

Determinación de variables morfométricas en glándulas endometriales en los días 30 y 70 de la gestación en porcinos

Morphometric variables determination in porcine endometrial glands at 30 and 70 gestation days

FIORIMANTI, MR ^{1,2} ; CRISTOFOLINI, AL ^{1,2} ; GÓMEZ, KP ^{1,2} ; BARBEITO, CG ³ ; MERKIS, CI ^{1,2}

¹Área de Microscopía Electrónica, Dpto. de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. ²Instituto de Ciencias Veterinarias (INCIVET), CONICET-Universidad Nacional de Río Cuarto. ³Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Se determinaron las variables morfológicas, número, área de lumen y altura celular de las glándulas endometriales de la cerda gestante en una etapa temprana de 30 días y en una media tardía al día 70. Se obtuvieron muestras placentarias de 30 y 70 días de gestación, provenientes de frigoríficos de Río Cuarto (Córdoba, Argentina). Parte de las placentas fueron procesadas mediante la técnica para microscopía óptica convencional y destinados al análisis digital de la morfometría glandular. Otra parte fue procesada por la técnica de microscopía electrónica convencional para la técnica de MOAR. Se detectó un número significativamente mayor de glándulas endometriales en el día 30 de gestación respecto del día 70. El área de lumen glandular fue significativamente mayor al día 70 respecto del día 30 de gestación. La altura celular fue significativamente mayor en el día 30 de gestación. La técnica de MOAR permitió visualizar con mayor detalle el epitelio glandular y diferenciar células ciliadas de secretoras. En la gestación temprana, el crecimiento glandular es activo, hay numerosas glándulas y moderada actividad secretora. En la gestación media tardía, las glándulas endometriales no aumentan en número, pero sí en actividad secretora acompañando las crecientes demandas metabólicas del feto en desarrollo.

Palabras clave: (glándulas), (placenta), (cerdos).

SUMMARY

Morphological variables, number, lumen area and cell height of the endometrial glands of the pregnant sow were determined at an early stage of 30 days and in a late average at day 70. Placental samples of 30 and 70 days of gestation were obtained from slaughterhouses from Río Cuarto, (Córdoba, Argentina). Part of the placentas were processed using the conventional optical microscopy technique and destined for digital analysis of glandular morphometry. Another part was processed by the conventional electron microscopy technique for the MOAR technique. A significantly higher number of endometrial glands was detected on day 30 of gestation compared to day 70. The glandular lumen area was significantly greater on day 70 compared to day 30 of gestation. Cell height was significantly higher on day 30 of gestation. The MOAR technique allowed visualizing the glandular epithelium in greater detail and differentiating ciliated from secretory cells. In early gestation, glandular growth is active, with numerous glands and moderate secretory activity. In late mid-gestation, the endometrial glands would not increase in number, but in secretory activity, accompanying the increasing metabolic demands of the developing fetus.

Key words: (endometrial glands), (placenta), (pigs).

INTRODUCCIÓN

La gestación en cerdas dura en promedio 114 días, dando camadas de 8 a 10 lechones para cerdas de primera parición y de 10 a 16 lechones en cerdas adultas¹⁶. En la cerda gestante, el crecimiento placentario comienza desde el día 20 de gestación, desarrollándose mediante el contacto que se establece entre el epitelio uterino y el trofoectodermo^{6,19}. De esta manera, las microvellosidades maternas y fetales se van interdigitando para incrementar el área de contacto sin pérdida de la continuidad de las membranas fetales²¹. La placenta porcina se caracteriza por ser epitelio corial, difusa, no invasiva, plegada y a decidua^{3,6}. La eficiencia del intercambio de nutrientes entre las circulaciones materna y fetal afecta el desarrollo de los embriones/fetos y, por lo tanto, influye en el tamaño de la camada, el peso al nacer y la supervivencia postnatal^{17,20,21}. El componente materno de la placenta proviene del endometrio de la cerda gestante, su superficie posee surcos o fosas que se entrelazan con los numerosos y complejos pliegues del corion fetal conformando las vellosidades placentarias^{4,5,6}. A medida que avanza la gestación pequeñas ondas de crecimiento de los pliegues dan lugar a los pliegues secundarios y terciarios, incrementando la superficie para el intercambio metabólico²³. En el componente fetal, el trofoblasto se continúa con el tejido mesenquimático que presenta vasos

sanguíneos de distintos tamaños que nutren al embrión^{3,4}. En el tejido conectivo materno, subyacente al epitelio uterino, existen abundantes glándulas uterinas que son encargadas de la nutrición histiotrofa. Cuando la gestación avanza se distinguen macroscópicamente en la placenta dos zonas, las areolas, discernibles histológicamente a partir del día 18 de gestación^{7,20} y las regiones interareolares. Las areolas surgen como prominencias proliferativas del trofoblasto frente a las cavidades de las glándulas uterinas y constituyen el principal sitio por donde se realiza la nutrición histiotrofa¹³. El epitelio de revestimiento areolar es cilíndrico simple, posee largas microvellosidades, un sistema tubular apical bien desarrollado y numerosas vesículas recubiertas, destacándose por su alta capacidad de absorción¹². Las regiones interareolares, consisten en una capa de epitelio endometrial materno fuertemente adherido a una capa de trofoblasto, donde ocurre el intercambio gaseoso y la absorción de sustancias hemotrofas por parte del trofoblasto^{2,9,20}. Las glándulas endometriales son de tipo tubular y su revestimiento epitelial es columnar simple y consiste básicamente en dos tipos de células, las ciliadas y las secretoras, que asientan sobre una delgada lámina basal¹³. Las secreciones glandulares forman el histotrofo, que contiene distintos factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, proteínas de transporte, y otras sustancias¹. Hacia el inicio de la gestación las

glándulas son tubulares y espiraladas con lumen estrecho, sin embargo, desde la mitad y hasta el final de la preñez, se dilatan, e involucionan rápidamente luego del parto¹³. Los defectos en el desarrollo y función de las glándulas uterinas pueden ser factores causantes de pérdidas o complicaciones en la preñez^{10,11,14,15}. Conocer los cambios morfofisiológicos glandulares a lo largo de la gestación es de especial importancia, ya que condicionan y acompañan el desarrollo embrionario/fetal. El objetivo de este trabajo fue determinar cambios morfológicos (número, área de lumen y altura celular) de las glándulas endometriales que ocurren entre una etapa temprana de gestación (30 días) y una media tardía al día 70 en la placenta porcina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se trabajó con muestras placentarias obtenidas de cerdas mestizas en estadios gestacionales de ± 30 (n=5) y ± 70 (n=5) días provenientes de frigoríficos y criaderos de la zona de Río Cuarto, destinadas a faena y consideradas libres de enfermedad de acuerdo a la examinación clínica y postmortem realizada. La edad gestacional de los embriones/fetos se estimó de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los embriones y/o fetos obtenidos de cada cerda gestante^{11,18}. Los tractos reproductivos se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco, USA) contenido 10.000 U/ml de penicilina G sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomycin y 2,5 µg/ml de fungizona, manteniéndolos a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Se realizó una palpación para detectar la ubicación de los embriones o fetos y los cuernos uterinos fueron cuidadosamente abiertos en forma longitudinal con una incisión por el borde anti-mesometrial y placentario fetal. Se extrajeron los embriones/fetos de ambos cuernos y se procedió al conteo, pesaje, medición y sexado de los mismos. Parte del tejido placentario se procesó por la técnica de microscopía óptica convencional para el análisis de la estructura tisular y para estudios morfométricos. El resto del tejido se procesó por la técnica de microscopía electrónica convencional para la observación a través de la técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR).

Análisis de la estructura tisular

Técnica de histología convencional para microscopía óptica. Las muestras de tejido placentario fetal y materno se fijaron en formol tamponado al 10 % por 24 a 48 h, se deshidrataron con baterías de alcoholes de graduación creciente atemperado a 38-40 °C (3 veces por alcohol 96 % y 2 veces por alcohol absoluto, 15 min cada uno de los lavados). Luego se aclaró el tejido mediante 3 pasajes por xilol, 10 min cada uno, y se impregnó en parafina fundida a 51 °C durante 2 a 4 h. Los tejidos fueron cortados en un micrótomos IEC Minetome en delgadas láminas de 5 a 6 µm, las que se colocaron en agua atemperada a 52 °C para ser recogidas sobre portaobjetos y luego secados sobre una platina térmica. Los cortes se colorearon con hematoxilina-eosina para el análisis por microscopía óptica de la estructura placentaria y morfometría.

Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR). Las muestras placentarias materno/fetales fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5 % en solución tampón fosfato (pH 7,2-7,4) e incubadas durante 24 horas a 4 °C para su fijación, luego fueron refijadas en tetróxido de osmio al 1 %, de 2 a 4 horas a temperatura ambiente y nuevamente lavadas en solución tampón fosfato (pH 7,2-7,4). La deshidratación se realizó en una batería de acetona de concentraciones crecientes (50 %, 70 %, 90 % y 100 %) y posteriormente las muestras fueron incluidas en EMBED 812 a 60 °C durante 24 horas. Se realizaron cortes semifinos de $\pm 0,25$ µm, fueron coloreados con azul de toluidina, sobre platina termostatazada, luego fueron montados sobre portaobjetos en DPX (Merk®) y observados a través de un microscopio óptico Axiophot (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 y el procesamiento de las mismas a través del software AxioVision Release 4.6.3 (Zeiss, Alemania).

Análisis morfométrico

Se utilizaron los cortes histológicos coloreados con hematoxilina/eosina. Para la observación de la estructura tisular placentaria se utilizó un microscopio óptico Axiophot (Zeiss, Alemania), mediante la cámara Canon Powershot G6 7.1 megapixels (Canon, Japón) se tomaron 10 imágenes digitales en formato TIFF, a 400 x, de

las muestras placentarias estudiadas por cada día de gestación. El análisis de las variables morfométricas área de lumen glandular (μm^2), número de glándulas/área de imagen (400 x) y altura de las células del epitelio glandular (μm), fue determinado a través de la utilización del Software Axiovision Release 4.6.3 (Zeiss, Alemania).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el software InfoStat, mediante un ANOVA con un test *a posteriori* LSD-Fisher para evaluar la dependencia de las variables analizadas con respecto al estadio gestacional⁸.

RESULTADOS

En el análisis de la estructura placentaria al día 30, se observaron las vellosidades placentarias primarias características del primer tiempo de gestación, formadas por pliegues de la membrana corioalantoidea interdigitada con los surcos uterinos. En el endometrio uterino, en el día 30 de gestación, se evidenciaron numerosas glándulas uterinas dispuestas uniformemente en el tejido conectivo (Figura 1 A). En este estudio,

en el día 70 de gestación, se pudo observar una mayor complejidad en las arborizaciones que conforman las vellosidades placentarias, sin embargo, la cantidad de glándulas observada en la gestación media tardía fue menor (Figura 1 B). En el día 30 de gestación, sobre el total de las imágenes analizadas, se contabilizaron 118 glándulas endometriales, mientras que en el día 70, 92 glándulas (Tabla I). El análisis estadístico, reveló un aumento significativo en el número de glándulas endometriales en el día 30 de gestación respecto al día 70 ($p < 0.05$) (Figura 2 A). Al evaluar el área de lumen glandular, se observó un aumento significativo al día 70 respecto del día 30 de gestación ($p < 0.05$) (Figura 2 B). Por otro lado, la variable altura celular, fue determinada por la diferencia entre el diámetro mayor y el diámetro menor de las glándulas. La altura celular fue significativamente mayor en el día 30 de gestación ($p < 0.05$) (Figura 2 C), e inversamente proporcional al área del lumen glandular. La técnica de MOAR permitió visualizar con mayor detalle el epitelio glandular. Se diferenciaron dos tipos celulares, células secretoras y células ciliadas en los dos momentos de gestación estudiados (Figura 3). Además, fue posible detectar, en ambos tiempos de muestreo, la presencia de abundantes gránulos densos en la parte apical del citoplasma.

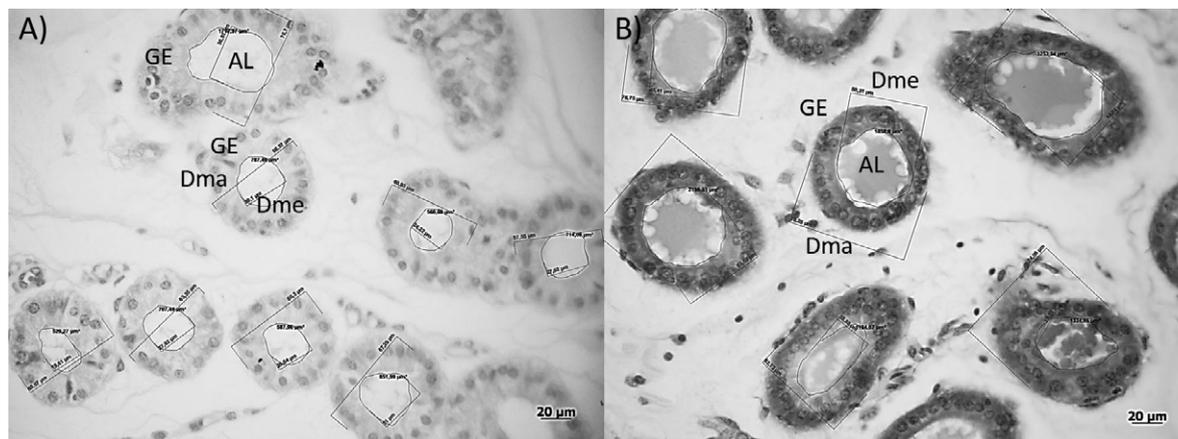


Figura 1. Microfotografías ilustrativas del análisis morfométrico con el software Axiovision 4.6.3. Tejido placentario porcino teñido con hematoxilina-eosina de 30 A) y 70 B) días de gestación. GE: glándulas endometriales, Dma: diámetro mayor, Dme: Diámetro menor, AL: área de lumen glandular.

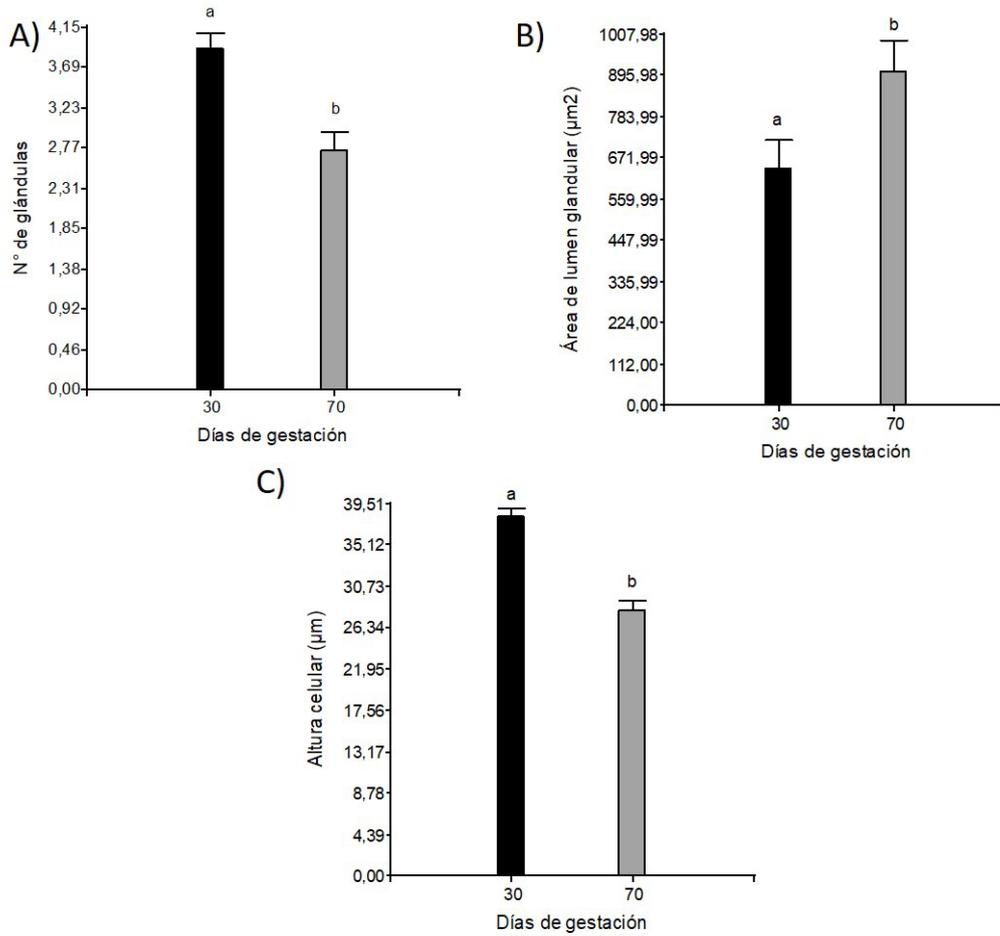


Figura 2. Gráficos que representan las variables morfométricas: A) Número de glándulas endometriales al día 30 y 70 de gestación, B) Área de lumen de las glándulas endometriales al día 30 y 70 de gestación, C) Altura celular de las glándulas endometriales.

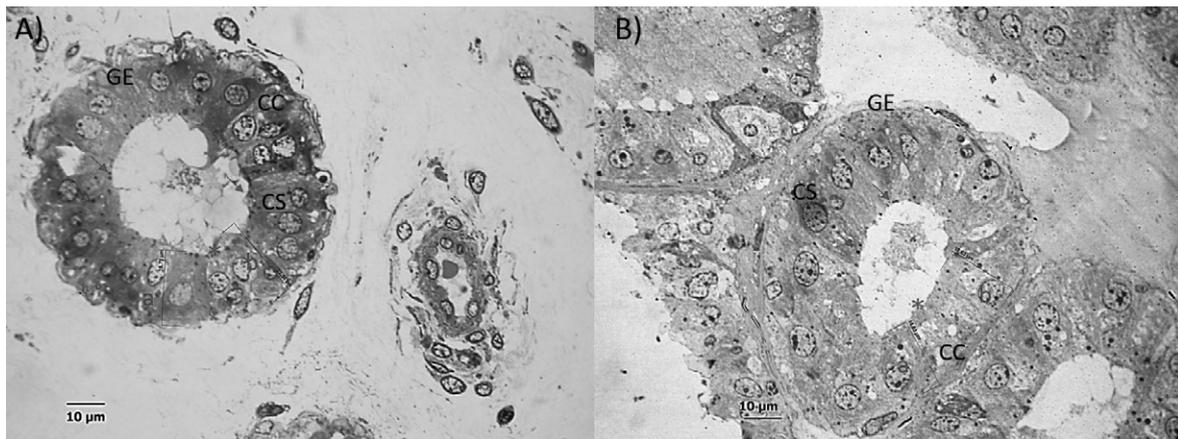


Figura 3. Tejido placentario porcino de gestación procesado por Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR): A) Glándula endometrial de 30 días de gestación, a) medición de altura celular: 19.73 µm, b) 22.34 µm; B) Glándulas endometriales de 70 días de gestación, a) 18.63 µm, b) 18.63 µm. Las flechas señalan los gránulos secretorios. Los asteriscos indican la presencia de cilios, correspondientes a las células ciliadas. GE: glándula endometrial, CS: célula secretoria, CC: célula ciliada.

Tabla I. Análisis descriptivo de las variables morfométricas en glándulas endometriales de la placenta porcina al día 30 y 70 de gestación.

Días de gestación	Variable	n	Media	D.E.
30	Nº de glándulas	118	3,91	2,19
30	Área de lumen glandular	118 μ^2	643,01 μ^2	443,55 μ^2
30	Altura celular	118 μ	38,11 μ	9,24 μ
70	Nº de glándulas	92	2,74	1,54
70	Área de lumen glandular	92 μ^2	904,67 μ^2	140,11 μ^2
70	Altura celular	92 μ	28,23 μ	9,48 μ

DISCUSIÓN

La interdigitalización entre el epitelio trofoblástico y el epitelio uterino observada al día 30 de gestación coincide con lo reportado por Dantzer⁵, en la etapa peri-implantacional, ya que esta asociación permite que ocurra una transición en la nutrición histotrofa a la hemotrofa, entre los días 15 a 20 de gestación. En otras especies, como ratones, ovejas y humanos, se ha descrito que el desarrollo del epitelio glandular uterino es crítico posterior a la implantación, así como para el desarrollo embrionario y placentario durante el primer trimestre antes del inicio de la circulación feto-materna¹⁵. En este trabajo, hemos detectado un mayor número de glándulas en la etapa temprana de gestación y una mayor altura celular del epitelio glandular, relacionado a la actividad secretora de dichas células para la nutrición histotrofa. En trabajos previos, mediante el estudio de residuos glicosilados sobre tejido placentario porcino, hemos detectado que en el tejido glandular y en el histotrofo se hallan principalmente residuos de galactosa, reconocidos por las lectinas PHA-P y PHA-E¹⁹. Por otro lado, el aumento del lumen glandular que hallamos hacia el día 70 de gestación, podría ser explicado por el aumento del contenido secretorio de las glándulas endometriales, coincidiendo con Gray *et al.*¹³, que,

a partir de la mitad de la gestación en adelante, describen una dilatación del lumen glandular como consecuencia de la alta actividad secretora. Otros autores describen un aumento de areolas con el avance de la gestación alcanzando alrededor de 2500 areolas por feto al día 70 de la gestación¹⁷. En estudios preliminares de nuestro laboratorio, en placentas porcinas, hemos detectado un mayor número de glándulas endometriales al día 60 de gestación y una disminución hacia el día 80¹⁰ con un mayor lumen de área glandular, también coincidente con lo descrito por Gray *et al.*¹³. Asimismo, también hemos evidenciado una extensa vascularización que acompaña el mayor crecimiento placentario y el desarrollo fetal, evento que ocurre entre los días 60 y 70 de gestación³. Estos resultados coinciden con el aumento de peso, el tamaño y el área de superficie placentaria que ocurren sustancialmente entre el día 20 a 30 y 60 a 70 de gestación¹⁷. Sin embargo, a partir del día 70 el crecimiento placentario se estabiliza, pero el volumen del lecho capilar continúa creciendo hasta la gestación a término debido una continua angiogénesis que aporta nutrición hemotrofa para satisfacer las crecientes necesidades metabólicas de los fetos^{2,5,11}.

CONCLUSIONES

La remodelación glandular a lo largo de la gestación es dinámica y coincide con los momentos críticos del desarrollo embrionario/fetal. A partir de este estudio concluimos que, en la gestación temprana, el desarrollo glandular es activo, hay numerosas glándulas y moderada actividad secretora. En la gestación media tardía, las glándulas endometriales no aumentarán en número, pero sí en actividad secretora para acompañar las crecientes demandas metabólicas del feto en desarrollo. Estos resultados apoyan la hipótesis que considera la importancia que adquiere la nutrición histotrófica en periodos avanzados de la gestación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente apoyado por SECyT (Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de Río Cuarto). También agradecemos a CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por el apoyo financiero.

Los autores no declaran conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bazer, F.; Wu, G.; Johnson, G. Environmental factors affecting pregnancy: endocrine disrupters, nutrients and metabolic pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014; 398 (1-2):53-68.
2. Burton, G.; Watson, A.; Hempstock, J.; Skepper, J.; Jauniaux, E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocr.* 2002; 87 (6):2954-2959.
3. Cristofolini, A.; Fiorimanti, M.; Campos, M.; et al. Morphometric study of the porcine placental vascularization. *Reprod. Domest. Anim.* 2018; 1-9.
4. Cristofolini, A.; Merkis, C.; Barroso, F.; et al. Determinación de apoptosis por TUNEL e inmunoreactividad de las proteínas Bcl-2 y Bax durante la placentación porcina. *Rev. argent. prod. animal, Supl.* 2010; 30(1): 43-49.
5. Dantzer, V.; Björkman, N.; Hasselager, E. An electron microscopic study of histiotrophe in the interareolar part of the porcine placenta. *Placenta.* 1981; 2 (1):19-28.
6. Dantzer, V.; Björkman, N. Placentation. Dellman HD, Ed *Textbook of Veterinary Histology.* Philadelphia: Lea and Febiger. 1993; 225-269.
7. Dantzer, V.; Leiser, R. Microvasculature of regular and irregular areolae of the areola-gland subunit of the porcine placenta: structural and functional aspects. *Anat. Embryol.* 1993; 188: 257-267.
8. Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzales, L.; Tablada, M.; Robledo, C. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2019.
9. Enders, A.; Carter, A. Comparative placentation: some interesting modifications for histotrophic nutrition. *Placenta.* 2006; 27:11-16.
10. Fiorimanti, M.; Cristofolini, A.; Alfonso, D; et al. Análisis morfométrico de las glándulas endometriales en la placenta porcina. Estudio preliminar. XXI Jornadas de Actualización Porcina. 2022. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
11. Fiorimanti, M.; Cristofolini, A.; Rabaglino, M.; et al. Placental vascularization in middle and late gestation in the pig. *Reprod. Fertil.* 2022; 3(1):57-66.
12. Friess, A.; Sinowatz, F.; Skolek-Winnisch, R.; Träutner, W. The placenta of the pig. II. The ultrastructure of the areolae. *Anat. Embryol.* 1981; 163 (1):43-53.
13. Gray, C.; Bartol, F.; Tarleton, B.; et al. Developmental biology of uterine glands. *Biol. Reprod.* 2001; 65 (5):1311-1323.
14. Johnson, G.; Bazer, F.; Seo, H. The Early Stages of Implantation and Placentation in the Pig. En: Geisert, RD, Spencer, T. (Eds) *Placentation in Mammals. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology.* Springer, Cham. 2021; 61-89.
15. Kelleher, A.; DeMayo, F.; Spencer, T. Uterine Glands: Developmental Biology and Functional Roles in Pregnancy. *Endocr. Rev.* 2019; 40 (5):1424-1445.
16. Klein, B. Cunningham. *Fisiología Veterinaria.* 6ª edición. Ed. Elsevier, España, 2020; pp: 430-437.

17. Kridli, R.; Khalaj, K.; Bidarimath, M.; Tayade, C. Placentation, maternal-fetal interface, and conceptus loss in swine. *Theriogenology*. 2016; 85: 135-144.
18. Marrable, A. The embryonic pig: a chronological account. Ed. Exeter, Pitman Medical, London. 1971; pp: 30-51.
19. Sanchis, G.; Cristofolini, A.; Chanique, A.; Merkis, C. Patrón de glicosilación glandular y vascular de la placenta porcina. *RedVet*. 2012; 13 (3): 1-15.
20. Soraci, A. Importancia práctica de los cambios fisiológicos en la alimentación del lechón. Memorias del XI Congreso Nacional de Producción Porcina. 2012. Salta. Argentina.
21. Vallet, J.; Freking, B.; Miles, J. Effect of empty uterine space on birth intervals and fetal and placental development in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 2011; 125:158-164.
22. Vallet, J.; McNeel, A.; Miles, J.; Freking, B. Placental accommodations for transport and metabolism during intra-uterine crowding in pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2014; 5: 55.
23. Wooding, P.; Burton, G. En: Comparative placentation. Structures, functions and evolution. Berlín Heidelberg, Alemania: Ed Springer-Verlag. Berlín Heidelberg. 2008; pp: 105-132