

ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO DEL ALANTOCORION OVINO DURANTE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

Histomophometric Study of Alantrocorian During the Implantation Embryonic

Piedad C. Rivas¹, José M. Rodríguez-Márquez² y Aureliano Hernández³

¹ *Estudiante del Postgrado en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.* ² *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A.*

E-mail: jmrodrim@telcel.net.ve, estado Zulia, Venezuela. ³ *Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.*

RESUMEN

Con el propósito de determinar el grado de desarrollo del trofoblasto (de acuerdo al número de capas) expresado en porcentaje y el porcentaje de sus células binucleadas, se llevó a cabo un estudio en 12 hembras ovinas mestizas a los días 20 (n=4), 28 (n=4) y 35 (n=4) de gestación (preñeces simples). En cada caso, se obtuvieron cortes longitudinales consecutivos para análisis a través de microscopía óptica, coincidiendo con una línea imaginaria trazada longitudinalmente sobre la parte media dorsal de todo el saco corioalantoideo. Según el tamaño del "conceptus", se procesaron entre 8 y 10 cortes por "conceptus". Se evaluó el porcentaje de trofoblasto desarrollado (no desarrollado= epitelio simple cúbico, con una sola capa de células; desarrollado= epitelio, de dos o tres capas de células cúbicas o cilíndricas); número de células binucleadas y su distribución en las diferentes zonas del "conceptus". El porcentaje de trofoblasto desarrollado (DT) aumentó con la edad de gestación, siendo de 51,9 % a los 20 días, 67,4% a los 28 días y 84,9 % a los 35 días de gestación. Los valores hallados para el número de células binucleadas (CBN) fueron de 28,7% en el día 20 de gestación, 25,9% a los 28 días y 53,5% a los 35 días. Los resultados obtenidos en este estudio revelan que el desarrollo trofoblástico se presenta de una manera cronológica y gradual, al tiempo que permiten postular la no existencia de un patrón completamente definido en relación con los cambios morfológicos de la implantación específicamente en relación al porcentaje de CBN. Contrariamente a lo encontrado en estudios previos, el desarrollo trofoblástico y por ende la modificación del epitelio uterino a partir del contacto con

un trofoblasto desarrollado, pueden ocurrir durante un lapso que llega hasta el final del período embrionario.

Palabras clave: Trofoblasto, células binucleadas, corioalantoideo, oveja, implantación.

ABSTRACT

In order to determine the degree of trophoblastic development (according to the number of layers) and the amount of binucleate cells in single pregnancies during part of the embryonic implantation period in sheep, twelve crossbred ewes were studied at 20, 28 and 35 days of gestation (4 animals per age). Consecutive longitudinal sections covering the whole dorsal length of the allantochorion were analyzed by optical microscope, along an imaginary line drawn longitudinally along the mid dorsal part of the corioalantoid sack. A non developed trophoblast was considered to be a simple cuboidal epithelium, whereas a developed one, was represented by a two or three layered epithelium. The percentage of trophoblastic development increased with the age of gestation. Thus, it was 51,9; 67,4 and 84,9 at 20, 28, and 35 days of gestation, respectively. The binucleate cells represented 28,7; 25,9 and 53,5 % of the total number of trophoblastic cells, at 20, 28 and 35 days of gestation, respectively. Therefore, it is clear that trophoblastic development occurs in a gradual manner. It is also valid to postulate that there is not a defined pattern of cellular change during the period of implantation studied, particularly in regard to the number of binucleate cells. In contrast to previous results, trophoblastic development may occur up to the end of the embryonic period in sheep.

Key words: Trophoblast, binucleate cells, allantochorion, sheep implantation.

INTRODUCCIÓN

La mortalidad embrionaria es la totalidad de pérdidas reproductivas desde la concepción hasta la terminación de la diferenciación embrionaria [2]. La mayor mortalidad embrionaria en ovejas tiene una incidencia de 33,5% [13], incluso se reportan porcentajes de 36,7% [11] siendo más alta en el período de preimplantación. La mortalidad embrionaria presenta niveles basales cuyas causas son aun desconocidas y hay influencia de factores que la incrementan, tales como endocrinos, nutricionales, estrés, manejo y genéticos, entre otros [6]. Ella tiene un gran impacto económico en la industria del ganado vacuno, dado que alrededor del 35% de todos los "conceptus" mueren durante el período de preimplantación [4]. Puede ser originada por varios factores, pero aún en condiciones óptimas de bienestar de los animales, los niveles basales de mortalidad embrionaria pueden tener un trasfondo genético y por lo tanto, su expresión se podría detectar a partir de la identificación de cambios morfológicos o ausencia de la expresión de moléculas claves características (hormonas esteroideas, factores de crecimiento, citoquinas, por ejemplo) para la supervivencia embrionaria cuya participación en este contexto no está completamente esclarecida.

En la oveja, la implantación es un proceso lento, ya que la formación de la placenta definitiva (verbigracia, cuando se han desarrollado totalmente los "placentomus" y su número definitivo se ha completado) puede tardar hasta el día 60 de la gestación. Así mismo, es un proceso gradual que se inicia cerca del embrión y se extiende hacia la periferia del "conceptus" [10]. Los aspectos mencionados, implican un área relativamente pobre de intercambio fisiológico entre el "conceptus" y la madre durante un lapso crítico de la gestación, con posibles consecuencias en la supervivencia del embrión. Las ovejas del trópico presentan un bajo índice de gestaciones múltiples en comparación con lo que ocurre en países de la zona templada [6, 14].

En estudios previos, se ha concluido que la implantación ya se ha iniciado el día 21 de gestación en la vaca [7] y 15 en la oveja [8, 9] en las áreas cercanas al embrión. Además la anatomía microscópica típica del corion que ha iniciado la implantación, consiste en la presencia de un trofoblasto con 2 ó 3 capas celulares, adherido al epitelio uterino el cual se ha transformado de epitelio cilíndrico simple a cúbico o plano simple [8, 15]. Los criterios de porcentaje de trofoblasto desarrollado (DT), modificación del epitelio uterino como resultado de su contacto con el trofoblasto desarrollado y porcentaje de células binucleadas (CBN) constituyen una base para la evaluación post-mortem de la viabilidad embrionaria [3, 7, 8, 10, 15]. Sin embargo, en estudios anteriores, las evaluaciones sobre cambios histológicos del útero y membranas embrionarias durante la implantación temprana en la oveja, se han llevado a cabo en micropreparados de cortes transversales del corion o alantocorion, los cuales, si bien pueden tomarse como representativos de las diferentes zonas del "conceptus", dejan un interrogante

acerca de los posibles cambios anatómicos que puedan ocurrir en las zonas comprendidas entre cortes [8, 10, 15].

Este trabajo fue realizado con el fin de evaluar el Desarrollo Trofoblástico y el porcentaje de Células Binucleadas en tres diferentes edades de la implantación ovina, en un área representativa del "conceptus".

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron doce hembras ovinas mestizas clínicamente sanas, en buen estado nutricional, las cuales se sacrificaron por degüello, previa insensibilización, en los días 20 (n=4), 28 (n=4) y 35 (n=4) de la gestación (preñeces simples). Las ovejas fueron mantenidas en observación durante dos ciclos estrales consecutivos. El estro fue detectado por observación directa (dos veces al día), y usando un macho caudoepidectomizado provisto de un chaleco marcador. La inseminación natural ocurrió por monta directa, luego de detectado el tercer celo. Después de varias cópulas, se tomó el día posterior al coito como el primero de la gestación. Lo anterior significa que el día de la inseminación natural, se consideró como el día cero. Al llegar al día de preñez señalado, los animales fueron sacrificados, previa confirmación de la preñez por ultrasonografía.

Los úteros se recolectaron dentro de los 2 ó 3 minutos siguientes al sacrificio del animal y fueron fijados por perfusión con glutaraldehído (solución al 1,5% de pH 7,0) a través de las arterias uterina media y vaginal y se les sometió a postfijación con formalina tamponada al 10% por más de 24 horas.

Se extrajo el "conceptus" de la cavidad uterina, y se tomaron entre 8 y 10 cortes longitudinales dorsales consecutivos del "conceptus" según el tamaño del mismo, abarcando así muestras del área completa del "conceptus". Además se identificó el corte en el que se hallaba el embrión. De las muestras imbibidas en parafina se obtuvieron cortes de 5 micrómetros de grosor, los cuales fueron coloreados con un método estándar de PAS para la visualización de las células binucleadas y con H&E para los demás análisis, usando criterios establecidos previamente, así: Trofoblasto de una sola capa de células cuboidales equivale a un trofoblasto no desarrollado. El trofoblasto desarrollado está formado, en general, por un epitelio de 2 a 3 capas celulares de tipo cúbico o cilíndrico [8; 15]. Para la determinación del porcentaje de trofoblasto desarrollado se observaron todos los campos ópticos de cada corte, utilizando el objetivo de 100 X. En cada campo óptico, se obtuvo un porcentaje de desarrollo que sumado a los valores de los otros campos, y dividido por el número de los observados, expresó el porcentaje promedio de trofoblasto desarrollado [7]. CBN: Se calculó el porcentaje de células binucleadas, a partir de todas las células trofoblásticas cuantificables en un campo óptico, con el objetivo de 100 X.

Se utilizó una metodología que incluyó estadística descriptiva para las diferentes variables zona histológica (cada corte longitudinal es una zona histológica) y día de implanta-

TABLA I
PORCENTAJE DE DESARROLLO TROFOBLÁSTICO Y DEL NÚMERO DE CÉLULAS BINUCLEADAS EN LA OVEJA A LOS 20, 28 Y 35 DÍAS DE LA GESTACIÓN

Edad	Desarrollo trofoblástico		Células binucleadas	
	\bar{X}	E.E	\bar{X}	E.E
20 días	51,9 ^a	4,2	28,7 ^a	3,0
28 días	67,4 ^b	4,7	25,9 ^a	2,5
35 días	84,7 ^c	4,78	53,5 ^b	4,65

• Valores con letras distintas presentan diferencias significativas (P<0,05), \bar{X} = promedio.

ción, y pruebas de *t* para la comparación de medias independientes, con un procedimiento sistematizado [16].

RESULTADOS

El DT aumentó concordantemente con el avance de la gestación detectándose diferencias significativas (P<0,05) entre edades (TABLA I). Para la variable CBN, no hubo diferencias significativas entre los valores encontrados a los 20 y los 28 días, encontrándose una ligera disminución en el día 28 con respecto al 20. Entre los días 20 y 28 versus el 35 sí hubo diferencias significativas (P<0,05), poniéndose en evidencia un aumento notable en este último muestreo (TABLA I).

El día 20 de la gestación, hubo diferencias significativas en relación con los valores de DT (P<0,05) entre las zonas de un mismo "conceptus", siendo mayor en la zona del embrión (promedio y error estándar 74,6 ± 4,76) y en las aledañas en el lado ipsilateral al embrión (54,9 ± 4,6), pero menor en el lado contralateral, así como en los extremos del "conceptus" (20 ± 2,8; FIG. 1). Para CBN también se detectaron diferencias significativas (P<0,05) entre las distintas zonas estudiadas, ya que la mayor cantidad de células se encontró en la zona del embrión (33,4 ± 3,6) y en las aledañas (24,9 ± 1,1), mientras que en las correspondientes al cuerno contralateral y en los extremos del "conceptus" los valores promedio de CBN fueron más bajos (17,6 ± 0,66; FIG. 2).

Para el día 28 de la gestación, hubo diferencias significativas (P<0,05) para DT, entre los valores correspondientes a las zonas cercanas al embrión (90 ± 4,83) y las del lado contralateral al embrión (55 ± 3,72), y los de las extremidades del "conceptus" (23,4 ± 2,8; FIG. 1). De igual forma se presentaron diferencias significativas (P<0,05) en los valores de CBN entre las zonas aledañas al embrión (33 ± 3,1) y las correspondientes al cuerno contralateral, así como en los extremos del "conceptus" en donde los valores de CBN fueron significativamente más bajos (17,2 ± 0,60; FIG. 2).

En el día 35 de la gestación, se encontraron diferencias significativas para los valores promedio de DT y CBN, entre zonas estudiadas (P<0,05). Cabe destacar que en la mayoría de los casos, en la zona del embrión y en las zonas correspondientes al cuerno ipsilateral, se encontró un valor de DT de 100% (FIG. 1), y en el área del "conceptus" correspondiente al cuerno

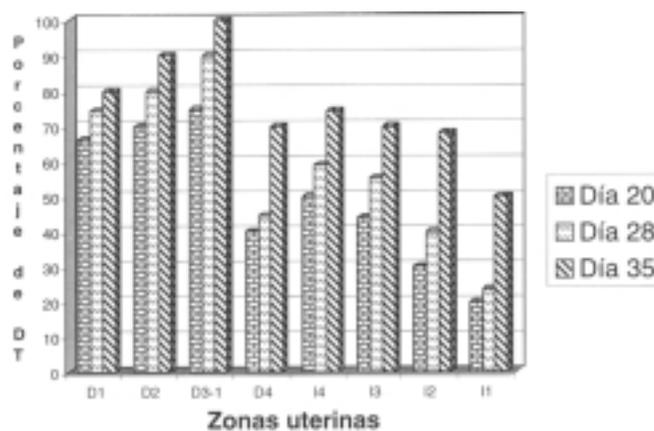


FIGURA 1. PORCENTAJE PROMEDIO DE DESARROLLO TROFOBLÁSTICO (DT) EN TODA LA EXTENSIÓN DEL "CONCEPTUS" OVINO DIVIDIDO EN ZONA, LOS DÍAS 20, 28 Y 35 DE LA GESTACIÓN. D3-1 = SITIO DE UBICACIÓN DEL EMBRIÓN. D, I = CUERNOS UTERINOS DERECHO E IZQUIERDO, RESPECTIVAMENTE. I1, D1 = REGIONES UTERINAS CERCANAS AL OVARIO I4 y D4 = CERCANAS AL CUERPO UTERINO.

contralateral, el porcentaje varió del 50 ± 4,76 al 74,3 ± 4,83% (FIG. 1). En cuanto a los valores de CBN para el día 35 de gestación, se encontró un % CBN aumentado respecto del día 28, presentándose porcentajes de 56,8 ± 4,5 en la zona del embrión, el cual varió del 25,3 ± 3,0 al 45,4 ± 3,4 en el área del "conceptus" correspondiente al lado contralateral al embrión (FIG. 2).

Se observó que durante el proceso de implantación, el trofoblasto muestra una gran diversidad morfológica, en lo que respecta al número de capas celulares, pues el día 20 de gestación presentó 1 ó 2 capas de células, mientras que en el día 35 de gestación, se observaron de 2 a 4 capas. En ambos casos el número de ellas fue mayor en las áreas adyacentes al embrión.

DISCUSIÓN

Con base en los hallazgos obtenidos en este trabajo, se puede plantear que la implantación en la oveja es un proceso lento y progresivo que se inicia en las zonas cercanas al em-

brión y va extendiéndose paulatinamente al resto de la interfase útero-trofoblasto lo cual está de acuerdo con lo encontrado en trabajos previos [8, 10, 15]. Lo anterior, corrobora lo planteado previamente en cuanto a que la implantación es una etapa crítica para la supervivencia del embrión, si se tiene en cuenta que la vascularización del corioalantoides ocurre a un ritmo menor que el observado en el crecimiento de las membranas extraembrionarias en la oveja y la vaca [10].

En este trabajo se encontraron valores diferentes en el porcentaje de DT, en relación con otros realizados anteriormente [8, 15], lo cual podría deberse al área de análisis utilizada en los estudios mencionados, siendo más representativa la del presente trabajo, dado que en aquellos se usaron cortes transversales de alantocorion, mientras que en éste, se tomaron cortes longitudinales que representaron el 100% de la extensión del saco alantoideo en su región dorsal, con lo que se logró cubrir un área mayor que en otros análisis, por lo cual puede inferirse que con ello se ofrecen datos de mayor confiabilidad.

Las variaciones halladas en función de la edad con respecto al número de células binucleadas ya había sido previamente descrito en ovejas y bovinos [7, 8].

Para realizar una evaluación post-mortem de la mortalidad embrionaria en ovinos, se conocen algunos parámetros tales como el número de células binucleadas, la vascularización del alantocorion, el número de cristaloides intracitoplasmáticos, tasa mitótica y desarrollo del trofoblasto [3, 5]. En el presente estudio se encontró que entre los días 20 y 35 de gestación, el trofoblasto posee de 1 a 4 capas de células, siendo las zonas más desarrolladas las adyacentes al embrión. Es claro entonces, que el desarrollo trofoblástico aumenta a medida que avanza la gestación, lo que ha sido comprobado antes, tanto en ovejas [8, 15], como en vacas [7].

Los valores de células binucleadas encontrados en el presente trabajo para las 3 edades de gestación estudiadas, se encuentran por encima de los reportados previamente para ruminantes (entre 15 y 20 % del total) [18]. Es posible que tales diferencias se deban al método empleado, dado que en el presente trabajo, se analizó un área mayor que la estudiada por otros investigadores, ya que se tomaron muestras de trofoblasto longitudinales consecutivas, en vez de transversales.

El porcentaje de CBN aumentó significativamente entre los 28 y los 35 días de la gestación, dado que el período embrionario de la oveja termina alrededor del día 36, es posible que el incremento en el número de células binucleadas observado tenga importancia en este contexto, así como en los procesos inherentes al desarrollo de los placentomas que se da durante el período ulterior al día 25 de la gestación y está aún en evolución en el día 35.

Las células binucleadas migran hacia el endometrio, lo cual haría fluctuar su número, es decir, una escasa cantidad de ellas, podría representar un estado de mayor utilización de los productos elaborados por estas células [17], haciendo va-

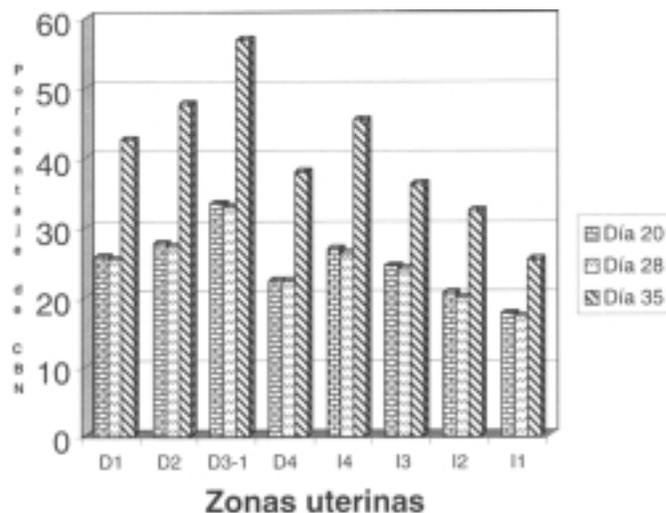


FIGURA 2. PORCENTAJE PROMEDIO DE CÉLULAS BINUCLEADAS (CBN) EN TODA LA EXTENSIÓN DEL “CONCEPTUS” OVINO DIVIDIDO EN ZONAS, LOS DÍAS 20,28 Y 35 DE LA GESTACIÓN. D3-1 = SITIO DE UBICACIÓN DEL EMBRIÓN. D, I = CUERNOS UTERINOS DERECHO E IZQUIERDO, RESPECTIVAMENTE. I1, D1 = REGIONES UTERINAS CERCANAS AL OVARIO. I4 y D4 = CERCANAS AL CUERPO UTERINO.

riar el número de manera importante. Las células binucleadas comienzan a formarse coincidentemente con el inicio de la implantación (día 15 de la gestación), posiblemente en las zonas basales del trofoblasto pues ellas se observan esporádicamente cerca de la membrana basal del trofoblasto, migrando posteriormente hacia la zona apical del epitelio y vertiendo su contenido en el útero, según lo propuesto por Wooding et al. [17]. Las células binucleadas secretan somatomatotropina (lactógeno placentario), posiblemente un modulador de procesos metabólicos y crecimiento fetal [12, 17], y proteínas asociadas con la preñez [1], teniendo como una función importante el suministro de proteínas estructurales y energía a partir de lípidos o del glucógeno liberados a la luz uterina [17].

CONCLUSIONES

Se concluye que la anatomía típica de la placenta incipiente, consiste en la presencia de un trofoblasto con 2 a 4 capas celulares. Así mismo es posible concluir que tanto el porcentaje de trofoblasto desarrollado como el de células binucleadas es mayor en las áreas cercanas al embrión, coincidiendo con la presencia de vasos sanguíneos que fue mayor en dichas áreas. Sin embargo, aún falta por conocer más acerca de los factores evaluados aquí, así como su importancia en la viabilidad embrionaria; si bien se han identificado algunas funciones de las células binucleadas, no es completa la información acerca de la función de dichas células. Así pues, aunque se sabe que dichos factores constituyen una base para la

evaluación post-mortem de las pérdidas de embriones durante la implantación, aun falta conocerlos más a fondo. Estos y otros interrogantes deben ser resueltos en aras de ofrecer un conocimiento más profundo de los fenómenos implicados en el evento de la mortalidad (o supervivencia) embrionaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BECKERS, A.; ZARROUK, J.F.; BATALHA, E.S.; GARBAYO, J.M.; MESTER, L.; SZENCI, O. Endocrinology of pregnancy: chorionic somatomammotropins and pregnancy-associated glycoproteins: review, **Acta Vet. Hung.** 46:175. 1998.
- [2] BOLET G. Timing and extent of embryonic mortality in pigs, sheep and goats: Genetic variability. In: Sreenan JM, and Diskin MG, (ed) Embryonic mortality in farm animals. Seminar of the comission or european communities. **Dordrecht, Martinus Nihoff Pub.** 12-43. 1986.
- [3] BOSHIER, D.P. Histological examination of serosal membranes in studies of early embryonic mortality in the ewe. **J. Reprod. Fertil.** 15: 81-86. 1968.
- [4] BRIJALDO, V.; HERNÁNDEZ, A.; SCHROEDER, W. Estudio del no retorno al calor en ganado Holstein friesian de la Sabana de Bogotá. **Rev. Acovez.** 6:20. 1982.
- [5] CARDONA, M.; GAVIRIA, M.; HERNÁNDEZ, A. Tasa mitótica, número de células binucleadas y desarrollo trofoblástico en la oveja durante la implantación. **Rev. Acovez.** 20: 6-8. 1995.
- [6] DIAZ, F. Fertilidad y características del ciclo estral en ovejas en el trópico alto colombiano. **Universidad Nacional de Colombia.** 28pp. 1992.
- [7] DLAIKAN, H.; HERNÁNDEZ, A.; CORTÉS, A. Modificación del epitelio de revestimiento del útero y desarrollo trofoblástico, a los 21, 23, 28 y 36 días de la gestación en la vaca. **Arch. Med. Vet.** XXXI(2): 197-203. 1999.
- [8] GAVIRIA, M.; HERNÁNDEZ, A. Morphometry of implantation in the sheep. Trophoblast attachment, modification of the uterine lining, conceptus size and embryo location. **Theriogenology.** 41:1139-1149. 1994.
- [9] GUILLMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. **J. Reprod. Fertil.** 49 (suppl): 39-51. 1995.
- [10] HERNÁNDEZ, A. The development of the extremities of the placenta of the domestic sheep. M.Sc. dissertation. **University of Bristol.** England: 82pp. 1971.
- [11] KAULFUSS, K.; MAY, J.; SÜSS, R.; MOOG, U. In vivo diagnosis of embryo mortality in sheep by real-time ultrasound. **Small Rumin. Res.** 24 (2): 141-145. 1997.
- [12] LIANG, R.; LIMESAND, S.W.; ANTHONY, R. V. Structure and transcriptional regulation of the ovine placental lactogen gene. **Eur. J. Biochem.** 265(3):883-895. 1999.
- [13] MOOG, U.; SÜSS, R.; SCHUIS, J. Ovulation rate, conception rate and embryonic mortality in German Mutton Merino ewes. **Monatshefte für Veterinärmedizin.** 49 (5): 213-218. 1994.
- [14] NARANJO, A. Comportamiento reproductivo ovino en una región alta de Colombia. Granja Experimental San Jorge ICA. **Rev. ICA.** 13:297-319. 1978.
- [15] RODRÍGUEZ, J.; JIMÉNEZ, C.; HERNÁNDEZ, A. A microscopical study of uterine lining modification, binucleate cells number and trophoblastic development, at days 14, 20, and 24 of gestation in single and multiple pregnancies in sheep. **Small Rumin. Res.** 35: 163-168. 2000
- [16] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, SAS User's Guide: Statistic (Version 5 Ed.) SAS Inst., Inc., Cary, NC. 1995.
- [17] WOODING, F.B.P.; FLINT, A.; HEAP, R.; MORGAN, G.; BUTTLE, H. Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. **J. Reprod. Fertil.** 76(2): 499-502. 1986.
- [18] WOODING, F.B.P.; MORGAN, G.; ADAM, C.L. Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: Central role of the trophoblast binucleate cell in deer. **Microsc. Res. Tech.** 38[1-2], 88-99. 1997.