celular.....	25
3.6.1 Apoptosis.....	25
3.6.2 Apoptosis placentaria.....	27
3.6.3 Proliferación celular placentaria	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1 Animales.....	31
4.2 Procesamiento de los tractos reproductivos y obtención de las placentas.....	31
4.3 Análisis de la estructura placentaria	33

4.3.1 Técnica histológica convencional para microscopía óptica	33
4.3.2 Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR).....	33
4.4 Análisis de Ultraestructura placentaria.....	34
4.4.1 Técnica convencional para Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	34
4.5 Técnicas inmunohistoquímicas	35
4.5.1 Determinación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF):.....	35
4.5.2 Determinación de la angiopoyetina 2 (Ang-2):	36
4.5.3 Determinación de los receptores Flt-1, Flk-1 y Tie-2	37
4.5.4 Determinación de la hormona gonadotrofina coriónica equina (eCG).....	38
4.5.5 Determinación de Caspasa-3.....	39
4.5.6 Semicuantificación de la inmunomarcación	40
4.5.7 Determinación del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA).....	40
4.6 Determinación de las variables morfométricas (área, perímetro y número) de los	41
vasos sanguíneos.....	41
RESULTADOS	43
5.1 Procesamiento de los tractos reproductivos	44
5.2 Estudio macroscópico de los tractos reproductivos y las placentas.....	46
5.3 Estudio microscópico de las placentas.....	49
5.4 Morfología de las copas endometriales.....	53
5.5 Ultraestructura placentaria por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	56
5.6 Inmunolocalización de la hormona gonadotrofina coriónica equina (eCG)	60
5.7 Inmunolocalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).....	63
5.8 Inmunolocalización de Angiopoyetina 2 (Ang-2)	68
5.9 Inmunolocalización del VEGF-R2 (Flk-1).....	74
5.10 Inmunolocalización de Tie-2	79
5.11 Determinación de proliferación placentaria	85
5.12 Determinación de apoptosis placentaria	89
5.13 Morfometría de los vasos sanguíneos	91
DISCUSIÓN.....	95
CONCLUSIONES.....	118
BIBLIOGRAFÍA	122
ANEXOS	135
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	141

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas		Página
I	Edad gestacional de cada placenta determinada a partir de parámetros biométricos fetales, placentarios y endometriales	44
II	Inmunoreactividad de VEGF en los diferentes estadios gestacionales	63
III	Inmunoreactividad de ANG-2 en los diferentes estadios gestacionales	69
IV	Inmunoreactividad de Flk-1 en los diferentes estadios gestacionales	74
V	Inmunoreactividad de Tie-2 en los diferentes estadios gestacionales	80
VI	Número de vasos sanguíneos de la interfase materno-fetal a lo largo de la preñez equina	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución de los equinos a nivel nacional. Extraído de Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (marzo 2020).	10
2	Perfiles hormonales y relaciones temporales con el desarrollo folicular y lúteo durante el ciclo estral en la yegua. Adaptado de Ginther, 1992.	12
3	Representación esquemática de los microcotiledones de la placenta equina. Nótese el contacto estrecho de los vasos sanguíneos fetales y uterinos. Tomado y modificado de Steven y Samuel, 1975.	14
4	Diagrama y fotografías que representan la formación de las copas endometriales, de las células de la cintura coriónica y la eventual degeneración y desprendimiento de las copas con la formación de las bolsas alantocoriónicas.	16
5	Diagrama que representa el desarrollo comparativo de la placenta y feto en el equino a partir de los 28 días de gestación. Extraído de Chavatte-Palmer <i>et.al.</i> , 2022.	18
6	Efectos diferenciales de la Ang-1 y Ang-2 sobre las células endoteliales. Reproducción con permiso de Wang y Lash, 2017.	25
7	Vías extrínseca e intrínseca de señalización intracelular de apoptosis. Extraído de Meresman, 2011.	26
8	Fotografías que representan la técnica de perfusión realizada sobre las arterias uterinas.	32
9	Tracto reproductivo de una yegua de \pm 55-60 días de preñez.	47
10	Útero gestante de yegua de \pm 100-120 días de preñez.	47
11	Vesícula embrionaria de \pm 39-42 días de gestación.	48
12	<i>Conceptus</i> de \pm 55-65 días de gestación con una longitud céfalo-caudal de 7cm.	48
13	<i>Conceptus</i> de \pm 100-120 días de gestación con una longitud céfalo-caudal de 25cm.	48
14	<i>Conceptus</i> de \pm 270 días de gestación con una longitud céfalo-caudal de 90cm.	48
15	Interfase materno-fetal de una placenta de \pm 25-30 días de gestación teñida con H/E.	49
16	Interfase materno-fetal de una placenta de \pm 55-65 días de gestación	50

	teñida con H/E (A: 100x B: 400x).	
17	Corte histológico de una placenta equina de $\pm 100-120$ días de gestación teñida con H/E (A: 25x; B: 100x).	51
18	Corte histológico de una placenta equina de $\pm 180-210$ días de gestación teñida con H/E (50x).	51
19	Corte histológico de una placenta equina de ± 300 días de gestación teñida con Tricrómica de Masson.	52
20	Corte histológico de la base de un microcotiledón de placenta equina de ± 300 días de gestación teñida con Tricrómica de Masson	53
21	Microfotografía de una copa endometrial entera perteneciente a un útero fijado por perfusión de $\pm 55-65$ días de gestación, teñida con H/E.	54
22	Sección histológica de una porción de copa endometrial de $\pm 55-65$ días de gestación teñida con H/E. 400x.	54
23	Sección histológica de una porción de copa endometrial de $\pm 55-65$ días de gestación teñida con H/E. 200x.	54
24	Sección histológica de una porción de copa endometrial de $\pm 100-120$ días de gestación teñida con H/E.	55
25	Sección histológica de una copa endometrial de $\pm 100-120$ días de gestación teñida con TM.	55
26	Imágenes de vellosidades coriónicas de un microcotiledón a los $\pm 240-270$ días de preñez procesadas por MOAR.	56
27	Microfotografía obtenida por TEM de tejido placentario equino de $\pm 55-65$ días.	57
28	Microfotografía obtenida por TEM de un capilar equino de $\pm 55-65$ días	57
29	Microfotografía obtenida por TEM de tejido placentario equino de $\pm 150-180$ días de gestación.	59
30	Microfotografía de una célula trofoblástica obtenida por TEM	59
31	Microfotografías de tejido placentario equino de $\pm 150-180$ días de gestación donde se visualiza el epitelio trofoblástico obtenidas por TEM.	60
32	Inmunohistoquímica de eCG de una copa endometrial entera en un útero fijado por perfusión de $\pm 55-65$ días de gestación.	61
33	Sección de copa endometrial entera de $\pm 55-65$ días de gestación.	61

	Inmunohistoquímica negativa para eCG en el epitelio de las glándulas endometriales.	
34	Inmunomarcación de células trofoblásticas de la copa endometrial	62
35	Inmunomarcación de eCG en una interfase materno-fetal con una copa endometrial adosada al útero a los \pm 100-120 días de gestación.	62
36	Sección de endometrio de una placenta equina de \pm 25-30 días de gestación inmunomarcada con anti-VEGF.	64
37	Inmunohistoquímica de VEGF de placenta equina de \pm 39-42 días de Gestación.	65
38	Inmunohistoquímica de VEGF en interface materno-fetal equina de \pm 55-65 días de gestación.	66
39	Inmunohistoquímica de VEGF de una copa endometrial entera de \pm 55-65 días de gestación.	66
40	Sección de copa endometrial entera de \pm 55-65 días de gestación inmunomarcada con anti-VEGF.	67
41	Inmunohistoquímica de VEGF en un microcotiledón equino de \pm 120-150 días de gestación.	67
42	Imagen de tejido placentario equino con ensayo inmunohistoquímico para VEGF en interface materno-fetal de \pm 300 días de gestación.	68
43	Inmunomarcación de ANG-2 en una sección de endometrio de una placenta equina de \pm 25-30 días de gestación.	70
44	Inmunohistoquímica de ANG-2 en placenta equina de \pm 39-42 días de gestación.	71
45	Inmunohistoquímica de ANG-2 de una copa endometrial de \pm 55-65 días de gestación.	71
46	Inmunohistoquímica de ANG-2 en una placenta equina de \pm 120-150 días de gestación.	72
47	Imagen de tejido placentario equino con ensayo inmunohistoquímico para ANG-2 en interface materno-fetal de \pm 300 días de gestación.	73
48	Inmunohistoquímica anti-Flk-1 de interfase materno-fetal equina de \pm 39-42 días de gestación.	76
49	Inmunohistoquímica de Flk-1 en una copa endometrial equina de	77

	± 55-65 días de gestación.	
50	Inmunolocalización de Flk-1 en interfase materno-fetal equina de ± 55-65 días de gestación.	78
51	Determinación de Flk-1 en placenta equina de ± 150-180 días de gestación por medio de inmunohistoquímica.	78
52	Imagen de tejido placentario equino con ensayo inmunohistoquímico para Flk-1 en interfase materno-fetal de ± 300 días de gestación.	79
53	Inmunomarcación de Tie-2 en interfase materno-fetal de ± 25-30 días de gestación.	81
54	Inmunohistoquímica de Tie-2 en placenta equina de ± 39-42 días de gestación.	82
55	Inmunolocalización de Tie-2 en interfase materno-fetal equina de ± 55-65 días de gestación.	83
56	Determinación de Tie-2 en placenta equina de ± 180-210 días de gestación por medio de inmunohistoquímica.	84
57	Imagen de tejido placentario equino con ensayo inmunohistoquímico para Tie-2 en interfase materno-fetal de ± 240 días de gestación.	84
58	Variación del IPr en las células del epitelio luminal del endometrio durante los tercios gestacionales en la preñez equina.	86
59	Variación del IPr en las células del epitelio glandular del endometrio a lo largo de la preñez equina.	87
60	IPr en las células del epitelio trofoblástico en los distintos tercios gestacionales de yeguas mestizas.	87
61	Inmunolocalización del antígeno nuclear de proliferación celular a lo largo de la placentación.	88
62	HSCORE de la intensidad de marcación de la inmunohistoquímica para Cas-3 en placentas de yeguas mestizas.	90
63	Determinación de apoptosis en las células especializadas trofoblásticas de yeguas mestizas mediante un ensayo inmunohistoquímico de CASPASA-3.	90
64	Determinación de apoptosis en placentas de yeguas mestizas mediante un ensayo inmunohistoquímico de CASPASA-3.	91
65	Área de los vasos sanguíneos de la interfase materno-fetal a lo largo de la	92

	preñez equina.	
66	Variación del perímetro de los vasos sanguíneos a lo largo de la preñez equina	93
67	Lectinhistoquímica de placenta equina de \pm 25-30 días de preñez.	93
68	Lectinhistoquímica de tejido placentario equino de \pm 150-180 días de Gestación.	94
69	Microscopía óptica de placenta equina de \pm 300 días de gestación teñida mediante lectinhistoquímica.	94

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ana/ana	partes iguales
ANG	angiopoyetinas
Ang-1	angiopoyetina 1
Ang-2	angiopoyetina 2
Bax	proteína 4 similar a bcl-2
BSA	albumina sérica bovina
Cas-3	caspasa-3
CBN	células binucleadas
cm	centímetro
CMN	células mononucleadas
CL	cuerpo lúteo
Da	Dalton
DAB	diaminobencidina
DCG	Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves
eCG	hormona gonadotrofina coriónica equina
EE	error estándar
E2	estrógenos
FSH	hormona folículo estimulante
FOB	Free on Board = Libre a Bordo del barco en el país de origen
h	horas
H/E	Hematoxilina-Eosina
INDEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
IPr	Índice de proliferación
Kg	Kilogramo
KDa	Kilodalton
LCC	longitud céfalo-caudal
LH	hormona luteinizante
MAGyP	Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca Argentina
mARN	ácido ribonucleico mensajero

mM	milimolar
mL	mililitro
min	minutos
MOAR	microscopía óptica de alta resolución
nm	nanómetro
PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular
PgE2	prostaglandinas E2
PgF2 α	prostaglandina F2 alfa
PI3K/AKT	vía de señalización de la fosfatidilinositol-.3-kinasa
PSA	<i>Pisum sativum</i>
P4	progesterona
seg	segundos
SEM	microscopía electrónica de barrido
SFB	solución de formol salino bufferado
SD	desvió estándar
TEM	microscopía electrónica de transmisión
Tie-1	receptor de angiopoyetina 1
Tie-2	receptor de angiopoyetina 2
TM	Tricrómica de Masson
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGF-R1	receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular / Flt-1
VEGF-R2	receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular / Flk-1
vol	volumen
μ m	micrón
μ L	microlitro
°C	grado Celsius

INTRODUCCIÓN GENERAL

La industria equina en nuestro país es muy importante ya que genera aproximadamente 400.000 puestos de trabajo en forma directa e indirecta, siendo la actividad hípica el principal sector en generar ganancias y la industria frigorífica en segundo lugar. La República Argentina tiene un stock ganadero equino de 2.603.894 caballos, donde la región pampeana cumple un importante rol participativo con aproximadamente un 51.6% del total de cabezas (MAGyP, 2022). Argentina es el cuarto productor de caballos de carrera y el primer productor de caballos de polo del mundo. Nuestro país se encuentra posicionado en el tercer lugar en producción de embriones después de Brasil y Estados Unidos, con aproximadamente 10.000 preñeces derivadas de esta técnica por año, de los cuales el 90% pertenecen a caballos de polo (MAGyP, 2017). Debido a esto en la producción equina, es fundamental el manejo sanitario, nutricional y reproductivo para alcanzar índices óptimos que representen una mayor rentabilidad y eficiencia de inversión.

La fisiología reproductiva del equino es diferente a la de otros animales domésticos ya que presenta un ritmo anual de capacidad e incapacidad reproductiva. La yegua es poliéstrica estacional y presenta sucesivos ciclos estrales que responden a un fotoperiodo positivo en primavera y otoño. El ciclo estral normal de la yegua, definido como el periodo entre dos ovulaciones consecutivas, comienza en la pubertad alrededor de los 10-24 meses de edad y su longitud aproximada varía entre 18 y 22 días, considerando en promedio un período de 21 días (Ginther *et.al*, 2008; Bergfelt, 2000). 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.

Con una gestación de aproximadamente 11 meses de duración, una implantación tardía, la existencia de 2 tipos diferentes de placentación y una maduración fetal muy retardada, el desarrollo del *conceptus* equino en un recién nacido sano es un desafío tanto para el criador como para el veterinario (Chavatte-Palmer *et.al.*, 2022).

La implantación se caracteriza por la coexistencia de copas endometriales, un trofoblasto invasivo proveniente de la cintura coriónica del embrión, que permanecerá activo hasta el cuarto mes de preñez, y el alantocorion no invasivo que permitirá los intercambios fetomaternos hasta el parto.

Entre el día 25 y 35 post-ovulación, una pequeña y espesa capa anular de trofoblasto especializado se desarrolla en la superficie externa del corion, en la región de contacto entre el alantoides y el saco vitelino, formando la llamada cintura coriónica. Entre el día 36 y 38, toda la cintura se desprende de las membranas fetales, se adhiere al endometrio subyacente y sus células invaden el estroma endometrial (Allen *et al.*, 1972). Aproximadamente al día 40, todas las células que ya se encuentran binucleadas (Wooding *et al.*, 2001) aumentan significativamente su tamaño y dejan de migrar, formando un conjunto de células compactas dentro del estroma endometrial conocido como copas endometriales (Clegg, 1954; Cole y Goss, 1943; Schauder, 1912) cuyas implicancias en el mantenimiento de la gestación son principalmente inmunológicas y endocrinológicas (Hamilton *et al.*, 1973; Allen *et al.*, 1973).

Las células especializadas de las copas endometriales se encargan de secretar en forma activa la hormona gonadotrofina coriónica equina (eCG) (Gospodorowicz 1972), que presenta una actividad biológica similar a la hormona folículo estimulante (FSH) y a la hormona luteinizante (LH) (Stewart *et al.*, 1976), estimulando el crecimiento en tamaño del cuerpo lúteo primario y la formación de cuerpos lúteos secundarios por los ovarios, con el consecuente incremento de la producción de progesterona para el mantenimiento de la preñez hasta que la placenta se haga cargo de la misma.

El alantocorion es la forma definitiva de la placenta equina, resultante de la fusión del corion y la vascularización alantoica. Presente a partir de los 40 días posteriores a la ovulación, se clasifica histológicamente como una placenta epiteliocorial difusa microcotiledonaria. Su desarrollo es contemporáneo de la regresión del saco vitelino y la transición de una placenta coriovitelina a una corioalantoidea. El microcotiledón es la unidad primaria de intercambio hemotrófico de la placenta no invasiva y se forma alrededor del día 120 de gestación en toda su superficie (Chavatte-Palmer *et al.*, 2022).

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 normal desarrollo placentario comprende un importante crecimiento vascular, denominado angiogénesis, con el fin de soportar las demandas crecientes de gases y metabolitos del feto. La angiogénesis

es un proceso altamente organizado de crecimiento (proliferación celular) y desarrollo (diferenciación celular) de nuevos capilares, arterias y venas a partir de vasos preexistentes. En este proceso intervienen diferentes moléculas, como hormonas, factores de crecimiento, receptores, citocinas y células inmunes, como así también células madres y progenitoras (Rizov *et al.*, 2017).

En la yegua el extenso desarrollo de nuevas redes capilares fetales y maternas es paralelo al desarrollo celular de la interfase materno-fetal, maximizando así el grado y la eficiencia del intercambio hemotrófico. Sin embargo, no hay estudios específicos que evalúen efectivamente la remodelación vascular a lo largo de toda la gestación en yeguas sanas, solo se han descriptos estudios con especial referencia a la microvasculatura de los microcotiledones fetales, a través de la creación de moldes de corrosión vascular en yeguas primíparas jóvenes frente a yeguas múltiparas viejas con endometrosis (Abd-Elnaeim *et al.*, 2006) y en equinos pura sangre de carrera con laminitis crónica y evaluación placentaria solo al momento del parto (Pazinato *et al.*, 2017).

El mantenimiento de la integridad estructural y funcional del tejido placentario involucra un recambio celular altamente regulado, que depende de un delicado balance entre proliferación, diferenciación y pérdida celular (Benirschke y Kaufmann, 2000; Alsat *et al.*, 1995). Durante la formación de la placenta existe una gran proliferación celular, que a su vez se acompaña también de la generación de una gran cantidad de desechos celulares que deben ser eliminados de manera muy eficiente por el proceso conocido como apoptosis (Rodríguez *et al.*, 2011). La variación en estos procesos puede generar el desarrollo de alteraciones a nivel placentario, lo que a su vez puede generar patologías de la preñez como insuficiencia placentaria y placentitis que llevan a muerte embrionaria temprana, abortos, retrasos en el crecimiento fetal o nacimiento de potros inmaduros (dismaduros y/o prematuros).

Debido a la falta de información respecto a la morfología básica, remodelación vascular y desarrollo tisular de la placenta de yeguas mestizas en Argentina, resulta imperioso estudiar la histología placentaria, ultraestructura, factores tisulares y vasculares placentarios con la finalidad de contribuir al estudio de las diferentes problemáticas que afectan a la reproducción equina en nuestro país, ya que en la industria de la transferencia embrionaria (sobre todo del equino de polo) se utilizan, mayormente, yeguas mestizas como receptoras

de embriones (facilitado por el gran stock ganadero equino) y el bajo coste del animal comparado con un caballo pura raza.

Por tal motivo se plantea como objetivo de esta tesis estudiar la estructura y ultraestructura, la angiogénesis y la remodelación tisular en placentas de yeguas mestizas de la región central Argentina con diferentes estadios de gestación.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La angiogénesis se incrementa durante el desarrollo de la placenta satisfaciendo las demandas metabólicas del feto mientras que la proliferación celular y la apoptosis deben correlacionarse para permitir una correcta remodelación del tejido placentario durante la preñez equina.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo General

Estudiar la estructura y ultraestructura, la angiogénesis y la remodelación tisular en placentas de yeguas mestizas de la región central Argentina con diferentes estadios de gestación.

2.2.1 Objetivos Específicos

1. Analizar la estructura y ultraestructura de placentas equinas del primer, segundo y tercer tercio de la preñez.
2. Caracterizar histológicamente la estructura de las copas endometriales y determinar su funcionalidad mediante la inmunolocalización de la hormona gonadotrofina coriónica equina en placentas equinas del primer tercio de preñez.
3. Determinar la inmunoexpresión del factor de crecimiento endotelio vascular, la angiopoyetina 2 y sus receptores en cortes histológicos de placentas en los diferentes estadios de la preñez.
4. Analizar la angiogénesis placentaria mediante el estudio de variables morfométricas (área y perímetro) de los vasos sanguíneos.
5. Evaluar la remodelación tisular placentaria en los períodos gestacionales propuestos, determinando la apoptosis y la proliferación celular.

MARCO TEÓRICO

3.1 Producción equina

La República Argentina tiene un stock ganadero equino de 2.603.894 caballos, donde la región pampeana cumple un importante rol participativo con aproximadamente un 51.6% del total de cabezas, según el reporte de marzo del 2021 del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca Argentina (MAGyP). La industria equina en nuestro país es muy importante ya que genera aproximadamente 400.000 puestos de trabajo en forma directa e indirecta, siendo la actividad hípica el principal sector en generar ganancias y la industria frigorífica en segundo lugar. Argentina cuenta con 73 centros registrados de inseminación artificial y transferencia de embriones, principalmente para caballos de salto, polo y, en menor medida, cuarto de milla, árabe y peruano de paso.

El Sistema Equino Argentino se puede diferenciar claramente en dos subsistemas: el del caballo de andar deportivo y el destinado a carne (Regúnaga *et al.*, 2006). La industria hípica asociada a la actividad deportiva le aportó al caballo argentino un alto valor agregado, ya que existen gran cantidad de equinos criados que se han posicionado en los mejores podios del deporte ecuestre mundial. Argentina es el cuarto productor de caballos de carrera y el primer productor de caballos de polo del mundo; reconocida mundialmente como la cuna del polo, ha aumentado su crecimiento en los últimos años, impactando mucho en la provincia de Córdoba. Según la coordinación de equinos del MAGyP en base a datos del INDEC y *Trade Map del International Trade Center* (ITC), en el 2019 Argentina exportó 2.970 équidos por 28,2 millones de dólares FOB (Free on Board = Libre a Bordo del barco en el país de origen) absorbiendo el 0,9% del mercado (MAGyP, 2022). Además, nuestro país se encuentra posicionado en el tercer lugar en producción de embriones después de Brasil y Estados Unidos, con aproximadamente 10.000 preñeces derivadas de esta técnica por año, de los cuales el 90% pertenecen a caballos de polo (MAGyP, 2017). En relación a los caballos destinados para la producción de carne, si bien Argentina no presenta consumo de dicha carne, se encuentra entre los principales países exportadores mundiales en la materia, siendo la Unión Europea el mercado por excelencia. Este subsistema adquiere importancia en lo que se refiere a la industrialización y exportación, representando una importante fuente de ingreso al erario público por exportaciones. A pesar de ello, no existe producción de caballos para tal fin; es decir, que no hay producción y engorde de caballos para faena, sino que se destinan a tal fin a aquellos equinos que no pueden -o dejan de- ser utilizados en sus actividades originales (deportivas, de trabajo, etc.); este esquema se ve facilitado por el gran stock de équidos existente (Barbero, 2016). En el año 2021, Argentina

vendió 10.024,26 toneladas de carne equina por un valor aproximado de 31.987,21 millones de dólares FOB. Dentro de las cabezas faenadas, la región pampeana aporta el 90% de las mismas (MAGyP, 2022). La Fig. 1 muestra la presencia de equinos en las distintas provincias de Argentina.

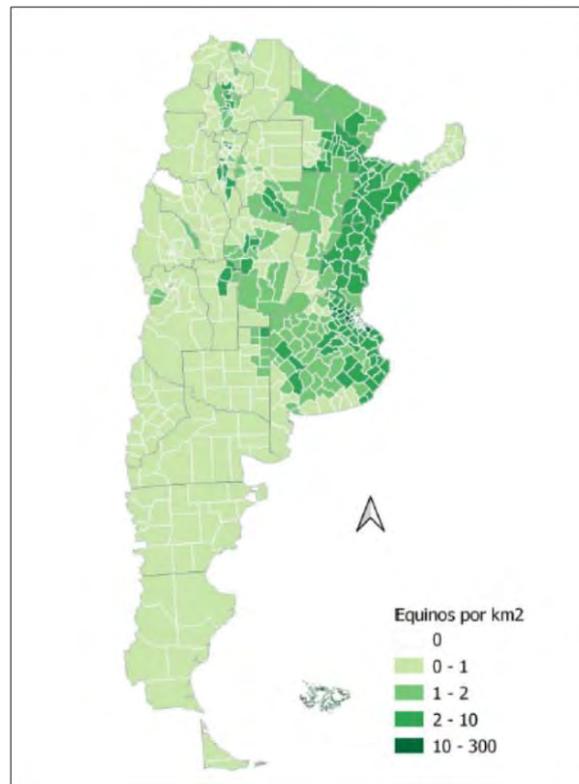


Fig.1: Distribución de los equinos a nivel nacional. Extraído de Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (marzo 2020).

En la producción equina, es fundamental el manejo sanitario, nutricional y reproductivo para alcanzar índices óptimos que representen una mayor rentabilidad y eficiencia de inversión.

3.2 Fisiología reproductiva equina

La fisiología reproductiva del equino es diferente a la de otros animales domésticos ya que presenta un ritmo anual de capacidad e incapacidad en la reproducción. El ciclo reproductivo anual de la yegua refleja una estrategia evolutiva para maximizar la supervivencia de los potrillos acorde a la duración de la preñez. Las yeguas con gestaciones de aproximadamente 11 meses, comienzan a aparearse a mediados de la primavera de forma tal que el momento

del parto sea al año siguiente en la misma época, donde se encuentra la mayor oferta de alimento (Grant, 2005).

La yegua es poliéstrica estacional y presenta sucesivos ciclos estrales que responden a un fotoperiodo (aumento o disminución de la luz del día) en primavera y otoño. Este fotoperiodo activa la glándula pineal liberando hormonas que estimulan la actividad ovárica. En zonas de clima templado, la mayoría de las yeguas presentan actividad sexual durante la primavera-verano (estación reproductiva) y muy pocas al final del otoño-invierno (estación anovulatoria). El aumento en la actividad ovárica producido por el incremento de las horas luz, lleva a que la especie equina sea considerada fotoperiódica positiva.

El ciclo estral normal de la yegua, definido como el periodo entre dos ovulaciones consecutivas, comienza en la pubertad alrededor de los 10-24 meses de edad y su longitud aproximada varía entre 18 y 22 días, considerando en promedio un periodo de 21 días (Ginther *et. al*, 2008; Bergfelt, 2000). Este ciclo consiste en dos etapas claramente diferenciadas: el estro o fase folicular y el diestro o fase lútea. Ambas fases se caracterizan por modificaciones internas de los órganos sexuales y del sistema glandular, así como también por cambios en el comportamiento de la yegua en función de los niveles dominantes de estrógenos (E2) y progesterona (P4) en cada uno de ellos, respectivamente (Aurich, 2011; Crowell-Davis, 2007). El estro se caracteriza por la presencia de folículos en diferentes etapas de desarrollo y el aumento simultáneo en la secreción de E2. Tiene una duración de 5-7 días, presentando una variabilidad de 3-9 días que está relacionada con la temporada estacional. Durante este periodo, la yegua es sexualmente receptiva al tracto genital del semental, pudiendo recibir y transportar el esperma para culminar finalmente con la ovulación. La fase diestra o lútea comienza en el momento de la ovulación con la formación del cuerpo lúteo (CL), que es responsable de la síntesis de P4. A diferencia de la fase folicular, la insensibilidad del CL al fotoperiodo hace que la duración de este periodo sea más constante. De hecho, la mayoría de las investigaciones estiman una duración promedio de 14-15 días (Ginther *et. al*, 2008; Crowell-Davis, 2007; Squires, 1993). El final de la fase lútea está marcado por la liberación de la prostaglandina (en el caso de no haber concepción) alrededor del día 14-15 del ciclo, la regresión del CL, la caída en los niveles de P4 y el comienzo de un nuevo estro 1-2 días después (Daels y Hughes, 1993). En la Fig. 2 se observa la interrelación entre los eventos fisiológicos y los perfiles hormonales del ciclo estral de la yegua.

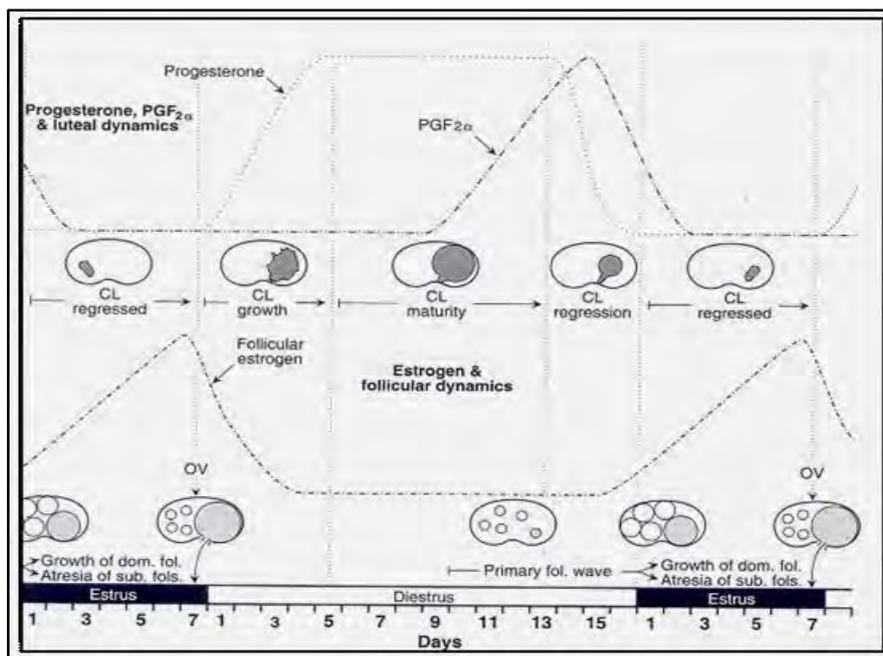


Fig.2: Perfiles hormonales y relaciones temporales con el desarrollo folicular y lúteo durante el ciclo estral en la yegua. Adaptado de Ginther, 1992.

3.3 Gestación equina

El dialogo feto-materno continuo es un pre-requisito de la preñez en todos los mamíferos. Sin embargo, en la preñez equina se presentan una serie de características que son únicas para esta especie y difieren de los eventos equivalentes en otras grandes especies de animales domésticos y silvestres. Es difícil dar una razón evolutiva sobre estas características particulares; no obstante, debe presumirse que son componentes importantes en el establecimiento y mantenimiento de la preñez (Allen, 2011). Algunos de los eventos significativos involucrados en el establecimiento de la preñez en la yegua son: su amplio rango gestacional, la movilidad embrionaria y fetal, el reconocimiento materno de la preñez, la formación de las copas endometriales y el desarrollo de microcotiledones, entre otros.

La gestación de la yegua se extiende desde la fecundación hasta el parto y se ha dividido en tres períodos: El período ovulatorio abarca desde la fecundación hasta el día 15 y es durante el cual se desarrolla el estadio de blastocisto y llega al útero. El período embrionario comprende desde el día 15 al día 60 y es durante el cual se lleva a cabo el desarrollo y crecimiento de los distintos órganos u organogénesis. El período fetal se extiende desde el día 60 al parto, y es durante el cual se presentan ligeras diferencias de tejidos, órganos o sistemas a lo largo del desarrollo y maduración del feto. La duración de la gestación en equinos varía de 320 a 405 días, con un promedio de 340 días (Cortés-Vidauri *et. al*, 2018).

3.3.1 Movilidad embrionaria y reconocimiento materno

El embrión equino demora un tiempo excesivamente largo para recorrer el oviducto y comienza a secretar cantidades apreciables de prostaglandinas E2 (PgE2) cuando alcanza el estadio de mórula compacta al día 5 post-ovulación. Esta PgE2 actúa localmente para relajar la musculatura lisa circular y contraer la musculatura lisa longitudinal de la pared del oviducto, permitiendo un avance rápido y la entrada al útero alrededor de las 24 horas (Weber *et al.*, 1995, 1992, 1991ayb). El embrión entra al útero a través de la papila útero-tubárica entre los días 6 y 7 post-ovulación (Battut *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1977). Por lo tanto, es la capacidad del propio embrión de secretar hormonas la que provoca su pasaje hacia el útero y no los cambios en el tamaño o cambios conformacionales en su capa más externa como ocurre en las otras especies domesticas (Allen, 2011). Una vez en el útero, el embrión se rodea de una estructura característica de la especie equina, desde el día 6-7 hasta el día 23 post-ovulación. Dicha estructura es conocida como cápsula del blastocisto equino y es un glicocáliz acelular, resistente y elástico, producido por el trofoectodermo después de que el conceptolo llega al útero y pierde la zona pelúcida (Oriol *et al.*, 1993; Betteridge *et al.*, 1992, 1989). La cápsula evita que el trofoblasto se elongue entre el día 10 y 16 post-ovulación, a diferencia de los embriones de cerdos y rumiantes que llevan a cabo este mecanismo para poner en contacto el trofoblasto con el endometrio y maximizar así la recepción del reconocimiento materno del factor de la preñez (Wooding, 1982; Perry *et al.*, 1973). Es por ello, que el embrión equino permanece esférico y completamente suelto dentro de la cavidad uterina, donde se mueve constantemente impulsado por las fuertes contracciones peristálticas del miometrio que son, a su vez, estimuladas por PgE2 y prostaglandina F2 alfa (PgF2 α) producidas por el embrión (Allen, 2001). Cuando el embrión está presente, la luteólisis debe ser bloqueada (primera respuesta luteal a la preñez) a través de la hormona progesterona. La presión evolutiva ha llevado a que se desarrollen distintas estrategias para permitir el desarrollo embrionario. El fenómeno de movilidad en la yegua permite que el embrión contacte con todo el endometrio uterino y de esta manera, una pequeña vesícula esférica es capaz de bloquear la luteólisis a pesar de la gran extensión del útero (Ginther, 1998). Este proceso de movilidad embrionaria en las yeguas persiste hasta el día 16-17, cuando el aumento de la tonicidad del miometrio inmoviliza la vesícula todavía esférica y la fija en la base de uno de los cuernos uterinos. Dicho aumento está probablemente inducido por la acción combinada de los estrógenos producidos por el embrión desde tan temprano como el día 10 post-ovulación (Heap *et al.*, 1982) y las

prostaglandinas embrionarias sobre la musculatura del útero. La vesícula fijada permanece sujeta a la acción de las contracciones uterinas continuas que se cree contribuyen a la rotación u orientación vesicular (Ginther, 1998; van Niekerk, 1965). Luego de que el concepto deja de moverse, realizará durante los próximos 60-70 días a los procesos de embriogénesis, organogénesis, y aumentará la interdigitación entre las capas epiteliales fetales y maternas para crear la placenta equina (Allen y Wilsher, 2009).

3.3.2 Desarrollo de microcotiledones

La membrana corioalantoidea de la placenta, está conectada a la pared uterina por millones de vellosidades microscópicas (1-2 mm aproximadamente) llamadas microcotiledones (debido a que se asemejan, en una menor escala, a la disposición cotiledonaria de los rumiantes). Las proyecciones vellosas se interdigitan con los pliegues del endometrio y las glándulas maternas de manera compleja. El microcotiledón es la unidad primaria de intercambio hemotrófico de la placenta no invasiva y se forma alrededor del día 120 de gestación en toda su superficie, exceptuando en la zona que contacta con el cérvix llamada estrella cervical. En consecuencia, mientras que la mayoría de la superficie coriónica exterior tiene un aspecto aterciopelado de color rojo ladrillo debido a la presencia de los microcotiledones, la región de la placenta que se apoya sobre el cuello uterino carece de este aspecto y tiene una apariencia blanco suave. La unión de la placenta al útero a través de los microcotiledones es crítica para la transferencia de nutrientes y oxígeno de la yegua al feto (Wilsher y Allen 2012, Abd-Elnaeim *et al.*, 2006). La Fig.3 muestra la formación de los microcotiledones de la placenta equina, con sus componentes maternos y fetales.

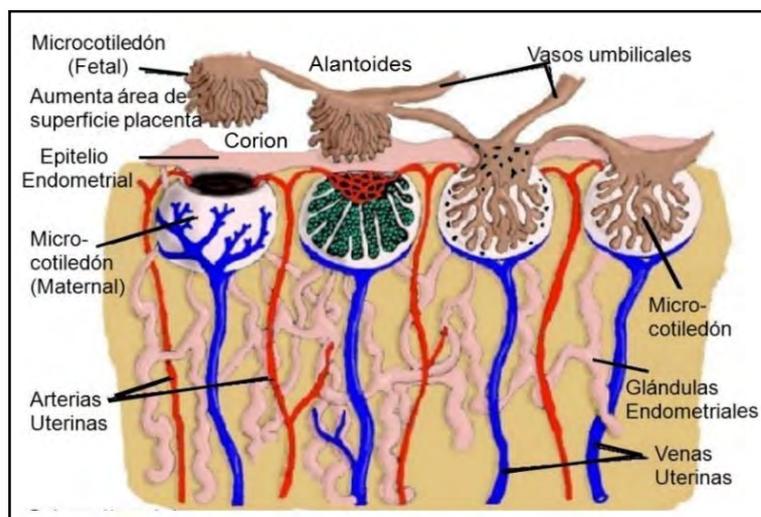


Fig.3: Representación esquemática de los microcotiledones de la placenta equina. Nótese el contacto estrecho de los vasos sanguíneos fetales y uterinos. Tomado y modificado de Steven y Samuel, 1975.

3.3.3 Formación de copas endometriales

Entre el día 25 y 35 post-ovulación, una pequeña y espesa capa anular de trofoblasto especializado se desarrolla en la superficie externa del corion, en la región de contacto entre el alantoides y el saco vitelino, formando la llamada cintura coriónica. Entre el día 36 y 38, toda la cintura se desprende de las membranas fetales, se adhiere al endometrio subyacente y sus células invaden el estroma endometrial (Allen *et al.*, 1972). Aproximadamente al día 40, todas las células que ya se encuentran binucleadas (Wooding *et al.*, 2001) aumentan significativamente su tamaño y dejan de migrar, formando un conjunto de células compactas dentro del estroma endometrial conocido como copas endometriales (Clegg, 1954; Cole y Goss, 1943; Schauder, 1912) cuyas implicancias en el mantenimiento de la gestación son principalmente inmunológicas y endocrinológicas (Hamilton *et al.*, 1973; Allen *et al.*, 1973). La formación detallada de las copas se muestra en la Fig.4. Las células especializadas de las copas endometriales se encargan de secretar en forma activa la hormona gonadotrofina coriónica equina (eCG) (Gospodorowicz 1972), que presenta una actividad biológica similar a la hormona folículo estimulante (FSH) y a la hormona luteinizante (LH) (Stewart *et al.* 1976). La eCG estimula el crecimiento en tamaño del cuerpo lúteo primario y la formación de cuerpos lúteos secundarios por los ovarios, tanto por la ovulación de folículos dominantes accesorios producidos en cada onda folicular, como por la luteinización de las células de la teca y de la granulosa, con el consecuente incremento de la producción de E2 y P4. Los estrógenos actúan sinérgicamente con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para estimular la vascularización placentaria (Allen *et al.*, 2007) y la progesterona ayuda a mantener la preñez hasta que se produce un gran crecimiento y desarrollo de las gónadas fetales (ovarios y testículos) a partir del día 80 de gestación (Holtan *et al.*, 1979). La eCG puede ser detectada tempranamente a los 37-41 días de gestación, presenta un pico entre los 60-75 días y desaparece alrededor de los 120-150 días (Evans *et al.*, 1933). Los cuerpos lúteos secundarios se observan entre los días 40 y 150 de la gestación, ya que a partir de ese momento la placenta corioalantoidea difusa está lo suficientemente establecida como para suministrar la progesterona que mantiene la preñez hasta término (Amoroso *et al.*, 1948; Cole *et al.*, 1931). Las células invasoras de la cintura coriónica expresan en su superficie antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I heredados de la línea paterna, previamente y durante unos días después de que invaden el endometrio materno para la formación de las copas endometriales (Donaldson *et al.*, 1990; Crump *et al.*, 1987). Estos antígenos inducen respuestas inmunes humorales y mediadas por células por parte de la

yegua, las cuales parecen proteger al concepto alogénico en lugar de dañarlo y podrían ser esenciales en la iniciación y desarrollo del proceso de placentación (Allen *et al.*, 1987; Allen, 1982). Al mismo tiempo, limitan la síntesis exócrina de las copas endometriales a solo 60-80 días (Allen, 1975).

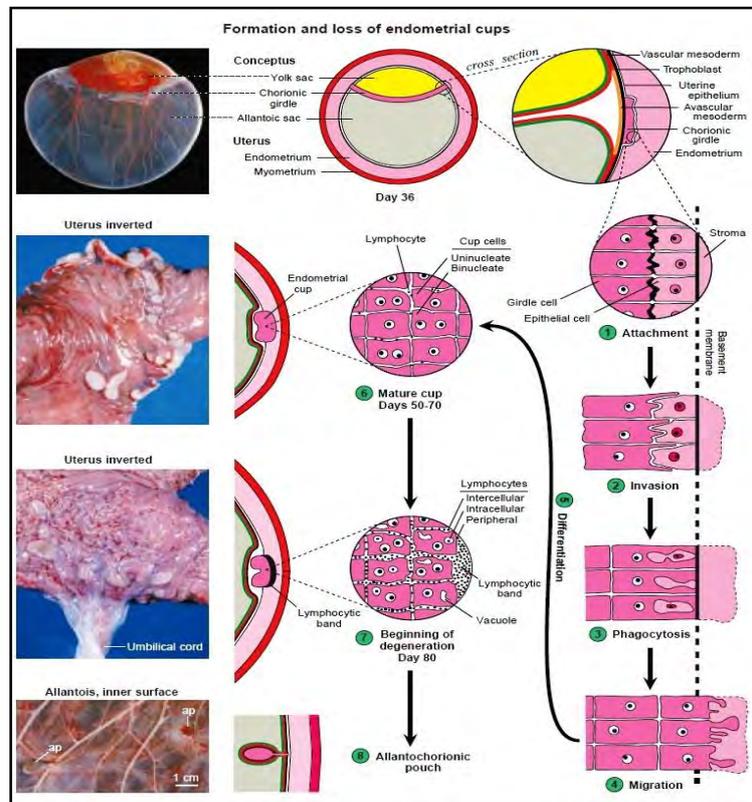


Fig.4: Diagrama y fotografías que representan la formación de las copas endometriales, de las células de la cintura coriónica y la eventual degeneración y desprendimiento de las copas con la formación de las bolsas alantocoriónicas. Los eventos secuenciales se numeran cronológicamente como se muestra con los puntos verdes. Extraído de Ginther, 1998.

3.3.4 Placentación equina

En todos los mamíferos la placentación inicia con la implantación, la cual incluye la adhesión y la migración celular y conduce a la fijación del trofoblasto al epitelio uterino. Una definición de placenta fue propuesta por Steven y Morris en 1975 como "un órgano de transporte que consta de uno o más epitelios situados entre la sangre fetal y materna". Su principal función consiste en regular el intercambio fisiológico entre el feto y la madre, aunque también actúa como un importante órgano endocrino e inmunológico durante la gestación (Watson y Cross, 2005; Noden, 1990).

La placenta está formada por la zona más superficial del endometrio materno y por el corion fetal, asociados con el saco vitelino o el alantoides dependiendo de la especie. Existen tres criterios para la clasificación placentaria: el primero es según el origen vascular y la naturaleza de los tejidos extraembrionarios que la componen. En equinos, la placenta se desarrolla inicialmente como una placenta coriovitelina, donde la pared del saco vitelino se une con el corion. Este tipo de placenta proporciona la base del intercambio materno-fetal hasta el día 42 de preñez donde experimenta un proceso de regresión (totalmente involucionado entre 56 y 75 días). La placenta corioalantoidea se desarrolla tardíamente cuando se fusionan el alantoides con el corion y se considera la placenta funcional en todas las especies domésticas, incluyendo el equino (Roa *et al.*, 2012). Durante esta etapa temprana, los estudios proteómicos indican que probablemente existe una diafonía entre el saco vitelino y la placenta corioalantoidea para el transporte de moléculas al feto (Francioli *et al.*, 2020; Loux *et al.*, 2018). Una vez que el saco vitelino ha retrocedido, la placenta corioalantoidea es la única proveedora de intercambio de nutrientes entre la yegua y el feto, tanto hemotrófico como histotrófico, intercambios que representan aproximadamente el 90% y el 10% respectivamente (Chavatte-Palmer *et al.*, 2022).

Otro criterio de clasificación se basa en la estructura de la superficie corioalantoidea y su interacción con el endometrio. Aquellas áreas donde las membranas corioalantoideas interactúan con el endometrio para formar la placenta, se conocen como corion frondoso. En equinos, el corion frondoso se distribuye de manera difusa sobre toda la superficie corioalantoidea y, por lo tanto, la placenta se clasifica morfológicamente como difusa completa. El último criterio de clasificación es el histológico y se basa en el número de capas de tejidos que separan la circulación materna de la fetal, formando de este modo la barrera placentaria (Roa *et al.*, 2012). La placenta equina se clasifica histológicamente como epiteliocorial y posee seis capas de tejidos, tres de origen materno (epitelio, tejido conectivo y endotelio de los vasos sanguíneos maternos) y tres de origen fetal (epitelio, tejido conectivo y endotelio de los vasos sanguíneos fetales). Además, esta placenta se considera adecidua ya que no hay pérdida de tejido materno en el momento del parto (Roa *et al.*, 2012; Wooding, 2008).

Para la formación de la placenta, el alantocorion se elonga continuamente durante los primeros 40 días hasta que ocupa completamente el interior del útero en el día 80-85. En esta interfase materno-fetal, las vellosidades con forma de dedos del alantocorion comienzan a interdigitarse con unas proyecciones más delgadas de la superficie del endometrio (Samuel

et al., 1974). Alrededor del día 60, estas vellosidades corioalantoideas y sus surcos endometriales comienzan a elongarse extensivamente, mientras que al mismo tiempo se hacen más largas y profundas (Allen y Wilsher, 2009). El trofoblasto consiste en ese momento en una capa simple de células columnares estrechamente adosadas a las microvellosidades del epitelio uterino. Alrededor del día 100, las células trofoblásticas se vuelven cúbicas y las uniones se tornan más complejas, desarrollándose pliegues secundarios. Un plegado más complejo tiene lugar durante los días 130-140, hasta que los microcotiledones maduros multi-ramificados se rodean, del lado materno, de una cápsula de tejido conectivo (Samuel *et al.*, 1974).

El desarrollo placentario persiste durante toda la gestación para maximizar el área de contacto entre las capas epiteliales fetales y las maternas, asegurando el intercambio hemotrófico de gases, nutrientes y productos de desecho (Macdonald *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 1976). Cada microcotiledón es irrigado por una arteria del lado materno, así como de lado fetal para maximizar el proceso de intercambio hemotrófico (Abd-Elnaeim *et al.*, 2006; Steven y Samuel 1975;). Asimismo, las glándulas endometriales largas y ramificadas permanecen funcionales durante la gestación, liberando secreciones exocrinas ricas en proteínas en los espacios intervellosos o areolas. Las células trofoblásticas que recubren la apertura de las glándulas se convierten en pseudoestratificadas y están adaptadas para tomar esta leche uterina y permitir así la nutrición histotrófica (Allen y Wilsher 2009; Samuel *et al.*, 1977; Amoroso 1952).

El siguiente diagrama resume el desarrollo de la placenta y el feto a lo largo de la gestación equina desde los 28 días de preñez al parto (Chavatte-Palmer *et.al.*, 2022; Fig.5)

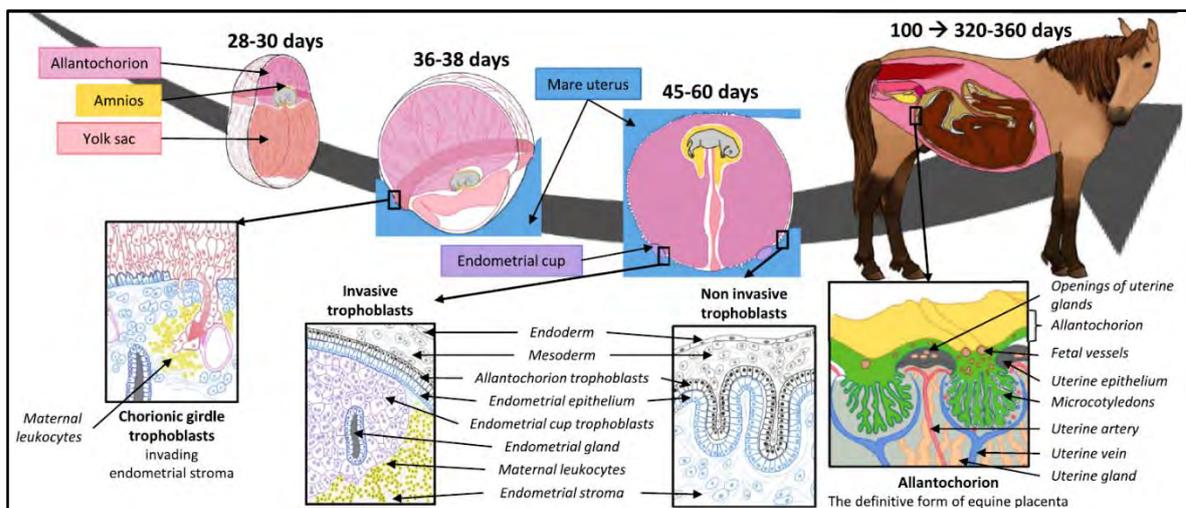


Fig.5: Diagrama que representa el desarrollo comparativo de la placenta y feto en el equino a partir de los 28 días de gestación. Extraído de Chavatte-Palmer *et.al.*, 2022.

3.4 Ultraestructura placentaria

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se aplicó por primera vez para estudiar la ultraestructura placentaria en la década de los cincuenta. Dada la influencia de la clasificación histológica de Grosser, no es sorprendente ver a los veterinarios a la vanguardia de los estudios ultraestructurales.

Amoroso participó en los primeros estudios de placentación epiteliocorial, en la cerda y en la yegua (Amoroso *et al.*, 1958; Dempsey *et al.*, 1955), mientras tanto, Nils Björkman escribió sobre la placentación en la vaca (Bjorkman *et al.*, 1957). Estos estudios, fueron los primeros análisis ultraestructurales de placentas en animales domésticos (Carter *et al.*, 2016).

Steven y Samuel fueron los primeros en describir y profundizar la ultraestructura de la placenta equina realizando estudios a través de microscopía electrónica en yeguas Welsh Mountain Pony en diferentes periodos gestacionales (Steven y Samuel, 1976, 1974). Después de un intervalo de más de dos décadas y gracias a los avances en los instrumentos utilizados por estas técnicas, se han realizado publicaciones sobre la ultraestructura placentaria a través de la observación por microscopía electrónica de barrido (SEM), dando nuevas miradas al cuestionamiento de la morfología microcotiledonaria y vascular de la placenta equina (Abd-Elnaeim *et al.*, 2003, 2006; Macdonald *et al.*, 2000; Macdonald *et al.*, 1999; Bracher *et al.*, 1996). Estos trabajos permitieron observar y caracterizar la ultraestructura superficial de la placenta equina en diferentes razas como ponis y pura sangre, la técnica de SEM demostró ser particularmente útil para visualizar la estructura más fina en los moldes de corrosión de los vasos sanguíneos en la placenta equina. Estudios recientes, han evaluado los cambios superficiales del endometrio equino durante la primera mitad de la gestación en yeguas mestizas y criollas (Camozzato *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2014).

A pesar de esto, el desarrollo de instrumentos y las implementaciones informáticas mejoradas siguen manteniendo a TEM a la vanguardia del análisis ultraestructural, por lo tanto, continúa siendo una herramienta útil en la era de la biología molecular (Carter, *et al.*, 2016). Actualmente, en yeguas mestizas, no hay evidencias de análisis ultraestructural placentario a través de la técnica de microscopía electrónica de transmisión.

3.5 Angiogénesis placentaria

La placenta juega un rol fundamental en la provisión de nutrientes al feto. Este intercambio transplacental depende del flujo sanguíneo umbilical y uterino, los cuales son dependientes de una adecuada vascularización de la interfase materno-fetal. Para satisfacer las demandas metabólicas de los embriones, el flujo sanguíneo hacia el útero aumenta notoriamente (Reynolds *et al.*, 2005). Este aumento ocurre a través de dos procesos consecutivos: la vasculogénesis y la angiogénesis, mientras que la vasculogénesis es la formación de vasos sanguíneos que se originan por la diferenciación de células mesenquimales pluripotenciales, provenientes de células progenitoras hemangiogénicas, la angiogénesis es un proceso altamente organizado de crecimiento (proliferación celular) y desarrollo (diferenciación celular) de nuevos capilares, arterias y venas a partir de vasos preexistentes (Rizov *et al.*, 2017).

Existen dos mecanismos diferentes para lograr este proceso, el brote de nuevos vasos a través de tubos vasculares preexistentes o la división de vasos preexistentes a través de la angiogénesis por invaginación (Djonov *et al.*, 2000). El más antiguo en su descubrimiento es el desarrollo angiogénico por brotación y compone un patrón de investigación que ha sido ampliamente estudiado. Actualmente, sobre la base de una gran cantidad de estudios, la angiogénesis brotante o más conocida por “sprouting”, coordina una serie de eventos centrados en donde las células endoteliales responden a los estímulos angiogénicos, proporcionados principalmente por los factores de crecimiento vasculares, ya sea secretados por las propias células endoteliales o por las células del estroma (Saharinen *et al.*, 2010, 2011).

La angiogénesis es un proceso meticulosamente regulado, que acontece tanto en tejidos normales y fisiológicos como en los anormales y patológicos, tales como la inflamación, aterosclerosis, reestenosis, diversos tipos de vasculopatías y cáncer, entre otros (Fagian *et al.*, 2013). Normalmente, los vasos maduros están en estado de reposo y muestran una proliferación mínima (Dreys, 2005), a excepción de los cambios que incluyen un patrón vascular asociado como el ciclo y la preñez en el sistema genital femenino (Stouffer *et al.*, 2001; Plendl, 2000).

El proceso comienza en los tejidos pobremente perfundidos cuando los mecanismos de detección de oxígeno captan un nivel de hipoxia que demanda la formación de nuevos vasos sanguíneos para compensar las necesidades metabólicas. La angiogénesis fisiológica se

caracteriza básicamente por un proceso que progresa gradualmente, tal es el caso de la gestación, donde se produce el aumento de las demandas metabólicas debido al desarrollo de los tejidos placentarios y el crecimiento fetal, generando zonas con hipoxia, este proceso activa ciertos genes que participan en la formación, producción y liberación de los factores angiogénicos por parte de los tejidos. Como respuesta a estos estímulos, el proceso de angiogénesis comienza con la dilatación de vasos sanguíneos preexistentes, aumento de la permeabilidad vascular y degradación de la matriz extracelular y lámina basal de los mismos, continuando con la proliferación y migración de células endoteliales (brotes), luego la organización de estas células endoteliales en líneas y formación de tubos endoteliales, recubrimiento de los nuevos vasos por células periendotheliales, reconstrucción de la matriz extracelular y lamina basal y finalmente, estabilización de vasos mediante la transición a una fase de inactividad (Bairagi *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2012).

Se han desarrollado numerosos métodos morfométricos para investigar el patrón de desarrollo vascular a lo largo de la gestación en placentas de animales domésticos, tales como ovejas (Borowicz *et al.*, 2007), cabras (Diaz *et al.*, 2015), vacas (Vonnahme *et al.*, 2008) y cerdas (Cristofolini *et al.*, 2018; Merkis *et al.*, 2006).

Al igual que en todas las placentas de mamíferos, en la yegua el extenso desarrollo de nuevas redes capilares fetales y maternas es paralelo al desarrollo celular de la interfase materno-fetal, maximizando así el grado y la eficiencia del intercambio hemotrófico (Abd-Elnaeim *et al.*, 2006). Sin embargo, no hay estudios específicos que evalúen efectivamente la remodelación vascular a lo largo de toda la gestación en yeguas sanas, solo se han descritos estudios con especial referencia a la microvasculatura de los microcotiledones fetales, a través de la creación de moldes de corrosión vascular en yeguas primíparas jóvenes frente a yeguas múltiparas viejas con endometrosis (Abd-Elnaeim *et al.*, 2006) y en equinos pura sangre de carrera con laminitis crónica y evaluación placentaria solo al momento del parto (Pazinato *et al.*, 2017).

3.5.1 Factores de crecimiento angiogénicos

Aunque hay numerosos factores implicados en la angiogénesis, dos de los principales reguladores son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con sus receptores VEGF-R1 (Flt-1) y VEGF-R2 (Flk-1) y la familia de proteínas angiopoyetinas (ANG) con sus receptores Tie-1 y Tie-2 (Espinosa, 2011).

3.5.2 Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y sus receptores

El VEGF es una glicoproteína homodimérica de 34,000-45,000 Da que es expresado por numerosos tejidos y células diferentes y es altamente específico para los receptores de VEGF-R1 (también llamado Flt-1) y VEGF-R2 (también llamado KDR o Flk-1) (Moliva *et al.*, 2011, Kacsmarek *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que este factor de crecimiento junto a sus receptores se expresa en el endometrio, el tejido decidual y el trofoblasto del humano (Rizov *et al.*, 2017; Shore *et al.* 1997), en primates no humanos (Wulff *et al.* 2002), en la placenta sindesmocorial de ovejas y cabras (Díaz *et al.* 2015; Cheung *et al.* 1995), en oviducto y placenta epiteliorial del cerdo (Guimarães *et al.* 2017; López Albors *et al.* 2017; Sanchis *et al.* 2015) y en cuerpos lúteos y folículos anovulatorios de ovarios equinos (Ellenberger *et al.*, 2009; Al-zi'abi *et al.*, 2003).

Se sabe que este factor es un potente mitógeno, morfógeno y quimio-atrayente para las células endoteliales y es ampliamente reconocido como el más potente estimulador de vasculogénesis y angiogénesis (Rizov *et al.*, 2017; Charnock-Jones *et al.*, 2004).

VEGF-R1 conocido también como Flt-1, es una glicoproteína de transmembrana de 180 KDa que pertenece a la familia de los receptores de tirosin-quinasa. Tiene una afinidad muy alta por VEGF y una actividad de proteína quinasa relativamente baja; puede funcionar como un regulador negativo de la señalización de VEGF al limitar la cantidad de VEGF libre y evitar su unión a VEGFR-2 (Ahmed *et al.*, 1997), no obstante, otros estudios realizados en cerdos reportaron que la unión de VEGF a VEGF-R1 puede producir una señal mitogénica leve, reclutamiento de células endoteliales progenitoras y liberación de factores de crecimiento específicos de tejido (Kaczmarek *et al.*, 2009).

VEGF-R2 conocido también como Flk-1, es una proteína de 230 KDa con dos variantes funcionales conocidas tras el procesamiento del mRNA, que se expresa principalmente en las células endoteliales, además de células madre hematopoyéticas y megacariocitos.

La expresión de Flk-1 en las células endoteliales adultas parece tener un papel importante en los efectos mitogénicos y quimiotácticos de VEGF, participando de manera crucial en la angiogénesis y la hematopoyesis. Es uno de los mediadores de la actividad proliferativa y del aumento de la permeabilidad del VEGF, cuando este factor se une a Flk-1 conduce a una cascada de diferentes vías de señalización (Pinzón *et al.*, 2009). Se sabe que es esencial para

la angiogénesis endometrial, importante para la implantación de embriones y modula la fosforilación de sus efectores posteriores, incluidas las vías de señalización PI3K/AKT y ERK1/2, que desempeñan papeles vitales en la proliferación, supervivencia, migración y permeabilidad de las células endoteliales (Wei Chen *et al.*, 2019). Por estas razones, el receptor Flk-1 se considera el receptor principal en el sistema VEGF, aunque esto podría estar sujeto a especificidad de tejido y especie (López Albors *et al.*, 2017).

Estudios previos han demostrado que VEGF es el regulador primario de la angiogénesis en procesos normales y patológicos, incluyendo el crecimiento vascular placentario (Rutland *et al.*, 2007). Se ha reportado también, que hay un alto grado de homología entre las formas humanas y equinas de este factor (Allen *et al.*, 2007), en este mismo estudio se demostró que VEGF y sus respectivos receptores se localizan durante la mayor parte de la gestación en los dos tipos de células secretoras principales de la placenta equina: el epitelio glandular y luminal del endometrio materno y el trofoblasto del alantocorion fetal. Por lo tanto, se podría postular que, en la yegua, VEGF y sus receptores facilitan el desarrollo de las redes vasculares maternas y fetales para el intercambio de gases, nutrientes y productos de desecho a lo largo de la gestación. Se sabe también que este factor tiene un efecto sinérgico con los estrógenos secretados a lo largo de la preñez, en primera instancia por el embrión previo a la fijación, luego por los cuerpos lúteos primarios y secundarios y finalmente por la placenta equina (Allen, 2011). Los estrógenos promueven la angiogénesis en el útero indirectamente mediante la estimulación de la secreción de factores angiogénicos por las células endometriales y directamente al aumentar la proliferación y migración de células endoteliales (Losordo DW, 2001).

3.5.3 Angiopoyetinas (ANG) y sus receptores

A pesar del papel indispensable que juegan los miembros de la familia VEGF en la formación de la red vascular, deben trabajar junto con otros factores. Las angiopoyetinas parecen ser uno de los asociados más importantes de VEGF. Fueron descubiertas como aglutinantes de receptores Tie, un grupo de receptores tirosin quinasa expresados selectivamente dentro del endotelio vascular de la misma manera que los receptores VEGF (Gowdak y Krieger, 2018).

Las angiopoyetinas son una familia de factores de crecimiento proangiogénicos que regulan el crecimiento y el desarrollo vascular (Hayes *et al.*, 1999) y desempeñan un papel crítico en

la supervivencia celular endotelial. Las Ang no son factores mitogénicos como lo es el VEGF, pero son fundamentales en el proceso de construcción de los vasos.

La familia de las angiopoyetinas incluye una molécula agonista (Ang-1) y una antagonista (Ang-2), ambas proteínas de ~75 KDa, se unen a los receptores de membrana Tie-1 y Tie-2. Estos receptores se encuentran expresados casi exclusivamente en células endoteliales, Tie-2 tiene afinidad similar para ambos ligandos (Wang y Lash, 2017; Linares *et al.*, 2014; Gale *et al.*, 2002).

Tie-2 es una proteína tirosin quinasa de 140 kDa que actúa como receptor de la superficie celular para las angiopoyetinas regulando la angiogénesis, activándola o inhibiéndola, según el contexto. Si Ang-1 se une a Tie-2 promueve el mantenimiento y la estabilización de vasos sanguíneos maduros, mediante la interacción entre células endoteliales, los pericitos y la membrana basal. Por otra parte, si se une Ang-2 a Tie-2, promueve la desestabilización de los vasos sanguíneos e inicia la neovascularización (Fig.6).

Ang-1 se expresa predominantemente en células perivasculares, como pericitos, células vasculares del músculo liso, fibroblastos y células tumorales. La hipoxia, VEGF-A y otros factores aumentan la expresión de Ang-1 en pericitos y células musculares lisas. Después de que Ang-1 se une al receptor Tie-2, se activan varias vías de señalización intracelular, lo que conduce a la síntesis de óxido nítrico y una mayor supervivencia de las células endoteliales debido a la disminución de su apoptosis (Gowdak y Krieger, 2018).

Por otro lado, Ang-2 se expresa en células endoteliales, y su producción está regulada por varios factores de crecimiento (incluido VEGF) y condiciones fisiopatológicas (hipoxia tisular). La expresión de Ang-2 aumenta rápidamente después de la activación angiogénica del endotelio, a través de un mecanismo autocrino, las células endoteliales producen la liberación de Ang-2 produciendo así su propia desestabilización sanguínea.

Los efectos angiolíticos (degenerativos) de Ang-2 pueden ser pronunciados en ausencia relativa de VEGF, pero cuando esta citosina angiogénica está presente, los vasos desestabilizados sufren cambios angiogénicos permitiendo un acceso más fácil del VEGF al endotelio vascular y, por lo tanto, a su receptor Flk-1 permitiendo que las células endoteliales se activen para migrar y proliferar, formando así nuevos vasos sanguíneos y por consiguiente promoviendo la remodelación vascular (Fig.6) (Rizov *et al.*, 2017). Como consecuencia, Ang-2 tiene un efecto pro-angiogénico indirecto (Hanahan, 1997).

Se ha demostrado, en diversos estudios, el sitio de unión de las Ang-1 y Ang-2 con el receptor Tie-2 en el humano (Eklund y Saharinen, 2013; y *et al.*, 2009; Seval *et al.*, 2008) en la placenta de babuinos (Babischkin *et al.*, 2007), en ovario, útero y placenta de ratones (Maisonpierre *et al.*, 1997) y en placentas de cerdos (Fiorimanti *et al.*, 2018). En yeguas, no hay reportes sobre la expresión de angiopoyetinas y Tie-2 en la interfase materno fetal, solo se han descrito estudios para la remodelación vascular ovárica (Müller *et al.*, 2009, 2012) y endometrial en condiciones fisiológicas (ciclo estral) y patológicas (Otzen *et al.*, 2016).

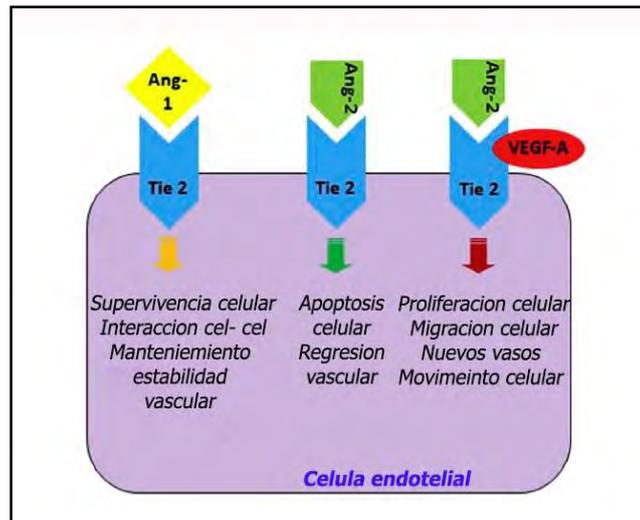


Fig.6: Se muestra los efectos diferenciales de la Ang-1 y Ang-2 sobre las células endoteliales. Reproducción con permiso de Wang y Lash, 2017.

En síntesis, los factores de crecimiento VEGF, sus receptores y la familia de las angiopoyetinas están involucrados en la iniciación de la angiogénesis en la placenta de los mamíferos durante la gestación.

3.6 Apoptosis y Proliferación celular

3.6.1 Apoptosis

La muerte celular programada, llamada apoptosis, es un fenómeno biológico fundamental que ocurre bajo una gran variedad de situaciones fisiológicas y patológicas. Este proceso junto con la mitosis (proliferación), controla el número de células de un tejido dado y están reguladas genéticamente (Espinosa, 2014; Heazell y Crocker, 2008).

La apoptosis puede desencadenarse por una vía originada en el interior de la célula (vía intrínseca) o por una vía iniciada por una señal externa (vía extrínseca). La vía extrínseca, esta mediada por interacciones entre los receptores de membrana y sus ligandos, tales como

Fas o TNF- α . Por el contrario, la vía intrínseca produce la señal de muerte a través de la mitocondria y puede ser programada para ocurrir en un punto específico del desarrollo celular o como respuesta a un daño celular (Fig.7). Estas injurias pueden ser daños en el ADN, grandes aumentos en la concentración de calcio citosólico, estrés celular, así como aumentos en la generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Merkis *et al.*, 2010; González *et al.*, 2010).

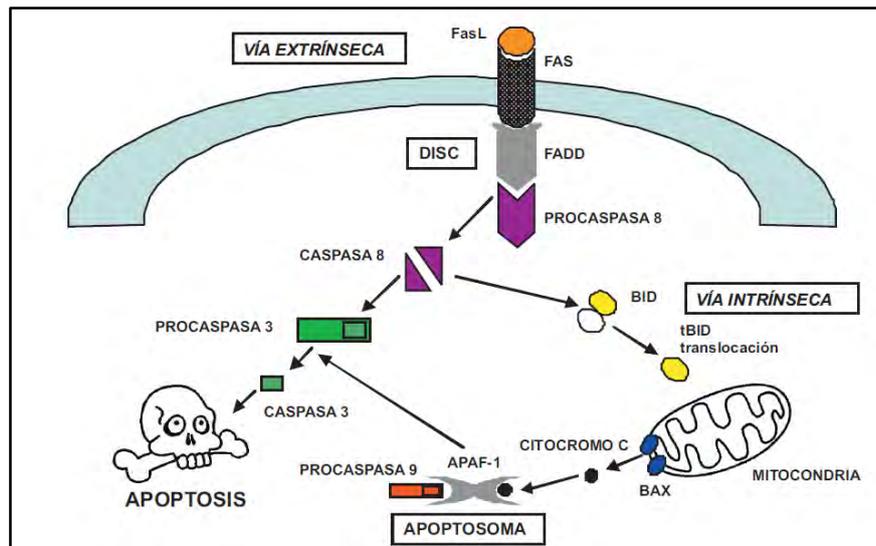


Fig.7: Vías extrínseca e intrínseca de señalización intracelular de apoptosis. La unión de Fas con su ligando FasL inician la vía extrínseca mientras que la activación de proteínas mitocondriales como Bax produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación del citocromo-c dando lugar al inicio de la vía intrínseca de señalización de apoptosis. La vía extrínseca y la vía intrínseca pueden converger en la activación la caspasa-3 por medio de la hidrólisis y translocación de Bid. Extraído de Meresman, 2011.

El proceso de apoptosis es un mecanismo complejo y regulado que se divide en dos etapas, la etapa de activación en la cual las vías de señalización activan la maquinaria de muerte celular y la etapa de destrucción, en la cual la maquinaria activada actúa sobre múltiples objetivos celulares. La destrucción celular ocurre mediante la activación de proteasas específicas denominadas caspasas que digieren proteínas intracelulares desencadenándose la muerte celular programada (Rodríguez *et al.*, 2011).

Las caspasas corresponden a una familia de 14 enzimas proteolíticas de las cuales la 2-3-6-7-8-9 y 10 están involucradas en la apoptosis (Fraser y Eva, 1996). A su vez, se subdividen en caspasas iniciadoras del proceso de muerte celular (caspasas 2-8-9-10) y otras efectoras o ejecutoras (caspasas 3-6-7). Una vez estimuladas las enzimas iniciadoras, éstas activan a las caspasas efectoras, que a su vez gatillan la acción de enzimas relacionadas con la degradación del ADN y de proteínas estructurales (Rodríguez *et al.*, 2011).

Caspasa-3 es un ejecutor, una caspasa que se ha implicado como una proteasa clave que escinde múltiples sustratos celulares, incluidos los componentes relacionados con la reparación y regulación del ADN, para llevar la célula a su desaparición. La activación de caspasa-3 también conduce a la escisión proteolítica de otras caspasas y sustratos de proteínas endógenas, y la medición de esta proteasa permite un mayor estudio de los mecanismos apoptóticos (Zhang *et al.*, 2005).

Las características morfológicas de la apoptosis son encogimiento celular, reorganización del núcleo celular, modificación del citoesqueleto y degradación del ADN en fragmentos nucleosomales, razón por lo cual se forman los llamados cuerpos apoptóticos. Estas estructuras son posteriormente fagocitadas por células vecinas o por macrófagos sin inducir una respuesta inflamatoria (en contraste con la necrosis) evitando así la permanencia de restos celulares en el espacio extracelular y la respuesta inmune que estos gatillarían. Existen signos ultraestructurales que diferencian la necrosis de la apoptosis, en esta última se observa condensación anular de la cromatina, deshidratación citoplasmática y plegamiento de la membrana, pero con conservación de organelas (Rodríguez *et al.*, 2011; Jerzak y Bischo, 2002).

3.6.2 Apoptosis placentaria

La placenta como otros órganos, normalmente presenta apoptosis, proceso fundamental para el mantenimiento y renovación de las estructuras. Para que este complejo proceso se realice con éxito, es necesario la estricta sincronización y modulación de las diferentes etapas de la apoptosis.

Se ha demostrado que la apoptosis juega un papel importante en la diferenciación de vellosidades trofoblásticas humanas y la formación de sincitios (Huppertz *et al.*, 2006). En porcinos, al comienzo de la gestación, la apoptosis se ha relacionado con la homeostasis de las vellosidades placentarias mediante la remodelación celular y hay un estudio que resalta las asociaciones dinámicas entre el tamaño fetal y el sexo con la apoptosis y la proliferación de la interfase materno fetal en cerdas (Stenhouse *et al.*, 2018; Sanchis *et al.*, 2015; Cristofolini *et al.*, 2013; Merkis *et al.*, 2010; Okano *et al.*, 2007).

Además, hay evidencias de la remodelación de las células placentarias por apoptosis en la placenta caprina a término y en animales con restricción alimentaria (Turiello *et al.*, 2019; Cristofolini *et al.*, 2012), como así también en placentas caninas y bovinas (Castro *et al.*, 2019; Kamemori *et al.*, 2011; Boos *et al.*, 2003). En equinos solo se conoce un estudio donde

se ha indicado que un aumento de la apoptosis en la interfase materno-fetal favorecería a la retención placentaria en yeguas de tiro pesado (Pázdziór *et al.*, 2012).

3.6.3 Proliferación celular placentaria

El mantenimiento de la integridad estructural y funcional del tejido placentario involucra un recambio celular altamente regulado, que depende de un delicado balance entre proliferación, diferenciación y pérdida celular (Benirschke y Kaufmann, 2000; Alsat *et al.*, 1995).

Durante la formación de la placenta existe una gran proliferación celular, que a su vez se acompaña también de la generación de una gran cantidad de desechos celulares que deben ser eliminados de manera muy eficiente por el proceso descrito anteriormente conocido como apoptosis (Rodríguez *et al.*, 2011).

La evidencia circunstancial en equinos, destaca la importancia del desarrollo tisular e histológico normal de la placenta para el crecimiento prenatal del feto y el resultado exitoso de la preñez. Se ha demostrado que el crecimiento tisular anormal puede conducir a la desnutrición placentaria. Bracher *et al.* (1996) demostraron que en yeguas subfértiles de edad avanzada que sufren cambios patológicos crónicos del endometrio, las vellosidades coriónicas y los microcotiledones están poco desarrollados, lo que resulta en inanición fetal. Allen *et al.* (2017) observaron que el desarrollo placentario anormal y retrasado es una de las causas de la alta tasa de aborto en yeguas que llevan embarazos extraespecíficos de burro en caballo, creados por transferencia de embriones. Las copas endometriales generalmente se forman de manera inadecuada y >70% de ellas fallan entre el día 80 y 100 de gestación, junto con una infiltración leucocitaria pronunciada en el estroma endometrial de la yegua receptora y evidencia de una placentación insuficiente (Allen, 1987 citado en Allen, 2017).

Muchas investigaciones se han llevado a cabo sobre los patrones de crecimiento placentario durante la preñez en especies con placenta invasiva, especialmente roedores (Hakan *et al.*, 2015; Weitlauf, 1994) y humanos (Goz de Unek *et al.*, 2014a y 2014b; Korgun *et al.*, 2006; Kaufmann y Burton, 1994). En animales domésticos se ha señalado que los procesos de remodelación celular son muy importantes para el desarrollo embrionario y placentario a lo largo de la gestación (Castro *et al.*, 2019; Turiello *et al.*, 2019; Stenhouse *et al.*, 2018; Sanchis *et al.*, 2017; Sanchis *et al.*, 2015; Cristofolini *et al.*, 2013; Cristofolini *et al.*, 2012; Pázdziór *et al.*, 2012).

El control del ciclo celular y la proliferación pueden ser estudiados en diferentes fases, que pueden estar relacionados con eventos o cambios moleculares. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) es una proteína accesoria de la polimerasa de ADN que se sintetiza durante el ciclo celular, y se correlaciona con el estado de proliferación de la célula (Marcello y Ward, 2013).

Se ha demostrado que PCNA posee un rango amplio de acción, ya que se une a una variedad de factores requeridos para la progresión del ciclo celular, replicación y reparación del ADN. PCNA está organizado como un anillo que envuelve al ADN y actúa como un cepo corredizo para la enzima ADN polimerasa que impide la separación entre dicha enzima y la molécula de ADN (Unek *et al.*, 2017; Naryzhny, 2008). Su máxima expresión se encuentra en las fases G1 tardía y S del ciclo celular (Takahashi y Caviness, 1993). Dado que la remodelación tisular depende del correcto funcionamiento del ciclo celular, PCNA es un buen marcador de proliferación celular placentaria ya que participa en los mecanismos de replicación y reparación del ADN y se ha descrito su utilización en numerosos estudios realizados en placentas de mamíferos y humanos (Castro *et al.*, 2019; Lopez Merlo *et al.*, 2017; Unek *et al.*, 2017, 2014a, 2014b; Sanchis *et al.*, 2015).

La apoptosis constituye un proceso esencial en el desarrollo placentario, y junto con la proliferación celular juegan un papel indispensable, siendo ambos procesos inversamente proporcionales: a medida que aumenta la proliferación, disminuye la apoptosis (Turiello *et al.*, 2019; Boss *et al.*, 2003).

La variación en estos procesos puede generar el desarrollo de alteraciones a nivel placentario, lo que a su vez puede generar patologías de la preñez como insuficiencia placentaria y placentitis que llevan a muerte embrionaria temprana, abortos, retrasos en el crecimiento fetal o nacimiento de potros inmaduros (dismaduros y/o prematuros). Se sabe también que un desequilibrio entre la apoptosis y la proliferación celular favorecerían la retención placentaria, pudiendo afectar a la fertilidad posterior en las yeguas que sufren esta condición, causando pérdidas económicas importantes en la producción equina (Pázdior *et al.*, 2012). En equinos no hay estudios que demuestren el comportamiento del proceso de remodelación celular placentaria a lo largo de la gestación. La caracterización del crecimiento placentario normal en los caballos es un requisito previo necesario para colaborar con los estudios sobre patologías placentarias en esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales

Los úteros grávidos se obtuvieron de yeguas mestizas destinadas a faena, provenientes de distintos frigoríficos de la región de Río Cuarto. Estas yeguas fueron consideradas libres de enfermedad de acuerdo a la examinación clínica y postmortem realizada. Previamente a la faena, en su correspondiente corral de espera se procedió a caravanear las yeguas de acuerdo a su biotipo racial, marcando solo yeguas mestizas; luego dichas caravanas fueron adheridas a cada útero a disecar. Los tercios de preñez se determinaron como: primer tercio (0 al 120 día de gestación), segundo tercio (120 al 240 día de gestación) y tercer tercio (240 días de gestación al parto).

4.2 Procesamiento de los tractos reproductivos y obtención de las placentas

Los úteros del primer, segundo y tercer tercio de la preñez (n=5 de cada edad gestacional) se perfundieron 20 minutos post faena para realizar la técnica de microscopía óptica e inmuohistoquímicas. Por otra parte, se obtuvieron 3 úteros (uno de cada tercio de preñez) para realizar las técnicas de microscopía óptica de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión.

La técnica de perfusión se realizó cateterizando las dos arterias uterinas y ováricas con agujas descartables calibre 21G x 11/2" y 25G x 5/8" respectivamente, de punta roma (para no lesionar la pared de los vasos sanguíneos) y se efectuó la fijación de las mismas (para conservarlas inmóviles dentro del lumen de las arterias) con la ayuda de pinzas hemostáticas. Posteriormente, una solución de formol salino bufferado (SFB - pH 7,5) fue perfundida bajo presión manual hacia el útero a través de las tubuladuras acopladas a una jeringa de 60 mL en una punta y a los vasos sanguíneos en la otra. Este procedimiento se realizó hasta observar que por las venas homónimas brotara la solución fijadora totalmente clarificada. A continuación, se ligaron los extremos arteriales y venosos para evitar la salida del formol hacia el exterior. En la Fig.8 se observan imágenes fotográficas de la técnica de perfusión llevada a cabo en las arterias uterinas. Los tractos se mantuvieron en reposo durante 1 h para que se llevara a cabo la acción fijadora del formaldehído. Luego de ese tiempo, dichos tractos se abrieron cuidadosamente, en forma longitudinal, con una incisión por el borde antimesometrial. Se extrajeron la placenta y el feto del cuerno gestante y se procedió al pesaje de la placenta y a la medición, sexado y pesaje del feto. Se determinó la edad gestacional aproximada a partir de tablas que utilizan parámetros biométricos fetales, placentarios y endometriales.

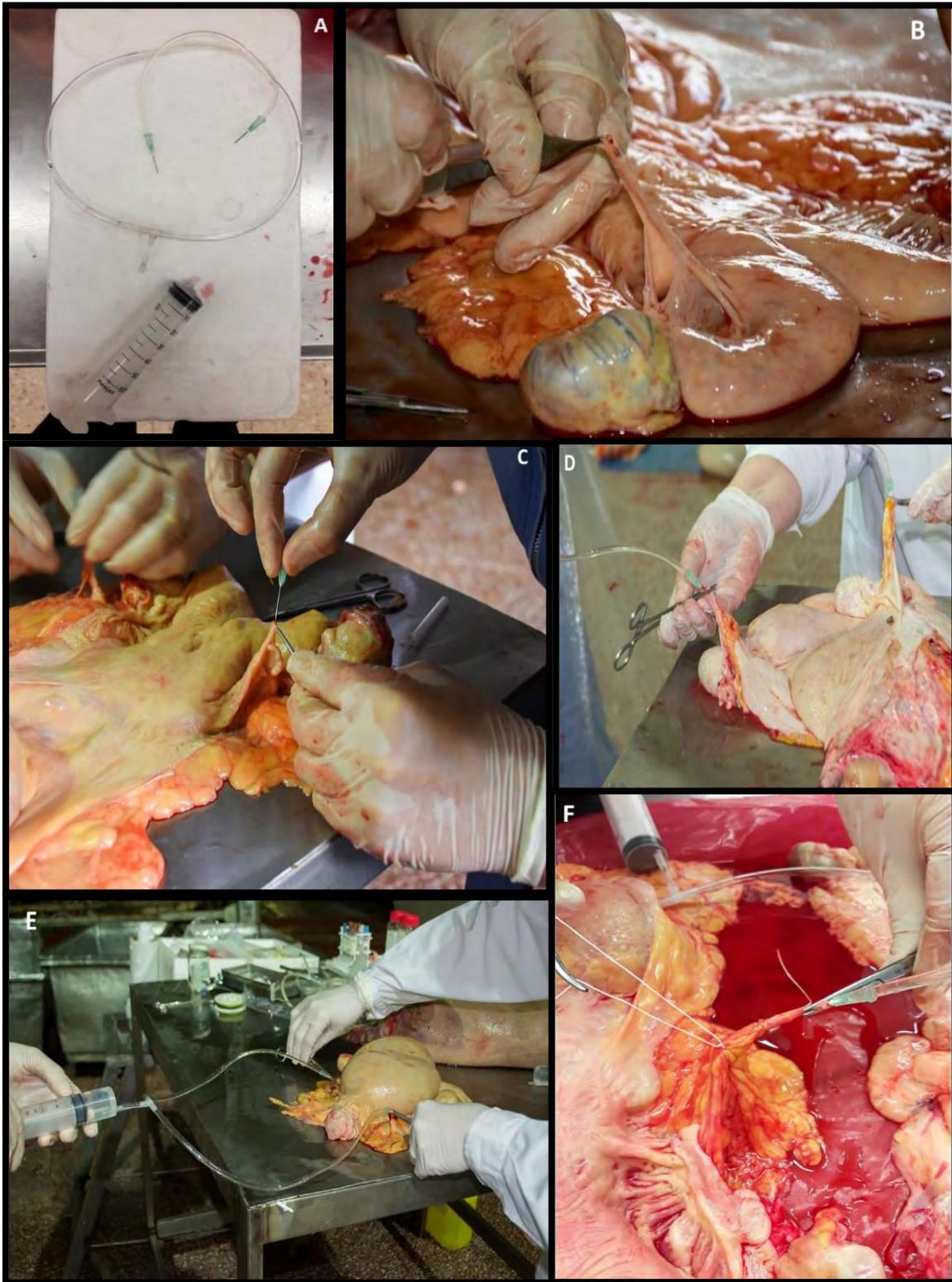


Fig.8: Fotografías que representan la técnica de perfusión realizada sobre las arterias uterinas. **A:** vía utilizada para realizar la perfusión; **B:** localización de las arterias; **C:** canalización de la arteria uterina con aguja descartable; **D:** fijación de la arteria uterina mediante pinza hemostática; **E:** repleción de las arterias con SFB; **F:** ligadura de los vasos sanguíneos.

4.3 Análisis de la estructura placentaria

4.3.1 Técnica histológica convencional para microscopía óptica

Se obtuvieron de manera aleatoria, seis porciones de tejido de interfase materno fetal (1cm x 1cm de diámetro) y cuatro segmentos de útero conteniendo una copa endometrial en cada uno (1cm x 1cm de diámetro). Estas muestras se fijaron en SFB (pH 7,5) y se deshidrataron en baterías de alcoholes de graduación creciente para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes histológicos seriados de $\pm 4 \mu\text{m}$ con un micrótomo de deslizamiento (Reichert_Jung.Mod.Hn 40, Alemania) y se montaron 3-4 cortes sobre cada portaobjeto. Previo al montaje, los cortes fueron pasados por un recipiente con agua destilada a 45 °C durante 10 minutos, para evitar plegamientos. Los portaobjetos con los cortes se colocaron 8 h en estufa a 37 °C por un lapso de 15 días consecutivos para lograr el secado completo de los mismos. Posteriormente, los tejidos se desparafinaron y se rehidrataron mediante una batería de alcoholes de graduación decreciente con el siguiente protocolo:

- 1 pasaje en xilol 100° de 10 min.
- 1 pasaje en xilol (50 %) y alcohol 100° (50 %) de 10 min.
- 2 pasajes en alcohol 100° de 10 min c/u.
- 1 pasaje en alcohol 96° de 10 min.
- 1 pasaje en alcohol 70° de 5 min.
- 2 pasajes en agua destilada de 10 min c/u.
- 2 pasajes en solución salina tamponada (PBS, ver anexo 1) de 10 min c/u.

Una parte de los cortes fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina (H/E) y Tricrómica de Masson (TM) (ver anexo 1) para el reconocimiento de estructuras tisulares. Los cortes restantes fueron reservados para realizar la detección de VEGF, Ang-2, sus receptores y la eCG mediante técnicas de inmunohistoquímica.

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 PBS (0,1 M, pH 7,4) (ver anexo 1) durante 3 h a 4 °C. Luego se lavaron dos veces con PBS y se re-fijaron con tetróxido de osmio al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron

dos veces en PBS y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona. Se procedió luego a la pre-inclusión en resina epoxi EMBED 812 1:1 en acetona 100 % (ver anexo 1) durante toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente a una inclusión en EMBED 812 a 60 °C, durante 24 h. 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 cuales fueron colocados sobre portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina sobre una platina termostaticada, para permitir la entrada del colorante al tejido incluido en la resina.

Previo a la técnica de tinción realizada, la deshidratación y el montaje de los portaobjetos se llevó a cabo de la siguiente manera:

- 1 pasaje en alcohol 70 %, 5 min.
- 1 pasaje en alcohol de 96 %, 5 min.
- 2 pasajes en alcohol de 100 %, 5 min c/u.
- 1 pasaje en xilol-alcohol 100 % (ana/ana) de 5 min
- 1 pasaje de xilol 100 %, 5 min c/u.
- Montaje con medio Entellan® MERCK (Alemania) y colocación de cubreobjetos.

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

4.4 Análisis de Ultraestructura placentaria

4.4.1 Técnica convencional para Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras de tejido placentario se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en solución tampón S-collidine (0,2M, pH 7,4) durante 3 h a 4 °C. Luego se lavaron dos veces con solución tampón S-collidine. Se refijaron en tetróxido de osmio al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron dos veces en solución tampón S-collidine y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (1 pasaje en acetona 30 %, 50 %, 70 % y 90 % durante 15 min cada uno, y 3 pasajes en acetona 100 % durante 15 min cada uno). La preinclusión se realizó en resina epoxi EMBED 812 1:1 en acetona 100 %, durante toda la noche a temperatura ambiente. La inclusión se realizó con EMBED 812 a 56 °C, durante 48 h. A través

de un ultramicrotomo manual (Sorvall MT-1A, DuPont), utilizando cuchillas de vidrio, se obtuvieron cortes semifinos ($\pm 0.25 \mu\text{m}$) los que fueron teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio óptico para la elección de la zona placentaria de interés. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos (20-60 nm) con cuchilla de diamante (Pelco®), los que se colocaron sobre grillas de cobre de 250 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo durante 30 min y con citrato de plomo durante 8 min. La observación de la ultraestructura del tejido placentario se realizó a través de un microscopio electrónico de transmisión Elmiskop 101 (Siemens) y la adquisición de imágenes mediante un microscopio electrónico de transmisión Jem 1200 Ex II (Jeol, Japón). Todos los reactivos utilizados fueron de Electron Microscopy Science.

4.5 Técnicas inmunohistoquímicas

Para la realización de estas técnicas se utilizaron 15 cortes histológicos del primer, segundo y tercer tercio de preñez, 5 muestras de interfase materno-fetal de cada tercio gestacional, adquiridos por medio de la técnica de histología convencional para microscopía óptica descrita anteriormente.

Los tejidos fueron primeramente desparafinados mediante colocación en estufa a 56°C durante 55 min y luego se procedió al diafanizado mediante 2 pasajes por xilol de 15 min cada uno. Posteriormente, se rehidrataron en baños sucesivos de alcoholes de graduación decreciente por 5 min cada uno de la siguiente manera: se comenzó con dos pasajes por alcohol 100 vol, luego los portaobjetos conteniendo los cortes de tejido placentario fueron tratados con 3 % (v/v) de peróxido de hidrógeno inmerso en metanol por 30 min, se prosiguió con la rehidratación a partir de dos pasajes por alcohol 96 vol y luego un último pasaje en alcohol 70 vol, finalizado este proceso se lavaron en agua destilada por 2 min y luego en solución tampón fosfato salino (PBS pH 7,2) por 15 min. Posteriormente se aplicó el protocolo que se detalla a continuación para cada molécula en particular.

4.5.1 Determinación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF):

Para la determinación de VEGF se realizó una técnica inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo específico VEGF (A-20: sc-152) de Santa Cruz Biotechnology Inc., USA. La técnica se realizó a temperatura ambiente, luego de la desparafinación y rehidratación, los cortes histológicos fueron incubados con suero de cabra (1/100: 50 μL de suero puro + 5 mL de PBS) durante 30 min. Luego fueron incubados con el primer anticuerpo anti-VEGF

dilución 1:200 durante toda la noche refrigerado entre 4-8 °C en cámara húmeda. Posteriormente fueron lavados con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) e incubados durante 1 h en cámara húmeda, a temperatura ambiente, con el segundo anticuerpo biotilado (Dako EnVision® Anti-ratón USA). Seguidamente, cada portaobjetos fue lavado con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) y tratado con el complejo streptavidina-peroxidasa por 20 min (Dako EnVision® System- HRP Labelled Polymer Anti-ratón USA). Luego del período de incubación, fueron lavados con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) y se adicionó la solución cromógena 3,3'-diaminobencidina (DAB, Vector® USA) durante 15 min o hasta la aparición de color marrón. Posteriormente, las muestras fueron contrastadas con hematoxilina activada de Biopur por 8 seg, lavadas con agua corriente por 5 min, deshidratadas en batería de alcoholes de graduación creciente y montadas con Entellan (Merck, Alemania), para ser observados en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania).

4.5.2 Determinación de la angiopoyetina 2 (Ang-2):

Para la determinación de la Ang-2 se realizó la técnica inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo específico Ang-2 (H-70: sc-20718) de Santa Cruz Biotechnology Inc., USA. La técnica se realizó a temperatura ambiente, luego de desparafinar y rehidratar los cortes histológicos se realizó la recuperación antigénica colocando los portaobjetos en coplin de plástico conteniendo buffer citrato 10 mM (pH 6). Los coplin fueron llevados al microondas, a máxima potencia (1000 watts), 2 veces de 3 min cada una, se repuso el buffer citrato en los casos donde se evaporó el mismo y se dejaron enfriar por 20 min. Se enjuagaron con PBS (pH 7,2) por 10 min. Los anticuerpos inespecíficos fueron bloqueados con suero de cabra (1/100: 50 µL de suero puro + 5 mL de PBS) durante 1 h. Luego se realizó la incubación con el primer anticuerpo anti-ANG2 dilución: 1/10 durante toda la noche refrigerado entre 4-8 °C en cámara húmeda. Posteriormente los portaobjetos fueron lavados con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) e incubados durante 1 h en cámara húmeda, a temperatura ambiente, con el segundo anticuerpo biotilado (Dako EnVision® Anti-ratón USA). Seguidamente, cada portaobjetos fue lavado con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) y tratado con el complejo streptavidina-peroxidasa por 20 min (Dako EnVision® System- HRP Labelled Polymer Anti-ratón USA). Luego del período de incubación, fueron lavados con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) y se adicionó la solución cromógena 3,3'-diaminobencidina (DAB, Vector® USA) durante 15 min o hasta la aparición de color marrón. Posteriormente, las muestras fueron contrastadas con hematoxilina activada de

Biopur por 8 seg, lavadas con agua corriente por 5min, deshidratadas en batería de alcoholes de graduación creciente y montadas con Entellan (Merck, Alemania), para ser observados en un microscopio óptico Axiophot Carl Zeiss, Alemania.

La adquisición de las imágenes se efectuó mediante una cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss, Alemania) adosada al microscopio óptico. A fines de obtener los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario correspondiente por una solución de PBS y los controles positivos consistieron en tejido adquirido de un carcinoma de células escamosas de parpado equino.

4.5.3 Determinación de los receptores Flt-1, Flk-1 y Tie-2

Para la determinación de Flt-1, Flk-1 y Tie-2 se realizaron técnicas inmunohistoquímicas utilizando los anticuerpos monoclonales de ratón: Flt-1 (D-2 Cat #sc-271789), Flk-1 (D-8 Cat # sc-393163) y Tie-2 (3A5 Cat # sc-293414), todos de Santa Cruz Biotechnology Inc., USA. La técnica se realizó a temperatura ambiente, luego de la desparafinación y rehidratación se realizó la recuperación antigénica colocando los portaobjetos en coplin de vidrio conteniendo buffer citrato 10 mM (pH 6). Los coplin fueron llevados al microondas, a máxima potencia (2540 watts) hasta observar la aparición de burbujas, luego se los dejó por 30 min a mínima potencia (590 watts), se repuso la solución tamponada de citrato en los casos donde se evaporó el mismo y se dejaron enfriar lentamente durante 20 min. Se enjuagaron con PBS refrigerado (pH 7,2) por 10 min. Los anticuerpos inespecíficos fueron bloqueados con albumina sérica bovina (BSA) al 3 % durante 30 min. Luego se realizó la incubación durante toda la noche en cámara húmeda, entre 4-8 °C, con los anticuerpos primarios: anti-Flk-1 dilución de trabajo 1/100, anti-Flt-1 dilución de trabajo 1/10 y anti-Tie-2 dilución de trabajo 1/10. Posteriormente los portaobjetos fueron lavados con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) e incubados durante 2 h en cámara húmeda, a temperatura ambiente, con el segundo anticuerpo (Mouse-on-Canine HRP-Polymer, Biocare Medical® USA) marcado con HRP. Luego del período de incubación, fueron lavados con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) y se adicionó la solución cromógena 3,3'-diaminobencidina (DAB, Vector® USA) durante 15 min o hasta la aparición de color marrón. Posteriormente, las muestras fueron contrastadas con hematoxilina de Mayer por 5 min, deshidratadas en batería de alcoholes de graduación creciente y montadas con Entellan (Merck, Alemania), para ser observados en un microscopio óptico Axiophot Carl Zeiss, Alemania.

En todas las inmunohistoquímicas realizadas la adquisición de las imágenes se efectuó mediante una cámara digital Olympus DP72 (Olympus Microscopy®, Europa) adosada al microscopio óptico. A los fines de obtener los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario correspondiente por una solución de PBS y los controles positivos consistieron en tejido adquirido de un carcinoma de células escamosas de parpado equino.

4.5.4 Determinación de la hormona gonadotrofina coriónica equina (eCG)

Para la determinación de la eCG se realizó la técnica inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo específico Anti-Luteinizing Hormone (abcam® 01A01- United Kingdom) cedido cordialmente por la PhD. Sandra Wilsher y el PhD. W.R (Twink) Allen (Paul Mellon Laboratory, Newmarket, United Kingdom). La técnica se realizó a temperatura ambiente, luego de desparafinar y rehidratar los cortes histológicos. Se realizó la recuperación antigénica colocando los portaobjetos en coplin de plástico conteniendo buffer citrato 10 mM (pH 6). Los coplin fueron llevados al microondas, a máxima potencia (1000 watts), 2 veces de 3 min cada una, se repuso el buffer citrato en los casos donde se evaporó el mismo y se dejaron enfriar por 20 min. Se enjuagaron con PBS (pH 7,2) por 10 min. Posteriormente, los portaobjetos conteniendo los cortes de tejido placentario fueron tratados con 0,3% (v/v) de peróxido de hidrógeno (100 volúmenes) por 5 min y lavados con PBS. Los anticuerpos inespecíficos fueron bloqueados con suero de cabra (1/100: 50 µL de suero puro + 5mL de PBS) durante 1 h. Luego se realizó la incubación con el primer anticuerpo anti-LH dilución de trabajo 1/200 durante toda la noche refrigerado entre 4-8 °C en cámara húmeda. Posteriormente los portaobjetos fueron lavados con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) e incubados durante 1 h en cámara húmeda, a temperatura ambiente, con el segundo anticuerpo biotilado (Dako EnVision® Anti-ratón USA). Seguidamente, cada portaobjetos fue lavado con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) y tratado con el complejo streptavidina-peroxidasa por 20 min (Dako EnVision® System- HRP Labelled Polymer Anti-ratón USA). Luego del período de incubación, fueron lavados con PBS (3 lavados de 5 min cada uno) y se adicionó la solución cromógena 3,3'-diaminobencidina (DAB, Vector® USA) durante 15 min o hasta la aparición de color marrón. Posteriormente, las muestras fueron contrastadas con hematoxilina de Mayer por 50 seg, lavadas con solución de hidróxido de amonio al 0,08 % por 30 seg, deshidratadas en batería de alcoholes de graduación creciente y montadas 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.

4.5.5 Determinación de Caspasa-3

Para la detección de apoptosis placentaria, se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3 (Cas-3, Sigma-Aldrich®, Cat #AB3623). Se montaron varias secciones histológicas en portaobjetos con carga positiva, luego de la desparafinación y rehidratación, se realizó la recuperación antigénica colocando los portaobjetos en coplin de vidrio conteniendo buffer citrato 10 mM (pH 6). Los coplin fueron llevados al microondas, a máxima potencia (2540 watts) hasta observar la aparición de burbujas, luego se los dejó por 30min a baja potencia (590 watts), se repuso el buffer citrato en los casos donde se evaporó el mismo y se dejaron enfriar lentamente durante 20 min. Se enjuagaron con PBS refrigerado (pH 7,2) por 10 min. Para el bloqueo de las uniones no específicas se utilizó BSA al 1 % durante 30 min. Más tarde, se lavaron nuevamente con PBS. Luego, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario anti-Cas-3 (dilución 1:800), en una cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C. Después de lavarlos con PBS, se realizó la incubación con un grupo de anticuerpos secundarios biotinilados (LSBA2 System-HRP, DakoCytomation®, Cat #K0675) en una cámara húmeda durante 20min, a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS, las muestras se trataron con el complejo de streptavidina-peroxidasa durante 30 min (LSBA, BioGenex®, San Ramón, Cat #94683, EE. UU.). Luego, se lavaron con PBS y se trataron con DAB (DakoCytomation®, Carpintería, EE. UU.). Posteriormente, las muestras fueron contrastadas con hematoxilina de Mayer por 5 min, deshidratadas en batería de alcoholes de graduación creciente y montadas con Entellan (Merck, Alemania), para ser observados en un microscopio óptico Axiophot Carl Zeiss, Alemania. Como controles negativos, se utilizaron secciones de interfase materno-fetal equina reemplazando el anticuerpo primario con PBS. Como controles positivos para los anticuerpos primarios, se utilizaron secciones de carcinoma de células escamosas de parpado equino, incubadas con Cas-3.

En todas las inmunohistoquímicas se efectuó la adquisición de las imágenes mediante una cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®, Alemania) adosada al microscopio óptico. Debido a que la marcación de Cas-3 es citoplasmática y zonal, el análisis de la inmunoreactividad fue semicuantitativo.

Para cada tejido se calculó un valor de High Score (HSCORE) 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 (Sanchis *et al.*, 2015; Cristofolini *et al.*, 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. Se realizó un análisis de ANOVA comparando las medias de los diferentes períodos gestacionales usando el software InfoStat versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).

4.5.6 Semicuantificación de la inmunomarcación

La inmunoreactividad se evaluó examinando 10 campos representativos al azar del tejido placentario por animal en 400x y se determinó cualitativamente como: débil (+), moderado (++) e intenso (+++), según Özgen *et al.* (2002) en Özgen *et al.* (2016).

4.5.7 Determinación del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)

Para la detección de proliferación celular se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, Sigma-Aldrich®, Cat #SAB2701819). Se montaron varias secciones histológicas en portaobjetos con carga positiva, luego de la desparafinación y rehidratación, se realizó la recuperación del antígeno con solución tamponada de citrato 10 mM (pH 6) en microondas durante 3 min. Una vez enfriadas, las secciones se lavaron con PBS a lo largo de 10min. Para el bloqueo de las uniones no específicas se utilizó BSA al 1 % durante 30 min. Más tarde, se lavaron nuevamente con PBS. Luego, las secciones se incubaron el anticuerpo anti-PCNA (dilución 1:1000) en una cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C. Después de lavarlos con PBS, se realizó la incubación con un grupo de anticuerpos secundarios biotinilados (LSBA2 System-HRP, DakoCytomation®, Cat #K0675) en una cámara húmeda durante 20 min, a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS, las muestras se trataron con el complejo de streptavidina-peroxidasa durante 30 min (LSBA, BioGenex®, San Ramón, Cat #94683, EE. UU.). Luego, se lavaron con PBS y se trataron con diaminobencidina (DakoCytomation®, Carpintería, EE. UU.). Después de un lavado final con PBS, los portaobjetos se contrañeron, deshidrataron y sellaron de la misma manera que en el estudio histoquímico de los receptores angiogénicos, descritos anteriormente. Como controles negativos, se utilizaron secciones de interfase materno-fetal equina reemplazando el anticuerpo primario con PBS. Como controles positivos se utilizaron secciones de carcinoma de células escamosas de parpado equino, incubadas con PCNA.

En todas las inmunohistoquímicas se efectuó la adquisición de las imágenes mediante una cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®, Alemania) adosada al microscopio óptico. Se analizaron diez (10) campos al azar por período gestacional (2 secciones por portaobjetos y

5 campos por sección) del epitelio trofoblástico, células de la cintura coriónica y de las copas endometriales en el área fetal y el epitelio luminal y las glándulas endometriales en la superficie materna, determinándose en cada campo el porcentaje de células marcadas para PCNA sobre el total de células evaluadas (IPr %).

Las células positivas para PCNA muestran una marcación nuclear marrón. Para calcular el IPr %, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IPr} = \frac{\text{células positivas a PCNA} \times 100}{\text{células totales}}$$

Por cada tipo celular y por cada tercio gestacional, se contaron y analizaron un mínimo de 1500 células directo del microscopio óptico con un aumento de 400x, las células especializadas de las copas endometriales fueron contadas en 20 campos al azar y con un aumento de 1000x (mínimo 250 células). Este protocolo se adaptó del descrito por Woudwyk *et al.* (2015).

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente a través del software InfoStat versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020). Para comparar y determinar si existen diferencias significativas de los %IPr entre los trimestres, se realizó un ANOVA. En caso de observarse diferencias significativas, las medias se compararon usando un test *a posteriori* DGC para todas las evaluaciones de tejidos. Para todos los análisis realizados, se evaluó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas. Se consideró una diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$. Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE).

4.6 Determinación de las variables morfométricas (área, perímetro y número) de los vasos sanguíneos

Para la determinación de las mediciones morfométricas en las muestras placentarias de yeguas mestizas, se utilizaron cortes histológicos de los diferentes tercios gestacionales inmunomarcados con la lectina *Pisum sativum* (PSA) L-1050 a través de la técnica lectinhistoquímica.

Se adquirieron imágenes a un aumento de 1000x con la cámara Canon Powershot G6 7.1 megapixels (Canon, Japón) adosada al microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes se procesaron con el software AxioVision (AxioVs40 V 4.8.2.0., Carl Zeiss,

Göttingen, Alemania) con el fin de obtener el número, área y perímetro individual de los capilares sanguíneos de la interfase materno-fetal.

El análisis morfométrico fue realizado por un solo operador, se analizaron dos secciones de tejido por portaobjetos de cada animal/placenta, seleccionando 5 microcotiledones y 7 campos de cada microcotiledón al azar (aproximadamente 500 campos en total). El área y perímetro vascular de cada vaso sanguíneo fueron medidos minuciosamente utilizando una tableta gráfica Wacom Intous S (Wacom Technology, USA).

Los datos de las muestras que se incluyeron para los análisis estadísticos posteriores fueron obtenidos mediante un análisis previo aportados por el diagrama de caja o “box plot” mediante el software estadístico InfoStat versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020). Este análisis se realizó para marcar el desvío de los datos con respecto a toda la muestra. Los datos expresados por el análisis que tenían un desvío mayor fueron los que no se tuvieron en cuenta para los análisis estadísticos posteriores.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el test paramétrico ANOVA para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos, utilizando el software estadístico InfoStat. En caso de observarse diferencias significativas, las medias se compararon usando un test *a posteriori* DGC. Para todos los análisis realizados, se evaluó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas. Se consideró una diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$. Los datos se expresaron como media \pm error estándar (EE).

RESULTADOS

5.1 Procesamiento de los tractos reproductivos

Los tractos reproductivos de yeguas mestizas se perfundieron 20 min post-faena como fue descrito en la sección materiales y métodos. Se calculó el peso de la placenta y se determinaron la longitud céfalo-caudal (LCC), el sexo y el peso del feto. La edad gestacional aproximada (Tabla I) fue determinada a partir de tablas que utilizan parámetros biométricos fetales y maternos (Ginther, 1992).

Tabla I: Edad gestacional de cada placenta determinada a partir de parámetros biométricos fetales, placentarios y endometriales

Parámetros Placenta	Edad gestacional aproximada (días)	Peso (Kg) de los tractos reproductivos	Peso (kg) de los fetos	Características placentarias y endometriales	Características fetales	Sexo	Longitud CC (cm)
PI 01	± 25-30	ND	ND	Vesícula de ± 9cm		ND	0,95
PI 02	± 39-42	Peso vesícula sin líquido alantoideo: 0,00938	ND	Vesícula de 9cm, copas endometriales blancas muy pálidas rodeando al feto.		ND	2
PI 03	± 55-65	Placenta no fijada: 0,150	Feto: 0,02058 (con cordón umbilical y saco amniótico sin líquido)	Copas endometriales amarillento fuerte rodeando al feto, longitud del cuerno gestante: 25 cm	Feto alojado en su saco amniótico con líquido amniótico, rodeado por la membrana alanto-coriónica	macho	6,9
PI 04	± 55-65	Placenta no fijada: 0,165	Feto: 0,01858 (con cordón umbilical y saco amniótico sin líquido)	Copas endometriales amarillento fuerte rodeando al feto, longitud del cuerno gestante: 26 cm	Feto alojado en su saco amniótico con líquido amniótico, rodeado por la membrana alanto-coriónica.	hembra	7
PI 05	± 100-120	Placenta no fijada: 0,240	Feto: 0,540	Copas endometriales sobreelevadas amarillentas pálidas rodeando al feto	Sin pelo, glándulas mamarias como botones	hembra	24

PI 06	± 100-120	UP: 1,900	Feto: 0,650	Copas endometriales sobreelevadas amarillentas pálidas rodeando al feto	Orejas triangulares para adelante, sin pelo, botones alrededor del pene, ojos saltones, cráneo prominente, longitud del fémur: 5 cm	macho	24
PI 07	± 120-150	Placenta: 1,340	Feto: 2,340	Ausencia de copas endometriales	pelos finos en órbita y morro no tiene pelos en cola	macho	34
PI 08	± 150-180	UP: 4,250	Feto: 3,850	Ausencia de copas endometriales	pelos en órbita, pestañas, mentón fino y en morro, testículo descendido del fémur: 11cm	macho	42
PI 09	±180-210	Placenta: 1,460	Feto: 4,060	Ausencia de copas endometriales	Pelo fino en morro crin presencia de pestañas	hembra	46
PI 10	± 210-240	UP: 6,300	Feto: 13	Ausencia de copas endometriales	pelo en dorso cola, almohadilla fina algo separada y blanda	macho	55
PI 11	± 240	UP: 9	Feto: 11	Ausencia de copas endometriales , membranas alantoamnióticas lisas y blanquecinas membranas alantocoriónicas aterciopeladas y rojas	ojos saltones, orejas triangulares hacia adelante, cráneo prominente, pelos finos en cola, crin, mentón, orejas y en morro	hembra	64
PI 12	± 240	Placenta: 4,550	Feto: 12,450	Ausencia de copas endometriales , membranas alantoamnióticas lisas y blanquecinas membranas	ojos saltones, cráneo prominente, orejas triangulares hacia adelante, pelos finos en	hembra	64

				alantocoriónicas aterciopeladas y rojas	cola, crin, mentón, orejas y morro, longitud del fémur: 17 cm		
PI 13	± 240-270	UP:8	Feto: 19	Ausencia de copas endometriales, membranas alantoamnióticas lisas y blanquecinas membranas alantocoriónicas aterciopeladas y rojas	Pelaje fino en dorso y cola, almohadilla plantar blanda	hembra	70
PI 14	± 270	UP:9	Feto: 27	Ausencia de copas endometriales, membranas alantoamnióticas lisas y blanquecinas membranas alantocoriónicas aterciopeladas y rojas	Pelaje fino en cabeza y cuello	hembra	90
PI 15	± 300	UP: 9	Feto: 27	Ausencia de copas endometriales, membranas alantoamnióticas lisas y blanquecinas membranas alantocoriónicas aterciopeladas y rojas	Pelaje fino en todo el cuerpo y punta de cola, presencia de dientes de leche	hembra	105

Referencias: UP=Útero y placenta. ND=No definido. CC=céfalo-caudal.

5.2 Estudio macroscópico de los tractos reproductivos y las placentas

En los tractos reproductivos de yeguas gestantes se reconocieron los ovarios, los cuernos, el cuerpo y el cérvix uterino (Fig.9 y 10). Al realizarse el abordaje por el borde antimesometrial del útero se notaron diferentes características acordes a la edad gestacional. En el periodo embrionario (día 39-42) se observaron vesículas embrionarias de pequeño tamaño, membranas alantocoriónicas notablemente vascularizadas y sacos vitelinos con el seno terminal circular en el extremo anembrionario (Fig.11), también hubo presencia de copas

endometriales en desarrollo temprano que protruían en la superficie del endometrio y eran de color blanquecinas con diferentes tamaños y formas irregulares. Al inicio del periodo fetal (hasta el día 120) se observaron fetos alojados en su saco amniótico con el aspecto fenotípico característico de la especie, las membranas alantocoriónicas evidenciaron amplia vascularización y las copas endometriales estaban totalmente desarrolladas sobre la superficie del útero, estas tenían aspecto de ulcera y una coloración amarillenta (Fig.12 y 13). En el periodo fetal tardío (hasta el momento del parto) se visualizaron fetos de gran tamaño, membranas alantoamnióticas de aspecto liso y color blanquecino con vasos sanguíneos prominentes y membranas alantocoriónicas de aspecto aterciopelado y color rojizo debido a su notable vascularización (Fig.14).

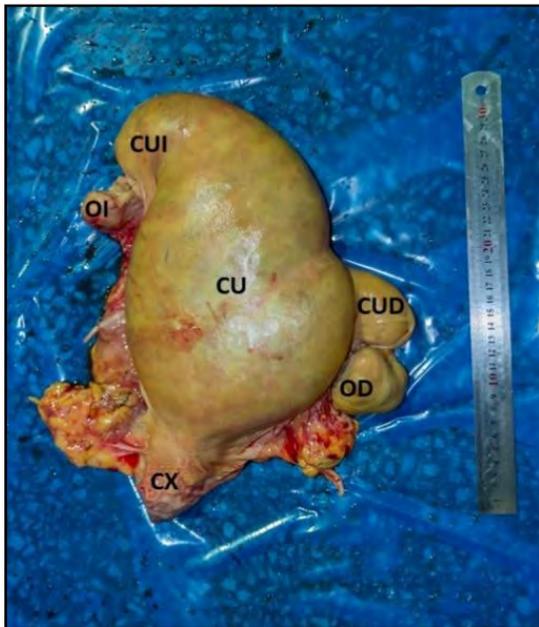


Fig.9: Tracto reproductivo de una yegua de \pm 55-60 días de preñez. Se observa el concepto ya ubicado dentro del cuerno gestante. **OD:** Ovario derecho **OI:** Ovario izquierdo; **CUI:** Cuerno uterino izquierdo **CUD:** Cuerno uterino derecho; **CX:** cérvix; **CU:** cuerpo uterino.

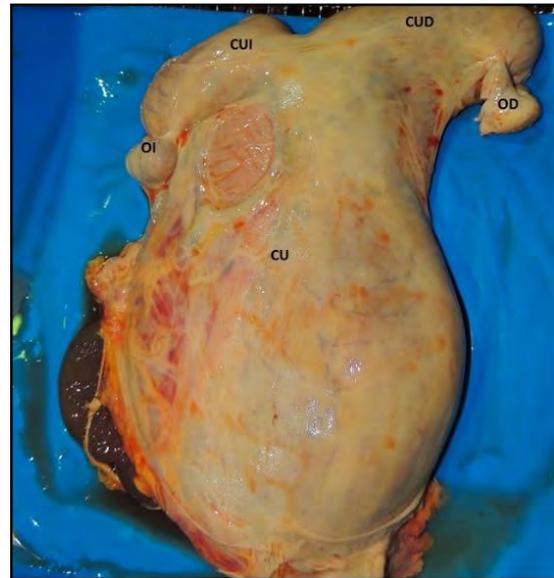


Fig.10: Útero gestante de yegua de \pm 100-120 días de preñez. Se observa el concepto ya ubicado dentro del cuerpo uterino. **OD:** Ovario derecho **OI:** Ovario izquierdo; **CUI:** Cuerno uterino izquierdo **CUD:** Cuerno uterino derecho; **CU:** cuerpo uterino.

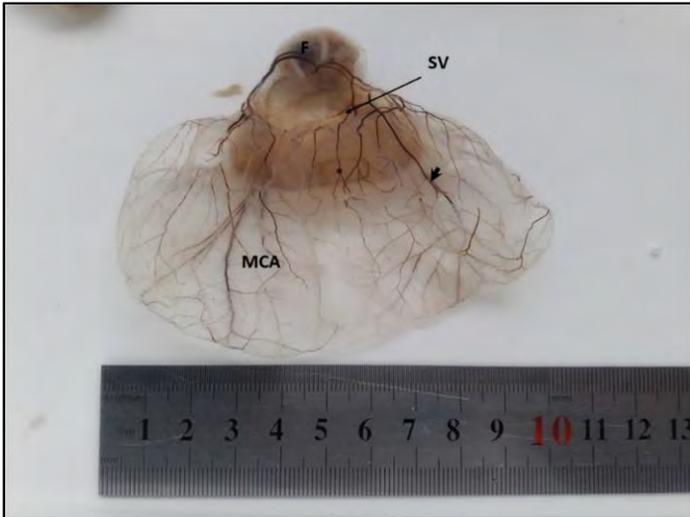


Fig.11: Vesícula embrionaria de \pm 39-42 días de gestación. Se observa la membrana alantocoriónica ampliamente vascularizada (punta de flecha). Nótese el anillo del seno terminal circular en el SV (asterisco). **F:** feto; **MCA:** membrana alantocoriónica; **SV:** saco vitelino.



Fig.12: *Conceptus* de \pm 55-65 días de gestación con una longitud céfalo-caudal de 7cm, el mismo se encuentra alojado en su saco amniótico, en contacto directo con el líquido amniótico, rodeado por la membrana alantocoriónica ampliamente vascularizada, se observaron las copas endometriales rodeando al feto. **MCA:** membrana alantocoriónica; **SA:** saco amniótico; **LA:** líquido amniótico; **CE:** copas endometriales; **ED:** endometrio.

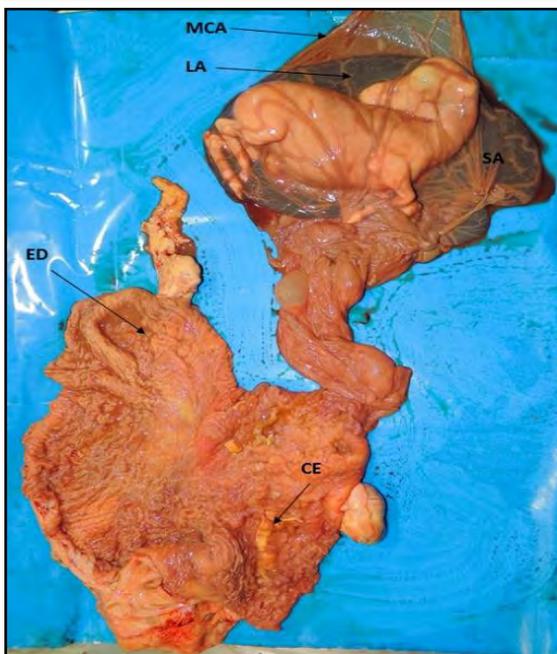


Fig.13: *Conceptus* de \pm 100-120 días de gestación con una longitud céfalo-caudal de 25cm. **MCA:** membrana alantocoriónica; **SA:** saco amniótico; **LA:** líquido amniótico; **CE:** copas endometriales; **ED:** endometrio.

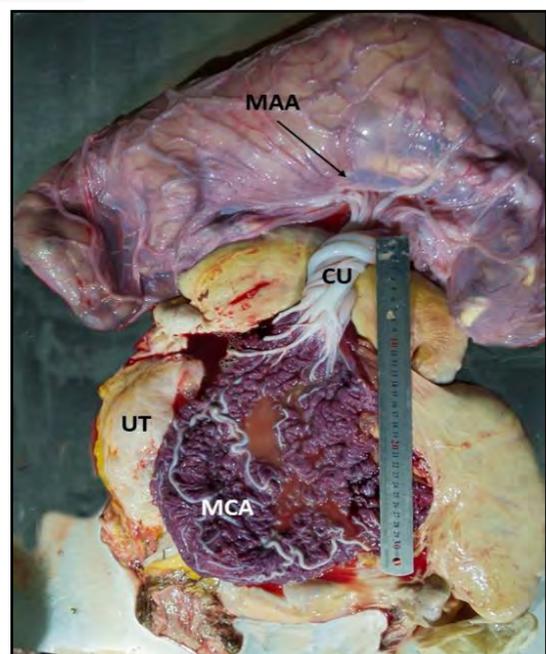


Fig.14: *Conceptus* de \pm 270 días de gestación con una longitud céfalo-caudal de 90cm. **MCA:** membrana alantocoriónica; **MAA:** membrana alantoamniótica; **CU:** cordón umbilical; **UT:** útero.

5.3 Estudio microscópico de las placentas

Se analizaron las estructuras histológicas de la interfase materno-fetal de placenta equina en los distintos periodos gestacionales, utilizando microscopía óptica y microscopía óptica de alta resolución (MOAR).

Las Fig.15 (A y B) corresponden a un corte histológico de placenta de $\pm 25-30$ días de gestación, teñida con H/E. Se puede visualizar el epitelio luminal materno como una capa simple de células cubicas o cilíndricas bajas con el núcleo en posición central y una membrana basal fina. En algunas zonas presentan la formación de varios pliegues de poca profundidad y células ciliadas en el epitelio luminal. Subsiguiente al epitelio materno, se observan abundantes glándulas endometriales penetrando el estroma endometrial, en las regiones apicales del mismo, las glándulas contienen gran cantidad de secreción exocrina en su lumen correspondiendo al histotrófo (“leche uterina”). Estas glándulas tortuosas están revestidas de epitelio cubico simple con núcleos en posición basal y fuertemente teñidos, algunas contienen células epiteliales ciliadas en su lumen. Las glándulas más alejadas del epitelio luminal, aparentemente estaban en menor actividad secretora y presentaron epitelio cilíndrico. La membrana coriovitelina se encuentra formada por aposición de dos epitelios simples, el epitelio de la membrana vitelina está formado por células cubicas bajas con un núcleo central bien definido y el corion fetal es un epitelio cilíndrico con un núcleo ovalado ubicado en la base de la célula. Entre los dos epitelios se observan numerosos capilares fetales con eritrocitos fetales (Fig. 15 B). Las dos capas epiteliales de la interfase endometrio-coriovitelina están estrechamente relacionadas por una aposición de los epitelios.

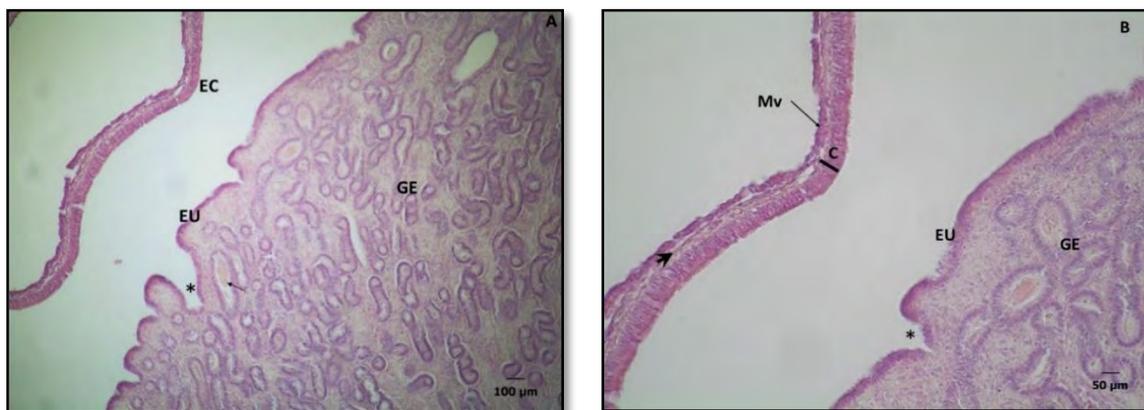


Fig.15: Interfase materno-fetal de una placenta de $\pm 25-30$ días de gestación teñida con H/E (A: 100x B: 200x). Se observa la membrana coriovitelina con aposición del corion y el saco vitelino. El epitelio coriónico está compuesto de células cilíndricas y la membrana vitelina de epitelio cubico bajo. Se observa también un surco endometrial (asterisco) en el epitelio materno, el histotrófo (flecha) dentro de una glándula y vasos sanguíneos embrionarios (punta de flecha) C: Corion; Mv: membrana vitelina; EU: epitelio uterino; EC: epitelio coriónico; GE: glándulas endometriales.

A los \pm 55-65 días de gestación la superficie placentaria presentó proyecciones coriónicas rudimentarias y con forma ondulada. Estas están formadas, en la región apical, por epitelio cubico simple con grandes núcleos en posición central y en la región basal se observan algunas áreas de epitelio cubico bajo y otras de epitelio cubico alto con núcleos basales. Algunas proyecciones presentan pseudoestratificación del epitelio y pleomorfismo celular. En el lado materno algunos pliegues endometriales formaron surcos más profundos donde se interdigitarán las vellosidades coriónicas. Al mismo tiempo, las proyecciones de las células del epitelio coriónico forman las primeras vellosidades, mostrando una aposición entre los epitelios de los surcos endometriales y de las vellosidades coriónicas (Fig.16 A).

En este momento de la gestación, las glándulas endometriales continúan secretando su histotrófo, evidenciándose en ciertas zonas una acumulación de esta secreción sobre la superficie endometrial. Las células del trofoblasto que recubren la abertura de las glándulas se presentan elongandas y de una apariencia pseudoestratificada ya que son las encargadas de obtener la “leche uterina” secretada por dichas glándulas (Fig.16 B).

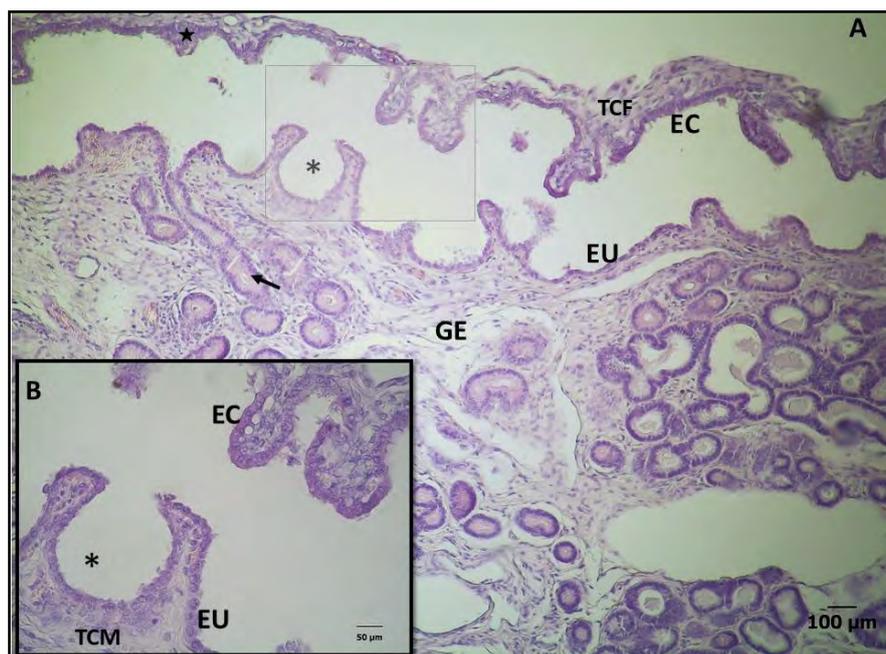


Fig.16: Interfase materno-fetal de una placenta de \pm 55-65 días de gestación teñida con H/E (A: 100x B: 400x). Se visualizan las vellosidades coriónicas primarias en el epitelio fetal y en la esquina superior izquierda de la fotografía se observa el trofoblasto pseudoestratificado (estrella). Glándula endometrial con contenido histotrófico (flecha). Surco endometrial en el epitelio materno (asterisco). EU: epitelio uterino; EC: epitelio coriónico; TCM: tejido conectivo materno; TCF.: tejido conectivo fetal; GE: glándulas endometriales.

En la Fig.17 (A y B) se observan las vellosidades alantocoriónicas que se interdigitan con los pliegues uterinos, conformando las vellosidades placentarias de la interfase materno fetal ($\pm 100-120$ días de preñez). Se distingue el trofoblasto como una capa simple de células cúbicas estrechamente adosadas a las criptas del epitelio uterino, desarrollando pliegues o ramificaciones secundarias. A los $\pm 180-210$ días se puede visualizar el microcotiledón multiramificado en el tejido placentario (Fig.18)

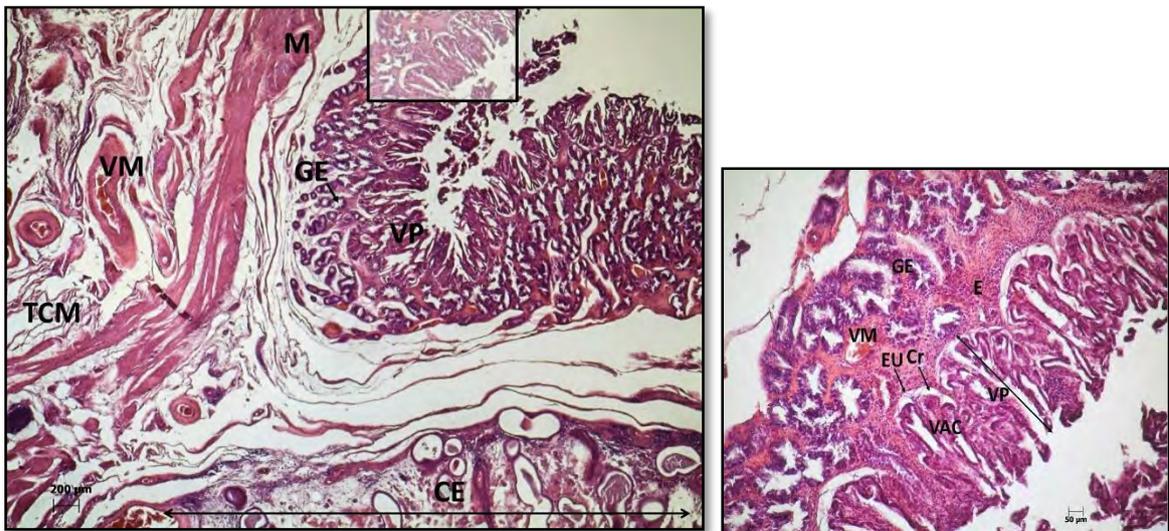


Fig.17: Corte histológico de una placenta equina de $\pm 100-120$ días de gestación teñida con H/E (A: 25x; B: 100x). VP: vellosidades placentarias; EU: epitelio uterino; Cr: Cripta; VAC: vellosidad alantocoriónica; VM: vasos maternos; GE: glándulas endometriales; TCM: tejido conectivo materno; M: miometrio; E: endometrio; CE: copa endometrial.

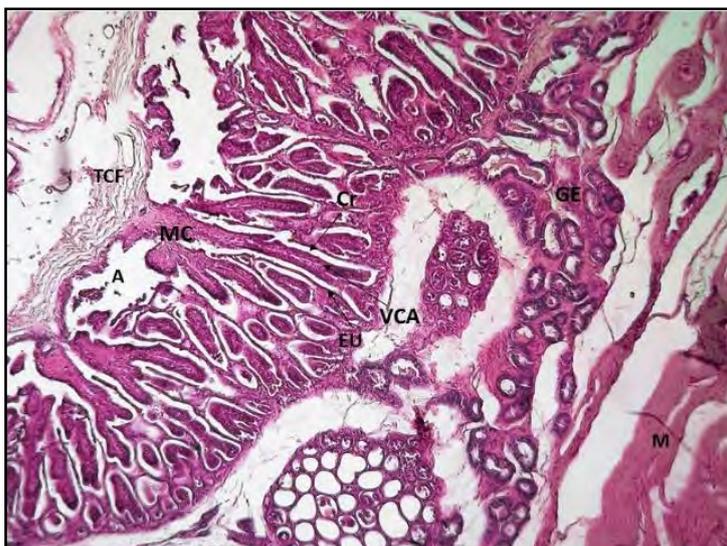


Fig.18: Corte histológico de una placenta equina de $\pm 180-210$ días de gestación teñida con H/E (50x). MC: microcotiledón; EU: epitelio uterino; VCA: vellosidad corioalantoidea; Cr: cripta; A: areolas; M: miometrio; GE: glándulas endometriales; TCF: tejido conectivo fetal.

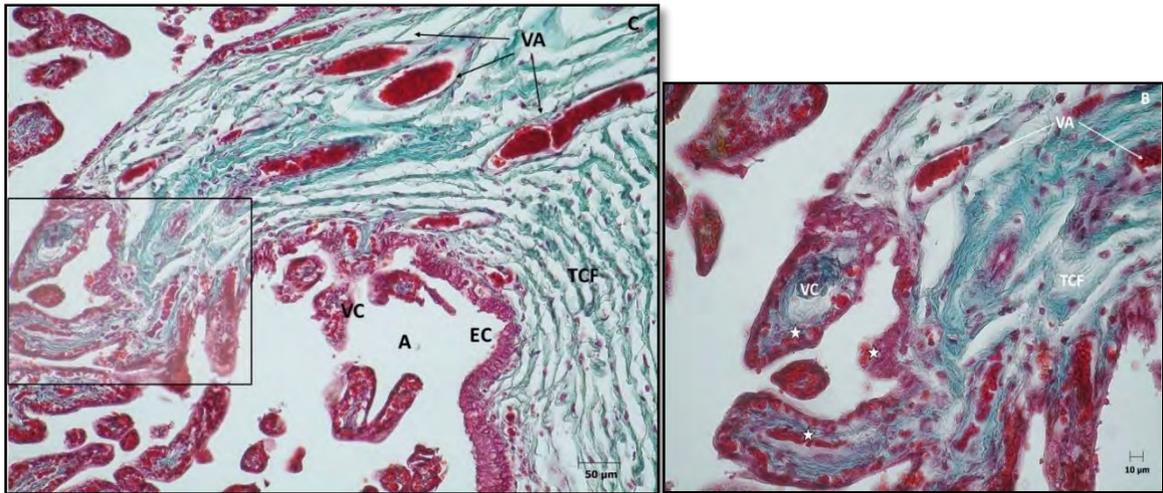


Fig.20: Corte histológico de la base de un microcotiledón de placenta equina de \pm 300 días de gestación teñida con Tricrómica de Masson (**A:** 200x; **B:** 400x). Obsérvese la abundante cantidad de fibras colágenas (verde) dispuestas de manera regular en la región del íleo del microcotiledón y la cuantiosa cantidad de hematies fetales teñidos de un color rojo intenso (estrellas). **VC:** vellosidad coriónica; **EC:** epitelio coriónico; **VA:** vasos alantoicos; **A:** areolas; **TCF:** tejido conectivo fetal.

5.4 Morfología de las copas endometriales

En la Fig.21 se muestra una copa endometrial correspondiente a los \pm 55-65 días de gestación. En ella se observa una masa densa de células fetales y maternas inmersas en el estroma endometrial. Se visualizan células trofoblásticas gigantes, constituidas por grandes núcleos y nucléolos prominentes. Entre ellas, se observan células binucleadas grandes y redondeadas, algunas de apariencia poliédrica que poseen dos núcleos grandes y claros, con predominio de eucromatina.

Estas células fetales se encuentran intercaladas entre los vasos sanguíneos, vacuolas lipídicas y numerosas glándulas endometriales que contienen en su lumen una secreción proteica acidófila (Fig.22).

En la región apical de la copa endometrial, el epitelio materno se encuentra ausente, debido a la erosión provocada por la migración de las células trofoblásticas de la cintura coriónica. En las regiones laterales de la misma, observamos surcos endometriales de epitelio cubico simple con abundantes glándulas uterinas activas en el estroma materno. En la base y periferia de la copa, adyacente al miometrio, se observan acúmulos de leucocitos maternos entremezclados con glándulas endometriales, las cuales se encuentran en mayor proporción que en la región apical. Las mismas son de diferentes tamaños, flexuosas y compuestas por un epitelio cubico a cilíndrico simple (Fig.23).

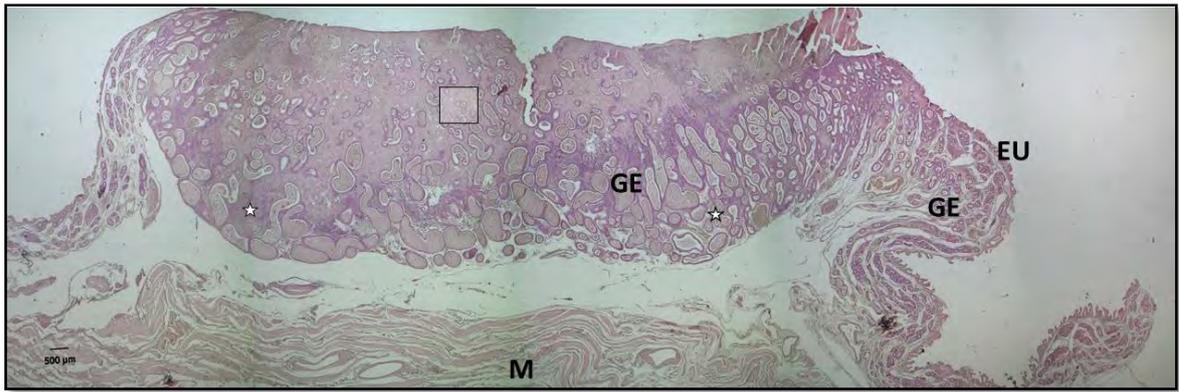


Fig.21: Microfotografía de una copa endometrial entera perteneciente a un útero fijado por perfusión de \pm 55-65 días de gestación, teñida con H/E (25x). Se observan la masa densa de células grandes entremezcladas con abundantes glándulas endometriales distendidas y un acúmulo de leucocitos maternos en la base de la copa endometrial (estrellas). EU: epitelio uterino, GE: glándulas endometriales, M: miometrio.

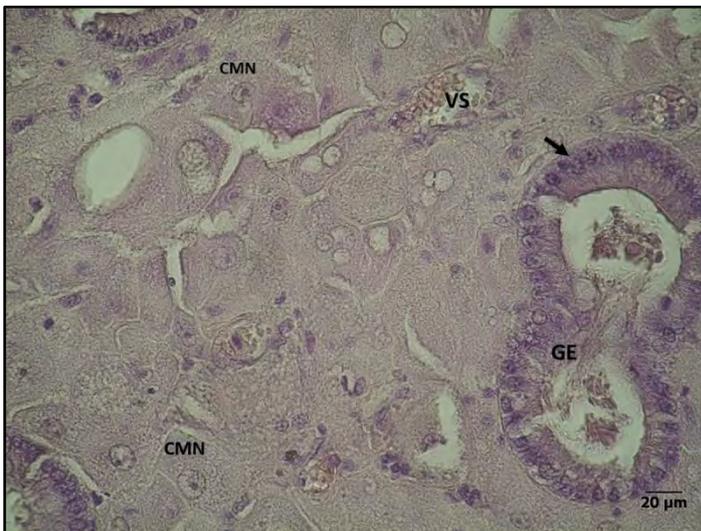
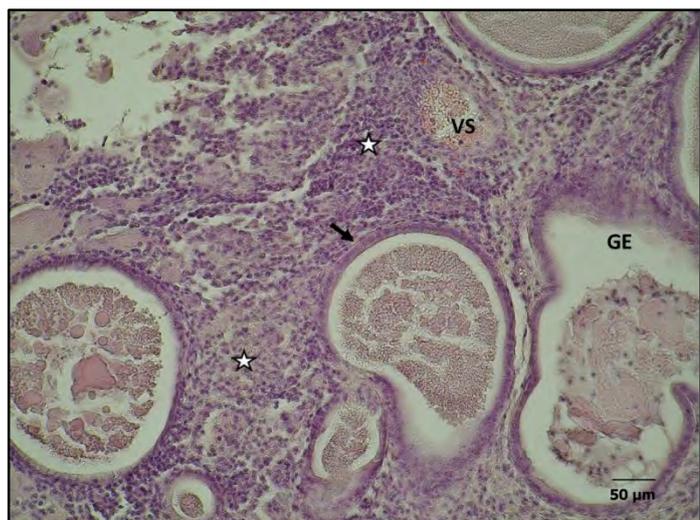


Fig.22: Sección histológica de una porción de copa endometrial de \pm 55-65 días de gestación teñida con H/E (400x). Se observan células mononucleadas en el estroma de la copa, nótese los núcleos y nucléolos prominentes. Se evidencia una glándula endometrial con epitelio cilíndrico simple (flecha). GE: glándula endometrial; CMN: célula mononuclear; VS: vaso sanguíneo.

Fig.23: Sección histológica de una copa endometrial de \pm 55-65 días de gestación teñida con H/E (200x). Se observa con mayor detalle el infiltrado de leucocitos maternos en el estroma de la copa endometrial (estrellas) y el epitelio cúbico simple de las glándulas endometriales (flecha) con su secreción proteica acidófila. GE: glándula endometrial, VS: vasos sanguíneos



A los \pm 100-120 días de gestación, se observa una porción de una copa endometrial teñida con H/E. En la base y laterales de la copa endometrial se aprecian grandes cantidades de linfocitos infiltrados comparados con el periodo anterior analizado. Se evidencian glándulas endometriales distendidas y de gran tamaño, formadas por epitelio cúbico bajo y con contenido acidófilo (Fig.24)

Con la técnica de coloración especial TM, podemos distinguir arteriolas de diversos calibres presentando cuantiosos glóbulos rojos en su interior teñidos de rojo a naranja intenso. También se evidencia tejido conectivo denso teñido de color verde entremezclado con las glándulas endometriales y células gigantes trofoblásticas en degeneramiento celular (Fig.25 A y B)

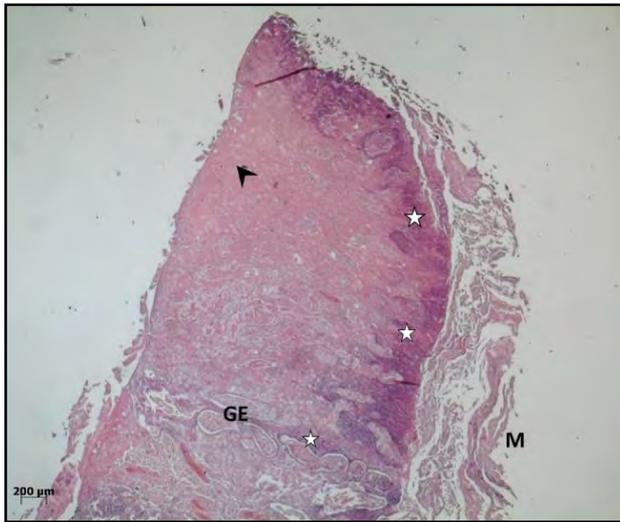


Fig.24: Sección histológica de una porción de copa endometrial de \pm 100-120 días de gestación teñida con H/E (25x). Infiltrado linfocítico (estrellas). Células trofoblásticas gigantes (punta de flecha) con su secreción proteica acidófila. GE: glándula endometrial, M: Miometrio.

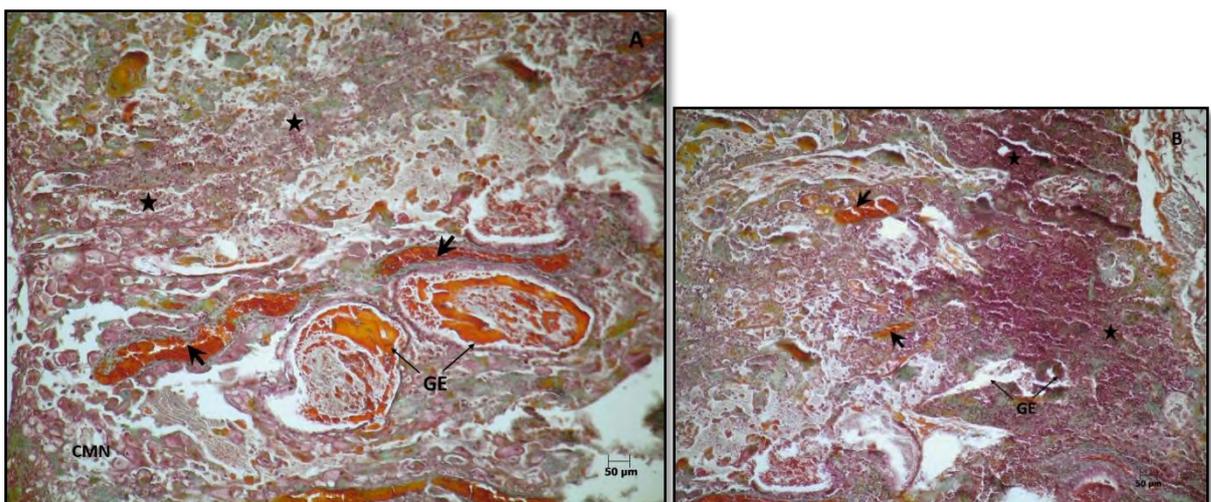


Fig.25: Sección histológica de una copa endometrial de \pm 100-120 días de gestación teñida con TM. (A y B: 100x). Los linfocitos han comenzado a moverse dentro del tejido de la copa (estrellas) y los vasos sanguíneos se encuentran distendidos (flecha). Nótese el tejido conectivo materno teñido en verde. CMN: célula trofoblástica mononucleada; GE: glándula endometrial.

El empleo de cortes semifinos para el estudio de la placenta por MOAR permitió la visualización con mayor detalle de diversas estructuras celulares placentarias.

En la Fig. 26 (A y B), se observa un corte transversal de las vellosidades coriónicas del microcotiledón, correspondiente a los \pm 240-270 días de preñez. Estas vellosidades están conformadas por células trofoblásticas con grandes núcleos apoyados sobre la membrana basal, siendo algunos bien redondos y otros con forma irregular, ricos en eucromatina y nucléolos bien diferenciados. Además, se evidencia la presencia de numerosos capilares fetales conteniendo eritrocitos tipo rouleaux característicos del equino y se visualizan células endoteliales, algunas con predominio de heterocromatina sobre las paredes nucleares con características apoptóticas.

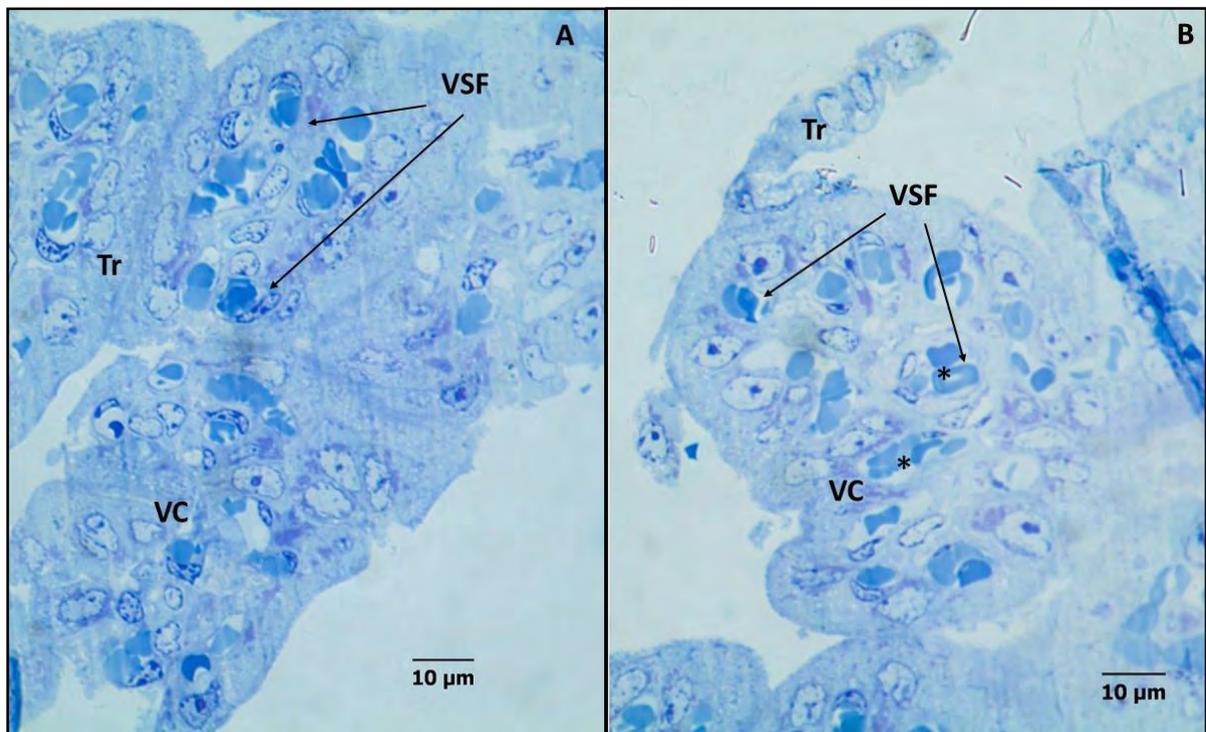


Fig.26: Imágenes de vellosidades coriónicas de un microcotiledón a los \pm 240-270 días de preñez procesadas por MOAR (A y B: 1000x). Se observan células trofoblásticas de epitelio cubico. Eritrocitos fetales (asterisco). VC: vellosidad coriónica; Tr: trofoblasto; VSF: vasos sanguíneos fetales.

5.5 Ultraestructura placentaria por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la Fig.27 se muestra una microfotografía procesada por la técnica TEM, correspondiente a una placenta del primer tercio de preñez (\pm 55-65 días). En ella se observa claramente una célula del epitelio luminal materno, estas células cilíndricas poseen el núcleo grande y claro en posición central, en su citoplasma se evidencian numerosas interdigitaciones de membranas que aumentan la superficie de contacto y establecen una íntima relación entre

las células contiguas del epitelio materno. También se puede observar mitocondrias de gran tamaño y vesículas electrodensas de diversas dimensiones dentro de la misma célula. En la región apical, se observan pocas microvellosidades cortas que evidencian la interconexión con las células del epitelio fetal que no se visualizan por cuestiones referidas a la técnica.

La Fig.28 muestra un vaso sanguíneo conteniendo eritrocitos, en él se puede observar el núcleo alargado y activo debido al alto contenido de cromatina laxa transcripcionalmente activa llamada “eucromatina”, se observa también el endotelio rodeado de fibras colágenas correspondientes al tejido conectivo circundante.

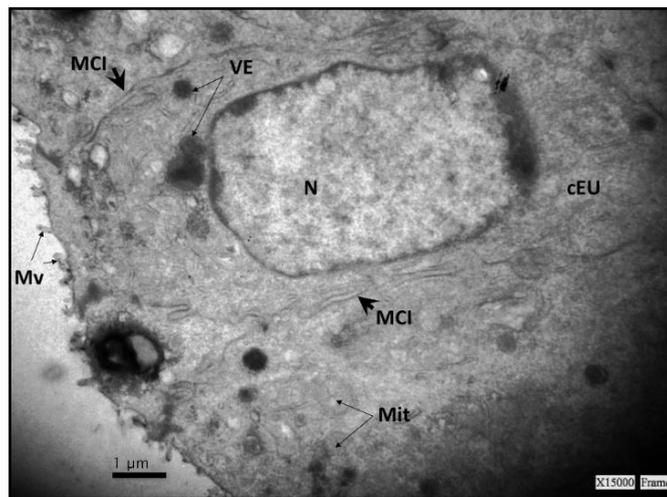


Fig.27: Microfotografía obtenida por TEM de tejido placentario equino de \pm 55-65 días donde se visualizan células del epitelio materno (15000x). **cEU:** célula del epitelio uterino; **N:** núcleo; **Mv:** microvellosidades; **MCI:** membranas citoplasmáticas interdigitadas; **Mit:** mitocondrias; **VE:** vesículas electrodensas.

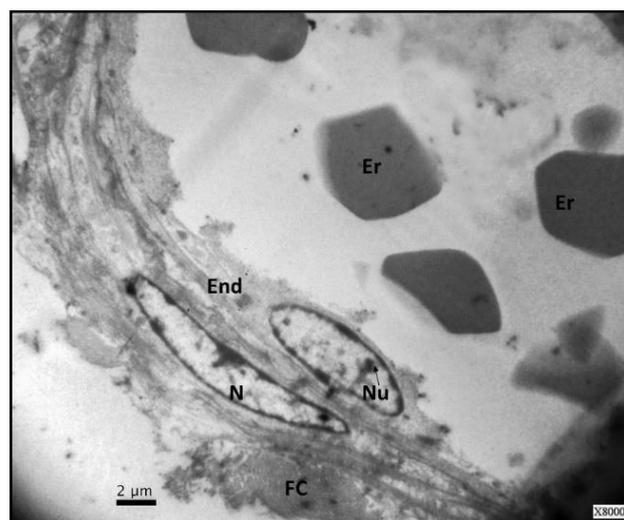


Fig.28: Microfotografía obtenida por TEM de un capilar fetal equino de \pm 55-65 días (8000x). Obsérvese las fibras colágenas de la matriz extracelular que rodea al capilar. **N:** núcleo; **Nu:** nucléolo; **End:** endotelio; **FC:** fibras colágenas; **Er:** eritrocitos.

A los \pm 150-180 días de gestación se puede observar el epitelio trofoblástico constituido por una capa simple de células cubicas. Estas células presentan numerosas microvellosidades en su cara apical y se encuentran unidas a las células vecinas por medio de sus membranas plasmáticas a través de uniones intercelulares, en la Fig.29 y 30 se pueden visualizar con mucha nitidez las uniones estrechas encargadas de sellar los espacios entre las células trofoblásticas. También se puede visualizar una célula cubica conteniendo en su cara apical, en contacto con las microvellosidades, una sustancia compatible a gotas de histotrófo, lo que revelaría la funcionalidad de la célula en absorber la leche uterina proveniente de las glándulas endometriales.

El citoplasma del epitelio fetal presenta organoides celulares, entre los que se destacan numerosas pero pequeñas mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi. En la Fig.31 se puede observar el retículo endoplásmico principalmente de tipo rugoso (RER) en estrecho contacto con el núcleo celular. En esta imagen también se puede apreciar la gran cantidad de microvellosidades cortas en la región apical de las células trofoblásticas, cabe resaltar las vesículas electrolúcidas en la región apical de la célula.

Las grandes células del epitelio trofoblástico presentan núcleos irregulares ubicados en la cara basal de las mismas, algunos tienen la característica de estar activos ya que son redondos, grandes y poseen nucléolos bien definidos, están constituidos predominantemente por eucromatina, en cambio otros son más pequeños, polimorfos y con predominio de cromatina condensada conocida como “heterocromatina”. En la Fig.31 B se pueden observar gránulos electrodensos compactados correspondientes a los llamados cuerpos apoptóticos, restos de cromatina nuclear altamente compactada y transcripcionalmente inactiva.

Se observaron gran cantidad de pequeños capilares contiguos a la membrana basal de las células trofoblásticas. Cabe destacar la estrecha distancia que separa el epitelio trofoblástico de los vasos sanguíneos subepiteliales, responsables de un activo intercambio materno-fetal.

En la Fig.29 se observan vasos sanguíneos con células endoteliales y núcleos irregulares alargados adosados al trofoblasto. En los mismos es posible visualizar el contenido de glóbulos rojos tipo rouleaux característicos del equino.

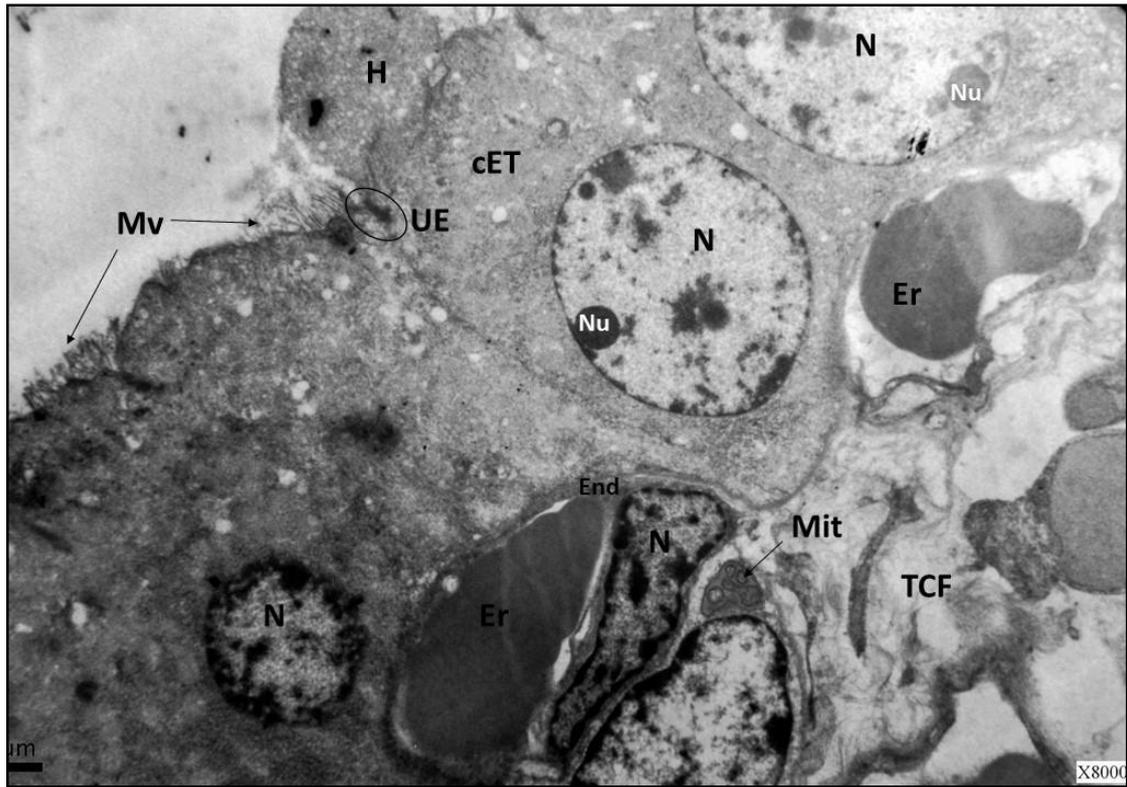


Fig.29: Microfotografía obtenida por TEM de tejido placentario equino de \pm 150-180 días de gestación donde se visualiza el epitelio trofoblástico (8000x). Nótese la estrecha relación entre los capilares y la membrana basal del epitelio coriónico. **cET:** célula del epitelio trofoblástico; **N:** núcleo; **Nu:** nucléolo; **End:** endotelio; **TCF:** tejido conectivo fetal; **Er:** eritrocitos; **Mv:** microvellosidades; **UE:** uniones estrechas; **Mit:** mitocondrias; **H:** histotrófo.

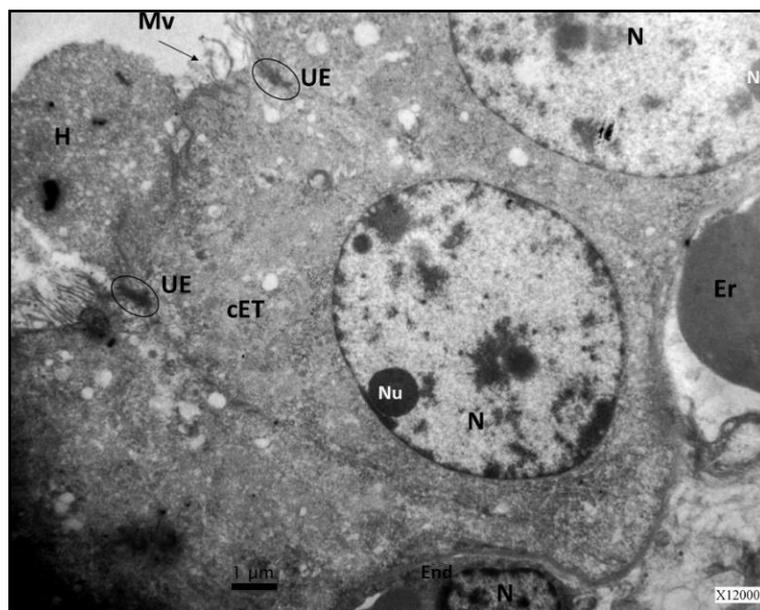


Fig.30: Microfotografía de una célula trofoblástica obtenida por TEM (12000x). **cET:** célula del epitelio trofoblástico; **N:** núcleo; **Nu:** nucléolo; **End:** endotelio; **Er:** eritrocitos; **Mv:** microvellosidades; **UE:** uniones estrechas; **H:** histotrófo.

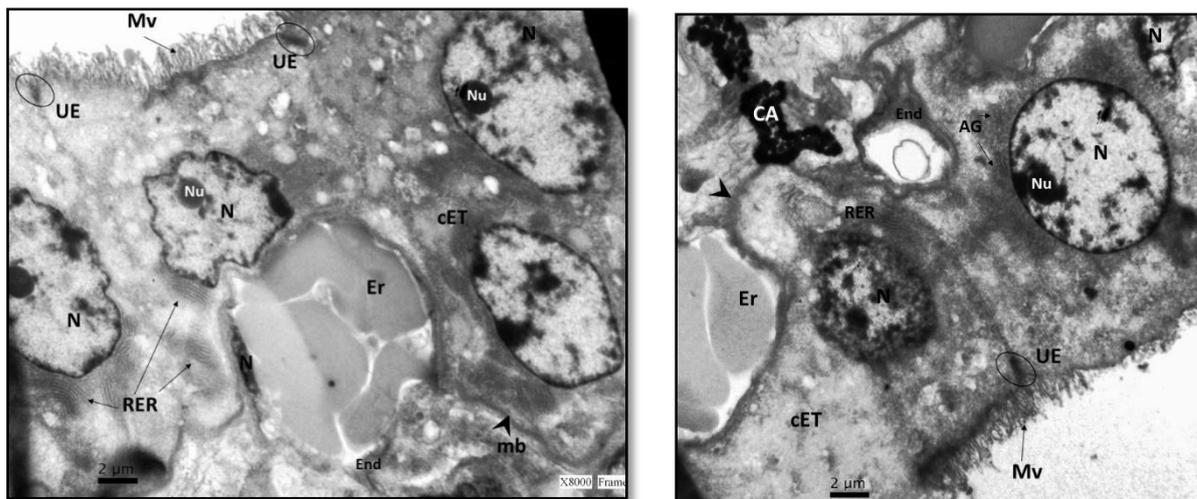


Fig.31: Microfotografías de tejido placentario equino de \pm 150-180 días de gestación donde se visualiza el epitelio trofoblástico obtenidas por TEM (A y B: 8000x). Se observan núcleos irregulares en proceso de apoptosis y restos de cuerpos apoptóticos. **cET:** célula del epitelio trofoblástico; **mb:** membrana basal; **N:** núcleo; **Nu:** nucléolo; **End:** endotelio; **Er:** eritrocitos; **Mv:** microvellosidades; **UE:** uniones estrechas; **AG:** aparato de Golgi; **RER:** retículo endoplásmico rugoso; **CA:** cuerpos apoptóticos.

5.6 Inmunolocalización de la hormona gonadotrofina coriónica equina (eCG)

La eCG se inmunolocalizó en las copas endometriales halladas en los periodos gestacionales estudiados del primer tercio gestacional, evidenciando la funcionalidad de las células trofoblásticas gigantes especializadas.

En el periodo medio del primer tercio de la gestación, a los \pm 55-65 días de preñez, se observó la inmunolocalización de la eCG sobre la región apical de la copa endometrial con zonas de mayor inmunomarcación que otras (Fig.32). El tejido conectivo materno y el epitelio de las glándulas endometriales fue negativo (Fig.33). El citoplasma de las células trofoblásticas especializadas se inmunomarcó intensamente (+++) en algunas células y en otras su marcación fue moderada (++) a débil (+). Se visualizó un patrón característico de marcación granular en las células mononucleadas (CMN) y binucleadas (CBN). Los núcleos y nucléolos de las CMN y CBN no evidenciaron inmunomarcación (Fig.34). Se observó una inmunoreacción moderada (++) sobre el epitelio uterino, en ciertas zonas de los surcos endometriales ubicados en las regiones laterales de la copa endometrial. Además, se visualizó marcación débil en la región apical de las células epiteliales maternas.

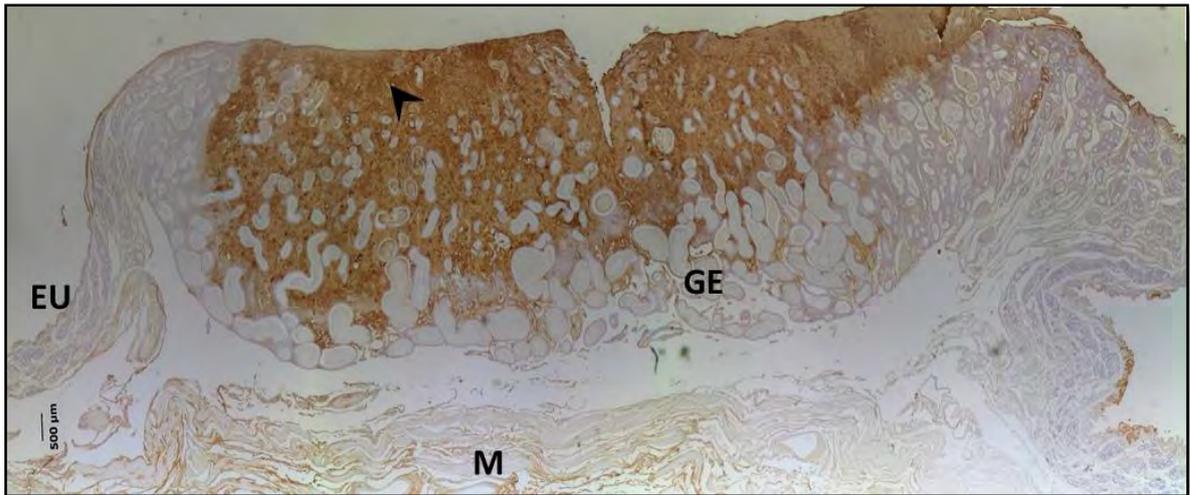


Fig. 32: Inmunohistoquímica de eCG de una copa endometrial entera en un útero fijado por perfusión de \pm 55-65 días de gestación (25x). Se observan la masa densa de células gigantes (punta de flecha). **EU:** epitelio uterino, **GE:** glándulas endometriales, **M:** miometrio

Hacia el final del primer tercio, a los \pm 100-120 días de gestación, se observó una copa endometrial con signos evidentes de daño y degeneración celular. No obstante, se pudo observar una inmunomarcación moderada (++) en el citoplasma de las células trofoblásticas gigantes de la copa. Se evidenciaron abundantes glándulas endometriales de diferentes tamaños, distendidas y tortuosas, con notable degeneración celular del epitelio de las mismas (presencia de núcleos de forma irregular y con citoplasma vacuolizado). El epitelio glandular no presentó inmunomarcación.

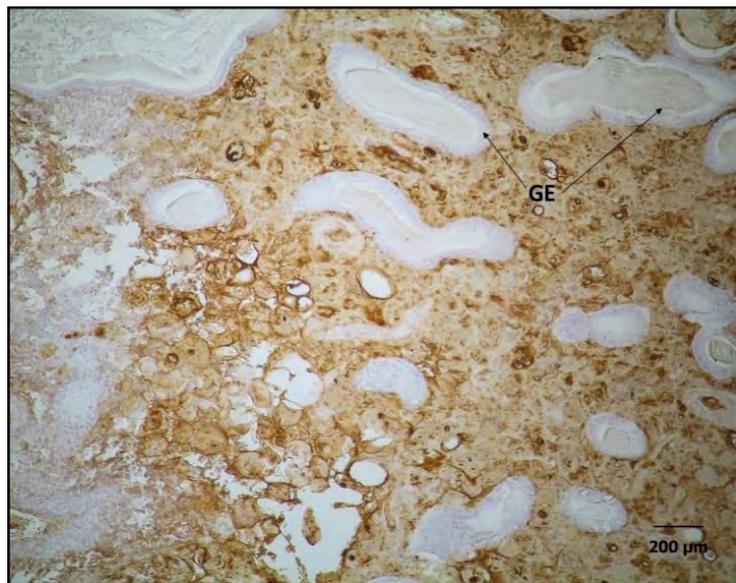


Fig.33: Sección de copa endometrial entera de \pm 55-65 días de gestación (100x). Inmunohistoquímica negativa para eCG en el epitelio de las glándulas endometriales. **GE:** glándulas endometriales.

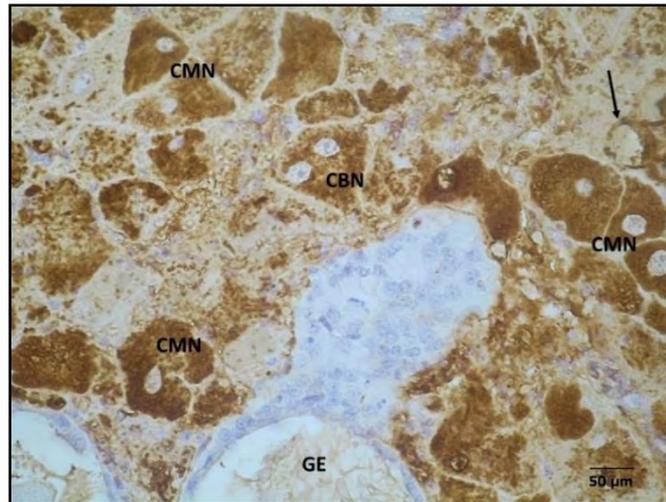


Fig. 34: Inmunomarcación de células trofoblásticas de la copa endometrial (400x). Nótese la fuerte marcación de algunas CMN y el patrón granular de marcación en la CBN. Vacuola lipídica (flecha). **CMN:** células trofoblásticas mononucleadas; **CBN:** células trofoblásticas binucleadas; **GE:** glándulas endometriales.

Debido al daño notable que presenta la copa endometrial, no pueden establecerse diferencias estructurales entre la parte apical y basal de la misma. En la microfotografía también se observa la interrelación de la copa endometrial con la interfase materno-fetal y el miometrio materno (Fig.35).

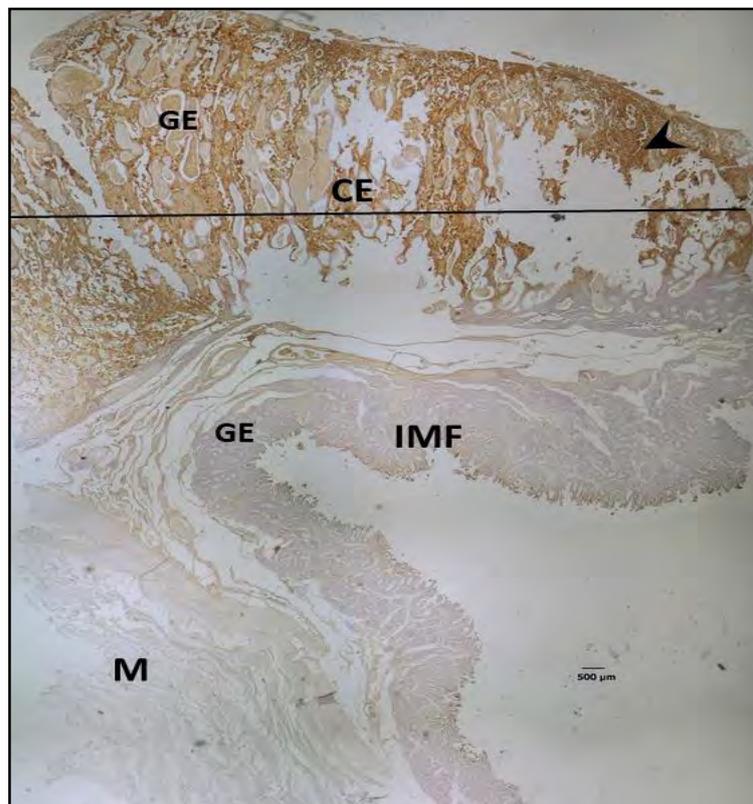


Fig.35: Inmunomarcación de eCG en una interfase materno-fetal con una copa endometrial adosada al útero a los \pm 100-120 días de gestación (25x). **CE:** copa endometrial; **IMF:** interfase materno-fetal; **GE:** glándulas endometriales; **M:** miometrio.

5.7 Inmunolocalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

La distribución de VEGF en tejidos placentarios de yeguas mestizas detectada mediante inmunohistoquímica se muestra en la Tabla II.

Tabla II: Inmunoreactividad de VEGF en los diferentes estadios gestacionales analizados (*Cap:* capilares; *Art/Vena:* Arterias, arteriolas, venas y vénulas; *GE:* Glándulas endometriales de las copas).

Parámetros Días de gestación aprox.	Epitelio luminal endometrial	Epitelio glandular	Estroma Endometrial	Endotelio materno		Trofoblasto	Estroma alantoidico	Endotelio fetal		Células de la cintura coriónica	Células de las copas endometriales	
				Cap	Art/ven			Cap	Art/ven		GE	
25-30	++	++	++	+/-								
39-42	++	++	-	+/-	-			-	-	+		
55-65	+++	++	-	+/-	-	+++	-	+/-	-		+++/ ++	++ /-
100-120	++	++	+	+/-	-	+++		+/-	-		+++/ ++	-
120-150	++	+	-	+	-	++	++	-	-			
150-180	++	++	-	-	-	+++	++	-	-			
180-210	-	++	-	-	-	+++*/+ +	+	-	-			
240	-	++	-	-	-	+++*/+ +	+	-	-			
270	++	++	-	-	-	+++	++	-	-			
300	++	++	-	-	-	+++*/+ +	+	+	-			

Referencias: *epitelio trofoblástico pseudoestratificado.

Las poblaciones celulares inmunomarcadas se caracterizaron por una expresión citoplasmática de VEGF, mientras que la intensidad de la marcación varió considerablemente en los diferentes estadios gestacionales estudiados.

En el primer tercio de la gestación, se observó una moderada a intensa inmunomarcación en la región apical de las células del epitelio luminal del endometrio a medida que avanzan los días de preñez respectivamente, el epitelio de las glándulas endometriales evidenció una marcación moderada del factor de crecimiento, no así el estroma endometrial que en este periodo no revelo inmunoreacción (Fig.36 A y B). El citoplasma de las células trofoblásticas presentes en los estadios finales del tercio gestacional estudiado, evidenciaron un inmunomarcación moderada al igual que la membrana alantoamniótica, es de destacar que en el estadio de \pm 55-65 días las células trofoblásticas pseudoestratificadas de las areolas presentaron una intensa marcación para VEGF (Fig.38 A y B). Los endotelios de los capilares sanguíneos marcaron débilmente en algunas zonas y en otra fueron negativos.

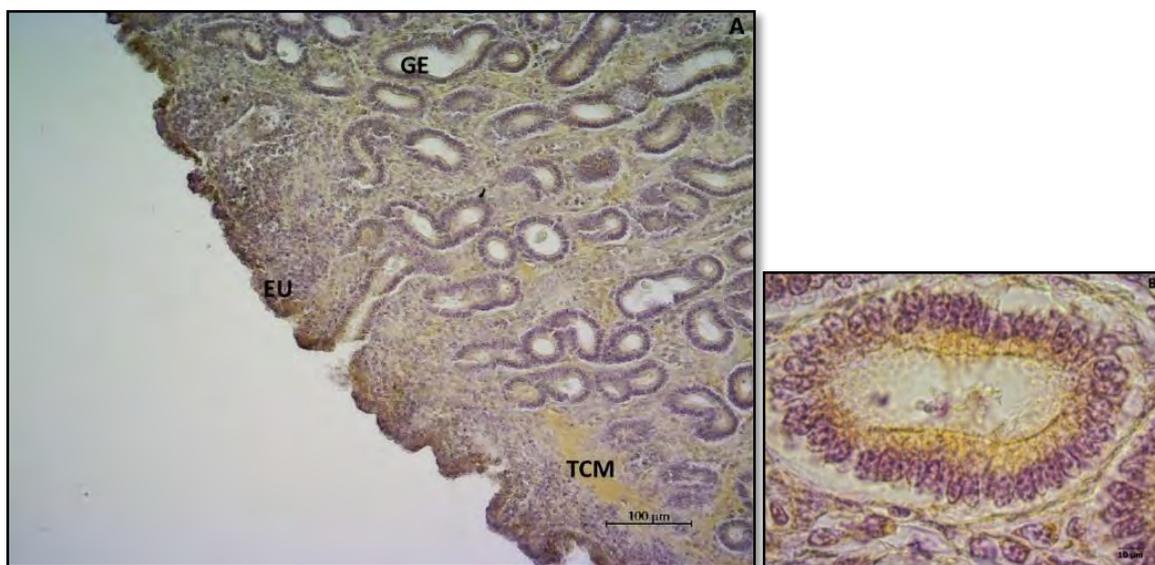


Fig.36: Sección de endometrio de una placenta equina de \pm 25-30 días de gestación inmunomarcada con anti-VEGF en una dilución 1:200 (A: 100x; B: 1000x). En la figura (a) se observa la inmunoreacción moderada del epitelio endometrial y la abertura de una glándula sobre el epitelio. Nótese en la figura (b) la marcación del factor de crecimiento en el citoplasma de las células del epitelio glandular. EU: epitelio uterino; GE: glándulas endometriales; TCM: tejido conectivo materno.

En la Fig.37 (A-E) se presenta una placenta de \pm 39-42 días, justo en el momento en que se está iniciando la placentación, las células de la cintura coriónica que comienzan a invadir el endometrio para formar las futuras copas endometriales se inmunomarcaron levemente, ya a los \pm 55-65 días, en la región apical y al centro de la copa endometrial ya formada completamente, el citoplasma de las células trofoblásticas especializadas (CMN y CBN) se inmunomarcó intensamente en algunas células y en otras su tinción fue moderada.

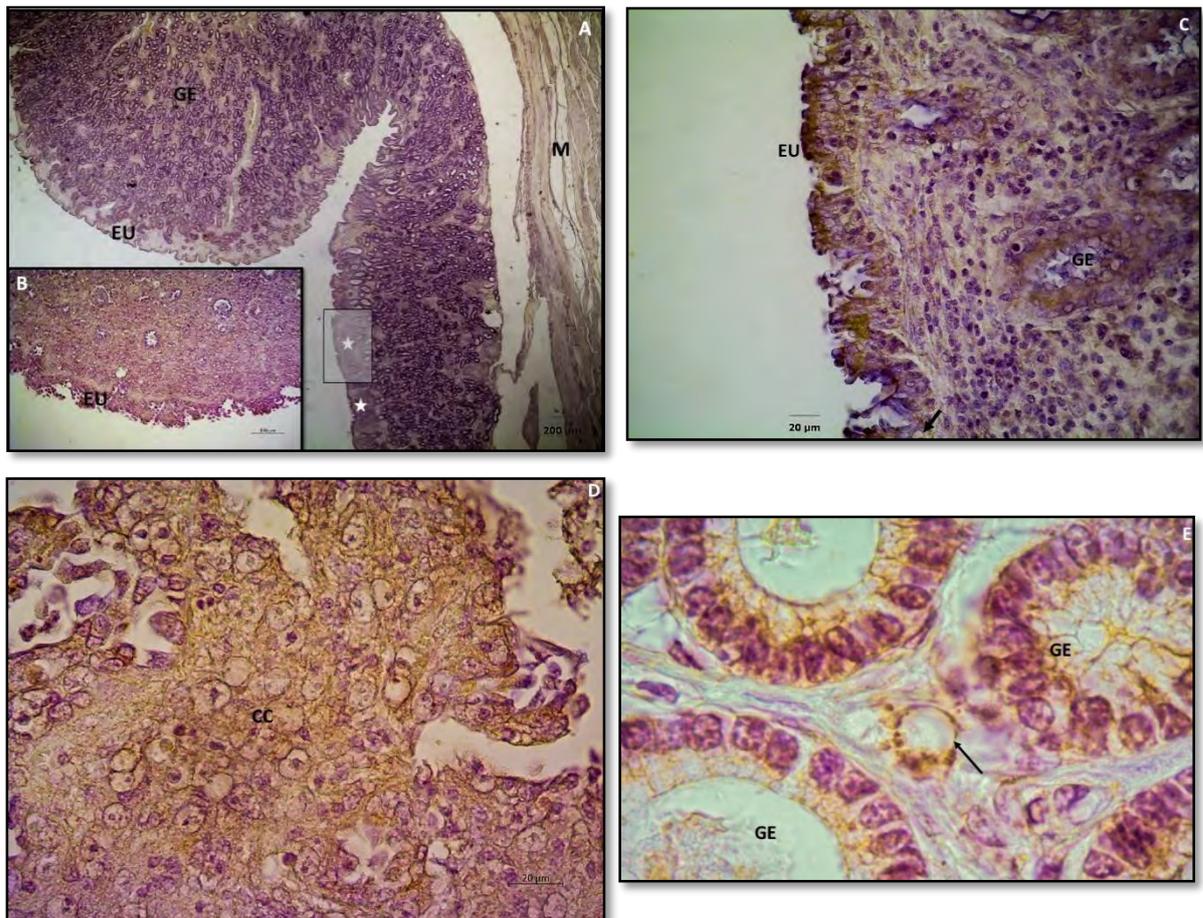


Fig.37: Inmunohistoquímica de VEGF de placenta equina de \pm 39-42 días de gestación (A: 25x; B: 100x; C y D:400x; E:1000x). Nótese la marcación moderada en las glándulas endometriales (e), el epitelio uterino (c) y la marcación débil de las células de la cintura coriónica (estrella) invadiendo el endometrio (b y d). En la figura (e) se puede observar la inmunomarcación positiva del endotelio vascular (flecha). EU: epitelio uterino; GE: glándulas endometriales; M: miometrio; CC: células de la cintura coriónica.

Esta marcación va disminuyendo a medida que nos acercamos a la base de la copa donde las células presentan una inmunoreacción débil a moderada, se visualizó un patrón característico de inmunomarcación granular en las CMN y CBN. En estos estadios, el epitelio de las

glándulas endometriales presentes en la copa endometrial fue negativo en algunas zonas y en otras débilmente inmunomarcado (Fig.39 y 40).

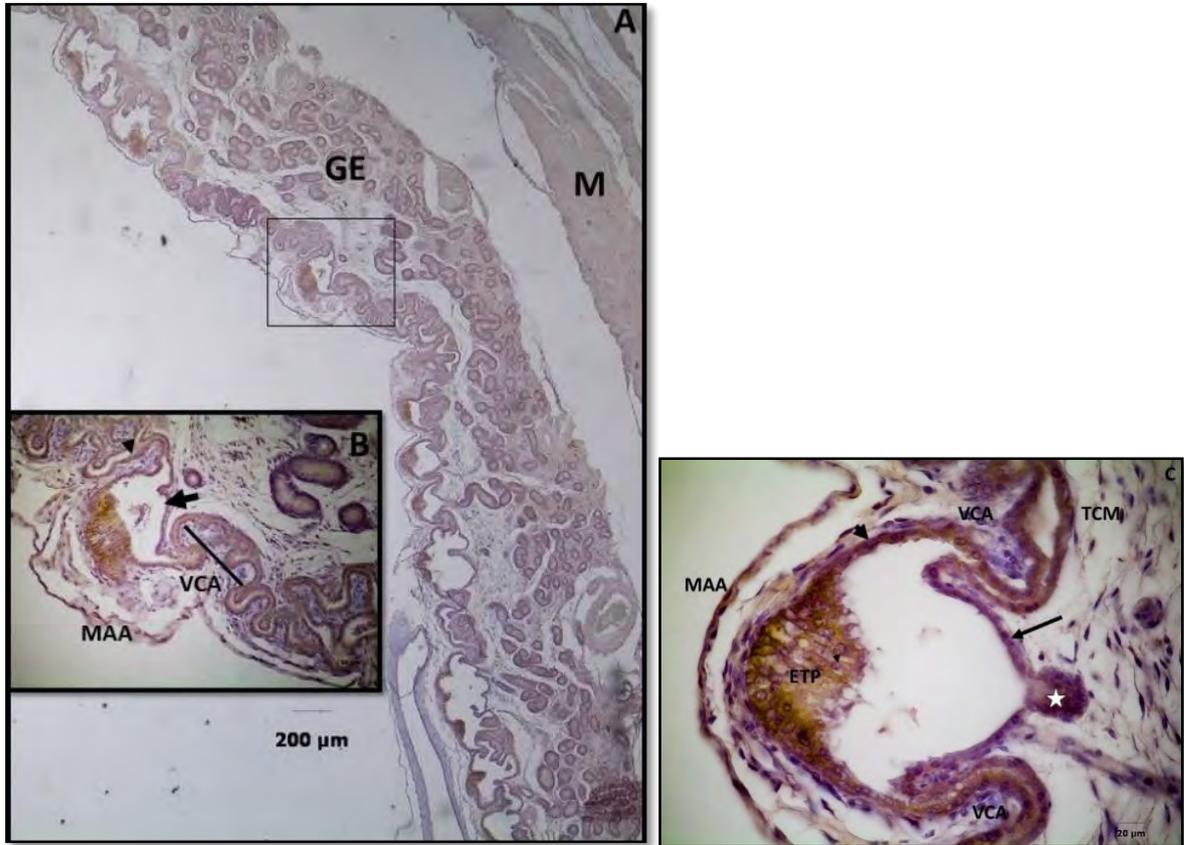


Fig.38: Inmunohistoquímica de VEGF en interface materno-fetal equina de \pm 55-65 días de gestación (A: 25x; B: 200x; C:400x;). Nótese la intensa inmunomarcación de las células trofoblásticas pseudoestratificadas en la región areolar, también se puede observar la abertura de una glándula endometrial (estrella) suministrando contenido histotrófico a las células fetales (b y c), epitelio uterino (flecha), epitelio coriónico (punta de flecha) ETP: epitelio trofoblástico pseudoestratificado; GE: glándulas endometriales; M: miometrio; VCA: vellosidad corioalantoidea; MAA: membrana alantoamniótica

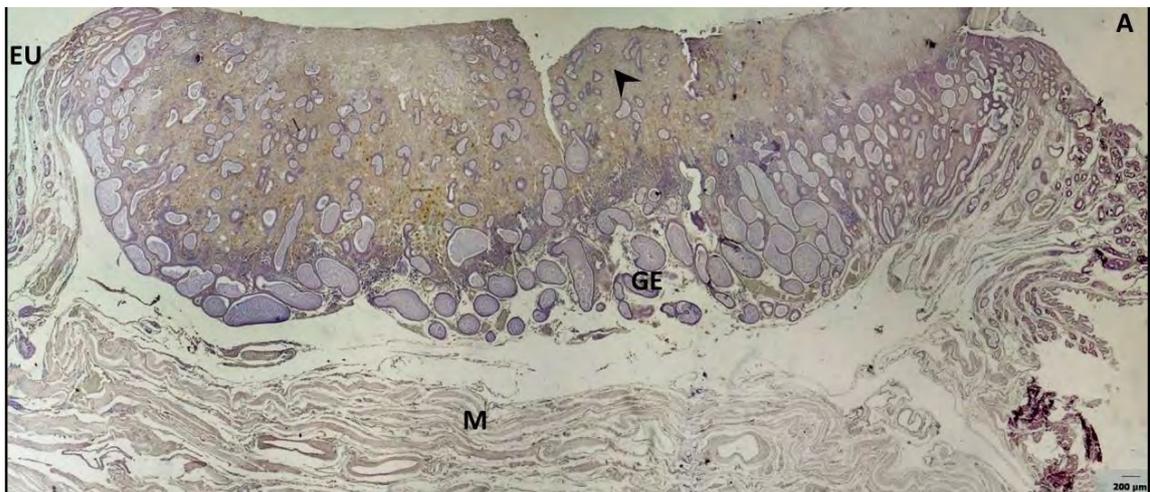


Fig.39: Inmunohistoquímica de VEGF de una copa endometrial entera de \pm 55-65 días de gestación (25x). Se observan la masa densa de células gigantes (punta de flecha). EU: epitelio uterino, GE: glándulas endometriales, M: miometrio

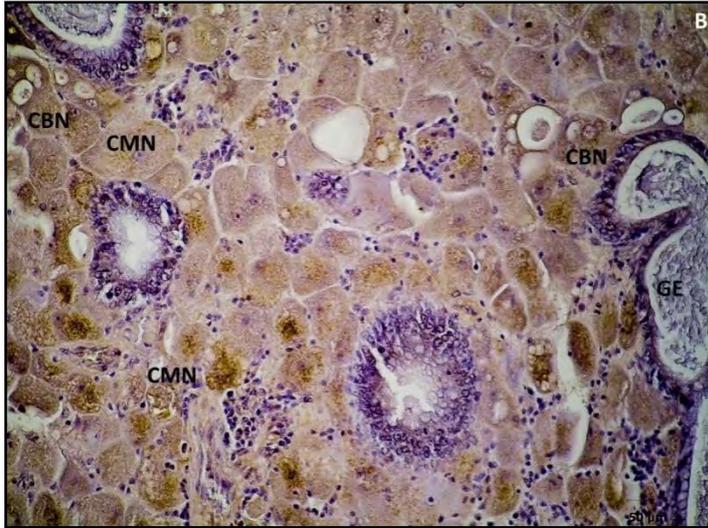


Fig.40: Sección de copa endometrial entera de \pm 55-65 días de gestación inmunomarcada con anti-VEGF (200x). Nótese la heterogeneidad en la intensidad de marcación y el patrón granular de las CBN. GE: glándulas endometriales; CMN: células trofoblásticas mononucleadas; CBN: células trofoblásticas binucleadas.

Durante el segundo tercio de preñez, ya con los microcotiledones totalmente formados, continuo la inmunomarcación moderada de las células trofoblásticas del alantocorion y del epitelio luminal y glandular materno, el estroma endometrial persistió sin marcación, no así el estroma alantoideo que revelo una inmunoreacción débil a moderada (Fig.41 A y B).

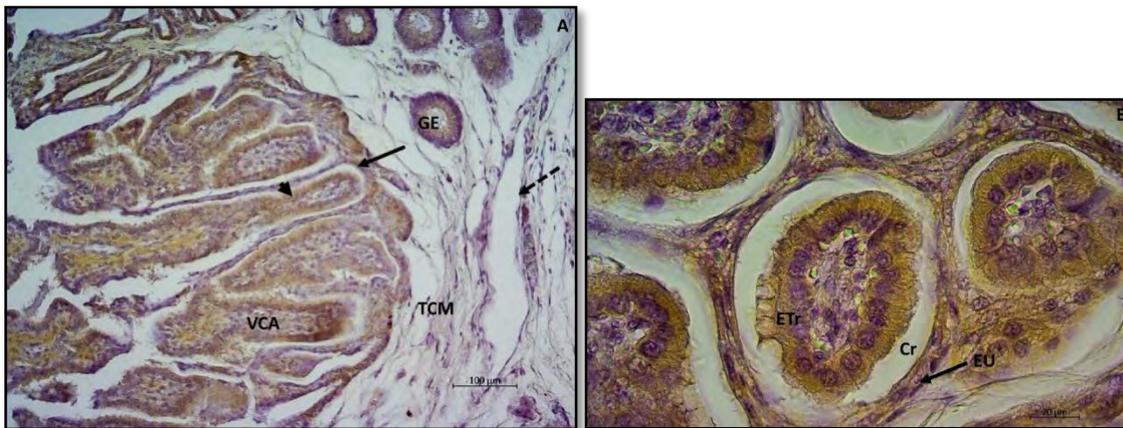


Fig.41: Inmunohistoquímica de VEGF en un microcotiledón equino de \pm 120-150 días de gestación (A: 100x; B: 400x), vaso sanguíneo (flecha discontinua), VCA: vellosidad corioalantoidea; Cr: cripta; ETr: epitelio trofoblástico (punta de flecha); EU: epitelio uterino (flecha); GE: glándulas endometriales; TCM: tejido conectivo materno.

En el último periodo de gestación, se halló el mismo patrón de localización para VEGF en el epitelio luminal y glandular materno, así como el estroma alantoideo y endometrial.

En la Fig.42 (A-C) se muestra una interfase materno-fetal de \pm 300 días de gestación en donde cabe resaltar un notable incremento en la intensidad de marcación de las células trofoblásticas pseudoestratificadas que se encuentran en las regiones intercotiledonarias llamadas areolas y están especializadas en absorber el histotrófo, se observó un patrón de

immunomarcación intenso en la región apical de las mismas. Se pudo visualizar una inmunoreacción nula en los endotelios de los capilares maternos y débil en los vasos sanguíneos fetales. Además, las fibras musculares lisas que conforman el miometrio, expresaron este factor pro-angiogénico con una intensidad de marcación moderada en la mayoría de los períodos analizados.

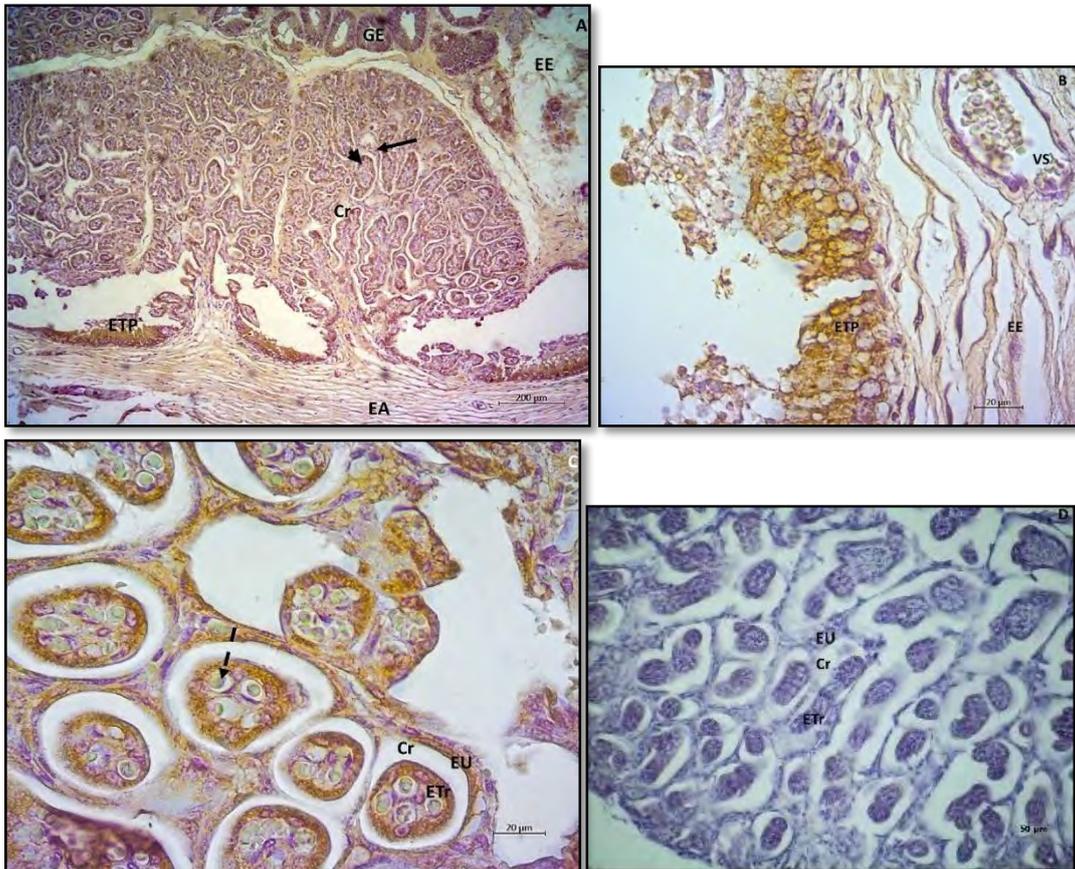


Fig.42: Imagen de tejido placentario equino con ensayo inmunohistoquímico para VEGF en interface materno-fetal de \pm 300 días de gestación (A: 50x; B y C: 400x; D:100x). Nótese la intensa marcación en las vellosidades corioalantoideas cortadas transversalmente (c) y en el epitelio trofoblástico pseudoestratificado especializado en absorber la leche uterina (b), también se observa una gran cantidad de capilares sanguíneos (flecha discontinua) dentro de la vellosidad. En el control negativo no se observa marcación. **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **EU:** epitelio uterino (flecha); **Cr:** cripta; **ETr:** epitelio trofoblástico (punta de flecha); **ETP:** epitelio trofoblástico pseudoestratificado; (flecha); **GE:** glándulas endometriales; **EE:** estroma endometrial; **EA:** estroma alantoideo; **VS:** vaso sanguíneo.

5.8 Inmunolocalización de Angiopoyetina 2 (Ang-2)

A través de la técnica inmunohistoquímica se detectó la Angiopoyetina 2 en los tejidos placentarios de yeguas mestizas en todos los periodos gestacionales estudiados. La distribución se muestra en la Tabla III.

Tabla III: Inmunoreactividad de Ang-2 en los diferentes estadios gestacionales analizados (Cap: capilares; Art/Vena: Arterias, arteriolas, venas y vénulas; GE: Glándulas endometriales de las copas).

Parámetros Días de la gestación aprox.	Epitelio luminal endometrio	Epitelio glandular	Estroma Endometrio	Endotelio materno		Trofoblasto	Estroma materno	Endotelio fetal		Células de la cintura coriónica	Células de las copas endometriales	
				Cap	Art/ven			Cap	Art/ven		GE	
25-30	+++	+++	+	++	++							
39-42	++	+++	++	++	-		+	-	-	+++	++/ +++	
55-65	+++	+++	-/+++ ^o	-	+	+++	+	+	+		+++/ ++	++/ +/-
100-120	++	++	-	+/-	-	+++*/ ++		+/-	-		+++/ ++	-
120-150	-	+++	-	-	-	+++	+/-	++	+			
150-180	+	+++	-	-	-	+++*/ ++	++	+	+			
180-210	-	+++	-	-	-	+++*/ ++	++	-	-			
240	++	+++	-	-	-	+++	++	-	-			
270	++	+++	+	-	-	+++	++	-	-			

Referencias: *epitelio trofoblástico pseudoestratificado. ^o Inmunomarcación del estroma en la base de la copa endometrial

300	++	+++	-	-	-	+++	++	-	-		
-----	----	-----	---	---	---	-----	----	---	---	--	--

Todas las poblaciones celulares inmunomarcadas se caracterizaron por una expresión citoplasmática precisa de Ang-2, en tanto que la intensidad de marcación varió en los distintos tercios gestacionales.

En el primer tercio de preñez, el componente materno se caracterizó por una inmunomarcación citoplasmática moderada a intensa en el epitelio luminal del endometrio y el estroma endometrial, así como una marcación muy intensa del epitelio de las glándulas endometriales, especialmente en las que se encontraban cercanas al epitelio uterino, el endotelio de los vasos sanguíneos presento un patrón de marcación moderado a débil a medida que avanzaban los días de preñez (Fig.43 A y B).

En el componente fetal, encontramos una inmunolocalización citoplasmática moderada a intensa en el epitelio trofoblástico y una marcación débil del estroma alantoideo, así como de los endotelios de los vasos sanguíneos fetales.

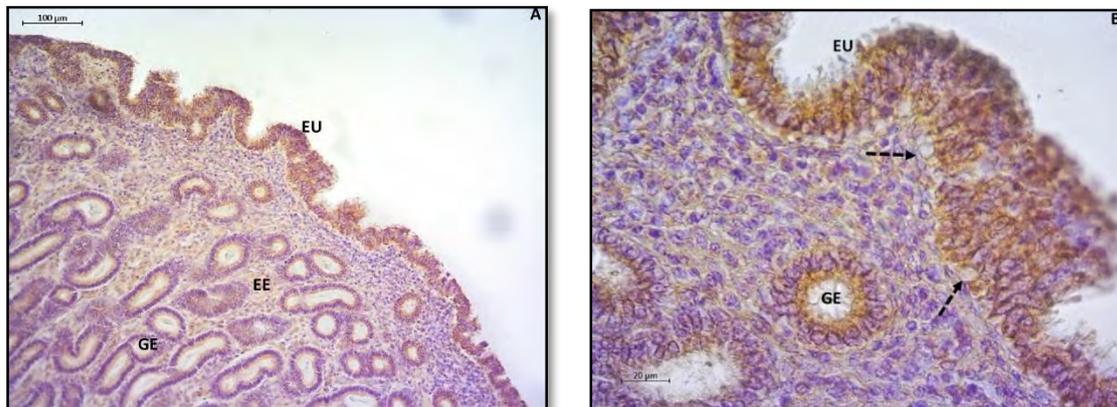


Fig.43: Inmunomarcación de Ang-2 en una sección de endometrio de una placenta equina de \pm 25-30 días de gestación (**A:** 100x; **B:** 400x). Nótese la fuerte marcación en el epitelio luminal del endometrio (b) capilares (flecha discontinua). **EU:** epitelio uterino; **GE:** glándulas endometriales; **EE:** estroma endometrial.

En el periodo de gestación temprana (\pm 39-42 días) hallamos que el patrón de marcación de las glándulas endometriales que se abren al epitelio endometrial para liberar su contenido histotrófico, mostraban una marcación intensa en la región basal y media y zonas de inmunomarcación débil a moderada en la región apical en contacto con el epitelio uterino. En este mismo estadio, se observó una gran zona con células trofoblásticas grandes y globosas correspondientes a las células fetales de la cintura coriónica penetrando el estroma

endometrial, estas células presentaron una inmunoreacción intensa para el factor de crecimiento proangiogénico (Fig.44 A-C).

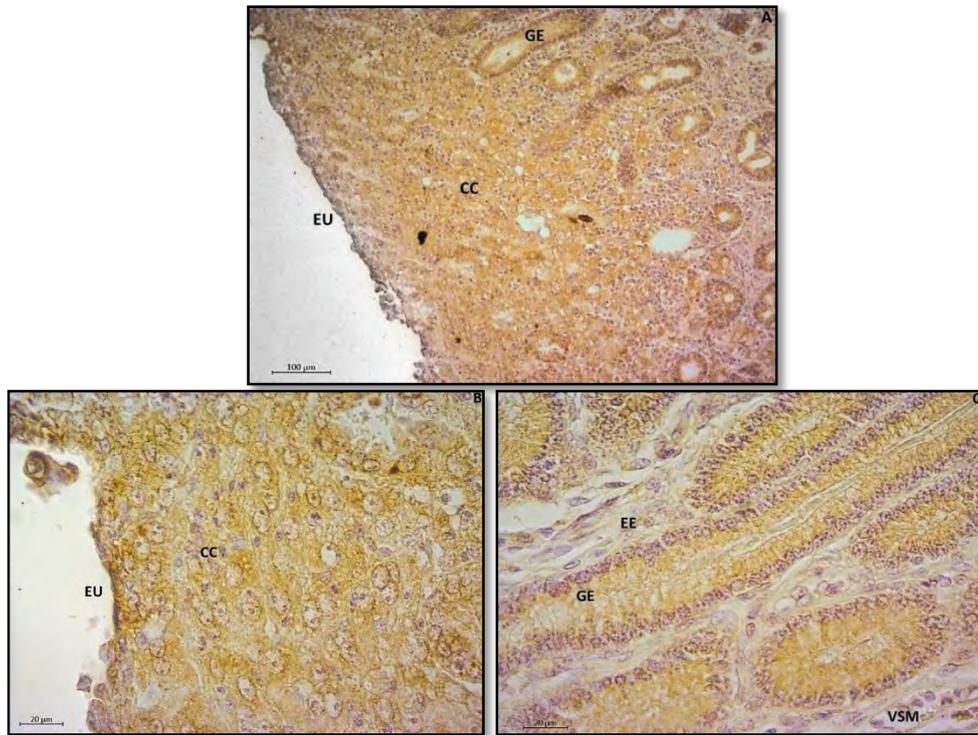


Fig.44: Inmunohistoquímica de ANG-2 en placenta equina de \pm 39-42 días de gestación (A: 100x; B y C: 400x;). Nótese la marcación intensa en las glándulas endometriales (c y d) y de las células de la cintura coriónica invadiendo el endometrio (b). EU: epitelio uterino; GE: glándulas endometriales; EE: estroma endometrial; VSM: vasos sanguíneos maternos; CC: células de la cintura coriónica.

La Fig.45 (A-C) correspondiente a los \pm 55-65 días de preñez, se observó la inmunolocalización de Ang-2 sobre las copas endometriales, en región apical de la copa endometrial se encontraron zonas alternadas de marcación moderada a intensa. Los epitelios de las glándulas endometriales presentes en la región apical de la copa madura presentaron una inmunoreacción moderada, en cambio las ubicadas en la región basal, distendidas y tortuosas no evidenciaron inmunomarcación o fue muy débil.

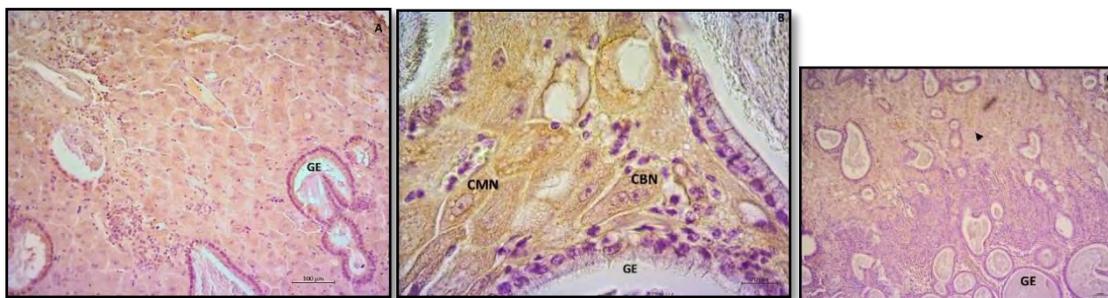


Fig.45: Inmunohistoquímica de ANG-2 de una copa endometrial de \pm 55-65 días de gestación (A: 100x; B: 400x; C: 50x). Se observan la masa densa de células gigantes (punta de flecha) y la marcación negativa de las glándulas de la base de la copa (c). EU: epitelio uterino, GE: glándulas endometriales; CMN: células trofoblásticas mononucleadas; CBN: células trofoblásticas binucleadas.

luminal del endometrio, el estroma endometrial y el endotelio de los vasos sanguíneos fueron negativos (Fig.46 A-D).

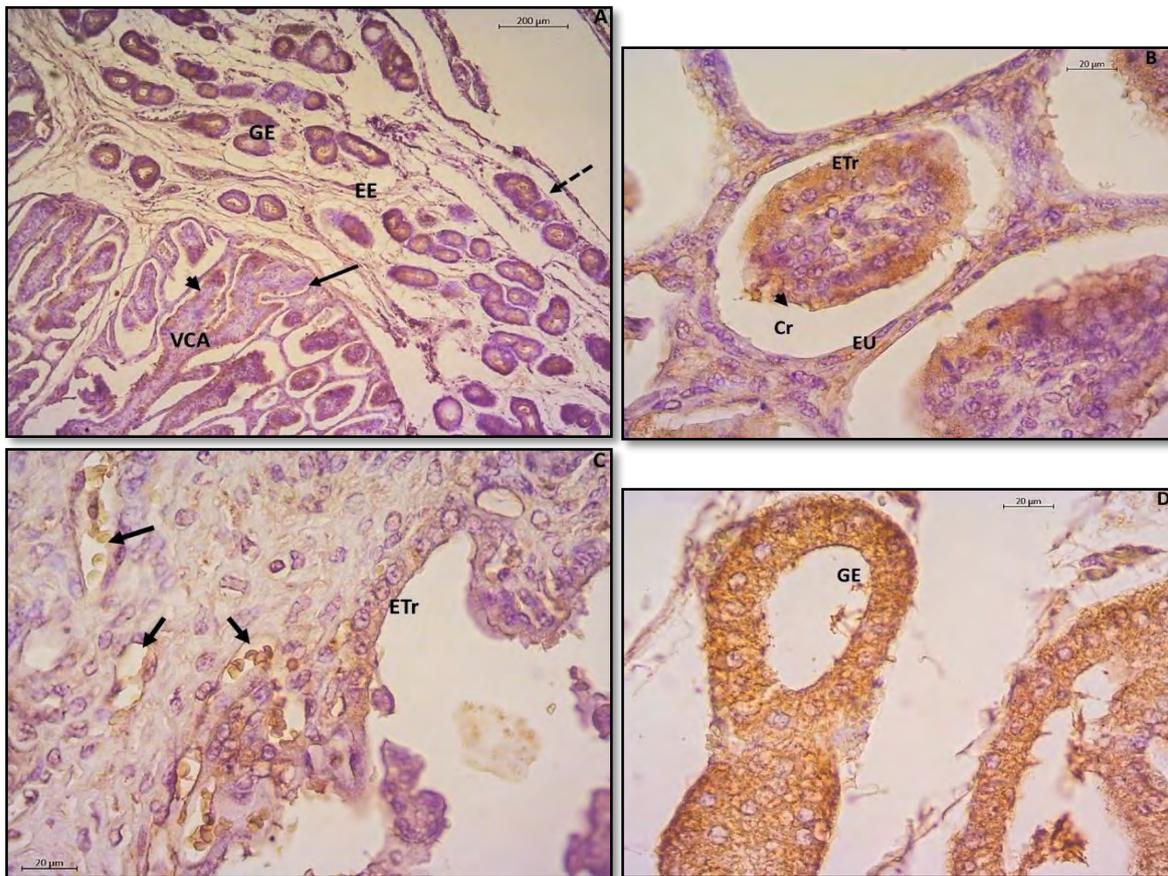


Fig.46: Inmunohistoquímica de Ang-2 en una placenta equina de \pm 120-150 días de gestación (A: 50x; B, C y D: 400x). Observe la marcada intensidad de marcación en el epitelio trofoblástico y el epitelio uterino negativo (b), capilares fetales (flechas), VCA: vellosidad corioalantoidea; Cr: cripta; ETr: epitelio trofoblástico (punta de flecha); EU: epitelio uterino (flecha); GE: glándulas endometriales; EE: estroma endometrial.

En el último periodo de gestación estudiado, se observó una inmunoreactividad moderada a intensa en las glándulas endometriales y débil a moderada en el epitelio uterino y el estroma endometrial. El corion presento una marcación intensa sobre todo en la región areolar, en las células trofoblásticas pseudoestratificadas, el estroma alantoideo presento una marcación moderada de las fibras colágenas y los endotelios de los vasos sanguíneos maternos y fetales fue negativo. También se encontró un patrón de inmunomarcación moderado en las fibras musculares lisas del miometrio (Fig.47 A-D).

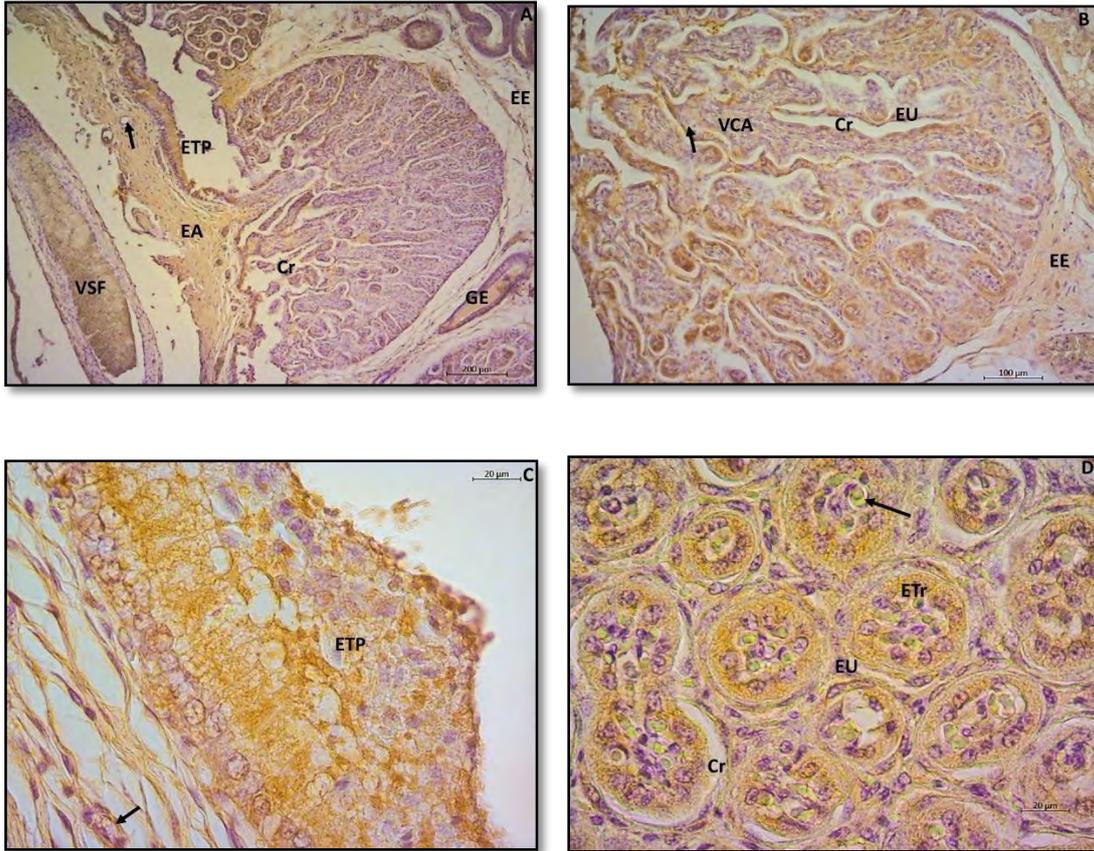


Fig.47: Imagen de tejido placentario equino con ensayo inmunohistoquímico para Ang-2 en interface materno-fetal de \pm 300 días de gestación (**A:** 50x; **B:** 100x; **C y D:** 400x;). Obsérvese la intensa marcación de las vellosidades corioalantoideas cortadas transversalmente (d) y del epitelio trofoblástico pseudoestratificado especializado en absorber el histotrófo (c), capilares (flecha). **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **EU:** epitelio uterino; **Cr:** cripta; **ETr:** epitelio trofoblástico (punta de flecha); **ETP:** epitelio trofoblástico pseudoestratificado; (flecha); **GE:** glándulas endometriales; **E:** estroma endometrial; **EA:** estroma alantoideo; **VS:** vaso sanguíneo.

5.9 Inmunolocalización del VEGF-R2 (Flk-1)

La distribución de Flk-1 en tejidos placentarios de yeguas mestizas detectada mediante inmunohistoquímica se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV: Inmunoreactividad de Flk-1 en los diferentes estadios gestacionales analizados (*Cap*: capilares; *Art/Vena*: Arterias, arteriolas, venas y vénulas; *GE*: Glándulas endometriales de las copas).

Parámetros Días de gestación aprox.	Epitelio luminal endometrio	Epitelio glandular	Estroma Endometrial	Endotelio materno		Trofoblasto	Estroma alantoides	Endotelio fetal		Células de la cintura coriónica	Células de las copas endometriales	
				Cap	Art/ven			Cap	Art/ven		GE	
25-30	++	-/+	-	+/-	-	+++	-					
39-42	+++	+/+++	-	+/ ++	-					++/ +		
55-65	++	+	-	+/ ++	-	+++	-	++/ +	+/-		-	++
100-120	-	+	-	-	-	-	-	+/-	-		-	-
120-150	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
150-180	-	+/-	-	+/-	-	+	-	-	-			
180-210	-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-			
240	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-			
270	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-			
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

En la etapa temprana de la preñez, se observó una moderada a intensa inmunomarcación en la región apical y los cilios de las células del epitelio luminal del endometrio, presentando una marcación intensa en el periodo de \pm 39-42 días de preñez. Las glándulas endometriales presentaron una inmunoreacción moderada a intensa en la región adyacente al epitelio luminal, y una inmunomarcación más débil, e incluso negativa, en el estrato esponjoso basal del endometrio. Fue interesante hallar que, en ciertas glándulas, hubo una marcación específica del receptor VEGF-R2 en algunas células y las colindantes fueron totalmente negativas (Fig.48 G). También se observó una marcación moderada a intensa de la secreción contenida dentro de las glándulas, más marcada en las glándulas adyacentes al epitelio luminal. En el periodo de \pm 39-42 días de gestación, fue notable hallar una marcación muy intensa del receptor en los pliegues que forma el endometrio, tanto de las células del epitelio luminal como de las glándulas endometriales adyacentes (Fig.48 A, B y C).

El estroma endometrial y alantoideo no reveló inmunomarcación (Fig.48). El citoplasma de las células trofoblásticas presentes en los estadios de \pm 55-65 días, evidenciaron una inmunomarcación intensa (Fig.50). Es de destacar que las células trofoblásticas pseudoestratificadas de las areolas, presentaron una marcación menor (+) que el corion adyacente. El receptor Flk-1 se inmunomarcó de manera variable en el endotelio de los vasos sanguíneos maternos y fetales, presentando una marcación negativa en las arterias y venas, a diferencia de los capilares que mostraron marcaciones moderada e intensa y algunos fueron negativos (Fig.48 H).

En la Fig.48 (E-F) se presenta una placenta de \pm 39-42 días, justo en el momento en que se está iniciando la placentación, las células de la cintura coriónica que comienzan a invadir el endometrio para formar las futuras copas endometriales presentaron una inmunomarcación débil y moderada, en cambio a los \pm 55-65 días, el citoplasma de las células trofoblásticas especializadas CMN y CBN no presentaron marcación para Flk-1. En estos estadios, el epitelio de las glándulas endometriales presentes en la copa endometrial joven evidenció una inmunoreacción moderada y algunos capilares presentes en el tejido fueron negativos y otros positivos débilmente para el receptor angiogénico (Fig.49).

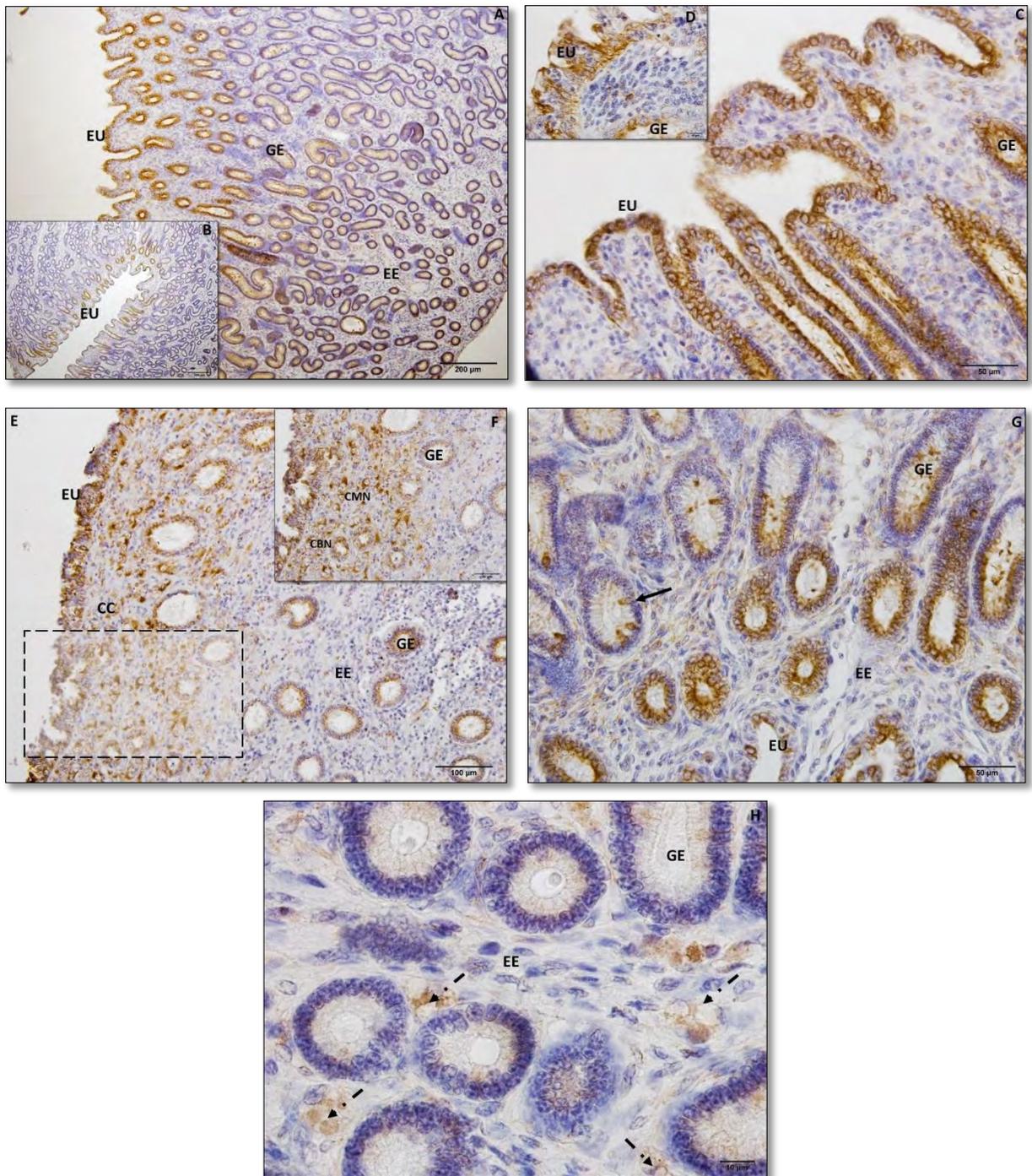


Fig.48: Inmunohistoquímica anti-Flk-1 de interfase materno-fetal equina de \pm 39-42 días de gestación (A y B: 100x; E: 200x; C, F y G: 400x; D y H: 1000x). En la figura (b) se observa un pliegue endometrial donde se nota mayor intensidad de marcación en las células del epitelio uterino. Nótese en la figura (g) las diferentes intensidades en las células colindantes de las glándulas endometriales y en la figura (h) la marcación del receptor en los capilares maternos (flecha discontinua). EU: epitelio uterino; GE: glándulas endometriales; EE: estroma endometrial; CC: cintura coriónica; CMN: células trofoblásticas mononucleadas; CBN: células trofoblásticas binucleadas.

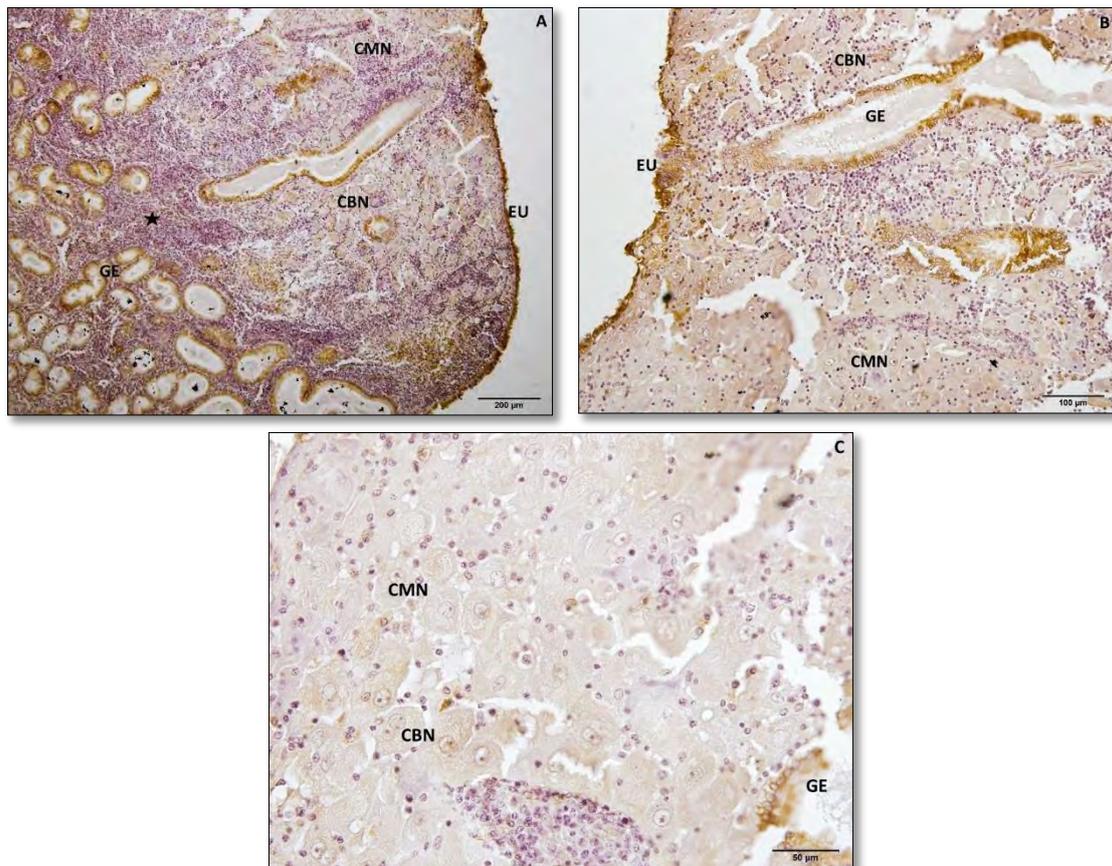


Fig.49: Inmunohistoquímica de Flk-1 en una copa endometrial equina de \pm 55-65 días de gestación (A: 100x; B: 200x; C:400x;). Se observa la intensa marcación del epitelio de las glándulas endometriales. Infiltrado linfocítico (estrella). EU: epitelio uterino; GE: glándulas endometriales; CMN: células trofoblásticas mononucleadas; CBN: células trofoblásticas binucleadas.

En los tejidos correspondientes al final del primer tercio de gestación (\pm 100-120 días), solo se observó inmunomarcación del receptor en el epitelio glandular del endometrio y en ciertos capilares fetales.

Durante el segundo y tercer tercio de preñez, solo se detectó marcación débil del receptor Flk-1 del VEGF, en las glándulas endometriales y en ciertos capilares fetales. En el epitelio glandular persistió el patrón de inmunomarcación de ciertas células de forma moderada mientras que las células vecinas correspondientes a la misma glándula endometrial, no revelaron inmunoreacción del receptor (Fig.50 y 51).

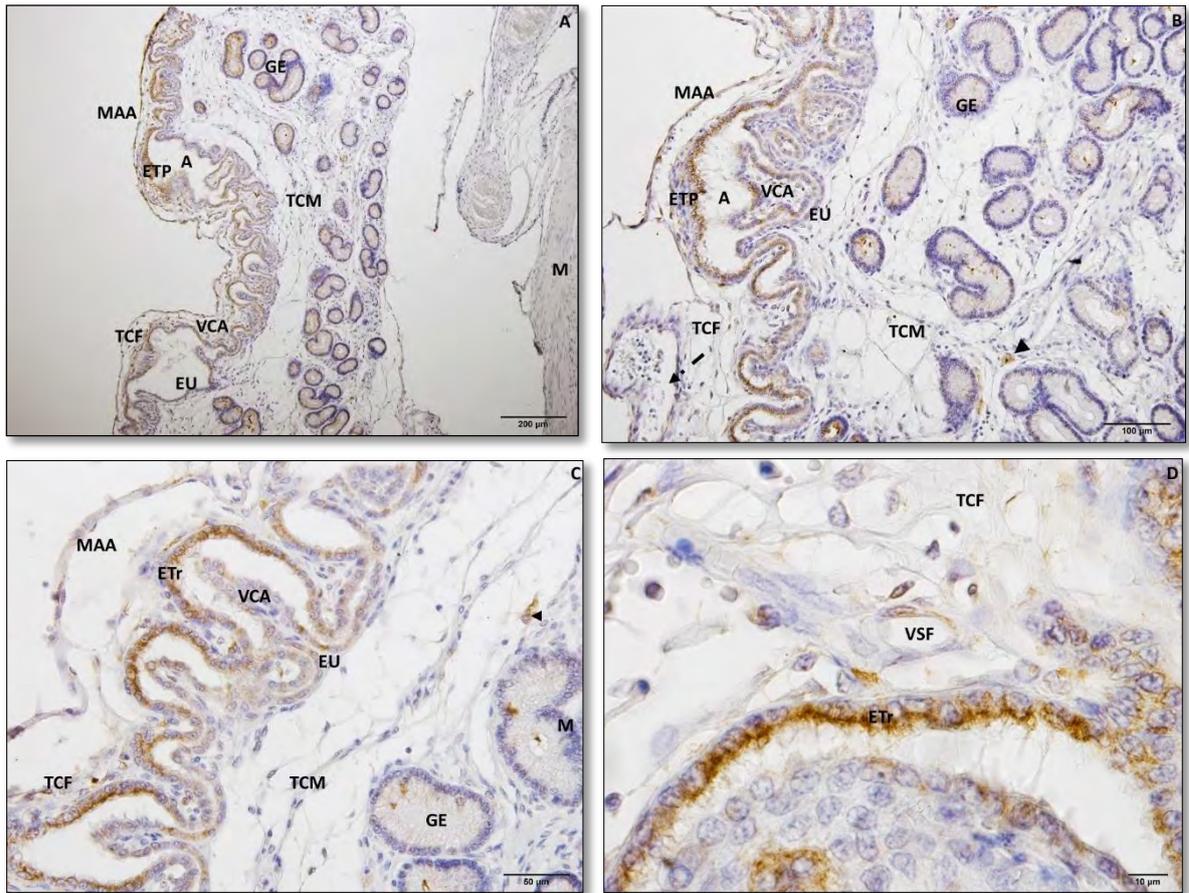


Fig.50: Inmunolocalización de Flk-1 en interfase materno-fetal equina de \pm 55-65 días de gestación (**A:** 100x; **B:** 200x; **C:**400x; **D:**1000x). Nótese la intensa marcación del epitelio trofoblástico y la variabilidad de la intensidad de marcación en las células de las glándulas endometriales. En la figura (d) se observa un capilar alantoideo intensamente marcado con el receptor de VEGF. Arteria alantoidea (flecha discontinua), capilares maternos (punta de flecha) **ETP:** epitelio trofoblástico pseudoestratificado; **A:** areola; **ETr:** epitelio trofoblástico; **EU:** epitelio uterino; **GE:** glándulas endometriales; **M:** miometrio; **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **MAA:** membrana alantoamniótica; **TCM:** tejido conectivo materno; **TCF:** tejido conectivo fetal; **VSF:** vaso sanguíneo fetal.

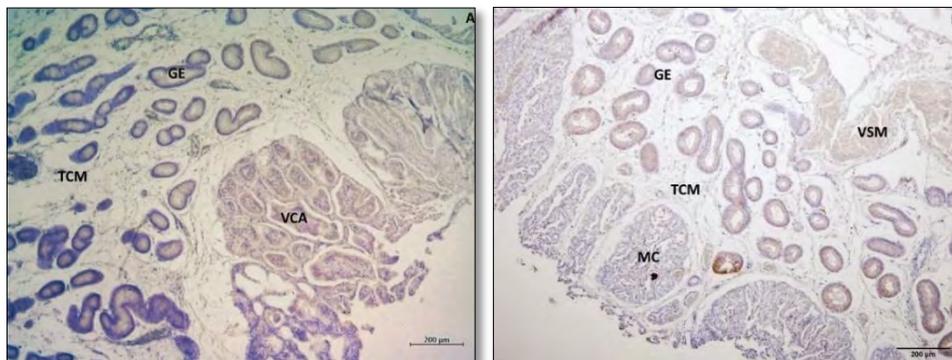


Fig.51: Determinación de Flk-1 en placenta equina de \pm 150-180 días de gestación por medio de inmunohistoquímica (**A:** 50x; **B:** 100x). Nótese la débil inmunomarcación de las glándulas endometriales y del epitelio luminal. **MC:** microcotiledones; **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **VSM:** vaso sanguíneo materno; **GE:** glándulas endometriales; **TCM:** tejido conectivo materno.

En la Fig.52 se muestra una interfase materno-fetal de \pm 300 días de gestación en donde cabe resaltar la marcación negativa del VEGF-R2 en todo el tejido.

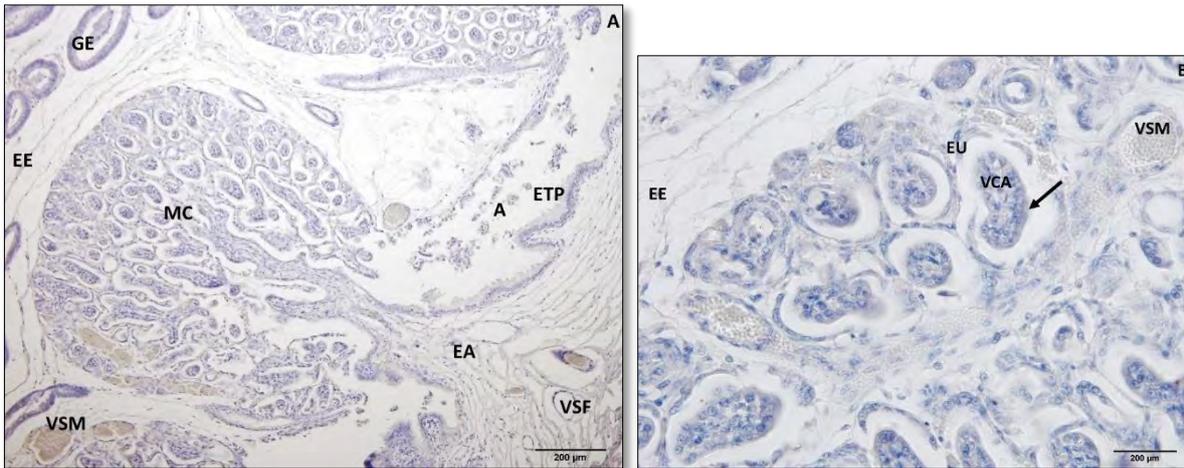


Fig.52: Imagen de tejido placentario equino con ensayo inmunohistoquímico para Flk-1 en interfase materno-fetal de \pm 300 días de gestación (**A:** 100x; **B:** 400x). Cripta uterina (flecha) **EU:** epitelio uterino; **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **GE:** glándulas endometriales; **ETP:** epitelio trofoblástico pseudoestratificado; **A:** areola; **EE:** estroma endometrial; **EA:** estroma alantoideo; **VSM:** vaso sanguíneo materno; **VSF:** vaso sanguíneo fetal.

5.10 Inmunolocalización de Tie-2

A través de la técnica inmunohistoquímica se detectó el receptor de Ang-2 en los tejidos placentarios de yeguas mestizas en todos los periodos gestacionales estudiados. La distribución se muestra en la Tabla V.

Todas las poblaciones celulares investigadas inmunohistoquímicamente se caracterizaron por una expresión citoplasmática precisa de Tie-2, en tanto que la intensidad de marcación varió en los distintos tercios gestacionales.

Tabla V: Inmunoreactividad de Tie-2 en los diferentes estadios gestacionales analizados (Cap: capilares; Art/Vena: Arterias, arteriolas, venas y vénulas; GE: Glándulas endometriales de las copas).

Parámetros Días de gestación aprox.	Epitelio luminal endometrio	Epitelio glandular	Estroma Endometrial	Endotelio materno		Trofoblasto	Estroma alantoides	Endotelio fetal		Células de la cintura coriónica	Células de las copas endometriales	
				Cap	Art/ven			Cap	Art/ven		GE	
25-30	+ / +++	+++	-	- / + / ++	-	++	-					
39-42	+ / -	+ / -	-	++ / +++	-					+		
55-65	+ / +++	+++	-	+ / -	-	++ / + ++	-	++ / -	-		+++ / ++ / + / -	++
100-120	-	+	-	+ / -	+ / -	++	-	+	-		+ / -	-
120-150	-	++	-	+ / -	-	++	-	+ / -	-		-	-
150-180	-	++	-	+ / -	+ / -	+++	-	+ / -	-			
180-210	+	+++	-	+ / ++	+ / -	+++	+	++ / +	-			
240	+	+++	-	+ / ++	-	+++	-	+	-			
270	+	++	-	+ / ++ / -	+ / -	++	-	+	-			
300	-	++ / +	-	-	-	++	+	++ / ++	-			

En el primer tercio de preñez, el componente materno se caracterizó por una inmunomarcación citoplasmática leve a moderada en el epitelio luminal del endometrio, así como una marcación variable del epitelio de las glándulas endometriales. En el periodo de gestación temprana ($\pm 25-30$ y $\pm 39-42$ días) las glándulas que se encontraban cercanas al epitelio uterino, presentaron una marcación más débil que las glándulas presentes en la parte basal del útero equino, en esta región se encontró mayor densidad glandular y la inmunoreacción del receptor Tie-2 fue de moderada a intensa (Fig.53 y 54). El endotelio de los vasos sanguíneos presento un patrón de marcación variable siendo negativo en los grandes vasos y moderado a intenso en los capilares sanguíneos (Fig.54 C y D). El estroma endometrial fue negativo para la inmunohistoquímica del receptor, en cambio las fibras del musculo circular interno del miometrio fueron positivas intensamente (Fig.53 B).

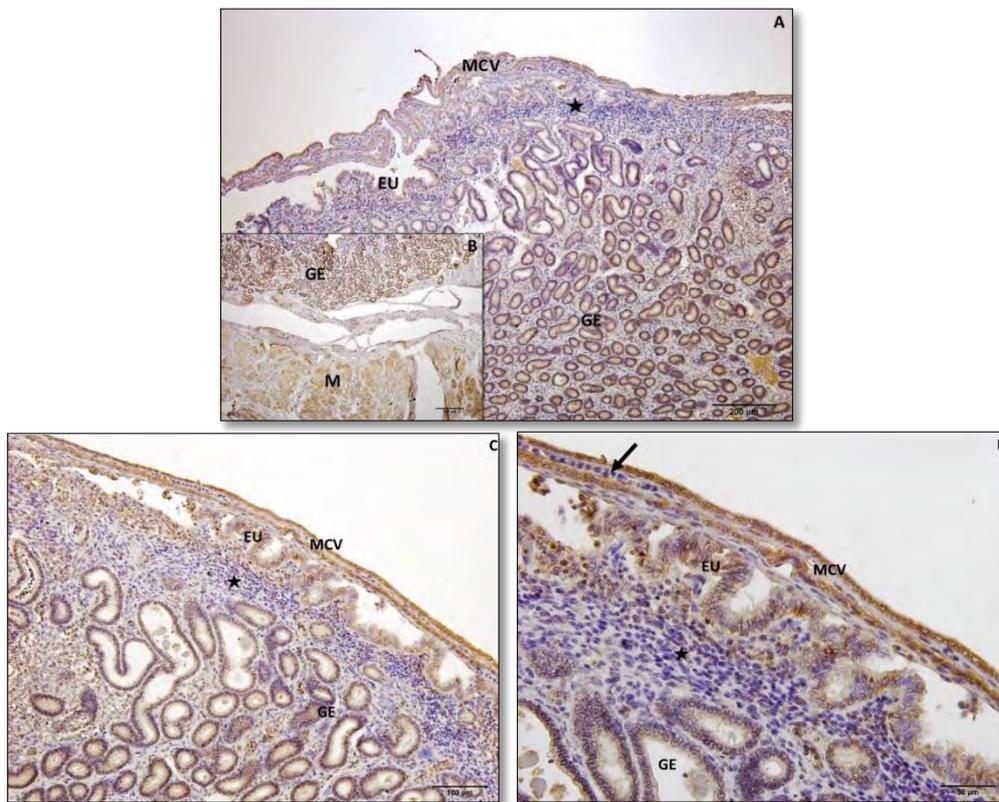


Fig. 53: Inmunomarcación de Tie-2 en interfase materno-fetal de $\pm 25-30$ días de gestación (**A y B:** 100x; **C:** 200x; **D:** 400x). Obsérvese la fuerte marcación de la membrana coriovitelina y de las fibras musculares lisas del miometrio. En la figura (d) se observa las células vasculares primitivas nucleados (flecha), también se nota el típico infiltrado linfocítico de este periodo gestacional (estrella). **EU:** epitelio uterino; **GE:** glándulas endometriales; **MCV:** membrana coriovitelina; **M:** miometrio.

En el componente fetal, encontramos una inmunolocalización citoplasmática moderada a intensa en la membrana coriovitelina y una marcación negativa de las fibras conectivas del estroma alantoideo. Los vasos sanguíneos fetales mostraron una inmunomarcación variable

del endotelio, siendo los capilares positivos y las arterias y venas negativas para el receptor de las angiopoyetinas (Fig.53 y 54).

A los \pm 39-42 días de gestación, se observó que las células de la cintura coriónica presentaron una marcación débil para Tie-2 y que las glándulas endometriales interdigitadas con las células especializadas estaban inmunomarcadas levemente (Fig.54). En este periodo fue notable observar la intensa afinidad del receptor por el endotelio de los capilares maternos.

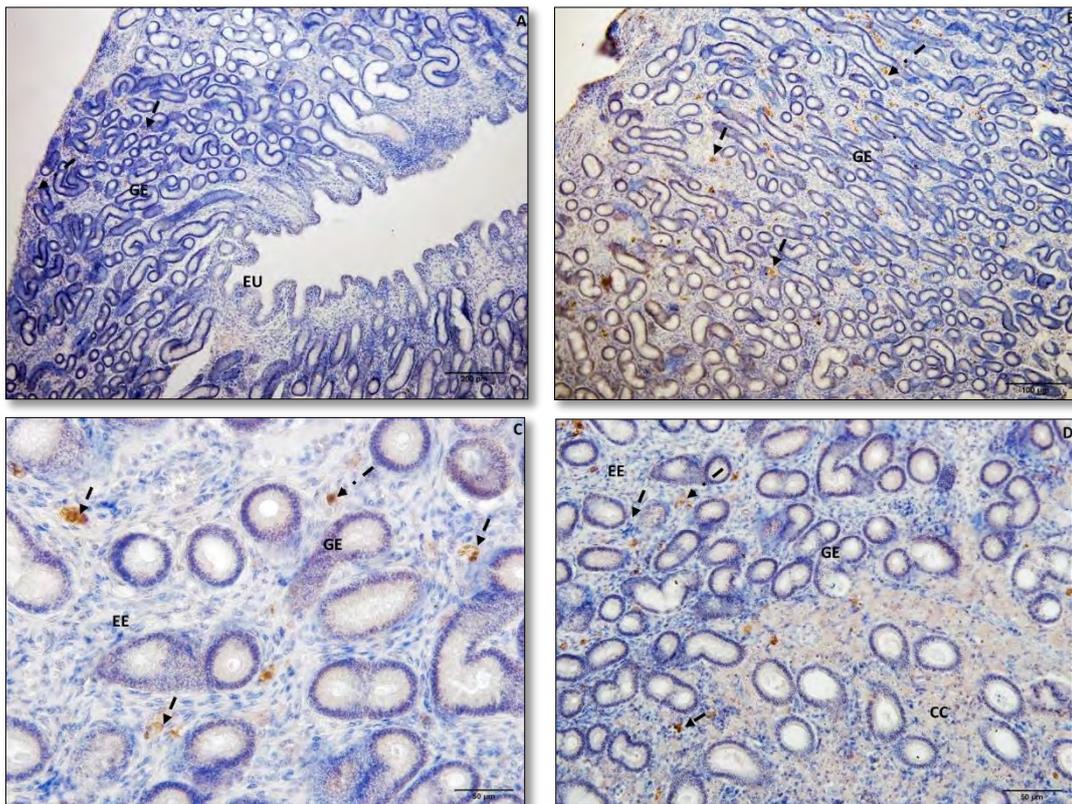


Fig.54: Inmunohistoquímica de Tie-2 en placenta equina de \pm 39-42 días de gestación (A: 100x; B: 200x; C Y D:400x;). Nótese la marcación intensa del endotelio de los capilares maternos (flecha discontinua) y la marcación débil de las células especializadas de la cintura coriónica invadiendo el endometrio (d). EU: epitelio uterino; GE: glándulas endometriales; EE: estroma endometrial; CC: células de la cintura coriónica.

La Fig.55 muestra microfotografías correspondientes a los \pm 55-65 días de preñez, en este periodo se observó la inmunolocalización de Tie-2 sobre las células de las copas endometriales jóvenes. En la región apical de la copa endometrial se encontraron zonas alternadas de inmunoreacción moderada a intensa y un patrón característico de marcación granular en las células mononucleadas y binucleadas. El epitelio de las glándulas endometriales presentes en la región apical de la copa madura presentó una marcación

moderada a intensa, en cambio las ubicadas en la región basal, distendidas y tortuosas no evidenciaron inmunoreacción o fue muy débil. Se encontró una marcación moderada de los capilares sanguíneos presentes en las copas endometriales jóvenes. En cambio, las copas correspondientes a los estadios finales del primer tercio de la preñez, no presentaron inmunomarcación de las CMN y CBN ni de las glándulas endometriales presentes.

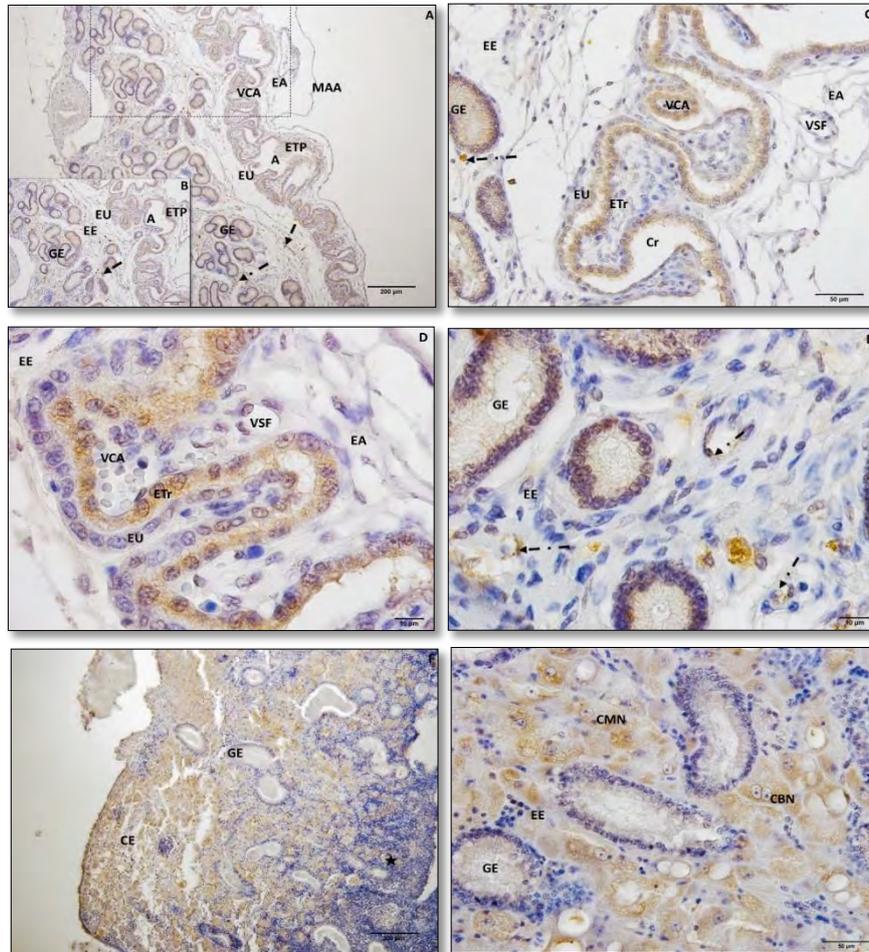


Fig.55: Inmunolocalización de Tie-2 en interfase materno-fetal equina de \pm 55-65 días de gestación (A y F: 100x; B, C y G: 400x; D y E: 1000x). Nótese la intensa marcación del epitelio trofoblástico (d). También se observa la variabilidad de marcación en las células trofoblásticas especializadas de la cintura coriónica (g). En la figura (e) se observan gran cantidad de capilares maternos inmunomarcados con el receptor de VEGF (flecha discontinua). Infiltrado leucocítico (estrella). **ETP:** epitelio trofoblástico pseudoestratificado; **A:** areola; **ETr:** epitelio trofoblástico; **Cr:** cripta; **EU:** epitelio uterino; **GE:** glándulas endometriales; **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **MAA:** membrana alantoamniótica; **VSF:** vaso sanguíneo fetal; **EE:** estroma endometrial; **EA:** estroma alantoideo; **CE:** copa endometrial; **CMN:** células trofoblásticas mononucleadas; **CBN:** células trofoblásticas binucleadas.

En la mitad de la gestación se encontró el mismo patrón de localización de Tie-2 para el componente fetal, en cambio en la región materna cabe destacar que el epitelio luminal del

endometrio no presento marcación y solo al final del segundo tercio la inmunoreacción fue débil (Fig.56).

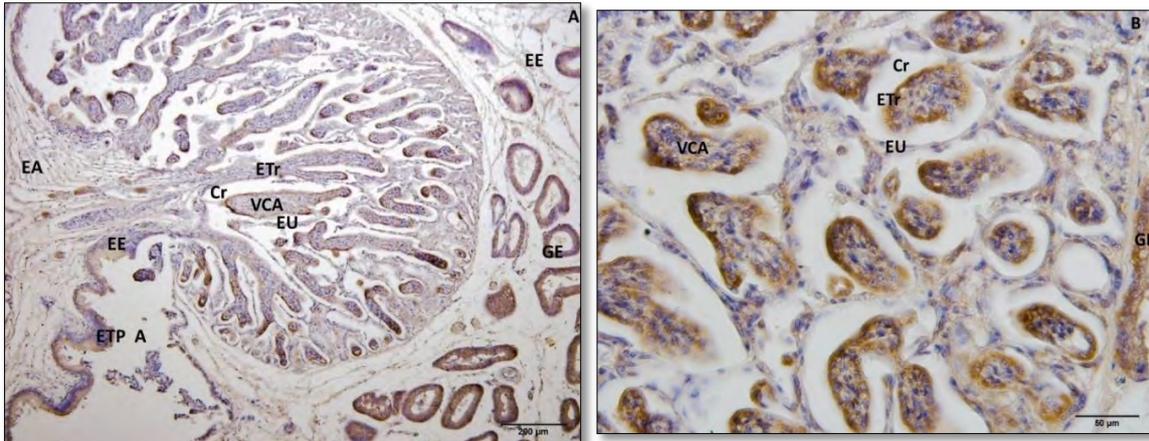


Fig.56: Determinación de Tie-2 en placenta equina de \pm 180-210 días de gestación por medio de inmunohistoquímica (A: 100x; B: 400x). En las imágenes se observa la intensa marcación del epitelio trofoblástico. EU: epitelio uterino; GE: glándulas endometriales; ETP: epitelio trofoblástico pseudoestratificado; A: areola; ETr: epitelio trofoblástico; Cr: cripta; VCA: vellosidad corioalantoidea; EE: estroma endometrial; EA: estroma alantoideo.

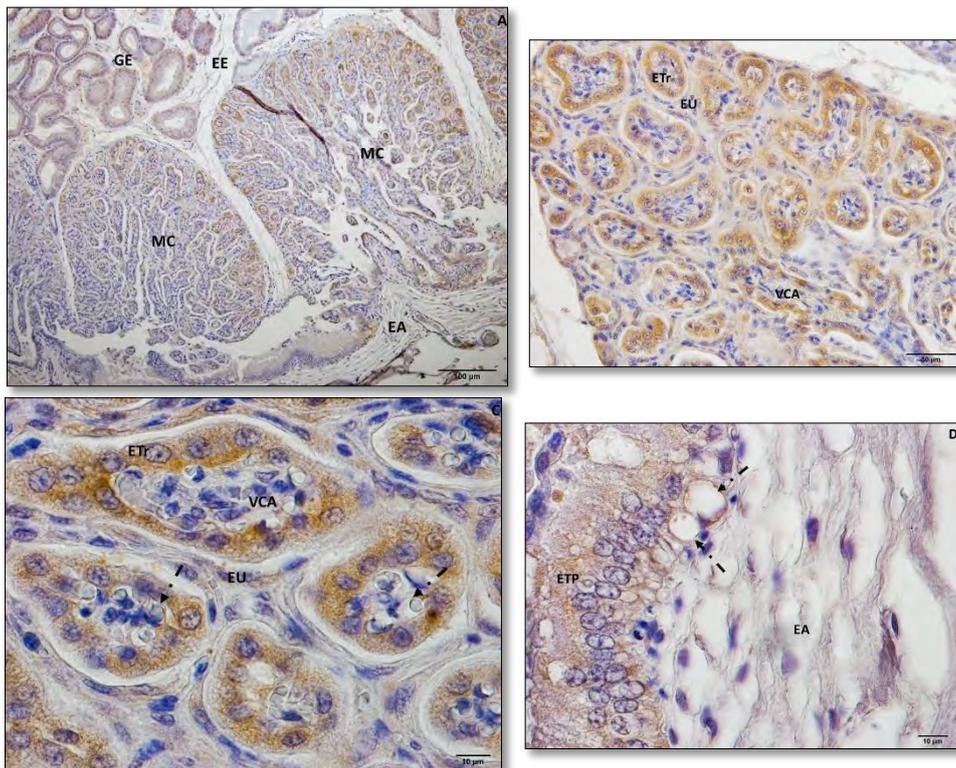


Fig.57: Imagen de tejido placentario equino con ensayo inmunohistoquímico para Tie-2 en interfase materno-fetal de \pm 240 días de gestación (A: 200x; B: 400x; C y D: 1000x). Capilares fetales (flecha discontinua). MC: microcotiledón; VCA: vellosidad corioalantoidea; EU: epitelio uterino; ETP: epitelio trofoblástico pseudoestratificado; GE: glándulas endometriales; EA: estroma alantoideo.

En el último periodo de gestación, se observó una inmunoreactividad moderada a intensa en las glándulas endometriales y débil en el epitelio luminal del endometrio. Los vasos sanguíneos maternos presentaron una inmunomarcación variable del receptor. El estroma endometrial fue negativo para Tie-2.

En la región fetal, el corion presento una inmunomarcación moderada a intensa, evidenciándose la particularidad de que, en una misma vellosidad placentaria, se encontraron células positivas y células negativas para el receptor. El estroma alantoideo presento una marcación débil de las fibras colágenas en la etapa de 300 días de preñez, en cambio en los otros periodos fue negativo. También se encontró un patrón de inmunomarcación variable en los capilares fetales, a diferencia de arterias y venas que fueron negativas para Tie-2 (Fig.57 A-D).

5.11 Determinación de proliferación placentaria

A través de la técnica inmunohistoquímica se detectó PCNA en el núcleo de las células placentarias y endometriales en todos los periodos gestacionales estudiados (Fig.61). Se analizaron 300 campos al azar y más de 17.000 células a lo largo de la gestación.

En yeguas preñadas del primer tercio de la gestación, encontramos que las células especializadas del trofoblasto correspondientes a la cintura coriónica, presentaron casi la totalidad de las células en estado proliferativo (97,44%). Con respecto a las células mononucleadas y binucleadas de las copas endometriales ya maduras, hallamos una manifiesta disminución en el porcentaje de marcación con PCNA (25,83%). Se observó también inmunomarcación nuclear de los linfocitos y del estroma presentes en la base de las copas endometriales.

En relación a las células del epitelio luminal del endometrio, las pruebas estadísticas revelaron diferencias significativas entre los trimestres ($p=0,0339$). El test *a posteriori* reveló una reducción significativa del IPr (índice de proliferación) en el segundo y tercer trimestre, en comparación al primero (Fig.58). A nivel descriptivo se observó que la base de los surcos endometriales que se forman en la preñez temprana (\pm 39-42 días) se encuentran en avanzado estado proliferativo. En este estadio también se visualizaron núcleos positivos a PCNA en las células del miometrio.

El ANOVA realizado para las glándulas endometriales arrojó diferencias estadísticamente significativas en el IPr entre los trimestres de la gestación analizados ($p=0,0272$). El análisis post hoc reveló una disminución significativa del IPr en el tercer y segundo trimestre, en relación al primer tercio gestacional (Fig.59). Fue interesante observar que en el estadio \pm 39-42 días de gestación, las glándulas endometriales que se encontraban en el estrato compacto del endometrio presentaron proliferación celular, en cambio las células de las porciones glandulares presentes en el estrato esponjoso presentaron muy pocos núcleos positivos a PCNA.

En cuanto a la detección de células trofoblásticas con fragmentación del ADN, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los trimestres estudiados ($p=0,0261$). El test *a posteriori* reveló un incremento significativo del IPr en el primer trimestre, en relación al segundo y tercer tercio gestacional, mientras que estos últimos no mostraron diferencias entre ellos (Fig.60).

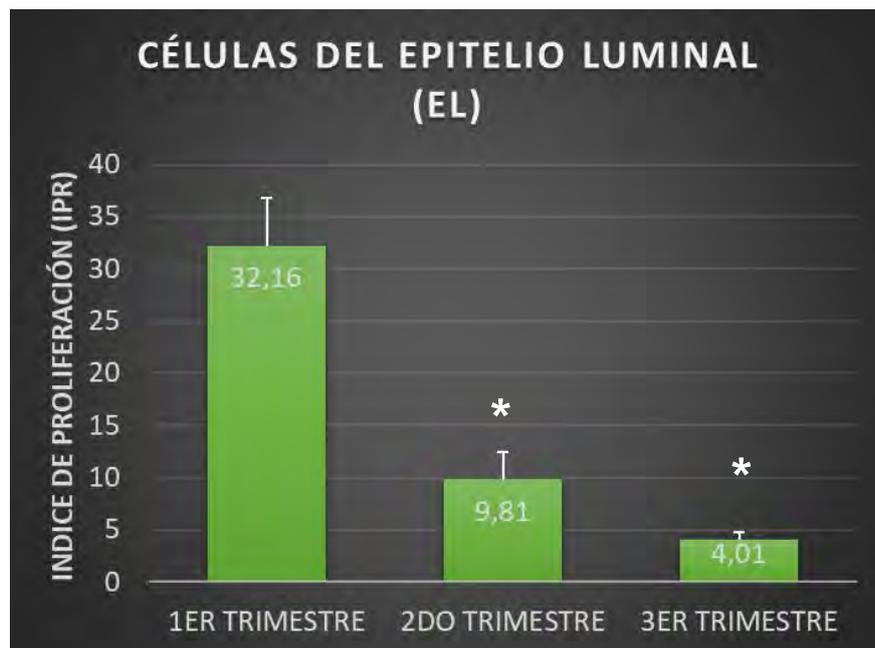


Fig.58: Variación del IPr en las células del epitelio luminal del endometrio durante los tercios gestacionales en la preñez equina. Las barras representan las medias de los porcentajes de IPr \pm SD. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$).

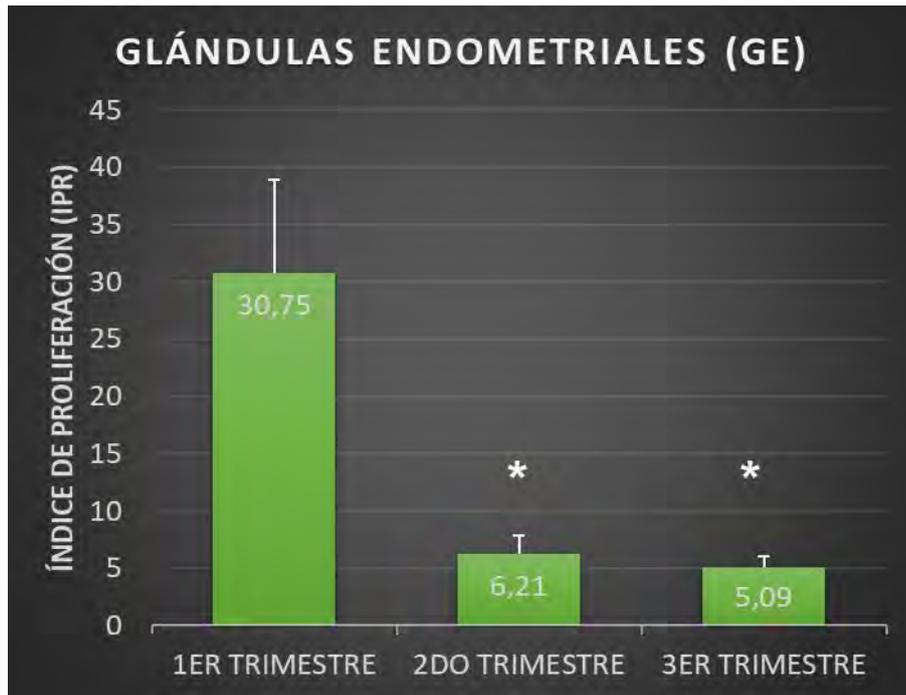


Fig.59: Variación del IPr en las células del epitelio glandular del endometrio a lo largo de la preñez equina. Las barras representan las medias de los porcentajes de IPr \pm SD. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

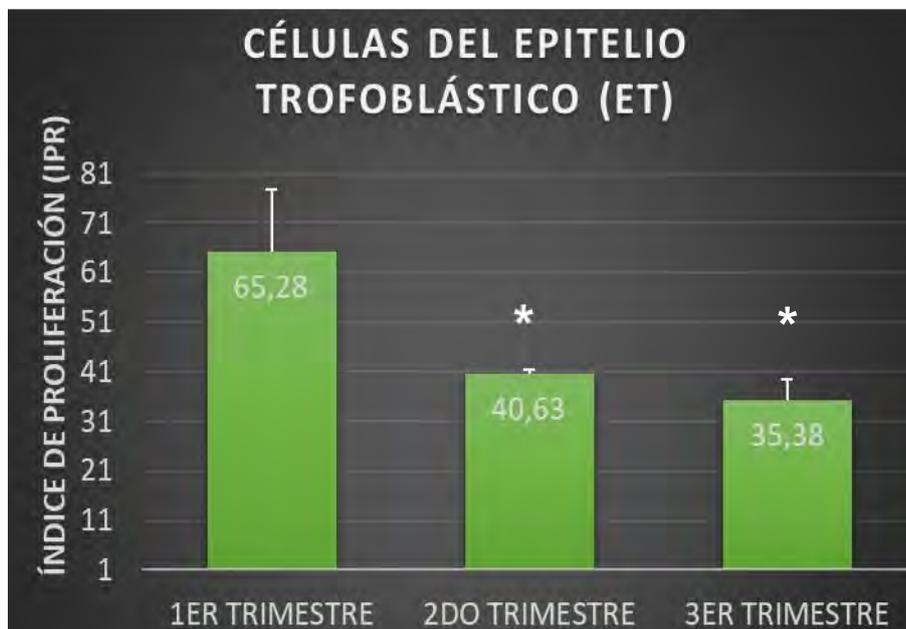


Fig.60: IPr en las células del epitelio trofoblástico en los distintos tercios gestacionales de yeguas mestizas. Las barras representan las medias de los porcentajes de IPr \pm SD. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

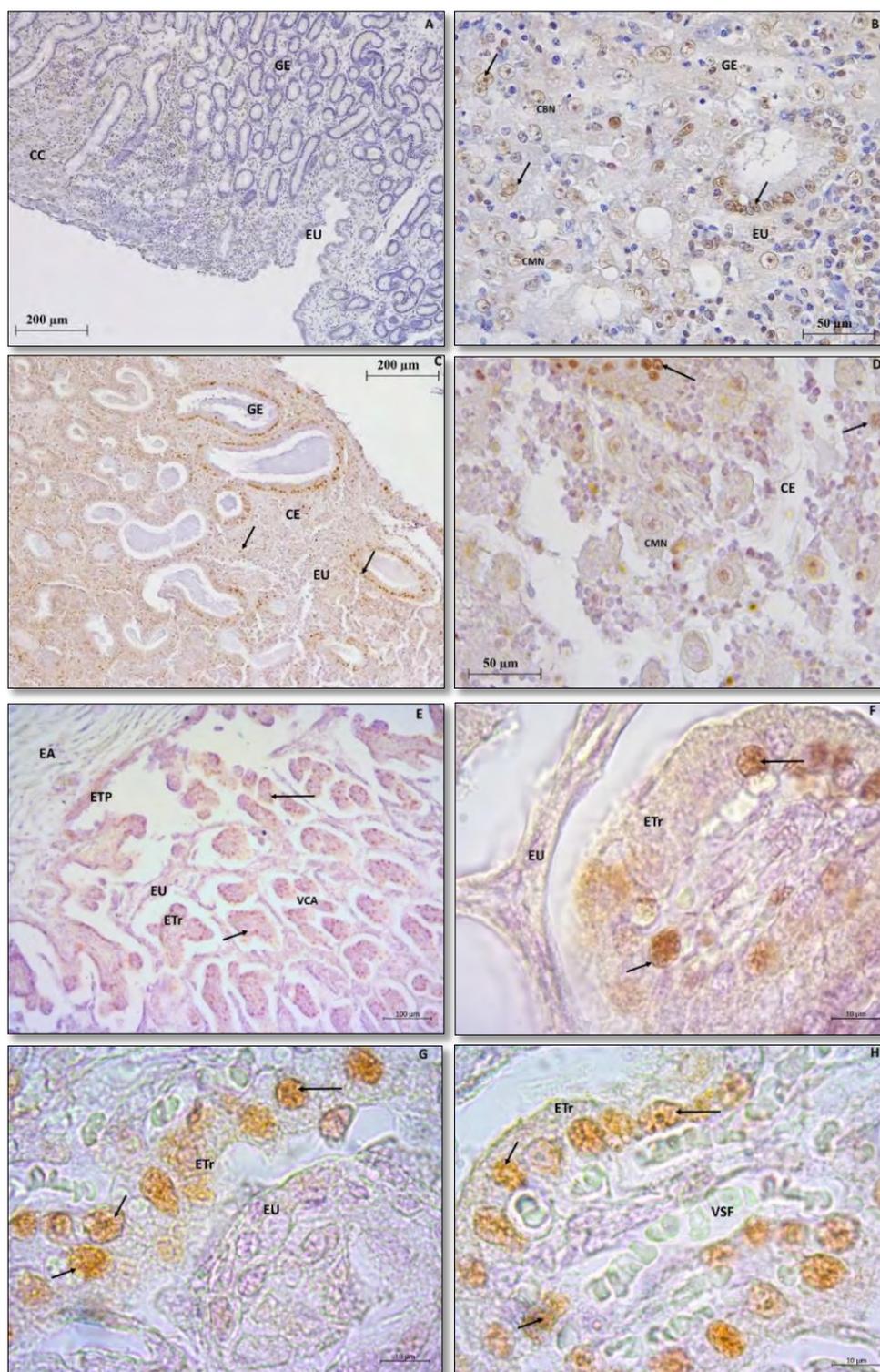


Fig.61: Inmunolocalización del antígeno nuclear de proliferación celular a lo largo de la placentación normal en yeguas mestizas (**A:** 100x; **B, D y E:** 400x; **C, F, G y H:** 1000x). Los núcleos positivos a PCNA se encuentran inmunomarcados de color marrón (flecha). **A y B:** ± 39-42 días; **C y D:** ± 55-65 días; **E:** ± 180-210 días; **F:** ± 120-150 días; **G y H:** ± 240 días de preñez. **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **EU:** epitelio uterino; **ETr:** epitelio trofoblástico; **ETP:** epitelio trofoblástico pseudoestratificado; **GE:** glándulas endometriales; **EE:** estroma alantoideo; **CC:** cintura coriónica; **CE:** copa endometrial; **CMN:** células trofoblásticas mononucleadas; **CBN:** células trofoblásticas binucleadas; **VSF:** vaso sanguíneo fetal.

5.12 Determinación de apoptosis placentaria

A través de la técnica inmunohistoquímica se detectó Caspasa-3 en el citoplasma de las células de la interfase materno-fetal en todos los trimestres de la gestación analizados y en el citoplasma de las células trofoblásticas especializadas del alantocorion invasivo durante el primer tercio de la gestación (Fig.63).

El primer tercio de preñez se caracterizó por una inmunomarcación citoplasmática moderada a intensa en la región apical de las células fetales de la membrana coriovitelina y a medida que avanzan los días de preñez, en las células trofoblásticas de la membrana corioalantoidea.

En el componente materno, encontramos una inmunolocalización leve a moderada del epitelio luminal del endometrio, así como una marcación variable del epitelio de las glándulas endometriales (Fig.64 A y B).

Con respecto a las células trofoblásticas especializadas del alantocorion invasivo se analizaron más de 1000 células a lo largo de este periodo encontrando que las células de la cintura coriónica presentes en las muestras tuvieron un promedio de 30,87% de células positivas a Cas-3 entre las células viables.

El número de las células inmunomarcadas positivamente a Cas-3 en las células de la cintura coriónica fue menor que el hallado en las células de la copa endometrial joven, en estas células se observó un patrón variable de marcación de moderada a intensa y se encontró un 48,42% de células apoptóticas. Las glándulas endometriales fúndicas y tortuosas presentes en las copas endometriales, presentaron un 64,22% de células en avanzado grado de muerte celular programada.

A nivel descriptivo, en el segundo y tercer trimestre de gestación continuo el patrón de intensidad de marcación en el componente fetal, siendo en algunas zonas leve a moderado. Sin embargo, se observó una disminución en la intensidad de inmunoreacción contra Cas-3 en el componente materno (Fig.64 C), evidenciándose en ciertas zonas nula y en otras áreas leve. El epitelio de las glándulas endometriales presentó una marcación moderada a intensa en ciertas células y otras correspondientes a la misma glándula fueron totalmente negativas.

El ANOVA y el test DGC, realizado para comparar HSCORE de la inmunohistoquímica para Cas-3 de cada período estudiado, mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre los diferentes tiempos gestacionales. Hubo un aumento en los valores de HSCORE de Cas-3 en el primer tercio de gestación en comparación con el segundo y tercer

trimestre de preñez, en el cual no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Fig.62).

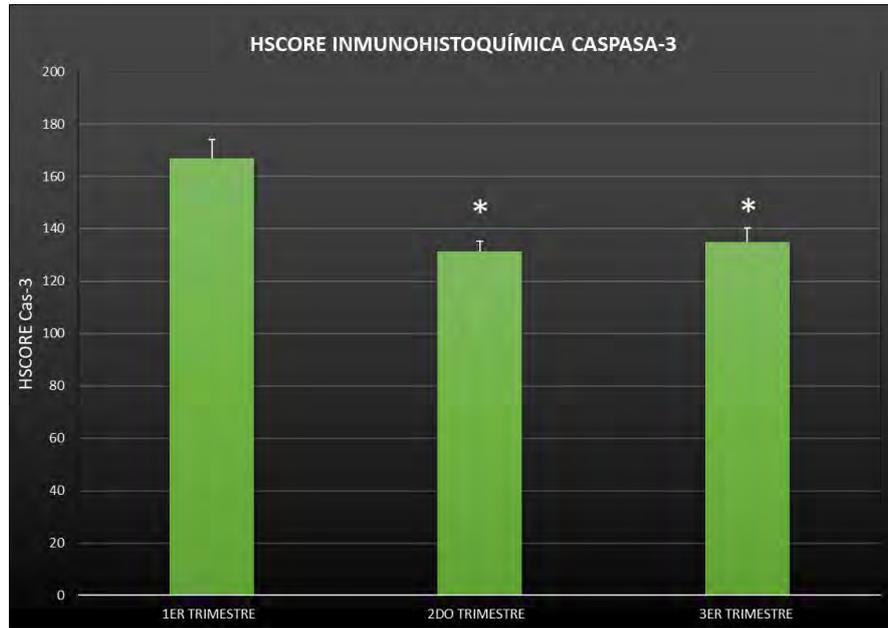


Fig.62: HSCORE de la intensidad de marcación de la inmunohistoquímica para Cas-3 en placentas de yeguas mestizas. Las barras representan las medias del HSCORE de cada trimestre gestacional ± EE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) versus el primer trimestre.

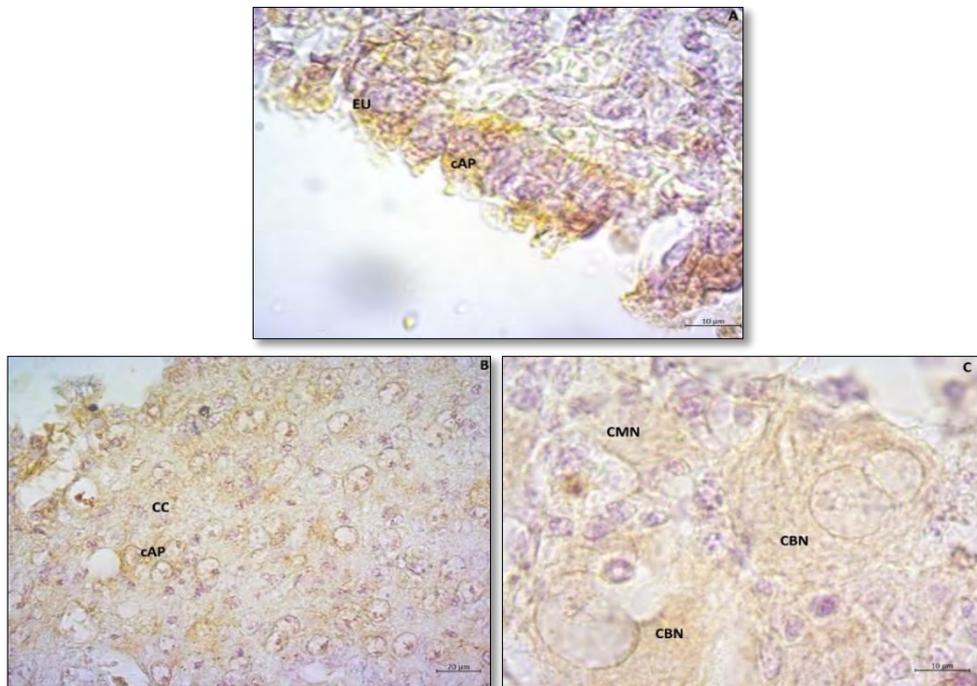


Fig.63: Determinación de apoptosis en las células especializadas trofoblásticas de yeguas mestizas mediante un ensayo inmunohistoquímico de CASPASA-3 (B: 400x; AyC: 1000x). Se observa una inmunomarcación marrón en el citoplasma de las células positivas a Cas-3. A: ± 25-30 días; B: ± 39-42 días; C: ± 55-65 días. cAP: células apoptóticas; EU: epitelio uterino; ETr: epitelio trofoblástico; CC: cintura coriónica; CMN: células trofoblásticas mononucleadas; CBN: células trofoblásticas binucleadas.

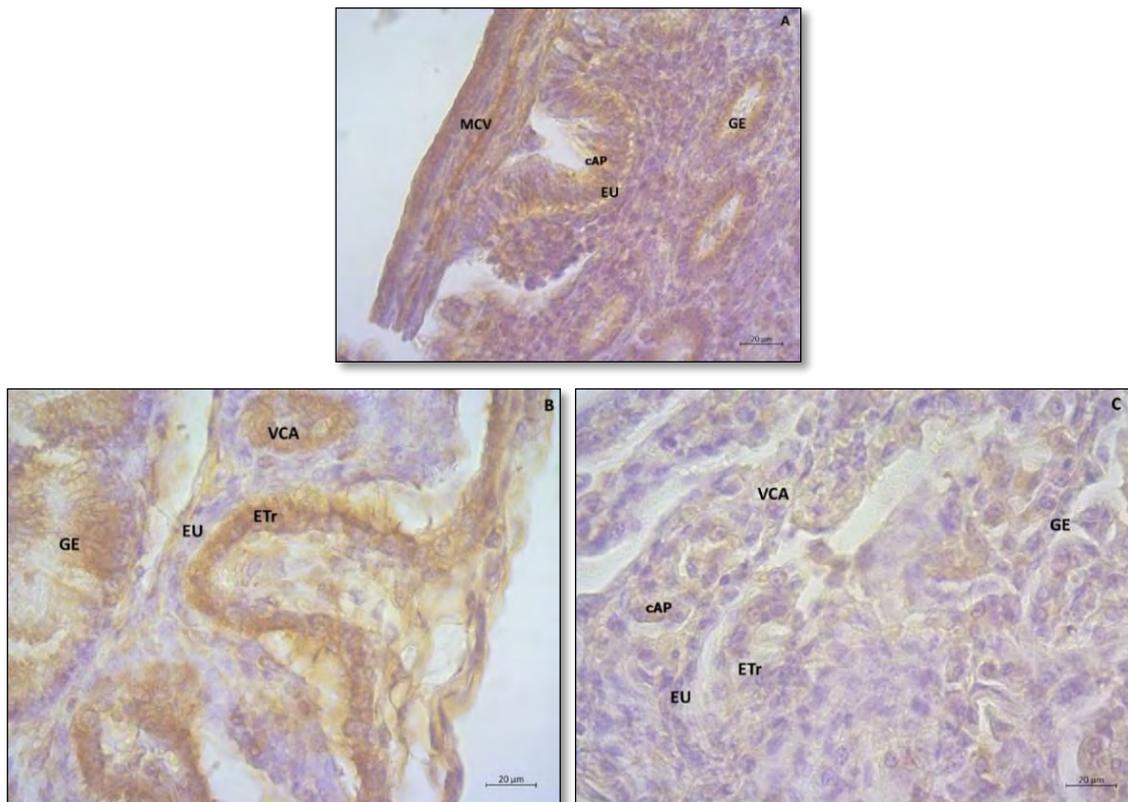


Fig.64: Determinación de apoptosis en placentas de yeguas mestizas mediante un ensayo inmunohistoquímico de CASPASA-3 (**A, B y C**:400x). Se observa una inmunomarcación marrón en el citoplasma de las células positivas a Cas-3. **A:** ± 25-30 días; **B:** ± 55-65 días; **C:** ± 240-270 días. **cAP:** células apoptóticas; **EU:** epitelio uterino; **ETr:** epitelio trofoblástico; **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **GE:** glándulas endometriales.

5.13 Morfometría de los vasos sanguíneos

La lectinhistoquímica y la metodología de medición empleada nos permitieron visualizar y mensurar correctamente los vasos sanguíneos del tejido placentario.

Se midió el área y perímetro de un total de 6431 capilares sanguíneos de la interfase materno-fetal, 2429 correspondientes al primer tercio de preñez, 2149 del segundo tercio y 1853 del tercer periodo gestacional, las estadísticas no arrojaron diferencias estadísticamente significativas en relación al número de capilares sanguíneos en la interfase materno fetal en los diferentes periodos gestacionales estudiados (Tabla VI).

Al cumplirse los supuestos de normalidad de los residuos y homogeneidad de la varianza, se realizó un ANOVA para comparar el área y el perímetro como medida del tamaño capilar relacionando los diferentes tiempos gestacionales.

Tabla VI: Número de vasos sanguíneos de la interfase materno-fetal a lo largo de la preñez equina. Los datos están expresados como medias \pm EE ($P= 0,0930$).

Periodos gestacionales	Vasos sanguíneos totales (n°)	Promedio de vasos sanguíneos (Media \pm EE)
PRIMER TRIMESTRE	2429	809,67 \pm 92,36
SEGUNDO TRIMESTRE	2149	537,25 \pm 70,15
TERCER TRIMESTRE	1853	617,67 \pm 62,71

En relación al área de los vasos sanguíneos placentarios, las pruebas estadísticas revelaron diferencias significativas entre los trimestres ($p= 0,0212$). El test *a posteriori* DGC reveló un aumento significativo del área vascular en el segundo y tercer trimestre, en comparación al primero (Fig.65).

El ANOVA realizado para el perímetro vascular arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los trimestres de la gestación analizados ($p= 0,0336$). Se encontró un aumento significativo del perímetro de los capilares en el segundo y tercer trimestre, en comparación al primer tercio gestacional (Fig.66).



Fig. 65: Área de los vasos sanguíneos de la interfase materno-fetal a lo largo de la preñez equina. Las barras representan las medias del área vascular de cada trimestre gestacional \pm EE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) versus el primer trimestre.



Fig. 66: Variación del perímetro de los vasos sanguíneos a lo largo de la preñez equina. Las barras representan las medias del perímetro vascular de cada trimestre gestacional \pm EE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) versus el primer trimestre.

A continuación, se muestran imágenes de microscopía óptica de cada período gestacional estudiado previo a la determinación del área vascular placentaria y luego de la misma a través del software AxioVision (Fig.67, 68 y 69).

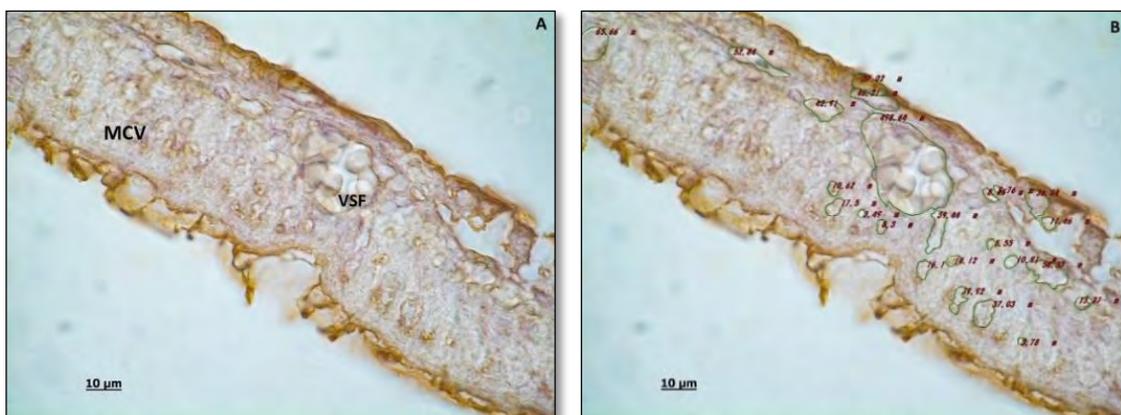


Fig. 67: Lectinohistoquímica de placenta equina de \pm 25-30 días de preñez. Se observa la membrana coriovitelina y vasos sanguíneos fetales de diferentes calibres en el mesénquima fetal. La figura (b) muestra las medidas del área vascular. (A, B: 1000x). MCV: membrana coriovitelina; VSF: vaso sanguíneo fetal.

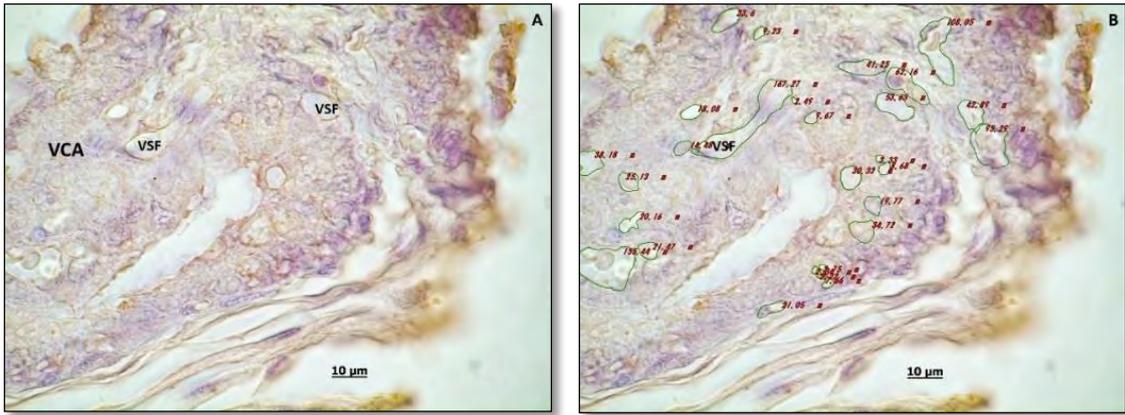


Fig. 68: Lectin histoquímica de tejido placentario equino de \pm 150-180 días de gestación (**A, B:** 1000x). La figura (a) muestra la imagen tomada antes de la medición del área vascular. En la imagen (b) se observa la medición de área correspondiente a cada uno de los vasos sanguíneos presentes en el campo. **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **VSF:** vasos sanguíneos fetales.

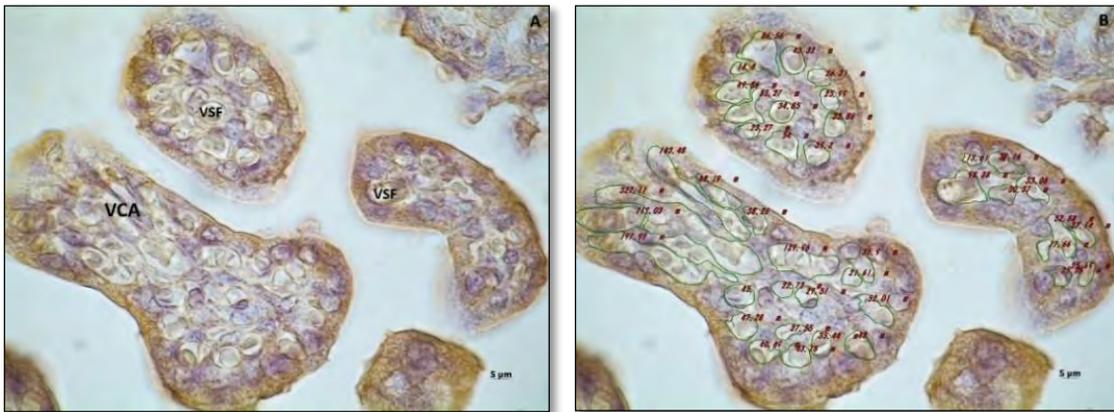


Fig. 69: Microscopía óptica de placenta equina de \pm 300 días de gestación teñida mediante lectin histoquímica (**A, B:** 1000x). En la figura (a) se observa las vellosidades corioalantoideas del microcotiledón cortadas transversalmente y vasos sanguíneos placentarios. Medición morfométrica del área de vasos sanguíneos (b). **VCA:** vellosidad corioalantoidea; **VSF:** vasos sanguíneos fetales.

DISCUSIÓN

En la especie equina, la duración de la gestación se considera extensa y el proceso de placentación es gradual. El desarrollo embrionario y fetal depende de una amplia variedad de adaptaciones a lo largo de todo el período gestacional. Es por ello, que una placenta microcotiledonaria sana unida a un endometrio saludable y completamente funcional es un prerrequisito para una preñez exitosa en la yegua (Steven y Samuel 1975). A su vez, profundizar sobre la estructura histológica de la placenta en desarrollo a lo largo de la gestación equina normal, aporta los conocimientos básicos para comprender cómo ciertas patologías afectan el tejido placentario, cuya integridad es vital para llevar a buen término la preñez y por consiguiente aumentar la producción equina.

En relación a la toma de muestra de placentas en yeguas, cabe destacar que en este trabajo se realizó previamente una técnica de perfusión de pequeño circuito, inyectando el fijador específicamente a través del sistema circulatorio de los tractos reproductivos preñados. El método de fijación por perfusión es mucho más efectivo que el de inmersión ya que la solución fijadora llega rápidamente a escasa distancia de todas las células de la estructura perfundida. Por tanto, la velocidad de penetración del fijador no es una condición limitante. Esta técnica fue recomendada y utilizada previamente por Allen *et al.*, (2017, 2009) para realizar un proceso de fijación más eficiente y reducir el grado de alteraciones que pudieran producirse sobre la interfase materno-fetal al procesar las placentas.

Para determinar la edad gestacional aproximada se realizó el análisis de características biométricas placentarias, fetales y endometriales, tomando como referencia las tablas de Ginther *et al.*, (1992). A partir del análisis de estos parámetros en los períodos muestreados, se observaron vesículas embrionarias y fetos alojados en las membranas extraembrionarias con las características fenotípicas acordes a la edad gestacional estudiada, coincidiendo con lo reportado por Francioli *et al.*, (2011). Sin embargo, en relación a los parámetros biométricos fetales se encontraron algunas diferencias que podrían deberse a la variabilidad de las razas equinas analizadas.

En relación al estudio estructural de las copas endometriales en el periodo temprano de la gestación, se observó que están compuestas por células trofoblásticas gigantes algunas binucleadas grandes y redondeadas de apariencia poliédrica y otras células gigantes mononucleadas. Estas células fetales se encuentran inmersas en el estroma endometrial e intercaladas entre vasos sanguíneos, vacuolas lipídicas y numerosas glándulas endometriales que contienen en su lumen una secreción proteica acidófila. En la base y periferia de la copa

se encontraron acúmulos de leucocitos maternos entre las glándulas endometriales. Esta descripción está en concordancia con lo hallado por Allen *et al.*, (2011, 2009) quienes encontraron que, histológicamente, cada copa endometrial consiste en una masa densa de grandes células binucleadas y epiteloideas intercaladas con vasos sanguíneos ocasionales y porciones dilatadas fúndicas de las glándulas endometriales. Después del día 70, las copas comienzan a degenerarse debido a la muerte y descamación celular en la depresión central de la superficie luminal, combinado con el comienzo de la infiltración y acúmulo de leucocitos. Finalmente, entre los días 100 y 120, en la mayoría de las yeguas, las copas necróticas se encuentran libres en el lumen uterino y se introducen en el alantocorion para formar un saco péndulo conocido como bolsa alantocoriónica (Clegg *et al.*, 1954). Concordando con estos autores, en nuestro trabajo observamos que las copas correspondientes a los \pm 100-120 días de gestación, evidenciaron un notable daño y degeneramiento celular y una considerable cantidad de linfocitos infiltrados comparados con los periodos analizados anteriormente (\pm 55-65 días de preñez).

Con respecto a la morfología macroscópica de las copas endometriales, se encontró que comprenden un círculo o herradura de protuberancias endometriales alrededor del concepto, a lo largo de las paredes lateral y medial del cuerno uterino grávido, concordando con lo hallado por Schauder (1912), Ginther (1998) y Allen (2009, 1975) en estudios previos.

Se observó que al inicio de la preñez (día 40-42) las copas se visualizan como placas pálidas sobre el endometrio materno. Posteriormente, a los 55-65 días de gestación, estas placas se tornan más sobreelevadas, cóncavas y con una notable coloración amarillenta sobre su superficie. Llegando a los 100-120 días aproximadamente, las copas se presentan de formas irregulares, desprendidas en su mayor parte del endometrio y con una coloración amarillenta más pálida. Esta particularidad en la coloración amarillenta de las copas, observadas en los *conceptus* a partir de la mitad del primer tercio de preñez, se debería a la secreción exocrina de eCG por parte de las células trofoblásticas, las cuales manifiestan su pico máximo de secreción entre los 60 y 75 días post-concepción. Estos resultados coinciden con Wooding *et al.*, (2008) quienes reportaron que, en este periodo de la gestación, las glándulas uterinas en la copa producen una cantidad considerable de secreción glandular, que contiene eCG secretada solo por las células de la copa y que sorprendentemente esto no llega a la circulación fetal. Esto fue corroborado mediante la inmunolocalización de la eCG mediante técnicas de inmunohistoquímica. En este trabajo, los núcleos y nucléolos de las CMN y CBN no evidenciaron inmunomarcación al igual que el epitelio glandular. Esto se debería a que

las células trofoblásticas son las únicas encargadas de secretar la eCG (Gospodorowicz, 1972).

Allen y Moor (1972) realizaron cultivos de células de la cintura coriónica recuperadas a los 35 días post-concepción durante 50 días, demostrando que las células son muy grandes, característicamente binucleadas y su citoplasma acumula numerosas gotas de lípidos que dan una apariencia punteada en microscopía óptica. Esto podría explicar el patrón de marcación granular encontrado en el citoplasma de las CMN y CBN en esta tesis, a través de la técnica de inmunohistoquímica. También se encontró que el citoplasma de las células especializadas se inmunomarcó intensamente (+++) en algunas células y en otras su marcación fue moderada (++) a débil (+). Esto podría deberse a la mayor actividad biológica de algunas células en secretar la eCG a lo largo de la vida útil de las copas endometriales. Se sabe que la cantidad de eCG producida depende del tamaño de la copa endometrial y está determinada por el número de células binucleadas que migran de la cintura coriónica entre los días 36 a 40 de la preñez, dependiendo esto último del genotipo del *conceptus*. Estudios realizados por Allen y sus colaboradores a principios de los años 80, concluyeron que hay grandes diferencias en el tamaño, la productividad y la vida útil de las copas endometriales entre las yeguas que llevan preñeces de caballo en comparación con preñeces de mula, desarrollándose en este último caso (híbrido) copas más pequeñas, de corta duración y por consiguiente con menor producción de eCG.

La morfología microscópica de la placenta equina en diferentes edades gestacionales ha sido descrita por medio de distintas técnicas de microscopía (Allen *et al.*, 2009; Abd-Elnaeim *et al.*, 2003; Macdonald *et al.*, 2000; Bracher *et al.*, 1996; Steven y Samuel, 1975; Samuel *et al.*, 1974 y 1975). Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado un análisis que abarque desde la fase inicial hasta el período anterior al parto. Samuel *et al.*, (1974) evaluaron el desarrollo de los microcotiledones hasta el día 150 de gestación en razas Welsh Mountain Pony. En este estudio, se describieron las características histológicas de placentas equinas de tres tercios gestacionales pertenecientes a yeguas mestizas de la región central de Argentina. Este tópico resulta importante ya que en la industria de la transferencia embrionaria (sobre todo del equino de polo) se utilizan, mayormente, yeguas mestizas como receptoras de embriones debido a la amplia oferta y el bajo coste del animal comparado con un caballo pura raza. A su vez, existen pocas investigaciones acerca de las diferencias en la estructura y la función placentaria entre las razas a lo largo de la gestación. Robles *et al.*, (2018) investigaron el tamaño, la estructura y la función de la placenta equina al nacimiento

en relación con el tamaño y el peso del potrillo en caballos de silla, tiro y ponis, concluyendo que la estructura de la placenta difiere entre las razas, con una marcada diferencia entre los ponis y las dos razas de caballos. Sin embargo, en dicho estudio sólo trabajaron con placentas de yeguas y ponis paridas. En nuestro trabajo, hallamos que en la gestación temprana de la yegua el epitelio luminal del endometrio se encuentra formado por células cúbicas o cilíndricas bajas, con formación de pliegues endometriales poco profundos y abundantes glándulas en la superficie apical del endometrio materno, las cuales están revestidas de epitelio cúbico simple. Estas glándulas contienen considerable secreción exócrina en su lumen correspondiendo al histotrófo (“leche uterina”). Estos hallazgos coinciden con las investigaciones realizadas por Allen y Wilsher (2009) sobre la preñez temprana de la yegua, donde reportaron que la secreción de las glándulas endometriales se acumula en las regiones apicales de las mismas y su exudado es tomado por las células trofoblásticas adyacentes para nutrir al embrión en desarrollo. También observaron que los epitelios coriónico y endometrial se encuentran estrechamente adosados, pero no unidos físicamente, tal como se observó en los cortes histológicos del presente trabajo.

A medida que avanza la gestación, se van formando surcos endometriales más profundos que se corresponden físicamente con las proyecciones coriónicas desarrolladas del lado fetal. A partir del día 60 aproximadamente, estas vellosidades alantocoriónicas primarias y sus surcos endometriales comienzan a elongarse extensivamente haciéndose más largas y profundas (Allen y Wilsher 2009). El proceso de plegamiento continúa formando vellosidades secundarias y terciarias hasta que se desarrolla el microcotiledón multiramificado alrededor del día 140 (Bracher *et al.*, 1996). En este trabajo, se observó en los cortes histológicos analizados la formación de microcotiledones desde el día 100 hasta el día 240 de gestación, coincidiendo con lo reportado por estos autores.

En el último tercio de gestación observamos, por medio de la tinción diferencial TM, que los microcotiledones multiramificados se envuelven por una cápsula de tejido conectivo denso del lado materno, limitando el espacio en el que las vellosidades fetales pueden expandirse. Esto concuerda con lo que describieron, mediante microscopía electrónica de barrido, Samuel *et al.*, (1974). En este periodo tardío de la gestación, observamos también entre los microcotiledones a las areolas bien diferenciadas y recubiertas de epitelio trofoblástico pseudoestratificado. Esto podría deberse a una modificación estructural y funcional de las células para absorber el histotrófo acumulado y transportarlo a los vasos

sanguíneos alantóideos a través de la extensa red capilar en cada vellosidad coriónica (Amoroso, 1952; Allen, 2011).

El esqueleto vascular de las vellosidades fetales, está formado por capilares con diámetros variables que en conjunto constituyen redes ampliamente vascularizadas (Abd-Elnaeim *et al.*, 2006). En este aspecto, es interesante señalar que en los períodos correspondientes a los $\pm 100-120$, $\pm 180-210$ y ± 300 días de gestación, la capa de células coriónicas de las vellosidades se hallaba aparentemente más delgada, permitiendo el reconocimiento de la estructura vascular. Se observaron abundantes capilares inmersos en el escaso tejido conectivo que los sostiene, inmediatamente debajo de los epitelios coriónico y endometrial. De manera adicional, la técnica de MOAR y TEM permitió observar con mayor detalle esta extensa red capilar dentro de las vellosidades. Estos capilares aumentan la superficie de intercambio hemotrófico en la interfase materno-fetal tal como lo describió Abd-Elnaeim *et al.*, (2006), a través de la microscopía electrónica de barrido.

Se destaca la pequeña distancia que separa el epitelio trofoblástico de los vasos sanguíneos subepiteliales, concordando con lo expresado por Samuel *et al.*, 1974 quienes evaluaron el desarrollo de los microcotiledones hasta el día 150 de gestación en razas Welsh Mountain Pony y encontraron que a medida que se van formando los microcotiledones, las láminas basales de los capilares y el epitelio se fusionan para formar una sola estructura. Al mismo tiempo, los capilares maternos se encuentran más cerca del epitelio uterino, aunque todavía están separados por una capa delgada de fibras de colágeno.

La presencia de capilares subepiteliales invaginados y fusionados a la región basal de las células del trofoblasto equino, reduce considerablemente la distancia que hay entre los capilares fetales y maternos, disminuyendo a su vez la distancia de difusión entre la sangre fetal y materna. Con respecto a esto, Cristofolini *et al.*, (2018), encontraron una cercana ubicación de los capilares subepiteliales a la interface materno-fetal a medida que progresa la preñez en cerdas de razas mestizas por medio de MOAR y TEM, como así también, hallaron una disminución en la distancia de difusión hemotrófica a medida que avanza la preñez por medio de estudios morfométricos. Estos hallazgos son importantes e indispensables dado el tipo de placentación epiteliochorial, en la que no hay contacto directo entre sangre fetal y materna y coincide con lo hallado en nuestro trabajo.

Se han realizado diversos estudios, a través de las técnicas de microscopía electrónica de barrido para mostrar detalles ultraestructurales de superficie como la formación, progresión

microcotiledonaria y los cambios adaptativos que sufre la superficie endometrial con el avance de la gestación en equinos (Macdonald *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2014; Camozzato *et al.*, 2019). Sin embargo, a nuestro conocimiento y con excepciones de trabajos muy antiguos (Amoroso *et al.*, 1958; Samuel *et al.*, 1974, 1975), no hay estudios de la ultraestructura celular por medio de la técnica de microscopía electrónica de transmisión realizadas a lo largo de la gestación en equinos (Carter *et al.*, 2016).

En nuestro trabajo demostramos la presencia de microvellosidades emergiendo desde la superficie apical tanto de las células del epitelio endometrial como en las células trofoblásticas, lo que evidenciaría las interdigitaciones estrechas que se produce entre el epitelio materno y fetal. Estas microvellosidades tienen la finalidad de aumentar el área de intercambio entre ambos epitelios, esto concuerda con lo hallado por Cristofolini *et al.*, (2018) en interface materno-fetal de cerdas mestizas.

Coincidiendo con otros autores (Samuel *et al.*, 1976; Wooding y Burton, 2008), observamos la presencia de células maternas y fetales caracterizadas por un núcleo redondo con nucléolos bien definidos, algunos se muestran activos y otros en proceso de apoptosis, debido a que se encontraron numerosos cuerpos apoptóticos en las células correspondientes a la etapa intermedia de la gestación. También se hallaron organoides celulares, entre los que se destacaron numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, sobre todo a los \pm 150-180 días de gestación se descubrió abundante retículo endoplásmico rugoso, lo que indicaría una gran actividad sintética de proteínas por parte de las células fetales hacia el final de la gestación.

En este mismo estadio, se observaron vesículas electrolucidas en la región apical del citoplasma de las células fetales, lo que difiere de lo hallado por Samuel *et al.*, 1976 que encontraron un incremento de cuerpos electrodensos a partir del día 180 de preñez a término en yeguas y con lo encontrado por Cristofolini *et al.*, (2018) en el periodo temprano de la preñez en cerdas. Estas vesículas reflejarían una gran actividad pinocítica por parte de las células fetales indicando que, en el periodo temprano y medio de la gestación, las células del trofoblasto se involucran en la captación de líquido del espacio estrecho que separa las microvellosidades fetales y maternas. En contraposición, en el estadio de \pm 55-65 días se observaron vesículas electrodensas en las células del epitelio materno, coincidiendo con estos autores.

A lo largo de toda la gestación, fue posible visualizar la comunicación intercelular entre las células epiteliales adyacentes del epitelio luminal del endometrio y del trofoblasto, las cuales se producen por el desarrollo de interdigitaciones en la membrana plasmática y de uniones celulares estrechas. Estas uniones son indispensables para mantener la estructura de los epitelios de la interfase materno-fetal.

Fue interesante hallar una sustancia apoyada sobre la región apical de una célula correspondiente al epitelio trofoblástico, lo que posiblemente sería una gota de histotrófo, Souza *et al.*, (2014) hallaron gotas de histotrófo sobre la superficie de células endometriales secretoras planas y protruidas en yeguas mestizas en el periodo comprendido entre los 21-149 días de gestación por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM), en tanto en un estudio reciente Camozzato *et al.*, (2019), por medio de la mencionada técnica, encontraron a los 13 días de gestación gotas de histotrófo en la superficie endometrial en yeguas mestizas tipo criollas, estos resultados evidenciaría la funcionalidad de las células fetales en absorber la leche uterina proveniente de las glándulas endometriales a lo largo de la gestación.

La vasculogénesis en la gestación temprana, seguida de angiogénesis a medida que avanza la preñez, da lugar a las redes capilares maternas y fetales extensas e interrramificadas en la interfaz placentaria y es claramente una parte fundamental del desarrollo placentario en todos los mamíferos eutherianos (Amoroso 1952; Steven 1982). Los principales reguladores del proceso de angiogénesis, son el factor de crecimiento endotelial vascular con sus receptores Flt-1 y Flk-1 y la familia de las angiopoyetinas con sus receptores Tie-1 y Tie-2 (Espinosa, 2011).

El VEGF es un regulador clave en el crecimiento de los vasos sanguíneos e induce cambios en la permeabilidad vascular y crecimiento de células endoteliales a través de la unión a su receptor Flk-1. La estimulación de Tie-2 por Ang-2 produce un efecto desestabilizador de los vasos que los deja en un estado de plasticidad. Cuando VEGF se une a Flk-1, el complejo Ang-2/Tie-2 se convierte en un factor proangiogénico que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Wang y Lash, 2017; Otzen *et al.*, 2016). No hay estudios sobre la expresión de angiopoyetinas y su receptor Tie-2 en la interfase materno-fetal a lo largo de la gestación equina y con solo unas pocas excepciones con respecto a VEGF (Allen *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011), se sabe poco sobre la ocurrencia y relevancia de este factor vasculogénico y sus receptores en placentas de yeguas.

Con respecto a la detección de VEGF por medio de inmunohistoquímica en placenta de yeguas mestizas, en este trabajo hallamos que el primer tercio de gestación se caracteriza por una inmunomarcación moderada a intensa del epitelio luminal y glandular del endometrio, como así también, detectamos una variabilidad en la tinción de los endotelios fetales y maternos, que se marcaron débilmente; estos resultados disciernen con los hallados por Allen *et al.*,(2007) que encontró una mayor inmunomarcación en los endotelios de los vasos sanguíneos y una menor intensidad de inmunomarca en el epitelio luminal del endometrio, en cambio, coincide la inmunomarca correspondiente a las glándulas endometriales.

Nuestro hallazgo de la inmunoreactividad de Ang-2 localizada en placenta de yegua en el primer tercio de preñez coincide con la inmunomarca moderada a intensa de VEGF en el epitelio luminal y glandular del endometrio. Además, detectamos una marcación moderada de Ang-2 en los endotelios de los capilares de la interfase materno-fetal en la etapa temprana de preñez equina, lo que sugiere que las angiopoyetinas podrían actuar de manera autocrina sobre estas células, promoviendo la angiogénesis al funcionar en sinergismo con el VEGF según los estudios realizados en el primer trimestre en placenta humana (Dunk *et al.*; 2000; Seval *et al.*;2008).

En relación a la determinación de VEGF en el segundo y tercer periodo de preñez, hallamos que continuó el patrón de marcación en el componente materno, pero hubo un aumento con respecto al primer tercio de preñez en las células fetales. Cabe destacar que se encontró una inmunomarcación intensa de las células del epitelio trofoblástico pseudoestratificado, y su contraparte las del epitelio luminal del endometrio en la región areolar intercotiledonaria, estos resultados concuerdan con la inmunomarcación de angiopoyetina 2 en el mismo periodo. De acuerdo con esto, en el cerdo, con su placenta alantocoriónica no invasiva similar al equino (Wooding y Burton, 2008; Charnock-Jones *et al.* 2004; Dantzer y Winther 2001), se ha descrito una red vascular más densa para la areola materna, que se supone que facilita la transferencia de sustancias y la actividad secretora por las glándulas (Leiser y Dantzer 1994), lo que se respalda en nuestro estudio e indicaría que las células trofoblásticas presentan una amplia red vascular para cumplir con la función de absorber el histotrófo y así favorecer el desarrollo del feto equino. También encontramos una inmunomarcación moderada de VEGF y Ang- 2 en células musculares lisas del miometrio y en el estroma endometrial y alantóideo, lo que concuerda con lo informado por Charnock-Jones *et al.*,

(2001) y Sanchis *et al.*, (2015) quienes estudiaron el factor de crecimiento endotelio vascular en cerdas.

De los 3 anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio, generados en ratón inmunizados con preparaciones de Tie-2, Flt-1 y Flk-1 de origen humano, solo Flk-1 y Tie-2 mostraron una marcación citoplasmática fuerte y precisa de los tejidos endometriales y placentarios en yeguas mestizas. Estos resultados coinciden en parte, con lo reportado por Allen *et al.*, (2007) y Silva *et al.*, (2011), donde encontraron una probable homología entre las formas humanas y equinas de los receptores del VEGF. Sin embargo, difiriendo de estos trabajos, en nuestro estudio el anticuerpo monoclonal de ratón producido contra los aminoácidos 23-247 de Flt-1 de origen humano, no evidencio inmunomarcación en los tejidos de yeguas preñadas, pudiendo inferir que el anticuerpo monoclonal Flt-1 (D-2 Cat #sc-271789) de Santa Cruz Biotechnology Inc. USA no funciona para la realización de inmunohistoquímica convencional en tejido placentario y endometrial equino.

Con respecto al anticuerpo policlonal de conejo inmunizado con Tie-2 de ratón, ha sido demostrada su funcionalidad en endometrio, ovario y tumores ováricos equinos (Otzen *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2012, 2009), sin embargo, nuestro trabajo fue el primero en utilizar un anticuerpo monoclonal generado contra epítopes Tie-2 de origen humano sobre placenta y endometrio equino, pudiendo confirmar su funcionalidad. Este resultado acentúa la evidencia de la homología que hay entre las formas humanas y equinas de estos receptores vasculogénicos.

En este ensayo encontramos que VEGF ejecutaría su acción angiogénica a través del receptor Flk-1 durante la gestación temprana, ya que se expresó con una marcación moderada a intensa en las células de la interfase materno-fetal como también en los endotelios de los vasos sanguíneos maternos y fetales durante el primer trimestre de la gestación. Esto podría deberse a que el factor de crecimiento secretado por las células trofoblásticas actuaría en forma parácrina sobre las células endoteliales para mediar el crecimiento de los vasos sanguíneos, como se ha descrito en placentas de ovejas (Bogic *et al.*, 2000).

Ferrara y colaboradores (2004) indicaron que la acción de VEGF es mediada preferentemente por VEGF-R2 (Flk-1). Los estrógenos también inducen indirectamente la expresión de VEGFR-2 a través de la producción de VEGF (Allen, 2011; Herve *et al.*, 2006; Losordo e Isner 2001). En un estudio realizado en endometrio equino tanto de yeguas cíclicas como preñadas antes de los 21 días de preñez, se ha observado que los niveles de ARNm de

Flt-1 no difieren entre los estados reproductivos estudiados y su detección fue solo posible después de más de 30 ciclos de amplificación, sugiriendo muy baja expresión en esta etapa (Silva *et al.*, 2011), justo en el momento en que el embrión equino libera cantidades apreciables de estrógenos (Klein, 2016). Esto sugiere que la fuerte expresión de Flk-1 sobre el epitelio luminal del endometrio encontrada en nuestro estudio, junto con la intensa inmunomarca del VEGF podría confirmar la evidencia de los estrógenos producidos por el embrión en desarrollo.

Nuestros resultados, difieren de los hallados por Sanchis *et al.*, (2015) en placentas de cerdas mestizas, quienes demostraron que en la gestación temprana y a término, VEGF actuaría principalmente vía el receptor Flt-1, mientras que a mediados de la preñez ejercería su acción fundamentalmente a través de Flk-1, ya que la ausencia de inmunoexpresión del VEGF-R1 en este periodo (60 días de preñez) indica que VEGF actuaría exclusivamente vía VEGF-R2 en los epitelios que conforman la interfase materno-fetal, en tejido conectivo y en miometrio de cerdas.

Los efectos biológicos de las angiopoyetinas dependen de las concentraciones de VEGF en los tejidos que tienen receptores de angiopoyetinas (Wang y Lash, 2017), cuando Ang-2 se une al receptor Tie-2 lo bloquea para la unión con Ang-1, este complejo da como resultado apoptosis de células endoteliales, regresión de vasos y, finalmente, pérdida de estructuras vasculares. Sin embargo, la desintegración de la pared vascular dependiente de Ang-2 permite un acceso más fácil del VEGF al endotelio vascular y por lo tanto a su receptor Flk-1, permitiendo que las células endoteliales se activen para migrar y proliferar, produciendo nuevos vasos sanguíneos. Nuestro hallazgo de la inmunoreactividad de Tie-2 localizado en placenta de yegua en el primer tercio de preñez coincide con la inmunomarca moderada a intensa de VEGF y su receptor en epitelio luminal, glándulas endometriales y endotelios de los vasos sanguíneos en la interfase materno-fetal.

Estos resultados concuerdan con los hallados por Fiorimanti *et al.*, 2018 en cerdas mestizas y apoyan lo descrito por la bibliografía (Cristofolini *et al.*, 2018; Seval *et al.*;2008; Charnock-Jones *et al.*, 2001; Bogic *et al.*, 2000) remarcando la importancia del complejo VEGF-Ang para lograr una correcta angiogénesis en la etapa temprana de la preñez. Además, la presencia de Tie-2 en el trofoblasto y el epitelio luminal del endometrio indica que las angiopoyetinas tienen un importante papel en la formación de los tejidos de la

interfase materno-fetal en yeguas, este hallazgo fue semejante a los presentados en cerdas por Fiorimanti *et al.* en 2018.

Con respecto a la detección de los factores angiogénicos y sus receptores en las células especializadas del trofoblasto invasivo del alantocorion, encontramos diferencias en el patrón de marcación en angiopoyetinas con respecto a la inmunomarcación que reveló VEGF; para este factor las células de la cintura coriónica presentes en el estadio de \pm 39-42 días de preñez se inmunomarcaron débilmente, en cambio, para Ang-2 fue intenso, esto sugeriría que las células especializadas fetales en la etapa temprana de preñez, responden mejor al estímulo angiogénico que les brindan las angiopoyetinas, sin perder el estímulo por parte del complejo Ang/VEGF. Flk-1 y Tie-2 mostraron un patrón de marcación débil a moderado en las células de la cintura coriónica presentes justo previo a la implantación (\pm 39-42 días de preñez), concordando con lo hallado por Allen *et al.* (2007). La intensidad de marcación parecía incrementar en aquellas zonas donde las células especializadas habían comenzado a invadir el endometrio y las que se estaban transformando en las típicas células gigantes binucleadas de las copas endometriales.

En lo que respecta a las células trofoblásticas gigantes binucleadas y mononucleadas de la copa endometrial ya madura (\pm 55-65 días) variaron su marcación de moderada a intensa, en cambio VEGFR-2 no presentó inmunomarcación. Esto podría deberse a que, en yeguas mestizas durante esta etapa, VEGF probablemente actuaría por medio del receptor Flt-1. Estos resultados son contrarios a los encontrados por Allen y sus colaboradores, quienes describieron la presencia de VEGF, Flt-1 y Flk-1 en las copas endometriales y células estromales hasta el día 70 de gestación. Sin embargo, los datos encontrados en nuestro ensayo dan una idea del fuerte mecanismo angiogénico en las copas en desarrollo por parte del complejo VEGF/Ang, sugiriendo que actúan de manera autocrina para mediar el crecimiento de la cintura coriónica y de las copas endometriales.

Las glándulas endometriales de la región apical de la copa se inmunomarcaron moderadamente y las presentes en la base de la copa fueron negativas para VEGF coincidiendo con lo reportado por Allen *et al.*,(2007), quienes describieron que las glándulas endometriales funcionales se inmunomarcaron intensamente para anti-VEGF y anti-Flt, mientras que las glándulas endometriales dilatadas presentes en el estroma de la copa, que representaban las porciones basales y fúndicas de las glándulas y que tuvieron sus aberturas apicales cerca del epitelio uterino destruyéndose durante la invasión endometrial alrededor

de los días 36-40 de preñez, no se inmunomarcaron pero sí para el anti-KDR. En relación a las angiopoyetinas se encontró también un patrón variable pero la intensidad de marcación fue menor que el encontrado para el factor de crecimiento endotelio vascular.

Esta fuerte actividad angiogénica y vasculogénica asociada a las copas en desarrollo, es necesaria para iniciar la red de vasos sanguíneos y linfáticos que se forman alrededor y en la base de cada copa endometrial para transportar la hormona gonadotrofina coriónica equina al torrente sanguíneo materno. Esto coincide con el fuerte aumento de la producción de estrógenos ováricos que se estimula por la acción de eCG secretada por las células de la copa joven (Clegg *et al.* 1954; Amoroso 1955; Daels *et al.* 1991) concordando con nuestros hallazgos en donde las células especializadas del trofoblasto evidenciaron su funcionalidad en producir eCG, al inmunomarcarse intensamente contra anti-LH, anticuerpo utilizado para marcar dicha hormona.

La ausencia de inmunomarcación de los receptores pro-angiogénicos en las células especializadas trofoblásticas y del epitelio glandular en las copas maduras, permite inferir que, aunque están presentes VEGF y Ang-2, estos factores no ejercerían acción angiogénica en las células de las copas que están próximas a necrosarse y en las cuales ya no hace falta la vasta red capilar para transportar eCG al torrente sanguíneo, puesto que la hormona desaparece alrededor de los 120-150 días de gestación (Antczak *et al.*, 2013). Esto lo pudimos comprobar en nuestros estudios histológicos previos, donde las células especializadas correspondientes a los \pm 100-120 días de gestación evidenciaron un notable daño y degeneración celular con un infiltrado linfocítico abundante en la base de las copas. Además, hallamos una menor inmunomarca de la hormona gonadotrofina coriónica equina, comparados con las copas endometriales jóvenes.

Durante el segundo y tercer periodo de preñez, encontramos que Ang-2 ejercería su acción vía receptor Tie-2 hasta el día 180 en endotelios fetales y hasta el día 100-120 de gestación en endotelios maternos. En estos periodos a diferencia de lo hallado por Allen *et al.*, (2007) no encontramos presente el receptor Flk-1, esto nos daría la idea de que, en el periodo medio y tardío de la gestación equina, VEGF ejercería la acción angiogénica sobre Flt-1, como describió Sanchis *et al.*, 2015 para cerdas mestizas.

El aumento de la intensidad de marcación de VEGF y Ang-2 durante la preñez tardía, puede reflejar condiciones de hipoxia tanto en los tejidos placentarios como en los endometriales a medida que aumenta la demanda de oxígeno por el feto en rápido crecimiento, mientras que

el crecimiento útero-placentario se está desacelerando (Reynolds y Redmer 1995). Además, las concentraciones muy altas de estrógenos secretados por el trofoblasto directamente sobre el endometrio íntimamente asociado, debido al aumento de las gónadas fetales durante la segunda mitad del embarazo, también desempeñan un papel en la regulación positiva del sistema VEGF/Ang-2 y sus receptores en las etapas finales de la preñez (Allen, 2011; Babischkin *et al.* 2007; Wilsher y Allen 2003). El estrógeno es bien conocido por promover la angiogénesis en el útero, tanto indirectamente a través de la estimulación de la secreción de factores angiogénicos por las células endometriales (Albrecht *et al.*, 2004, 2003) como directamente a través de la mejora de la proliferación y migración de células endoteliales (Losordo *et al.*, 2001).

En esta tesis, la variabilidad y principalmente las bajas puntuaciones de inmunorreactividad y/o la localización de las proteínas involucradas en la angiogénesis, que se encontraron en los endotelios de los vasos sanguíneos en el último periodo de la gestación, llevan a la conclusión de que no hay nueva formación de vasos durante las últimas etapas de preñez, pronunciando la baja expresión de los factores vasculogénicos en vasos maduros quiescentes. Conjuntamente, la permanencia de inmunomarcación débil a moderada de Tie-2 en los endotelios capilares, permite suponer que en este periodo actuaría Ang-1 promoviendo la remodelación, maduración y mantenimiento de los vasos sanguíneos y vasculatura linfática, luego de la acción de VEGF, para complementar las últimas etapas de la angiogénesis durante las fases posteriores del desarrollo embrionario y postnatal (Eklund y Saharinen, 2013), como lo postula Fiorimanti *et al.*, (2018) en cerdas mestizas.

Nuestro trabajo fue el primero en evidenciar la localización temporo-espacial del sistema Ang-2-Tie2 y Ang-2/VEGF en la placenta equina a lo largo de la gestación. Estos factores pro-angiogénicos y sus respectivos receptores ejercerían su acción en sinergismo y serían una parte esencial de las vías de señalización celular paracrina y autocrina sobre las células endoteliales de los capilares, favoreciendo su crecimiento y estrecha ubicación hacia la superficie epitelial, aumentando la capacidad de intercambio hemotrófico de la placenta. Estos hallazgos se correlacionan con los pequeños capilares contiguos a la membrana basal de las células trofoblásticas y epiteliales del endometrio en el segundo y tercer tercio de preñez, encontrados por medio de MOAR y TEM. Esto resulta sumamente necesario dado el tipo de placentación epiteliocorial equina, en la que no hay contacto directo entre sangre fetal y materna.

Se han desarrollado numerosos métodos morfométricos para investigar el patrón de desarrollo vascular a lo largo de la gestación en placentas de animales domésticos, tales como ovejas (Borowicz et al., 2007), cabras (Díaz et al., 2015), vacas (Vonnahme et al., 2008) y cerdas (Cristofolini et al., 2018; Merkis et al., 2006).

Durante los períodos gestacionales estudiados y por acción de los factores de crecimiento angiogénicos y proangiogénicos, la red vascular se fue modificando. En nuestro ensayo histomorfométrico observamos que hay un aumento significativo del tamaño capilar a medida que avanza la gestación en placentas de yeguas mestizas. Cabe destacar la gran cantidad de vasos sanguíneos analizados durante toda la preñez. Debido a que el número de capilares analizados fue relativamente equilibrado, constante y las estadísticas no arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre cada tercio gestacional, el aumento del área y perímetro vascular podría deberse a un aumento en el tamaño capilar más que al número de capilares.

Estos hallazgos acuerdan con los observados en placentas de otras especies como ovinos y humanos (Borowicz et al., 2007; Ramsey, 1982) y difieren en parte con lo hallado en caprinos (Díaz et al., 2015). En este último estudio, Díaz y colaboradores (2015) hallaron un aumento significativo del área vascular en el día 100 de la gestación comparado con el día 50, tanto en el tejido caruncular como en el cotiledonario, siendo la densidad del área capilar (DAC) caruncular mayor que la del cotiledón placentario a lo largo del período estudiado, concluyendo que la DAC aumenta en la región caruncular debido al aumento en el tamaño de los capilares y en la región cotiledonaria por el aumento en la densidad del número capilar.

Debido a la naturaleza microcotiledonaria de la placenta equina, no se pudo diferenciar correctamente los capilares fetales y maternos por medio de las técnicas histoquímicas, por lo que la medición morfométrica se hizo en base a la interfase materno-fetal.

Abd-Elnaeim y colaboradores (2006) hallaron mediante SEM en una yegua joven y sana a los 309 días de gestación que la mayoría de los capilares encontrados, mediante la creación de moldes de corrosión vascular, se caracterizaron por zonas que contenían sinusoides dilatados, lo que aumentaba el área de superficie para el intercambio materno-fetal, esto podría explicar el aumento en el área y perímetro capilar en el último tercio gestacional, hallado en nuestro estudio. La dilatación sinusoidal de este tipo ofrece una superficie endotelial expandida para la absorción y también puede ralentizar el flujo sanguíneo localmente. Esto no influiría en el rápido equilibrio y el intercambio transplacentario

difusional de oxígeno y dióxido de carbono, pero puede ayudar con el transporte más lento, pero aún activo, de solutos.

Cristofolini y colaboradores (2018) hallaron en cerdas mestizas que el área vascular depende del período gestacional. Describieron que, en gestaciones tempranas, intermedias y a término los vasos sanguíneos predominantes son de entre 100 y 500 μm^2 , en cambio en gestaciones avanzadas son de menor tamaño (1 y 100 μm^2). Nuestro estudio mostró que el área y perímetro vascular aumentan en tamaño con un valor constante en el número de los vasos sanguíneos, por lo que nuestros resultados difieren en parte con estos hallazgos ya que no dividimos los vasos sanguíneos en intervalos como si lo hicieron estos investigadores, debido a la naturaleza del tejido placentario equino.

Durante la gestación, la red vascular de la placenta se vuelve más extensa y los vasos se agrandan para adaptarse a las crecientes demandas del feto en crecimiento (Charnock-Jones *et al.*, 2004).

Estos hallazgos, complementarios a la ausencia de inmunomarcación del sistema VEGF/Ang y sus receptores en los endotelios de los vasos sanguíneos al final de la gestación, evidencia que no hay nueva formación de vasos durante las últimas etapas de preñez y sumado a un mantenimiento de la inmunomarcación moderada del epitelio de las glándulas endometriales, afirma el protagonismo de las mismas en asumir el dominio en la conducción del escaso desarrollo y alto crecimiento capilar tanto fetal como materno, que se daría en las etapas finales de la gestación. Dicha hipótesis se basa en la reducción observada en el crecimiento placentario y fetal en yeguas ancianas que sufren endometriosis (Bracher *et al.* 1996; Wilsher y Allen 2003) en las que se desarrollan “nidos glandulares” no funcionales, los cuales reducen significativamente la cantidad de histotrofo disponible para el feto, provocando además una reducción paralela de factores vasculogénicos y por consiguiente pérdida de preñez en el periodo intermedio de la gestación equina.

Conjuntamente, la permanencia de inmunomarcación débil a moderada de Tie-2 en los endotelios capilares, permite suponer que en este periodo actuaría Ang-1 promoviendo la remodelación, maduración y mantenimiento de los vasos sanguíneos y vasculatura linfática, luego de la acción de VEGF, para complementar las últimas etapas de la angiogénesis durante las fases posteriores del desarrollo embrionario y postnatal (Eklund y Saharinen, 2013), como lo postula Fiorimanti *et al.*, (2018) en cerdas mestizas.

Según Zachary and Glik (2001) un mecanismo celular fundamental por el cual VEGF promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos y mantiene su integridad es la activación de células endoteliales sobrevivientes o de señalización anti-apoptótica. De manera tal que apoptosis y angiogénesis son procesos estrechamente relacionados, tal como ha sido informado por Cristofolini y col. (2008).

Como describimos anteriormente, el sistema Ang-Tie2 y Ang/VEGF ejercerían su acción en sinergismo y serían una parte esencial de las vías de señalización celular paracrina y autocrina sobre las células endoteliales de los capilares en la etapa temprana de la preñez. Estos resultados concuerdan con los hallados por Fiorimanti et al., 2018 en cerdas mestizas y apoyan lo descrito por la bibliografía (Fiorimanti *et al.*, 2018; Cristofolini *et al.*, 2018; Seval *et al.*;2008; Charnock-Jones *et al.*, 2001; Bogic et al., 2000) remarcando la importancia del complejo VEGF-Ang para lograr una correcta angiogénesis placentaria.

El desarrollo de la fase materno fetal durante la preñez implica una compleja organización tanto del tejido endometrial como de las membranas extraembrionarias para formar la placenta que es esencial para favorecer el óptimo crecimiento fetal. Esta remodelación tisular involucra procesos tales como la proliferación celular y la apoptosis que en conjunto con la diferenciación celular y la amplia red vascular descrita anteriormente mantienen la homeostasis del tejido placentario.

En nuestro estudio encontramos que la localización inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) fue una técnica útil para monitorear los patrones de proliferación celular durante la placentación en yeguas ya que el PCNA está asociado no solo con la replicación, sino que también participa en la reparación del ADN, coincidiendo con lo reportado por Pázdziór *et al* (2012).

Durante la gestación temprana encontramos un elevado IPr en todas las poblaciones celulares estudiadas, con respecto a la gestación tardía y a término. Gerstenberg *et al.*, (1999) reportaron un aumento en el porcentaje de proliferación en los estratos superficiales del endometrio cuando se administró benzoato de estradiol a yeguas en anestro que habían sido tratadas con progestágenos exógenos. En humanos se sabe que la implantación requiere un aumento de la secreción de 17β estradiol que estimula la proliferación y diferenciación de las células epiteliales uterinas (Norwitz *et al.*, 2001).

Estos resultados sumados a los encontrados en nuestro trabajo, indican que los estrógenos derivados del concepto podrían ser la causa del aumento de la actividad proliferativa que

ocurre en el epitelio luminal y glandular del endometrio durante la preñez temprana. Además, como mencionamos anteriormente, en esta etapa encontramos que el sistema VEGF/Ang, activado también por los estrógenos, se encuentra ejerciendo la acción angiogénica sobre los vasos sanguíneos y sobre la interfase materno-fetal indicando un importante papel en la formación de los tejidos placentarios.

Las muestras correspondientes al estadio \pm 39-42 días, momento en que se está iniciando el proceso de formación de los pliegues endometriales primarios para contactar con el corion adyacente, presentaron una mayor proliferación en la base de los surcos, esto indicaría el crecimiento marcado de esta zona endometrial respondiendo a los estímulos del trofoblasto subyacente, que es la zona donde primero van a contactar los epitelios para formar las vellosidades corioalantoideas secundarias y terciarias.

En relación al trofoblasto los resultados de este trabajo coinciden con estudios previos donde se observaron altas tasas de proliferación celular fetal durante el embarazo temprano en humanos, monos y ovejas (Korkmaz *et al.*, 2013; Grazul-Bilska *et al.*, 2011; Kar *et al.*, 2007; Korgun *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2005). También nuestros hallazgos son semejantes a los descritos por Sanchis y colaboradores (2015) que encontraron una constante proliferación placentaria desde la gestación temprana hasta el día \pm 80 de gestación en cerdas mestizas.

Los patrones de inmunoreactividad de Ki-67 en los epitelios de las criptas coriónicas y maternas fetales de vacas indican que la proliferación juega un papel importante durante el embarazo y, con la gestación en curso, es más prominente en el epitelio materno que en el fetal (Boss *et al.*, 2003). En base a los porcentajes individuales de proliferación celular encontradas en nuestras muestras, diferimos de lo hallado en este estudio ya que encontramos mayores índices de proliferación en el epitelio trofoblástico comparados con el epitelio luminal.

El endometrio de todos los mamíferos está ricamente dotado de glándulas que se abren sobre la superficie luminal. Las secreciones de las glándulas desempeñan un papel esencial en el mantenimiento del concepto pre implantación. Con el avance del embarazo en equinos hay un aumento aparente, pero no significativo, en la densidad de las glándulas endometriales hasta el día 21 (Silva *et al.*, 2011) o el día 30 (Lefranc y Allen, 2007b). Al comparar el endometrio del cuerno uterino gestante con el no gestante, de 12 a 30 días de gestación, tampoco hubo diferencias significativas para la densidad glandular (Lefranc y Allen, 2007b). Es interesante determinar si el desarrollo, la ramificación y el plegamiento de las glándulas

continúa con el avance de la preñez, especialmente en los días 40 o 42 y más adelante, cuando comienza la placentación y las microvellosidades corioalantoideas se adhieren al endometrio.

En nuestro estudio encontramos un alto índice proliferativo en el epitelio glandular del primer tercio gestacional comparados con los demás periodos, esto es primordial que suceda ya que antes de la implantación y previo a la formación de los microcotiledones la nutrición del embrión es esencialmente histotrófica, luego una vez que la placenta corioalantoidea está establecida completamente, se torna predominante la nutrición hemotrófica, tal como sucede en humanos (Burton *et al.*, 2003 ,2007). El aumento en la producción histotrófica probablemente esté relacionado con el aumento en la densidad glandular del epitelio materno (Lefranc y Allen, 2007a; Wilsher y Allen, 2012).

Además, a nivel descriptivo se encontró una importante proliferación en las glándulas endometriales presentes en el estrato compacto del endometrio, especialmente en el estadio de \pm 39-42 días de preñez, esto coincide con lo expresado por Silva y colaboradores (2011) que encontraron una mayor densidad glandular en el endometrio lateral al concepto en yeguas hasta los 21 días de gestación. Un estudio de Lefranc y colaboradores (2014) comparó la ultraestructura de las células de las glándulas endometriales en yeguas gestantes a los 26 días en comparación con yeguas de la misma edad gestacional que sufrieron una ruptura intencional de la vesícula embrionaria ocho días antes, promoviendo un diestro prolongado por medio de microscopía electrónica de transmisión. Los autores demostraron que las células del epitelio glandular en yeguas preñadas tuvieron una mayor cantidad de vacuolas secretoras que en yeguas en diestro prolongado.

Estos datos en conjunto corroboran la idea de que el embrión en sí es co-responsable de su desarrollo, promoviendo cambios en la morfofisiología endometrial a través de sus propios factores embrionarios. Como describimos anteriormente, la inmunomarcación del complejo Ang-VEGF y sus receptores en las glándulas endometriales durante toda la gestación equina, propondría que estos receptores pro-angiogénicos pueden actuar como estímulos mitogénicos para la propia proliferación de las glándulas y por consiguiente el mantenimiento de la función histotrófica en yeguas mestizas, ya que a pesar que el IPr fue marcadamente menor durante el segundo y tercer tercio de preñez, el epitelio glandular continuó proliferando.

En relación a la remodelación celular de las copas endometriales, en el presente estudio encontramos una tasa de mitosis altamente marcada y un bajo porcentaje de apoptosis en las células de la cintura coriónica halladas en el estadio de \pm 39-42 días de preñez, esto coincide con Stout *et al.* (2003) quienes encontraron un 90% de células inmunomarcadas con Ki67 en las células trofoblásticas de la cintura coriónica en activo desarrollo, en comparación con el 10% de las células del corion adyacente. Estos resultados también se condicen con Enders y Liu (1991) quienes informaron sobre las numerosas figuras mitóticas visibles por MET, en los pliegues o vellosidades de las células de trofoblasto modificado que comprenden la llamada cintura coriónica.

Entre el día 36 y 38, toda la cintura coriónica se desprende de las membranas fetales, se adhiere al endometrio subyacente y sus células pasan entre las células del epitelio luminal invadiendo el estroma endometrial (Enders y Liu, 1991b; Allen *et al.*, 1973). En nuestro ensayo se observó una marcada disminución en el porcentaje de proliferación celular, como también un aumento en el porcentaje de apoptosis en las células correspondientes a las copas endometriales ya maduras. Estos resultados respaldan la observación (Allen *et al.*, 1973; Hamilton *et al.*, 1973; Enders y Liu, 1991a, 1991b) de que las células de la cintura dejan de dividirse en el momento en que migran hacia el endometrio y se terminan de diferenciar en células gigantes binucleadas.

Este cese de la actividad proliferativa tras la invasión de los tejidos maternos es similar a la situación en la placenta humana en la que las células fetales abandonan continuamente las columnas y la cubierta citotrofoblástica en proliferación durante el primer trimestre del embarazo (Genbacev *et al.*, 1992; Kaufmann y Burton, 1994), para luego dejar de mostrar actividad mitótica cuando invaden la decidua materna (Bulmer *et al.*, 1988; Loke, 1990). La alta tasa de proliferación observada en el primer trimestre en relación al epitelio luminal del endometrio podría suponer el proceso de reparación del epitelio superficial en respuesta a la invasión, tal como lo describen Allen (1982) y Gerstenberg (1999).

Algunas células de la cintura coriónica pasan por las glándulas endometriales al migrar entre las células epiteliales glandulares y su lámina basal antes de ingresar al estroma endometrial (Allen *et al.*, 1973; Allen, 1979). Esto podría explicar el porcentaje de apoptosis en las glándulas endometriales de las copas endometriales ya maduras observadas en nuestro ensayo.

Se ha descrito en detalle la acumulación de leucocitos alrededor de las copas endometriales y probablemente estos llegan al sitio en respuesta a estímulos quimiotácticos (Grünig *et al.*, 1995). En nuestro estudio se halló una importante proliferación de las células estromales como también de los linfocitos presentes en la base de las copas maduras, por lo que apoyaría este apartado al igual que lo descrito por Gerstenberg y colaboradores (1999).

Después del día 70, las copas comienzan a degenerarse debido a la muerte y descamación celular en la depresión central de la superficie luminal, combinado con el comienzo de la infiltración, ataque y acumulo de leucocitos. A pesar de que se conoce que las células de la copa endometrial mueren por necrosis a través de un complejo proceso inmunológico, nuestro estudio es el primero en determinar que existe muerte por apoptosis en las células trofoblásticas especializadas durante todo su desarrollo, rebatiendo lo expresado por Allen (1982), quien sugirió que la citólisis y la regresión de las copas endometriales es causada solo por una reacción inmunológica más que por una muerte celular programada.

Nuestros datos evidencian el activo proceso de remodelación celular en estas estructuras únicas de la preñez equina y corroboran lo que postulan diversos autores que existe una relación inversa entre proliferación celular y apoptosis (Turiello *et al.*, 2019; Boos *et al.*, 2003; Heazell y Crocker, 2008). El hallazgo de la presencia y acción del complejo VEGF/Ang2 y sus respectivos receptores en las células de la cintura coriónica y luego en las células mononucleadas y binucleadas de las copas endometriales durante todo su desarrollo, sugeriría que estos factores pro-angiogénicos pueden actuar de una manera autocrina en la maduración y proliferación de las células trofoblásticas especializadas.

En esta tesis se hallaron bajas tasas de proliferación celular en la interfase materno-fetal en la gestación tardía, difiriendo en parte de un estudio preliminar realizado en placentas caninas, donde se observó una inmunomarcación moderada de PCNA en las células del sincitiotrofoblasto, mientras que la mayoría de las células de citotrofoblasto resultaron positivas. Además, se encontró proliferación en las vellosidades coriónicas extralaberintinas del trofoblasto (Castro *et al.*, 2019). En esta especie, el sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto siguen siendo proliferativos en la placenta madura, debido a que es un estudio preliminar y que no se realizó aún el IPr no podemos diferir completamente en los resultados. Sin embargo, existe una reducida proliferación celular en placentas de gestación a término, tal como ha sido descrito en placentas de rata (Unek *et al.*, 2012), humanas (Xue *et al.*, 2003;

Olvera *et al.*, 2001), cerdas (Sanchis *et al.*, 2015) y yeguas de tiro pesado con retención placentaria (Pázdior *et al.*, 2012).

Nuestros datos evidencian un activo proceso de apoptosis celular en el primer trimestre gestacional comparado a los dos trimestres siguientes, confirmado a través de MOAR y microscopía electrónica. Esto difiere en parte a lo que postulan diversos autores que existe una relación inversa entre proliferación celular y apoptosis a medida que avanza la gestación (Turiello *et al.*, 2019; Boos *et al.*, 2003; Heazell y Crocker, 2008), ya que en el segundo y tercer tercio gestacional observamos un equilibrio en los índices de HSCORE, pero elevados y sumado a nuestros hallazgos previos sobre proliferación celular, la apoptosis es mayor a la mitosis en estas etapas.

Nuestros hallazgos coinciden con estudios previos realizados en porcinos (Sanchis *et al.*, 2015; Cristofolini *et al.*, 2013; Cristofolini, 2010; Merkis *et al.*, 2010; Okano *et al.* 2007; Merkis *et al.*, 2007), donde se relaciona la apoptosis placentaria en la gestación temprana con la homeostasis tisular. De acuerdo con los resultados obtenidos, a partir de la inmunolocalización de Cas-3 se ha demostrado que el proceso apoptótico se observa en condiciones normales del desarrollo placentario en yeguas mestizas a través de una vía caspasa dependiente.

El elevado índice apoptótico hallado en el presente estudio en las vellosidades placentarias de la gestación temprana sería indicativo de una mayor remodelación tisular por la gran cantidad de acontecimientos que ocurren en el desarrollo de la placentación temprana de la yegua sumado al rápido crecimiento fetal. Este período de rápido crecimiento embrionario constituye uno de los momentos más críticos en la gestación equina por los elevados índices de muerte embrionaria que se producen entre los 14-42 días (Allen *et al.*, 2007).

Los resultados demostrados de apoptosis celular junto con nuestros hallazgos de una importante actividad mitótica durante el periodo temprano de la preñez, evidencian una activa remodelación tisular, proceso indispensable en la gestación equina dado que el día 40 post ovulación comienza la interdigitación del alantocorion no invasivo para formar las vellosidades corioalantoideas primarias, secundarias y terciarias que constituirán al microcotiledón totalmente formado durante el comienzo del segundo tercio gestacional. De hecho, Wilsher y Allen (2003) realizaron mediciones estereológicas en la interfase materno-fetal de yeguas pura sangre de carrera revelando que el área microscópica total de contacto feto-materno promedio a término es de 50-60 m^2 . Este desarrollo es indispensable para

lograr un potro que puede pararse, mamar y galopar junto a su madre dentro de una hora después del nacimiento. Conjuntamente, se sabe que el compromiso de ese extenso mecanismo de nutrición fetal, como ocurre en yeguas de edad avanzada que sufren endometriosis (Bracher *et al.*, 1996) o, en menor medida, en potrancas primíparas debido a subdesarrollo óptimo de los microcotiledones placentarios, da como resultado el nacimiento de potros más pequeños que muestran diversos grados de debilidad y falta de madurez (Allen y Wilsher, 2009).

CONCLUSIONES

- ❖ El análisis por medio de microscopía óptica puestas a punto en muestras de tejido placentario y copas endometriales de yeguas mestizas, permitió ahondar sobre la histología de la interfase materno-fetal y el desarrollo sucesivo de los microcotiledones (unidad primaria de intercambio hemotrófico) como así también de las copas endometriales en los diferentes estadios de la gestación.
- ❖ A través del empleo de MOAR y dadas las características de esta técnica en cuanto al espesor de los cortes semifinos, nos permitió visualizar y profundizar las características de las células placentarias y de los capilares sanguíneos en las yeguas mestizas.
- ❖ El estudio de los factores proangiogénicos por medio de inmunohistoquímica y la ultraestructura placentaria por medio TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión), permitió describir los cambios morfológicos y vasculares, mediante la identificación de diversas estructuras físicas y moleculares para poder vincularlos a una gestación exitosa en yeguas mestizas. A su vez esta técnica nos permitió la observación de pequeños capilares fetales fusionados a la membrana basal de las células trofoblásticas y maternas disminuyendo su distancia interhemal.
- ❖ Por medio de la puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica a fin de localizar la hormona gonadotrofina coriónica equina, se encontró que está se inmunomarcó en el citoplasma de las células mononucleadas y binucleadas, evidenciando la funcionalidad de las mismas en producir y secretar dicha hormona.
- ❖ El factor de crecimiento vascular endotelial presente en las células trofoblásticas permitiría incrementar el intercambio de gases y nutrientes en la región areolar, gracias a la atracción de células endoteliales adyacentes.
- ❖ El sistema Ang-Tie2 y Ang/VEGF ejercerían su acción en sinergismo y serían una parte esencial de las vías de señalización celular paracrina y autocrina sobre las células endoteliales de los capilares, favoreciendo su crecimiento y estrecha ubicación hacia la superficie epitelial, aumentando la capacidad de intercambio hemotrófico de la placenta y activando la angiogénesis en la preñez equina.
- ❖ El aumento del área y perímetro vascular de la placenta sumado a la ausencia de inmunomarcación del sistema VEGF/Ang y sus receptores en los endotelios de los vasos sanguíneos al final de la gestación evidencia que no hay nueva formación de vasos durante este periodo y sumado a un mantenimiento de la inmunomarcación

moderada del epitelio de las glándulas endometriales, afirma el protagonismo de las mismas en asumir el dominio en la conducción del desarrollo y crecimiento capilar tanto fetal como materno, que se daría en las etapas finales de la gestación.

- ❖ Nuestro hallazgo de la inmunoreactividad de Tie-2 localizado en el primer tercio de preñez coincide con la inmunomarca de VEGF y su receptor en epitelio luminal, glándulas endometriales y endotelios de los vasos sanguíneos en la interfase materno-fetal, esto podría confirmar la evidencia de los estrógenos producidos por el embrión en desarrollo, ya que son los encargados de estimular directa e indirectamente estos factores pro-angiogénicos.
- ❖ Los datos encontrados en nuestro ensayo dan una idea del fuerte mecanismo angiogénico en las copas en desarrollo por parte del complejo VEGF/Ang, sugiriendo que actúan de manera autocrina para mediar la proliferación de la cintura coriónica y de las copas endometriales, sin embargo, estos factores no ejercerían acción angiogénica en las células de las copas que están próximas a necrosarse y en las cuales ya no hace falta la vasta red capilar para transportar eCG al torrente sanguíneo.
- ❖ La ausencia de marcación contra Ang-2 sumado a la inmunomarcación débil a moderada de Tie-2 en los endotelios capilares en el último trimestre de preñez, permitiría suponer que en este periodo actuaría Ang-1 promoviendo la remodelación, maduración y mantenimiento de los vasos sanguíneos y vasculatura linfática, luego de la acción de VEGF. Se requieren más estudios.
- ❖ En este trabajo encontramos un alto índice proliferativo en el epitelio glandular, luminal y trofoblasto durante el primer tercio gestacional comparados con los demás periodos, esto es primordial que suceda ya que antes de la implantación y previo a la formación de los microcotiledones la nutrición del embrión es esencialmente histotrófica.
- ❖ A partir de la inmunolocalización de Cas-3 se ha demostrado que el proceso apoptótico se observa en condiciones normales del desarrollo placentario en yeguas mestizas a través de una vía caspasa dependiente.
- ❖ Los resultados de apoptosis celular junto con nuestros hallazgos de una importante actividad mitótica durante el periodo temprano de la preñez, evidencian una activa remodelación tisular, proceso indispensable en la gestación equina.
- ❖ Dada la naturaleza epiteliocorial y adecidua de la placenta equina, la apoptosis en gestaciones a término podría ser responsable de la pérdida de contacto entre las células trofoblásticas y endometriales maternas.

- ❖ A pesar de que se conoce que las células de la copa endometrial mueren por necrosis a través de un complejo proceso inmunológico, es importante destacar que nuestro estudio es el primero en determinar que existe muerte por apoptosis en las células trofoblásticas especializadas durante todo su desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elnaeim, M.M.M., Leiser, R., Wilsher, S., Allen, W.R. (2006). Structural and Haemovascular Aspects of Placental Growth throughout Gestation in Young and Aged Mares. *Placenta*. 27:1103-1113.
- Abd-Elnaeim, M.M.M., Leiser R, Allen W.R. (2003). Structural and haematological aspects of the equine placenta in mid-pregnancy. *Havemeyer Foundation Monograph Series 10*: 39-42.
- Amoroso, E.C. (1952). Placentation. *Marshall's Physiology of Reproduction*, 127-311.
- Amoroso, E.C., Hancock J.L., Rowlands I.W. (1948). Ovarian activity in the pregnant mare. *Nature 161*: 355-56.
- Antczak, D.F., De Mestre, A.M., Wilsher, S. y Allen, W.R. (2013) The Equine Endometrial Cup Reaction: A Fetomaternal Signal of Significance. *Annu. Rev. Anim. Biosci. 1*:419-442
- Alsat, E., Marcotty, C., Gabriel, R., Igout, A., Frankenne F., Hennen, G. y Evain-Brion, D. (1995). Molecular approach to intrauterine growth retardation: an overview of recent data. *Reproduction, Fertility and Development 7*: 1457-1464
- Albrecht, E.D., Babischkin, J.S., Lidor, Y., Anderson, L.D., Udoff, L.C., Pepe G.J. (2003) Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. *Hum Reprod*: 18:2039-47.
- Albrecht, E.D., Robb, V.A, Pepe G.J. (2004) Regulation of placental vascular endothelial growth/permeability factor expression and angiogenesis by estrogen during early baboon pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*;89: 5803-9.
- Al-zi'abi, M.O., Watson, E.D., Fraser, H.M. (2003) Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction*: 125: 259-270
- Ahmed, A., Dunk, C., Kniss, D., Wilkes, M. (1997). Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Lab Invest*.:76 (6):779-91.
- Allen, W.R. (2011). Factores que influncian el establecimiento, mantenimiento y la falla de la gestación en la yegua. Congreso Argentino de Reproducción Equina II. Mendoza 2011 pp 273-297 Ed. UNRC.
- Allen, W.R., (1982). Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effect of xenogeneic pregnancy in horses and donkeys. *J. Reprod. Fertil. Suppl. 31*: 57-94.
- Allen, W.R, Gower, S., Wilsher, S. (2007). Immunohistochemical localisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (Flt-I and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals 42*: 516-526.
- Allen, W.R., (1975). The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progestagen production in equids. *J. Reprod. Fertil. Suppl. 23*: 405-13.
- Allen, W.R, Moor, R.M. (1972). The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J Reprod Fertil*; 29: 313-6.
- Allen, W.R, Kydd, J.H., Boyle, M.S., Antczak, D.F. (1987). Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*: 35:197-209.

- Allen, W.R, Moor, R.M. (1973). The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J Reprod Fertil.* 29: 313–316.
- Allen, W.R, Stewart, F., (2001) Equine placentation *Reprod. Fertil. Dev* (13); 623–634
- Allen, W.R y Wilsher, S. (2009). A Review of Implantation and Early Placentation in the Mare. *Placenta*, 30: 1005–1015.
- Allen, W.R, Gower, S., Wilsher, S. (2017). Localisation of epidermal growth factor (EGF), its specific receptor (EGF-R) and aromatase at the materno-fetal interface during placentation in the pregnant mare. *Placenta* 50: 53-59.
- Aurich, C., (2011) Reproductive cycles of horses. *Anim Reprod Sci* 124: 220-228.
- Babischkin, J., Suresch, D., Pepe, G., Albrecht, E. (2007). Differential Expression of Placental Villous Angiopoietin-1 and -2 During Early, Mid and Late Baboon Pregnancy. *Placenta*: 28: 212-218.
- 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.
- Barbero, E.E. (2016). *El caballo como industria: Descripción del subsistema de la carne de équidos en la Argentina*. Tesis de Magister de la Universidad de Buenos Aires, Área Agro negocios y Alimentos.
- Battut, I., Colchen, S., Fieni, F., Tainturier, D., Bruyas, J.F. (1997). Success rate when attempting to non surgically collect equine embryos at 144, 156 and 168 hours after ovulation. *Equine Vet J*; 25:60–2.
- Benirschke, K., y Kaufmann, P. (2000). *Pathology of the Human Placenta*. (4ta ed.) New York, USA: Springer-Verlag.
- Bergfelt, D.R., (2000). Estrous synchronization. In: Equine breeding management and artificial insemination. Samper, JC (ed.) Saunders Company, Philadelphia:165-177.
- Betteridge, K. J., (1989). The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. *Equine Vet. J.*:8;92–100.
- Bjorkman N., G. Bloom, (1957) On the fine structure of the foetal-maternal junction in the bovine placentome, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 45: 649-659.
- Bogic, L., Brace, R., Cheung, C., (2000). Cellular Localization of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovine Placenta and Fetal Membranes. *Placenta*: 21: 203–209.
- Boos, A., Janssen, V., 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 factorexpression. *Biology of Reproduction*: 76, 259-267.

- Bracher, V., Mathias, S., Allen, W. (1996). Influence of chronic endometritis (endometriosis) on placental development in the mare. *Equine Veterinary Journal*: 28 (3): 180-188.
- Bulmer, J.N, Morrison, L. y Johnson, P.M. (1988). Expression of the proliferation markers Ki67 and transferrin receptor by human trophoblast populations. *Journal of Reproductive Immunology* 14: 291-302
- Burton, G.J., Jauniaux, E., Charnock-jones, D.S. (2007) Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* 28, 21: 64-69
- Burton, G.J, Hempstock y Jauniaux, E. (2003) Endometrial secretions and development of the human fetoplacental unit during early pregnancy. *Havemeyer Foundation Monograph* 10: 20-22.
- Boos, A., Janssen, V. and 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.
- Camozzato, G.C., Martinez, M.N., Bastos, H.B.A, Fiala-Rechsteiner, S., Meikle, A., Jobim, M.I.M., Gregory, R.M., Mattos, R.C. (2019). Ultrastructural and histological characteristics of the endometrium during early embryo development in mares. *Theriogenology* 123: 1-10
- Carter, A.M., Enders, A.C. (2016). Early studies of placental ultrastructure by electron microscopy. *Placenta* 41: 10-13
- Castro, G.G., Zanuzzi, C., Merkis, C., Barbeito, C., Diessler, M. (2019). Apoptosis y proliferación en placenta canina. *Placenta*: 83: e70-e71
- Chavatte-Palmer, P., Derisoud E., Robles M. (2022). Pregnancy and placental development in horses: an update. *Domestic Animal Endocrinology*: 79:2-12.
- Cristofolini, A., Sanchis, G., Moliva, M., Alonso, L., Chanique, A., Koncurat, M., Merkis, C. (2013). Cellular remodelling by apoptosis during porcine placentation. *Reproduction in domestic animals*: 48: 584–590.
- Cristofolini, A., Merkis, C., Barroso, F., Vaquer, V., Lloret, M., Moschetti, E. y Koncurat M. (2008). Detección de fibrinógeno, FAS B-10, FAS ZB4 y FAS C-20 durante la placentación porcina. *Revista Electrónica de veterinaria (REDVET)*, IX (7): 1-10.
- Cristofolini, A., Fiorimanti, M., Campos, M., Sanchis, E., Diaz, T., Moschetti, E., Merkis, C. (2018) Morphometric study of the porcine placental vascularization. *Reprod Dom Anim*. 53:217–225.
- Charnock-Jones, D., Clark, D., Licence, D., Day, K., Wooding, F., Smith, S. (2001) Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal–fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction*, 122: 753–760.
- Charnock-Jones, D., Kaufman, P., Mayhew, T. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I Molecular regulation. *Placenta*: 25: (2-3):103-113.
- Cheung, C., Singh, M., Ebaugh, M., Brace, R. (1995). Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am. J Obstets. Gynec.*: 173: 753-759.

- Clegg, M.T., Boda, J.M., Cole, H.H. (1954). The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin. *Endocrinology*, 54: 448–63
- Crowell-Davis, S.L. (2007). Sexual behavior of mares. *Horm Behav* (52); 12-17.
- Crump, A., Donaldson, W. L., Miller, J. M., Kydd, J. H., Allen, W. R., and Antczak, D. F. (1987). Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on horse trophoblast. *J. Reprod. Fertil.* (35); 379–88.
- Cole, H.H. y Goss, H. (1943). The source of equine gonadotropin. *In Essays in Biology in Honor of Herbert M Evans*, pp. 107–19. Berkeley: Univ. Calif. Press
- Cole, H.H., Howell, C.E., Hart, G.H. (1931). The changes occurring in the ovary of the mare during pregnancy. *Anat. Rec.* (49); 199–209.
- Cortés-Vidauri, Z., Aréchiga-Flores, C., Rincón-Delgado, M., Rochín-Berumen, F., López-Carlos, M., Flores-Flores, G. (2018). Mare Reproductive Cycle: A Review. *ABANICO VETERINARIO* 8(3):14-41.
- Daels, P.F., De Moraes, J.J, Stabenfeldt, G.H, Hughes, J.P, Lasley, B.L. (1991) The corpus luteum: source of oestrogen during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*; 44:501–508.
- Daels, P.F y Hughes J.P (1993). The normal estrous cycle. *Equine Reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia, London.
- Dempsey, E.W., Wislocki, G.B., Amoroso, E.C (1955). Electron microscopy of the pig's placenta, with especial reference to the cell membranes of the endometrium and chorion, *Am. J. Anat.* 96: 65-101.
- Diaz, T., Merkis, C., Cots, D., Sanchis, E., Cristofolini, A., Romanini, M.C., Rolando, A. (2015). Angiogenesis at different stage of pregnancy in goat placenta. *Journal of Life Sciences*: 9:391–398.
- Di Rienzo, J., Casanoves, A., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2020. InfoStat Group, Facultad De Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Djonov, V., Schmid, M., Tschanz, S.A., Burri P.H. (2000). Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation, *Circ. Res.* 86: 286– 292.
- Donaldson, W. L., Zhang, C. H., Oriol, J. G., and Antczak, D. F. (1990). Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens. *Development* (110); 63–71.
- Dreves, J., Einführung. In: Dreves, J. (2005), Tumor angiogenesis–Grundlagen und therapeutische Ansätze, 1st ed. *UNI-MED Verlag* 13–16.
- Dunk, C., Shams, M., Nijjar, S., Rhaman, M., Qiu, Y., Bussolati. B., Ahmed, A., (2000). Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Activate Trophoblast Tie-2 to Promote Growth and Migration during Placental Development. *American Journal of Pathology*, 156 (6): 2185-2199

- Er, H., Acar, N., Kipmen-Korgun, D., Celik-Ozenci, C., Ustunel I., Asar, M., Korgun, E T. (2015). Determination of PCNA, cyclin D3, p27, p57 and apoptosis rate in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restricted rat placentas. *Acta Histochem.*: 117(2):137-47.
- Enders, A.C y Liu I.K.M. (1991a). Lodgement of the equine blastocyst in the uterus from fixation through endometrial cup formation. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement 44*: 427-138
- Enders, A.C. y Liu I.K.M. (1991b). Trophoblast-uterine interactions during equine chorionic girdle cell maturation, migration and transformation. *American Journal of Anatomy 192*: 366-381
- Espinosa, C.R. (2011). Angiogénesis placentaria. *Rev. vet.*: 2 (22): 131-138.
- Espinosa, M.B. (2014). Apoptosis, muerte celular fisiológica, reseña histórica y actualidad. *Revista de Educación en Biología*: 16 (2): 153-159
- Eklund, L., Saharinen P. (2013). Angiopoietin signaling in the vasculature. *Exp. Cell. Res.*: 319(9):1271-1280
- Ellenberger, C., Muller, K., Schoon, H.A, Wilsher, S., Allen, WR. (2009). Histological and Immunohistochemical Characterization of Equine Anovulatory Haemorrhagic Follicles (AHFs). *Reprod. Dom. Anim.*: 44: 395–405
- Evans, H.M, Gustus, E.L, Simpson, M.E. (1933). Concentration of the gonadotropic hormone in pregnant mare's serum. *J. Exp. Med.* (58):569–74.
- Fagian, E., Christofori, G., 2013. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 328: 18–26.
- Ferrara, N., Gerber, H., Le Couter, J. (2004). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9: 669 – 76.
- Fiorimanti, M., Rabaglino, M.B., Cristofolini, A., Merkis, C. (2018). Immunohistochemical determination of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in placentas of sows at 30, 60 and 114 days of gestation and validation through a bioinformatic approach. *Animal Reproduction Science*: 195: 242–250
- Fraser, A. y Eva, G. (1996). A license to kill. *Cell*: 85:781-784.
- Francioli A. L., Cordeiro B.M., Fonseca E. T., Rodrigues M. N., Sarmiento C.A., Ambrosio C. E, Carvalho A.F, Miglino M.A, Silva L.A (2011). Characteristics of the equine embryo and fetus from days 15 to 107 of pregnancy. *Theriogenology* (76); 819-832.
- Francioli, A.L.R, da-Silva-Nunes-Barreto, R., Carvalho, R.C., de- Oliveira, F.D, de-Carvalho, A.F, Ferraz, A.C. (2020). Characteristics of the equine placenta at first trimester. *Int J Morphol* 38:1018–25.
- Gale, N., Thurston, G., Hackett, S., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M., Jackson, D. (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev. Cell* :3: 411–423.
- Ginther, O.J, Beg, M.A., Neves, A.P., Mattos, R.C., Petrucci, B.P., (2008). Miniature ponies: 2. Endocrinology of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* (20); 386-390.

- Ginther, O.J. (1998). Equine Pregnancy: Physical Interactions between the Uterus and Conceptus. *AAEP Proceedings (44)*;73-104.
- Ginther, O.J. (1992). *Reproductive biology of the mare – basic and applied aspects*. 2nd ed. Cross Plains: Equiservices.
- Genbacev, O., Schubach, S.A y Miller, R.K (1992). Villous culture of first trimester human placenta model to study extravillous trophoblast (EVT) differentiation. *Placenta 13*: 439-61
- Gerstenberg, C., Allen, W.R. y Stewart, F. (1999) Cell proliferation pattern in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. *J Reprod. Fertil. :117*: 143-52
- Gosporodowicz, D. (1972). Purification and physiochemical properties of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG). *Endocrinology (91)*; 101-106.
- Grant, S.F. (2005). *Alteraciones del aparato reproductor*. En: Medicina interna equina. Reed S.M Editorial intermedica.
- Grazul-Bilska, A. T., Johnson, M. L., Borowicz, P. P., Minten, M., Bilski, J. J., Wroblewski, R., Reynolds, L. P. (2011). Placental development during early pregnancy in sheep: cell proliferation, global methylation, and angiogenesis in the fetal placenta. *Reproduction, 141*(4): 529–540.
- Guimarães G., Alves L., Betarelli R., Guimarães C., Helmo F., Pereira Júnior C., Correa R., Zangeronimo M. (2017). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and factor VIII in the gilt placenta and its relation to fetal development. *Theriogenology: 92* :63-68.
- Gowdak Wolff, L.E. y Krieger, J.E. (2018). Cap.5: Vascular Growth Factors, Progenitor Cells, and Angiogenesis. En. Da Luz P. L. (1ra ed.), *Endothelium and Cardiovascular Diseases*: 49-62. EE. UU Elsevier.
- Hamilton, D. W, Allen, W. R y Moor, R.M (1973). The origin of equine endometrial cups. III. Light and electron microscopic study of fully developed equine endometrial cups. *Anatomical Record 177*: 503-518
- Hanahan D., (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science :277*: 48–50.
- Hayes, A, Huang, W, Mallah, J, Yang D, Lippman, M., Li, L. (1999). Angiopoietin 1 and its receptor Tie2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvascular Researchn (58)*; 224-237.
- Heap, R.B, Hamon, M., Allen, W.R (1982). Studies on oestrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus. *Journal of Reproduction and Fertility: (32)*: 343–352.
- Heazell, A., Crocker, I. (2008). Live and Let Die. Regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Placenta: 29*: 772-783.
- Hyttel. P., Sinowatz F., Vejlsted M. (2010). *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Saunders Elsevier
- Holtan, D.W., Squires, E.L, Lapin, D.R., Ginther, O.J. (1979). Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. *J. Reprod. Fertil:(27)* ;457–63.

- Huppertz, B., Kadyrov, M., Kingdom, J.C. (2006). Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am. J. Obstet. Gynecol.*: 195: 29-39.
- Jerzak, M. y Bischof, P. (2002). Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*: 100(2):138-42.
- Kaczmarek, M., Kiewisz, J., Schams, D., Ziecik, A. (2009). Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology*: 71: 1298-1306
- Kar, M., Ghosh, D. y Sengupta, J. (2007). Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast. *Human Reproduction*: 22: 2814-2823.
- Kaufmann y Burton G. (1994). Anatomy and genesis of the placenta. En: *The Physiology of Reproduction*. (2da Ed) 441-484. Eds E Knobil and JD Neill. Raven Press Ltd, New York
- Kamemori, Y., Wakamiya, K., Nishimura, R., Hosaka, Y., Ohtani, S., Okuda, K. (2011). Expressions of apoptosis regulating factors in bovine retained placenta. *Placenta*: 32:20-26
- Klein, C. (2016). Early pregnancy in the mare: old concepts revisited. *Domestic Animal Endocrinology* 56: S212-S217
- Korgun, E., Celik-Ozenci, C., Acar, N., Cayli, S., Desoye, G., Demir, R. (2006). Location of cell cycle regulators cyclin B1, cyclin A, PCNA, Ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas. *Histochem Cell Biol.*: 125: 615-624.
- Korkmaz, C., Sakinci, M., Akyol, S.N., Korgun, E.T., Ozogul, C. (2013). Location of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in human first trimester and 541 term placenta. *Anal Quant. Cytol. Histol.* 35: 335-343.
- Lefranc, A.C. y Allen, W.R. (2007a). Influence of breed and oestrous cycle on endometrial gland density in the mare. *Equine Vet J* 39: 506-510
- Lefranc A.C. y Allen W.R. (2007b). Endometrial gland surface density and hyperaemia of the endometrium during early pregnancy in the mare. *Equine Vet J* 39: 511-515.
- Lefranc, A.C., Neto, V., Buff, S., Guérin, P., Pohl, O. (2014). Ultrastructure of the equine endometrium during natural and artificially induced prolonged dioestrus. *J Equine Vet Sci* 34; 182-183
- Linares, P.M., Chaparro, M., Gilbert, J.P. (2014). Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*: 8(3):183-190.
- Loke, Y.M. (1990). Experimenting with human extravillous trophoblast: a personal view. *American Journal of Reproductive Immunology* 24: 22-28
- López Albors, O., Olsson, F., Llinares, A.B., Gutiérrez, H., Latorre, R., Candanosa, E., Guillén-Martínez, A., Izquierdo, Ma. J. (2017). Expression of the vascular endothelial growth factor system (VEGF) in the porcine oviduct during the estrous cycle. *Theriogenology*: 93:46-54

- Lopez Merlo, M., Faya, M., Priotto, M., Barbeito, C., Gobello, C. (2017). Development and proliferation of feline endometrial glands from fetal life to ovarian cyclicity. *Theriogenology*: 99 119-123
- Losordo, D.W., Isner, J.M. (2001). Estrogen and angiogenesis: a review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:6–12.
- Loux, S.C., Ball, B.A. (2018). The proteome of fetal fluids in mares with experimentally-induced placentitis. *Placenta*; 64:71–8.
- Macdonald A. A, Chavatte P., and Fowden A. L, (2000). Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. *Placenta* (21);565-574.
- Ministerio de agroindustria presidencia de la nación. *Agroindustria apoya el fortalecimiento de los oficios del sector equino*. Recuperado el 12 de febrero de 2022 en https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/equinos/informacion_estadistica/
- Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Yancopoulos, G. D. (1997). Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. *Science* :277 (5322): 55-60
- Meresman., G. (2011). Relevancia de la apoptosis en la reproducción femenina. *Invest. Clin.:* 52(3): 274 – 290
- Merkis, C., Cristofolini, A., Franchino, M., Sanchis, E., Moschetti, E., & Koncurat, M. (2006). Angiogénesis placentaria durante la gestación porcina. *Redvet*, 7(4), 1–4.
- Merkis, C., Cristofolini, A., Sanchis, E., Koncurat, M. (2010). Expression of death cellular receptors FAS/CD95 and DR4 during porcine placentation. *International Journal of Morphology*: 28(3): 829-834.
- Moliva, M., Cristofolini, A., Alonso, L., Sanchis, G., Chanique, A., Merkis C. (2011). High Score of VEGF receptors, Flt-1 and Flk-1, during porcine gestation. Preliminar study. *Biocell*: 35(3): A291.
- Müller, K., Ellenberger, C., Schoon, H.A. (2009). Histomorphological and immunohisto-chemical study of angiogenesis and angiogenic factors in the ovary of the mare. *Research in Veterinary Science*: 87: 421–443.
- Müller, K., Ellenberger, C., Hoppen, H.O., Schoon, H.A. (2012). Immunohistochemical study of angiogenesis and angiogenic factors in equine granulosa cell tumours. *Research in Veterinary Science*: 92: 471–477
- Naryzhny, S.N. (2008). Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell. Mol. Life. Sci.:* 65(23):3789-808
- Noden, D.M y De Lahunta, A. (1990). Membranas extraembrionarias y placentacion, *Embriología de los animales domésticos*.:53-64. Editorial ACRIBIA S.A.
- Norwitz, E.R, Schust, D.J y Fisher, S.J. (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.*;345(19):1400-1408.

- Okano, A., Ogawa, H., Takahashi, H., Geshi, M. (2007). Apoptosis in the porcine uterine endometrium during the estrous cycle, early pregnancy and post partum. *J. Reprod. Dev.*: 53(4): 923-930.
- Olvera, M., Harris, S., Amezcua, C., McCourty., A, Rezk., S, Koo, C., Felix., J, Brynes R. (2001). Immunohistochemical expression of cell cycle proteins E2F-1, Cdk-2, Cyclin E, p27kip1, and Ki-67 in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Mod Pathol*, 14(10): 1036-1042.
- Oriol, J.G., Betteridge, K.J., Clarke, A.J, Sharom, F.J. (1993). Mucin-like glycoproteins in the equine embryonic capsule. *Mol Reprod Dev* (34); 255–65.
- Oriol, J.G, Sharom, F.J, Betteridge, K.J. (1993). Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. *J Reprod* 653–64.
- Özgen, S., Schoon, H.-A., Aupperle, H., Sieme, H., Klug, E. (2002). Etiopathogenesis of equine intrauterine fluid accumulation. *Pferdeheilkunde* 18: 594–599.
- Özgen, S., Sieme, H., Oldenhofb, H., Kassensb, A., Ertmerb, F., Rodec, K., Müllerd, K., Klosed, K., Rohne, K., Schoond, H.A., Meinecke, B. (2016). Equine endometrial vascular pattern changes during the estrous cycle examined by Narrow Band Imaging hysteroscopy. *Animal Reproduction Science*: 166 :80–89.
- Pazdzior, K., Rapacz, A., Rotkiewicz, T., Ras, A. (2012). Proliferation and Apoptosis in Fetal Membranes and Endometrium During Placental Retention in Heavy Draft Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*: 32: 80-84
- Pazinato, F.M, da Curcio, B.R, Fernandes, C.G, Santos, C.A, Feijó, L.S, Varela, A.S. (2017). Histomorphometry of the placental vasculature and microcotyledons in Thoroughbred mares with chronic laminitis. *Theriogenology*; 91:77–81.
- Perry, J.S., Heap, R.B., y Amoroso, E.C (1973). Steroid hormone production by pig blastocysts. *Nature* (245); 45–47.
- Pinzón, C. E., Serrano M.L, Sanabria M. C. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Rev. Cienc. Salud*. Bogotá: 7 (2): 47-66.
- Plendl, J., 2000. Angiogénesis and vascular regression in the ovary. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 29: 257–266.
- Regúnaga, M.; Cetrangolo, H. y Mozeris, G. (2006). *El impacto de las cadenas agroindustriales pecuarias en la Argentina*. Evolución y potencial. Biogénesis- Bagó.
- Reynolds, L.P. y Redmer, D.A. (1995). Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci*. 73: 1839–1851.
- Reynolds L., Borowicz P., Vonnahme K., Johnson M., Grazul-Bilska A., Wallace J., Caton J., Redmer D. (2005). Animal Models of Placental Angiogenesis. *Placenta* (26); 689-708.
- Rizov, M., Andreeva, P., Dimova, I. (2017). Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* :56 (2):127-132

- Roa, I.; Smok, S. C. & Prieto, G. R. (2012) Placenta; anatomía e histología comparada. *Int. J. Morphol.*, 30(4):1490-1496,
- Robles, M., Peugnet, P.M., Valentino, S.A., Dubois, C., Dahirel, M., Aubriere, M.-C., Reigner, F., Serteyn, D., Wimel, L., Tarrade, A., Chavatte-Palmer. P. (2018). Placental structure and function in different breeds in horses. *Theriogenology (108)*; 136-145.
- Rodríguez, M., Couve, C., Egaña, G., Chamy, V. (2011). Apoptosis placentaria: mecanismos moleculares en la génesis de la preclampsia. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*:76 (6): 431 – 438.
- Rutland, C. S., Latunde-Dada, A.O, Thorpe, A., Plant, R, Langley-Evans, S, Leach, L. (2007). Effect of Gestational Nutrition on Vascular Integrity in the Murine Placenta. *Science Direct. Placenta (28)*; 734 -742.
- Saharinen, P., L. Eklund, K. Pulkki, P. Bono, K. Alitalo (2011). VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis, *Trends Mol. Med. 17*: 347–362.
- Saharinen, P., Bry, M., Alitalo, K. (2010), How do angiopoietins Tie in with vascular endothelial growth factors?, *Curr Opin. Hematol. 17*: 198–205.
- Samuel Ca, Allen Wr, Steven Dh. (1974). Studies on the equine placenta I. Development of the microcotyledons. *J Reprod Fert (41)*; 441-445.
- Samuel, C., Allen, W, Steven, D. (1976). Studies on the equine placenta. II. Ultrastructure of the placental barrier. *J Reprod Fert (48)*; 257-64.
- Samuel, C., Allen, W., Steven, H. (1975). Ultrastructural development of the equine placenta. *J Reprod Fert.*, 23; 575-578.
- Samuel, C. A., Allen, W. R., and Steven, D. H. (1977). Studies on the equine placenta. III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. *J. Reprod. Fertil. (51)*; 433–7.
- Sanchis, E. G., Cristofolini, A., & Merkis, C. (2015). Porcine placental immunoexpression of vascular endothelial growth factor, placenta growth factor, Flt-1 and Flk-1. *Biotechnic & Histochemistry :90 (7)*: 486–494.
- Schauder, W. (1912). Untersuchungen uber die eithaute und Embryotrophe des pferdes. *Arch. Anat. Physiol. (192)*;259–302.
- Schiessl, B., Innes, B., Bulmer, J., Otun, H., Chadwick, T., Robson, S., Lash, G. (2009). Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy. *Placenta :30*: 79–87.
- Seval, Y., Sati, L., Celik-Ozenci, C., Taskin, O., Demir, R. (2008). The Distribution of Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 and Their Receptors Tie-1 and Tie-2 in the Very Early Human Placenta. *Placenta: 29*: 809-815.
- Shore, V., Wang, T., Wang, C., Torry, R., Caudle, M., Torry, D. (1997). Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta: 18(8)*: 657-665.
- Silva, LA., Klein, C., Ealy, AD., Sharp, D.C. (2011). Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: an anatomic, histomorphometric, and vascular

- endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. *Reproduction*:142(4): 593-603.
- Souza A.M., Winter G.H.Z., Cazales N., Miglino M.A., Mattos R.C. (2014). Endometrial surface adaptive changes during first half of pregnancy in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 34: 204
 - Squires, E.L., (1993). Embryo transfer en: *Equine Reproduction*. McKinnon AO, Voss, JL (eds.) Lea & Febiger, Philadelphia.
 - Stenhouse, C., Hogg, C.O., Ashworth, C J. (2018). Associations between fetal size, sex and both proliferation and apoptosis at the porcine feto-maternal interface. *Placenta* 70: 15–24
 - Steven, D.H y Morris, G. (1975). Development of the foetal membranes en: *Steven DH (ed) Comparative Placentation, New York: Academic Press* 214-67.
 - Stewart, F., Allen, W.R, Moor, R.M. (1976). Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of folliclestimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J. Endocrinol.* (71);471–82.
 - Stouffer, R.L., Martinez-Chequer, J.C., Molskness, T.A., Xu, F., Hazzard, T.M., (2001). Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Archives of Medical Research* 32: 567–575.
 - Stout, S. S., Stewart, F. y Allen, W. R. (2003). Development of the equine chorionic girdle: A role for allantoic mesenchyme?. *Workshop on Embryonic And Fetal Nutrition* 10: 36-38
 - Takahashi, T. y Caviness, V. S. Jr. (1993). PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral Wall. *Journal of Neurocytology* 22: 1096–1102
 - Turiello, M.P., Cristofolini, A., Fiorimanti, M., Diaz, T., Cavaglieri, L., Merkis. C. (2019). Effect of prepubertal nutrition on cellular apoptosis and proliferation in at term placenta of Anglo-Nubian goats. *Reprod. Dom. Anim.*: 54:560–570.
 - Unek, G, Ozmena, A., Ozekincib, M., Sakincib, M., Korguna, E. T. (2014a) Immunolocalization of cell cycle proteins (p57, p27, cyclin D3, PCNAand Ki67) in intrauterine growth retardation (IUGR) and normalhuman term placentas. *Acta Histochem.*: 116(3):493-502
 - Unek, G., Ozmen, A., Mendilcioglu, I., Simsek, M., Korgun, E.T. (2014b). The expression of cell cycle related proteins PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and preeclamptic human placentas. *Tissue Cell.*: 46(3):198-205.
 - Van Niekerk, C.H.I., (1965). Early clinical diagnosis of pregnancy in mares. *J S Afr Vet Med Ass* (36);55–8.
 - 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.
 - Wang, Q., Lash, G. (2017). Angiotensin 2 in placentation and tumor biology: the yin and yang of vascular biology. *Placenta*: 56 :73–78.
 - Watson, E.D. & Cross, J.C.C. (2005) Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology.* (20); 180-193.

- Weber, J.A., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K., Wood, G.L. (1991a). Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos *Biology of Reproduction* (45): 540–543.
- Weber, J.A., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K., Wood, G.L. (1991b). Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos *Biology of Reproduction* (45): 544–546.
- Weber, J.A., Woods, G.L., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K. (1992). Prostaglandin E2-specific binding to the equine oviduct Prostaglandins (43): 61–65.
- Weber, J.A., Woods, G.L., Lichtenwalner, A.B. (1995). Relaxatory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. *Biology of Reproduction Monograph* (1): 125–130.
- Wei Chen, Chen, J., Menghao X, Zhiyan Z., Zhang Q., Wei Yang., Guangying H. (2019). Electroacupuncture facilitates implantation by enhancing endometrial angiogenesis in a rat model of ovarian hyperstimulation. *Biology of Reproduction: 100*(1): 268–280
- Wei, P., Jin, X., Zhang, X.S., Hu, Z.Y., Han, C.S., Liu, Y.X. (2005) Expression of Bcl-2 and p53 at the fetal–maternal interface of rhesus monkey. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3-4
- Weitlauf, H.M. (1994). En: Biology of implantation. *The Physiology of Reproduction*. (2da Ed.) 391-429 Eds E Knobil and JD Neill. Raven Press Ltd, New York
- Winther, H., Ahmed, A., Dantzer, V. (1999). Immunohistochemical localization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus. *Placenta*, 20: 35-43.
- Wooding, F.B.P, Morgan, G., Fowden, A.L y Allen, W.R (2001). A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cell. *Placenta* (22): 749-767.
- Wooding, F.B.P. (1982). The role of the binucleate cell in ruminant placental structure *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* (31) 31–39.
- Wooding, P. y Burton, G. (2008). Comparative placentation: structure, functions and evolution. Springer. *Verlag Berlin Heidelberg*.: 1-291.
- Woudwyk, M., Zanuzzi, C., Nishida, F., Gimeno, E.J., Soto, P., Monteavaro, C., Barbeito, C.G. (2015) Apoptosis and cell proliferation in the mouse model of embryonic death induced by *Tritrichomonas foetus* infection. *Experimental parasitology* :156: 32 - 36
- Wulff, C., Wilson, H., Dickson, S., Wiegand, S., Fraser H. (2002) Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol. Reprod.*: 66: 802-812.
- Xue, W., Khoo., U, Ngan, H., Chan, K., Chiu, P., Tsao, S., Cheung, A. (2003). Minichromosome maintenance protein 7 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with Ki67, PCNA and clinicopathological parameters. *Histopathology*, 43: 485-490.
- Zhang, X., Barile, G. y Chang, S., Hays, A., Pachydaki, S., Schiff, W., Sparrow, J. (2005). Apoptosis and Cell Proliferation in Proliferative Retinal Disorders: PCNA, Ki-67, Caspase-3, and PARP Expression. *Current Eye Research*: 30:395–40

ANEXOS

ANEXO 1: TINCIONES Y SOLUCIONES

Solución salina tamponada (PBS)

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

Solución A: Na₂HPO₄.H₂O 35,61 g / 1.000 ml

Solución B: NaH₂PO₄.H₂O 27,60 g / 1.000 ml

Para obtención de pH 7,4: Solución A: 40,5 ml

Solución B: 9,5 ml

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

Tinción de hematoxilina eosina (H/E)

A)- Hematoxilina

Solución stock:

-10 % de hematoxilina en 95 % de etanol absoluto

-4 % de alumbre de sodio

-0,1 % de IO₃Na

Solución de trabajo:

-1 ml de Sn stock de hematoxilina

-40 ml de alumbre de sodio

-4,5 ml de IO₃Na

-100 ml de agua destilada

B) Eosina

Solución stock:

-1 g de eosina

-99 ml de etanol 70%

Solución de trabajo:

-1 ml de Sn stock

-15 ml de agua destilada

El protocolo de la técnica consta de los siguientes pasos:

1- Colorear con hematoxilina 1 min.

2- Lavar con agua corriente.

3- Colorear con eosina 30 seg.

4- Lavar con agua corriente.

5- Deshidratar y montar.

6- Observar al microscopio óptico.

Con esta técnica, la cromatina nuclear y otros componentes celulares basófilos se tiñen de azul/violeta, mientras que el citoplasma y otros componentes acidófilos se observan rosados.

Tinción tricrómica de Masson (TM)

Soluciones stock:

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

1º)- Ácido sulfúrico 0,8 ml

Alumbre férrico 1 g

Agua destilada 50 ml

2º)- Hematoxilina 0,5 g

Alcohol 95° 50 ml

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

B)- Fucsina ácida de Ponceau

Fucsina ácida 0,1 g

Cristal Ponceau 0,2 g

Agua destilada 300 ml

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

C)- Naranja G- molíbdico

Naranja G 2 g

Agua destilada 100 ml

Ácido fosfomolíbdico 3 g

D)- Verde luz acético

Verde luz 0,1 g

Agua destilada 100 ml

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

E)- Solución de ácido acético 1 %

Ácido acético glacial 1 ml

Agua destilada 99 ml

El protocolo de la técnica incluyó:

- 1- Teñir con hematoxilina de Groat, 2-5 min.
- 2- Lavar 5 min con agua corriente.
- 3- Teñir con la mezcla fucsina de Ponceau, 5 min.
- 4- Lavar rápido con agua acética.
- 5- Teñir con naranja G-molíbdico, 5 min.
- 6- Lavar rápido con agua acética.
- 7- Teñir con verde luz acético, 5 min.

8- Lavar rápidamente con agua acética.

9- Deshidratar los cortes de tejido y montar los portaobjetos.

Como los tejidos fueron fijados con SFB, previo a la tinción, se colocaron los portaobjetos conteniendo los tejidos a teñir en líquido de Bouin, el cual actúa como mordiente, durante toda la noche a temperatura ambiente, luego se lavaron en alcohol 70° hasta que desapareció el color amarillo del fijador.

Solución de Bouin:

-solución acuosa saturada de ácido pícrico	150 ml
-solución de formaldehído (40%)	50ml
-ácido acético glacial	10ml

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

Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

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

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

Glutaraldehído al 25 % 10 ml

PBS Sörensen 0,2 M pH 7,2 – pH 7,4 20 ml

Agua bidestilada 70 ml

Se preparó la solución fijadora, se alicuotó y se conservó a - 2 °C hasta su utilización.

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

Preparación de resina para preinclusión

Solución A:

Embed 812 5 ml

DDSA 8 ml

Solución B:

Embed 812 8 ml

NMA 7 ml

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

Preparación de resina para inclusión

Solución A:

Embed 812 5 ml

DDSA 8 ml

Solución B:

Embed 812 8 ml

NMA 7 ml

Solución de inclusión:

Solución A + B 28 ml

DMP-30 16 gotas

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

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

Solución stock OsO₄ al 2%:

-Tetróxido de osmio 1 g

-Agua bidestilada 50 ml

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

Solución de trabajo OsO₄ al 1%:

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

C)- Azul de toluidina

Borato de sodio 0,5 gr

Azul de toluidina 0,5 gr

Agua destilada 50 ml

Filtrar.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

2022



INCUBADORIA DE BUK 0035-100144



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA