



## INTERACCIÓN TROFOBlasto-EPITELIO UTERINO EN LA FORMACION DE LA PLACENTA EPITELIOCORIAL, ALPACAS

<sup>1</sup>Luis V Olivera Marocho y <sup>2</sup>Estela Bevilacqua

<sup>1</sup> HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-Universidad Nacional del Altiplano – PUNO <sup>2</sup>  
DEPARTMENT OF CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, INSTITUTE OF BIOMEDICAL SCIENCES, UNIVERSITY OF SAO PAULO-BRAZIL

### INFORMACIÓN DEL ARTICULO

Art. Recibido 20 de Octubre 2014  
Art. Aceptado 27 de Diciembre 2014  
Publicado: 29 Diciembre del 2014

#### PALABRAS CLAVE:

\* Placenta epiteliocorial  
\* alpaca  
\* endometrio  
\* interface trofoblasto  
\* epitelio uterino

### ARTICLE INFO

Article Received October 20, 2014  
Article Accepted December 27, 2014  
Published: December 29, 2014

#### KEY WORDS:

\* Epitheliochorial Placenta  
\* Alpaca  
\* endometrium  
\* trophoblast  
\* maternal interface

### RESUMEN

Estudios reproductivos en Camélidos Sudamericanos son escasos. Para entender el desarrollo y fisiología celular de la interacción trofoblasto-epitelio uterino en la formación de la placenta epiteliocorial de alpacas fueron examinadas muestras desde los 150 días a término de la preñez. Las evaluaciones morfológicas fueron realizadas utilizando técnicas para microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido y transmisión y localizaciones histoquímicas de fosfatasa ácida y alcalina. A través de la preñez hubo un progreso incremento en la formación de pliegues con depresiones profundas de la mucosa uterina mostrándose muy delgada el endometrio. Las glándulas uterinas mostraron reacción positiva para PAS y fosfatasa ácida. Las células trofoblásticas no gigantes exhibieron fosfatasa alcalina. En la abertura de las glándulas, el corion formó típicas areolas, donde el trofoblasto mostró reacción positiva a la fosfatasa ácida y PAS. La interface trofoblasto-epitelio uterino exhibió una compleja interdigitación de microvellosidades, donde la reacción a la fosfatasa alcalina fue muy marcada. Los capilares coriónicos progresivamente indentan a las células trofoblásticas. Estos datos sugieren que a pesar de ser una placenta epiteliocorial, de la alpaca, diversos tipos celulares del trofoblasto y áreas especializadas de la interface materno-fetal poseen funciones microregionales, especializadas en nutrición histotrófica, producción hormonal e intercambio molecular.

### TROPHOBLAST - UTERINE EPITHELIUM INTERACTION TO FORMATION OF THE EPITELIOCHORIAL PLACENTA, ALPACAS

### ABSTRACT

Reproductive studies in South American Camelids are scarce. To understand cellular physiology and the development of the trophoblast-uterine epithelium interaction in formation of epitheliochorial placenta, samples were examined from day 150 to term of the pregnancy. The morphological evaluations were performed using techniques for light microscopy, scanning electron microscopy and transmission and histochemical locations acid phosphatase and alkaline. Throughout pregnancy there was a progressive increase in the depths of folds on the uterine mucosa surface together with a thickening of the endometrium. Glandular cells exhibited PAS and acid phosphatase (AcP) positive secretion granules. In the chorion, giant trophoblast polyploid cells gradually became more numerous and larger. Non-giant cells exhibited positive granules for PAS, alkaline phosphatase (Akp). Over the glandular openings, the chorion formed typical areolae, where the trophoblast exhibited AcP and PAS positive reactions. The trophoblast-epithelial interface exhibited a complex microvillous interdigitation, in which an Akp reaction was very prominent. The chorionic capillaries progressively indented adjacent trophoblast cells. These data suggest that although the epitheliochorial alpaca placenta is diffuse, various trophoblast cell types and specialized areas of the maternal interface give the placenta micro-regional functions where histotrophic nutrition, hormone production and molecular exchange are prevalent.

## INTRODUCCION

Las condiciones y elementos involucrados en la interacción entre el blastocisto y el epitelio uterino deben estar sincronizadas para el proceso de implantación y placentación, esta alta especificidad es propia para cada especie. El trofoblasto al modularse con el endometrio establece a futuro el tipo de placenta y las modificaciones que se inician corresponden a una remodelación de la interface entre ambos organismos, alteraciones vasculares, de la población tisular y molecular (Olivera, 1998). En rumiantes, el embrión al llegar al cuerno uterino evidencia una expansión del trofoblasto, que esta relacionado con la intensa mitosis observada en las células trofoblásticas, que es un indicativo para cubrir las necesidades nutricionales del embrión. Varias investigaciones han sido referidas para definir los cambios moleculares en la composición de la membrana plasmática apical del epitelio uterino y su receptividad, consistentemente una reducción en el glucocalix del epitelio uterino ha sido observada en diversas especies (Anderson et al., 1990; Enders & Schlafke, 1977; Thie et al., 1996). La polaridad celular entre ambos tipos celulares fue estudiada en porcinos por Dantzer (1986), evidenciando la formación de gránulos parcialmente electrodensos en la región apical de las células epiteliales uterinas.

En general es aceptado que durante la implantación se modifique las superficies de contacto a una organización estructural de microvellosidades, potencializando el pasaje de moléculas desde el endometrio al embrionario (Lopata, 1996). En todo el proceso de implantación, de todos los modelos de animales, parece ser que la interacción adhesiva entre los dos epitelios: el trofoblasto y el epitelio uterino es dado en un estado denominado receptividad, el cuales controlado hormonalmente (Psychoyos, 1994; Thie et al., 1998). Con el avance de la preñez, estructuras especializadas se hacen presentes asumiendo un control de interacción hormonal o de adhesividad y de áreas especializadas en el intercambio de nutrientes (Carter & Enders, 2004; Wooding et al., 2003). En el presente trabajo estudiamos las modificaciones que se presentan durante los diferentes estadios de la implantación embrionaria y en la formación de la placenta epiteliochorial de la alpaca.

La placenta de alpaca es descrita como epiteliochorial y difusa (Steven et al., 1980; Mossman, 1987; Olivera 1998) y similar a lo encontrado en camélidos del Viejo Mundo (Van Lennep, 1961; 1963; Skidmore et al., 1996; Abd-Elnaeim et al., 1999). Este tipo de placentación fue estudiado intensamente en porcinos (Björkman 1973; Friess et al., 1980; Dantzer, 1984; 1985; 1986; Dantzer & Leiser, 1994) y en equinos (Samuel et al., 1974; Enders & Liu, 1991a; 1991b; Macdonald et al., 2000) En llamas (Fowler & Orlander, 1990; y alpacas (Steven et al., 1980), sin embargo, solamente la morfología de placenta a término fue investigado. Los estudios en camellos y dromedarios fueron mayormente estudiados, tanto en los aspecto morfológicos como fisiológicos de su placentación (Skidmore et al., 1996; Abd-Elnaeim et al., 1990; Hombach-Klonisch et al., 2000).

A pesar de tener el mismo tipo de placenta entre camellos, porcinos, equinos, existe diferencias específicas entre placentas epiteliochoriales. En este estudio detallamos la morfología de la interface materno-embionaria-fetal en la alpaca, enfatizando el desarrollo de estructuras que juegan un rol importante durante la placentación epiteliochorial.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Colección de la interface maternofetal

De un total de 12 alpacas adultas con diagnóstico de preñez desde los 150(2), 264(2), 283(2), 296(2) y 367(2) y placenta a término (2) fueron beneficiadas, se aislaron ovarios, cuernos uterinos y úteros. Pequeños fragmentos conteniendo muestras de membrana embrionaria y/o fetal fueron inmersos en solución fijadora 2.5% de glutaraldehído en 0.1M de tampón buffer, pH 7.2 para microscopía electrónica. Otras muestras fueron procesadas en 4% de paraformaldehído para microscopía luz.

### Microscopía de Luz

Seguido a la fijación en 4% paraformaldehído, las muestras fueron lavadas en 0.1M de tampón buffer, pH 7.4 deshidratado en una serie ascendente de etanol y embebido en parafina o en glicol metil metacrilato, Los cortes se realizaron entre 2 a 5 µm y coloreados con hematoxilina y eosina o azul de toluidina. Reacciones histoquímicas fueron efectuadas para localizar actividad del ácido periódico de Schiff, fosfatasa alcalina y ácida.

### Microscopía Electrónica

#### Microscopía Electrónica de barrido

Pequeñas piezas de tejido fueron lavadas en solución tampón fosfato (PBS), post fijado en 1% de tetróxido de ósmio en 0.1M PBS a temperatura ambiente por 2 h, luego llevado a incubación en 2% de ácido tánico (Electron Microscopic Science, Fort Washington, Pa., USA) en PBS, pH 7.2 por 1 h y deshidratado en grados ascendentes de etanol. Las muestras seguidamente fueron secados a punto crítico (BALZERS CPD 030) y luego colocados en soportes de aluminio. Posteriormente las piezas fueron bañadas en oro paladio (BALZERS SCD 040) y observadas en un microscopio de barrido (Jeol JSM 6100 Scanning Electron Microscope).

#### Microscopía Electrónica de transmisión

Para el análisis de las muestras en microscopía electrónica de transmisión. Las muestras seleccionadas fueron fijados en 2.5% de glutaraldehído en 0.1M PBS, pH 7.2, post fijado en 1% de tetróxido de osmio en 0.1M PBS, por 1 h a temperatura ambiente, luego lavados en PBS, deshidratados en etanol y embebidos en resina Spurr (Cyclohexene dioxide, Sigma Chem., St Louis, MO., USA). Cortes semifinos fueron coloreados con 0.25% de azul de toluidina y observados para seleccionar las áreas de contacto materno embrionario o fetal. Secciones ultrafinas fueron contrastados con 2% de acetato de uranilo y 0.5% de citrato de plomo por 5 a 10 min. Las secciones luego fueron examinadas y fotografiadas utilizando el microscopio electrónico de transmisión JEOL CX II 100.

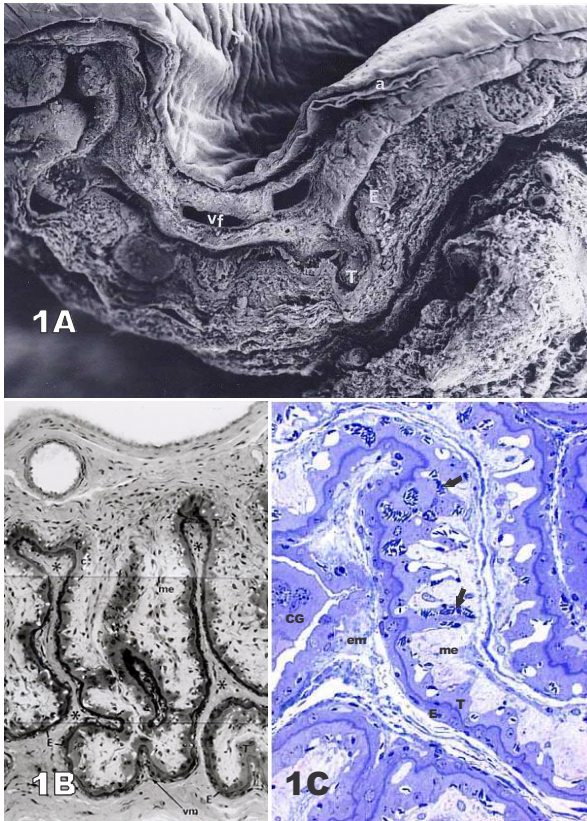
**RESULTADOS**

**Cambios morfológicos durante el desarrollo de la placenta**

**Corion**

El trofoblasto estuvo formado por una simple capa de células mononucleadas, células binucleadas o gigantes y células multinucleadas, todas ellas en proximidad o intrusión de una rica vascularización mesenquimal (Fig.1). Las células trofoblásticas mononucleadas se mostraron de mayor dimensión y en general exhiben una compleja región apical. Granulaciones PAS+ frecuentemente se encontraron en la región basal. La organización intracelular presentó un núcleo eucromático, nucléolo, sistemas del retículo endoplasmático granular y del aparato de Golgi distribuidos por toda la célula, numerosas y alargadas mitocondrias, filamentos intermedios y granulaciones electrodensas en la región basal. En la región apical, numerosas y regulares microvellosidades fueron observadas; la región basal mostró una bien definida lámina basal. Desmosomas e interdigitaciones fueron comunes entre membranas de células vecinas (Figs, 3,4).

Desde los 264 días de preñez, gránulos PAS+ fueron pequeños y menos frecuentes. Células mononucleadas con menor afinidad a la tinción fueron observadas, exhibiendo numerosas mitocondrias. Los capilares fetales se observaron indentando a las células trofoblásticas



**Fig. 1. Proyecciones coriónicas. A. Placenta de 150 ddp**, note en la superficie del trofoblasto (T) las proyecciones coriónicas en dirección al endometrio (E) en diferentes grados de desarrollo. En

la espesura de la placenta fetal observe los vasos fetales (vf). **B. Placenta de 264 ddp.** Observar las ramificaciones de las proyecciones coriónicas al lado materno; las células trofoblásticas se muestran con mayor tinción en la interface materno-fetal. **C. Placenta de 347 ddp.** Notar en el lado del trofoblasto, la presencia de una célula gigante (CG), las proyecciones endometriales (E) están reducidas en espesura y los vasos fetales con mayor proximidad a la capa celular trofoblástica (T). **A.** Electromicrografía, 170X. **B.** Fotomicrografía, Histo-resina, azul de Toluidina, 640X. **C.** Histo-resina, azul de Toluidina, 840X. (a) alantoide; (E) epitelio; (me) mesénquima; (vm) vaso materno; (c, ▲) capilar fetal; (★, em) estroma endometrial.

Células trofoblásticas gigantes multinucleadas fueron escasas a los 150 ddp, pero incrementaron en número y tamaño con el avance de la preñez. Estas células fueron localizadas preferentemente en el extremo apical de las proyecciones coriónicas. Mostraron mayor afinidad a colorantes básicos. Ultraestructuralmente predominó ribosomas y polirribosomas sobre el resto de organelas. Mitocondrias estuvieron en mayor número en la región apical. El núcleo se observó irregular, eucromático, y exhibiendo varios nucléolos, interdigitaciones y desmosomas fueron observados.

Aldía 150, el mesénquima coriónico fue observado con pérdida de organización; en etapas posteriores, gradualmente se incrementó la celularidad y una compleja matriz extracelular. Macrófagos fetales fueron más frecuentes al final de la preñez, frecuentemente localizado en el ápice de las vellosidades coriónicas, exhibiendo actividad de fosfatasa ácida.

Las ramas vilosas y la indentación de los capilares incrementaron con la preñez. Entre los 150 y 264, estos vasos formaron una extensa red en proximidad estrecha con la capa trofoblástica. Entre los 296 a 327 ddp esta indentación fue más profunda observándose que la lámina basal del trofoblasto y células endoteliales se fusionan (Fig. 1).

**Endometrio**

La superficie uterina fue revestida por células epiteliales polidricas, con proyecciones irregulares y presencia de microvellosidades. Estas células mostraron características de intensa actividad biosintética, con numerosas mitocondrias, polirribosomas, sistemas del retículo endoplasmático granular y del aparato de Golgi, con vesículas conteniendo material electrodenso. En la región apical, granulaciones esféricas y pequeñas estuvieron en el citoplasma apical. El núcleo eucromático, predominando al menos dos nucléolos fue observado con frecuencia (Figs.3,4).

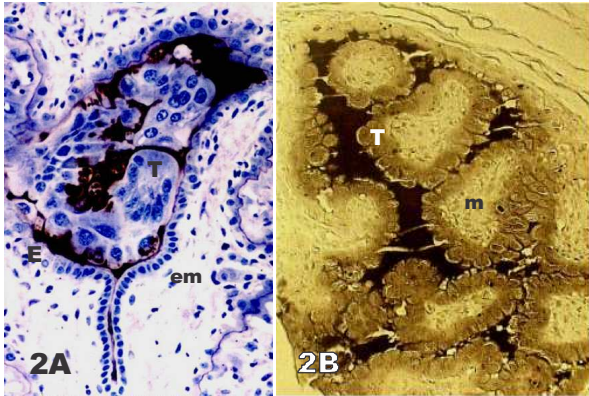
Por debajo del epitelio uterino, el estroma endometrial presentó una red capilar, éstos fueron muy sinuosos y dilatados. Macrófagos con gránulos positivos para fosfatasa estuvieron distribuidos por el estroma.

Con el progreso de la preñez, el estroma endometrial se muestra reducido debido al alargamiento y complejidad de las vellosidades coriónicas (Fig. 1)

Entre los 150 a 347 ddp, el compartimento glandular no fue desarrollado. La región secretora mostró un amplio conducto



conteniendo células columnares con pleomorfismo nuclear. El material secretado fue positivo a fosfatasa ácida y PAS+ (Fig. 2).



**Fig. 2. Areólas. Placenta 283 ddp.** Las figuras A y B muestran reacción positiva para actividad fosfatasa ácida, observado de color negro, tanto en la secreción como en las células trofoblásticas (T) de la aréola. (m) mesénquima; (em) estroma endometrial; (E) epitelio uterino. Histoiresina. 2A, 320X; 2B, 600X.

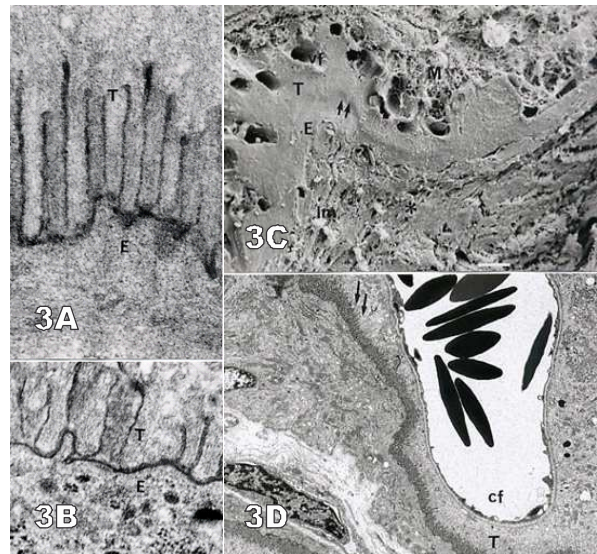
#### Interface materno fetal

Por microscopía electrónica de barrido, fue posible verificar, que a través de la preñez, la superficie uterina presentó concavidades y depresiones, donde la superficie del trofoblasto fue irregular debido a las numerosas proyecciones. Ambas superficies, materno y fetal perfectamente encajaban. Reacción histoquímica demostró que ambas superficies estuvieron separadas por un fino material PAS+. Las proyecciones del trofoblasto y las correspondientes depresiones al lado uterino fueron relativamente simple hasta el día 264 de preñez, pero muy ramificada y estrecha después de este periodo, hacia el final de la preñez (Fig. 1).

Ultraestructuralmente, microvellosidades del trofoblasto y del epitelio uterino se unen en una perfecta interdigitación. Microvellosidades desde el epitelio uterino, sin embargo, tienden a penetrar el citoplasma del trofoblasto opuesto, mientras que los del trofoblasto no penetran al citoplasma del lado materno (Figs. 3,4). En ambos lados de la interface materno fetal, la región apical del trofoblasto y del epitelio uterino contiene numerosas vesículas con actividad a fosfatasa alcalina

Ocasionalmente dilataciones o vesículas podrían a veces observarse en la base de las microvellosidades del trofoblasto, contiguos con el espacio extracelular y a menudo contienen material electrodensito (Fig. 3B). A los 347 ddp, el contacto íntimo entre el epitelio uterino y el trofoblasto fue ocasionalmente perdido, en estos puntos, un espacio discreto con presencia de filamentos estuvo presente. Algunas células bordeando este material mostraron señales de degeneración.

A la detección de células en apoptosis se evidenció un alto número de éstas, principalmente en la capa trofoblástica y en algunas células mesenquimales fueron positivas, las cuales se observaron a los 347 ddp y placenta a término.



**Fig. 3. Interface materno fetal.** Las figuras A y B corresponden a placenta de alpaca con 150 ddp. Note las interdigitaciones de las microvellosidades maternas y fetales perfectamente elaboradas. En 3B, observe próxima a la interface materno fetal presencia de vesículas. Las figuras C y D pertenecen a placentas de 283 y 296 ddp. Se muestra la disposición de las estructuras materno-fetales. Observar en C el mesénquima (M) en el interior de las vellosidades coriónicas con vasos fetales (vf) apoyadas al trofoblasto (T). La interface materno-fetal (↑↑) puede ser observada como una línea continua. El epitelio uterino (E) corresponde a la capa más fina, debajo de la cual está la lámina propia (lm) con fibras colágenas (\*) compactadamente organizadas. En D notar la disposición del capilar fetal (cf) entre células trofoblásticas. La interface muestra numerosas microvellosidades (↑↑). Electromicrofotografías 3A, 6.400X, 3B, 4.000X, 3D, 3.000X. 3C, Barra = 10 μm.



**Fig. 4. Interface materno fetal, 283 ddp.** La figura muestra la disposición de las células trofoblásticas (T) entre los vasos

sanguíneos fetales (**fc**) y el epitelio (**E**). El citoplasma de estas células presentan numerosas mitocondrias y granulaciones electrodensas (**l**). En el mesénquima hay fibroblastos (**f**) y fibrillas de colágeno. La interface materno-fetal (**↑ ↑**) muestran microvellosidades en ambas faces, interdigitadas. Las células epiteliales uterinas contienen abundantes mitocondrias (**m**) con escasas granulaciones. La región basal exhibe proyecciones en dirección al estroma endometrial y el núcleo es eucromático. Los vasos fetales (**fc**) se proyectan para el lado materno y están más próximos del trofoblasto. Eritrocito fetal (**ef**), capilar fetal (**fc**), capilar materno (**cm**), eritrocito materno (**em**). Electromicrografía, 5.000X.

## DISCUSION

La morfología de la placenta en alpacas fue estudiado por la importancia que representa estos animales para el poblador de los andes (Novoa 1970; Sumar, 1988). Steven et al. (1980) y Fowler & Orlander (1990) han demostrado la naturaleza de este tipo de placenta epiteliochorial, simple difusa en placentas de alpaca y llama a término, también enfatizando algunos aspectos similares con la placenta de marranas, yegua y el galágo (Björkman, 1973; Dantzer, 1984; Samuel et al., 1974; Friess et al., 1980; Mossman, 1987; Kaufmann & Burton, 1994) y camélidos del Viejo Mundo (Van Lennep, 1961; 1963; Skidmore et al., 1996; Abd-Elnaeim et al., 1999). Trabajos sobre implantación embrionaria en alpacas fue descrita (Olivera 1998). El proceso de aposición y adhesión en la implantación fue detallado hasta el día 45 de la preñez, en este periodo, el perímetro de la interface materno embrionaria fue mostrado como una asociación cerrada y el corion vascularizado. El presente estudio continúa la progresión de la interface materno fetal a través de toda la preñez y concluyendo en la placenta a término.

La morfología de la interface materno-fetal mostró un complejo incremento en el tiempo, representado por modificaciones del corion y endometrio, sin invasión por células trofoblásticas. Por el día 150, las proyecciones coriónicas asumen una forma ovoide, que corresponden a proyecciones muy complejas que simples ondulaciones de la mucosa coriónica observada entre los días 22 a 45 de la preñez (Olivera, 1998). Con el transcurrir de la preñez, estas estructuras inician a ser más largas y muestran ramificaciones, pero con perfectas depresiones de la mucosa endometrial, observándose en la interface materno-fetal un aumento en la complejidad de superficies. Este patrón sincrónico, de desarrollo morfológico, también fue reportado en llamas, camellos y dromedarios (Elwishy, 1987; Mossman, 1987; Fowler & Orlander, 1990; Leiser et al., 1997); en equinos (Steven, 1982; Wooding & Flint, 1994) y en porcinos (Dantzer, 1984; Macdonald & Bosma, 1985; Keys & King, 1990). Sin embargo, en el patrón del desarrollo de las ramificaciones coriónicas en suínos no son tan profundas como en alpacas, mientras en equinos esto es aún más complejo.

En referencia a las ramificaciones, las vellosidades coriónicas inician gradualmente a estructuras más largas y estrechas como observado en otras placentas epiteliochoriales (camellos: Skidmore et al., 1996; rumiantes: Wathes & Wooding, 1980; Mossman, 1987; Reynolds & Redmer, 1992; Leiser et al., 1997). Este acercamiento entre superficies, incrementa la proximidad de los vasos materno y fetales, con una reducción en la espesura de la barrera placentaria, por tanto maximizando el intercambio molecular entre el tejido fetal y

maternal hasta etapas finales de la preñez (Björkman, 1973; Friess et al., 1980; Steven et al., 1980; Leiser & Dantzer, 1980). Esta aproximación probablemente este relacionado con el incremento en la demanda del consumo de O<sub>2</sub> fetal, puesto que, estos animales viven en condiciones de extrema altitud.

Observaciones ultraestructurales, se evidencia una constante presencia de interdigitaciones en la interface materno-fetal, que es una característica común de placentas epiteliochoriales (Leiser & Kaufmann, 1994; Skidmore et al., 1996; Leiser et al., 1997). Varias funciones han sido atribuidas a estas estructuras; como incrementar la superficie de contacto entre el tejido fetal y materno, lo que significa una interacción glúcido-glúcido facilitando una verdadera adhesión de la placenta. Un rico material glicosilado, depositado en la interface materno-fetal también ha sido reportado en placentas epiteliochoriales, endoteliochoriales y hemomonocoriales (Jones et al., 1995; 1997; 2002), lo que ha sugerido que esta interacción también esta presente en la fijación del embrión en el sitio de la implantación. Por otro lado, se considera que estas moléculas juegan un rol en el control invasivo del trofoblasto (Dantzer, 1985).

Al comparar estadios iniciales de la implantación embrionaria (Olivera 1998), material electrodensito similar al depositado en la interface esta presente en forma de granulaciones localizadas en el citoplasma apical de las células epiteliales uterinas. Mostramos previamente (Jones et al., 2002) que numerosas clases de glicanos están presentes en el trofoblasto y epitelio uterino de alpaca, con algunas modificaciones a lo largo de la preñez. En porcinos (Dantzer, 1985) y equinos (Jones et al., 1997; 1999) similares morfologías han sido asociados con una variedad de hormonas, enzimas y factores de crecimiento producidos por el organismo materno y depositados en la interface materno-fetal para garantizar la gestación.

El intercambio de nutrientes, encontramos vesículas relacionadas al sistema de endocitosis como característica común de la superficie apical del trofoblasto en toda la superficie materno-fetal. La indentación del trofoblasto por capilares también parece ser un mecanismo en el cual disminuye la distancia entre la vascularización materna y fetal y optimiza las condiciones de absorción (Friess et al., 1980; Mossman, 1987; Leiser & Dantzer, 1988). En alpacas, la indentación del trofoblasto es muy prominente al final de la preñez, esto comparado con otros animales, la distancia intervascular en alpacas es substancialmente menor que otras especies con placenta epiteliochoriales (Steven et al., 1980; Mossman, 1987), una condición que es atribuida, es el proceso de adaptación para compensar la baja disponibilidad de O<sub>2</sub>. Patrón importante de la vascularización en alpacas que resulta de este ambiente hipóxico (Kingdom & Kaufmann, 1997; Krebs et al., 1997; Ahmed et al., 2000).

Actividad de fosfatasa alcalina en la región apical del trofoblasto y del epitelio enfatiza la condición absorptiva de esta interface, desde esta superficie, enzimas son caracterizadas comprometidas con el transporte metabólico, como ocurre en los enterócitos, células tubulares renales y células placentales (Jones & Fox, 1976; McComd et al., 1979; Millán, 1990; Bevilacqua et al., 1991; Johansson & Wide, 1994). Además la distribución fue homogénea por toda la superficie, sin prevalecer por alguna región, como ocurre en porcinos y camellos (Van Lennep, 1961; Friess et al., 1980).

Presencia de células multinucleadas gigantes aumenta en número y dimensiones durante el curso de la preñez y estas células son más comunes en el ápice de las proyecciones coriónicas. Ellos no expresan actividad para fosfatasa ácida y alcalina, no poseen material PAS+. Por el contrario material glicosilado ha sido demostrado en su citoplasma, especialmente en la región apical (Jones et al., 2002). La función de estas células es desconocida. Estas células también fueron encontradas en otros camélidos (Van Lennep, 1961; 1963; Gorokhovskii et al., 1975; Skidmore et al., 1996; Abd-Elnaeim et al., 1990; Jones et al., 2002), pero una gran proporción, en estadios iniciales de la preñez son asociado con areolas (Skidmore et al., 1996).

En numerosas placentas epiteliocoriales, las glándulas uterinas han sido relacionadas con transporte de nutrientes y moléculas específica hacia el feto, siendo de vital importancia para el suceso de la preñez (Van Lennep, 1963; Sinowatz & Friess, 1983; Dantzer & Leiser, 1993). En caso de alpacas, también son válidas estas apreciaciones, pero el número de glándulas en fase final de la preñez no es numeroso, ellos aparentemente compensan la intensa actividad biosintética. Pero la presencia y distribución de mitocondrias en la región basal del citoplasma sugiere transporte de hierro, como se observa en los túbulos renales y glándulas salivales (Ross et al., 1995).

En las aberturas de las glándulas se observo unidades conocidas como areolas, estas son áreas de intercambio de nutrientes como encontrado en porcinos (Friess et al., 1980; Mossman, 1987; Dantzer & Leiser, 1993); Leiser & Dantzer, 1994), en equinos (Jones et al., 1997) y camellos (Van Lennep, 1961). Como en estas especies, existe una probable relación en la transferencia de moléculas, hacia las células trofoblásticas que muestran características absorbivas, de intensa actividad fagocitaria y de transporte vesicular. Las areolas se mostraron de mayor volumen en estadios avanzados de la preñez, coincidentemente con la demanda de nutrientes por el feto. En porcinos, la secreción areolar esta compuesta de material heterogéneo conteniendo células degeneradas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glucoproteínas y actividad fosfatasa ácida. En ovinos, este material contiene hierro y calcio (Berger et al., 1982; Myagkaya et al., 1984; Wooding et al., 1996b). En ambas especies, esta estructura es como una fuente de nutrientes para el feto (Bielanska-Osuchowska, 1995; Bielanska-Osuchowska & Kunska, 1995). En base a las observaciones, en alpacas, las areolas son estructuras activas en la transferencia de nutrientes hacia el feto, además del pasaje de vesículas difusas de moléculas a través de la interface materno fetal.

En conclusión, este estudio apertura más la comprensión en la formación y organización de la placenta epiteliocorial y sus variaciones que existe dentro del mismo tipo de placenta y aporta en el estudio del transporte de moléculas para estudios de la bioquímica y fisiología reproductiva de esta especie.

#### BIBLIOGRAFIA

- Abd-Elnaeim MM, Pfarrer C, Saber AS, Abou-Elmagd A, Jones CJ, Leiser R. (1999). Fetomaternal attachment and anchorage in the early diffuse epitheliochorial placenta of the camel (*Camelus dromedarius*). Light, transmission and scanning electron microscopic study *Cells Tissues Organs* 164:141–154.
- Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. (2000). Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen: a review. *Placenta* 21 [Suppl A]: 16–24.
- Anderson, TL., Simon, JA. and Hodgen, GD. (1990). Histochemical characteristics of the endometrial surface related temporally to implantation in the non-human primate (*Macaca fascicularis*). In *Trophoblast Invasion and Endometrial Receptivity. Novel Aspects of the Cell Biology of Embryo Implantation. Trophoblast Research, Vol. 4* (Eds. H.-W. Denker and J.D. Aplin). Plenum Medical Book Comp., New York and London. 273-284.
- Berger EG, Buddecke E, Kamerling JP, Kobata A, Paulson JC, Vliegthart JF. (1982). Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans. *Experientia* 38:1129–1162.
- Bevilacqua EM, Faria MR, Abrahamsohn PA. (1991). Growth of mouse ectoplacental cone cells in subcutaneous tissues: Development of placental-like cells. *Am J Anat* 192:382–399.
- Bielanska-Osuchowska Z, Kunska A. (1995). A new approach to the areolar structures in the pig placenta: histochemistry and development of mucous areolae. *Folia Histochem Cytobiol* 33:95–101.
- Bielanska-Osuchowska Z. (1995). Ultrastructure of mucous areolae in the pig placenta. *Folia Histochem Cytobiol* 33:103–110.
- Björkman N. (1973). Fine structure of the fetal-maternal area of exchange in the epitheliochorial and endotheliochorial types of placentation. *Acta Anat* 86:1–22.
- Carter A, and Enders, A. (2004). Comparative aspects of trophoblast development and placentation. Review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2:1-46.
- Dantzer V, Leiser R. (1993). Microvasculature of regular and irregular areolae of the areola-gland subunit of the porcine placenta: structural and functional aspects. *Anat Embryol* 188:257–267.
- Dantzer V, Leiser R. (1994). Initial vascularisation in the pig placenta: I. Demonstration of nonglandular areas by histology and corrosion casts. *Anat Rec* 238:177–190.
- Dantzer V. (1984). Scanning electron microscopy of exposed surfaces of the porcine placenta. *Acta Anat* 118:96–106.
- Dantzer V. (1985). Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat Embryol* 172:281–293.
- Dantzer V. (1986). Cell biological aspect of porcine placentation. A scanning and Transmission electron microscopic study. *A/S Carl Fr. Mortensen, Copenhagen*.



**INTERACCIÓN TROFOBlasto-EPITELIO UTERINO EN LA FORMACION DE LA PLACENTA EPITELIOCORIAL, AL PACAS**

- Elwisy AB. (1987). Reproduction in the female dromedary (*Camelus dromedarius*): a Review. *Anim Reprod Sci* 15:273–297.
- Enders A, Liu I. (1991a). Trophoblast-uterine interactions during equine chorionic girdle cell maturation, migration and transformation. *Am J Anat* 192:366–381.
- Enders A, Liu I. (1991b). Lodgement of the equine blastocyst in the uterus from fixation through endometrial cup formation. *J. Reprod Fertil.* 44:427–438.
- Enders, AC. & Schlawke, S. (1977). Alteration in uterine luminal surface at the implantation site. *J. Cell Bio.* 75: 70a.
- Fowler ME, Olander HJ. (1990). Fetal membranes and ancillary structures of llamas (*Lama glama*). *Am J Vet Res* 51:1495–1500.
- Friess AE, Sinowatz F, Skolek-Winnisch R, Trutner W. (1980). The placenta of the pig. I. Fine structural changes of the placental barrier during pregnancy. *Anat Embryol* 158: 179–191.
- Gorokhovskii NL, Shmidt GA, Shagaeva VG, Baptidanova IuP. (1975). Giant cells in the placenta of the bactrian camel in the fetal period of development. *Arkh Anat Gistol Embriol* 69:41–46.
- Hombach-Klonisch S, Abd-Elnaeim M, Skidmore JA, Leiser R, Fischer B, Klonisch T. (2000). Ruminant relaxin in the pregnant one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Biol Reprod.* 62:839–846.
- Johansson S, Wide M. (1994). Changes in the pattern of expression of alkaline phosphatase in the mouse uterus and placenta during gestation. *Anat Embryol* 190:287–296.
- Jones CJ, Abd-Elnaeim M, Bevilacqua E, Oliveira LV, Leiser R. (2002). Comparison of uteroplacental glycosylation in the camel (*Camelus dromedarius*) and alpaca (*Lama pacos*). *Reproduction* 123:115–126.
- Jones CJ, Dantzer V, Leiser R, Krebs C, Stoddart RW. (1997). Localisation of glycans in the placenta: a comparative study of epitheliochorial, endotheliochorial and haemomonochorial placentation. *Microsc Res Tech* 38:100–114.
- Jones CJ, Dantzer V, Stoddart RW. (1995). Changes in glycan distribution within the porcine interhaemal barrier during gestation. *Cell Tissue Res* 279:551–564.
- Jones CJ, Fox H. (1976). An ultrahistochemical study of the distribution of acid and alkaline phosphatases in placentae from normal and complicated pregnancies. *J Pathol* 118:137–151.
- Jones CJ, Koob B, Stoddart RW, Hoffmann B, Leiser R. (1994). Lectin histochemical analysis of glycans in ovine and bovine near-term placental binucleate cells. *Cell Tissue Res* 278:601–610.
- Jones CJ, Wooding FB, Dantzer V, Leiser R, Stoddart RW. (1999). A lectin binding analysis of glycosylation patterns during development of the equine placenta. *Placenta* 20:45–57.
- Kaufmann P, Burton G. (1994). Anatomy and genesis of the placenta. In: Knobil E, Neill J (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp 441–484.
- Keys JL, King GJ. (1990). Microscopic examination of porcine conceptus-maternal interface between days 10 and 19 of pregnancy. *Am J Anat* 188:221–238.
- Kingdom JC, Kaufmann P. (1997). Oxygen and placental villous development: Origins of fetal hypoxia. *Placenta* 18:613–621.
- Krebs C, Longo LD, Leiser R. (1997). Term ovine placental vasculature: comparison of sea level and high altitude conditions by corrosion cast and histomorphometry. *Placenta* 18:43–51.
- Leiser R, Dantzer V. (1994). Initial vascularisation in the pig placenta: II. Demonstration of gland and areola-gland subunits by histology and corrosion casts. *Anat Rec*: 238:326–334.
- Leiser R, Kaufmann P. (1994). Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* 102:122–134.
- Leiser R, Krebs C, Klisch K, Ebert B, Dantzer V, Schuler G, Hoffmann B. (1997) Fetal villosity and microvasculature of the bovine placenta in the second half of gestation. *J Anat.* 191:517–527.
- Leiser, R. & Dantzer, V. (1988). Structural and functional aspects of porcine placental microvasculature. *Anat. Embryol.* 177: 409-19.
- Lopata A. (1996). Blastocyst-endometrial interaction: an appraisal of some old and new ideas. *Molecular Human Reproduction* 2: 519-525.
- Macdonald AA, Bosma AA. (1985). Notes on placentation in suina. *Placenta* 6:83–91.
- Macdonald AA, Chavatte P, Fowden, AL. (2000). Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. *Placenta*, 21:565–574.
- McComb R, Bowers G, Posen S. (1979). *Alkaline Phosphatases*. Plenum Press, New York.
- Millan J. (1990). Oncodevelopmental alkaline phosphatases: in search for a function. In: Eds. Z.I. Ogita Z, Markert C (eds) *Isozymes: structure, function, and use in biology and medicine*. New York, Wiley-Liss, pp 453–475.
- Mossman H. (1987). *Vertebrate Fetal Membranes. Comparative ontogeny and morphology; evolution; phylogenetic*

- significance; basic functions; research opportunities. Rutgers university Press, New Jersey.
- Myagkaya GL, Schornagel K, van Veen H, Everts V. (1984). Electron microscopic study of the localization of ferric iron in chorionic epithelium of the sheep placenta. *Placenta* 5:551–558.
- Novoa C. (1970). Reproduction in camelidae. *J Reprod Fertil* 22:3–20.
- Olivera LV. (1998). Implantação embrionária em alpacas. Msc. thesis, Depto Histologia e Embriologia, ICB-I, University of São Paulo, Brazil.
- Psychoyos, A. (1994). The implantation window: basic and clinical aspects. In *Perspectives on Assisted Reproduction*. Sarono Symposia Series - Frontiers in Endocrinology, Vo 1. 4 (Eds. T. Mori, T. Aono, T. Tominaga and H. Hiroi). Ares-Serono Symposia, Christengraf, Rome. 57-63.
- Reynolds L, Redmer D. (1992). Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. *Biol Reprod* 47:698–708.
- Ross H, Romrell L, Kaye, G. (1995). *Histology: A Text and Atlas*. Third edition, Williams & Wilkins, Maryland, USA.
- Samuel CA, Allen WA, Steven DH. (1974). Studies on the equine placenta. I. Development of the microcotyledons. *J Reprod Fert* 41:441–445.
- Sinowatz F, Friess AE. (1983). Uterine glands of the pig during pregnancy. An ultrastructural and cytochemical study. *Anat Embryol* 166:121–134.
- Skidmore JA, Wooding FB, Allen WR. (1996). Implantation and early placentation in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Placenta* 17:253–262.
- Steven DH, Burton GJ, Sumar J, Nathanielsz PW. (1980). Ultrastructural observations on the placenta of the alpaca (*Lama pacos*). *Placenta* 1:21–32.
- Steven DH. (1982). Placentation in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 31:41–55.
- Sumar J. (1988). Removal of the ovaries or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Acta Vet Scand Suppl* 83:133–141.
- Thie M; Fuchs, P; Denker H. (1996). Epithelial cell polarity and embryo implantation in mammals. *Int J. Dev. Biol.* 40: 389-393.
- Thie, M; Röspe, R; Dettmann, W; Benoit, M; Ludwig, M; Gaub, H; Denker, H. (1998). Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces. *Human Reproduction*. 13: 3211-19.
- Van Lennep E. (1961) The histology of the placenta of the one humped camel (*Camelus dromedarius* L.) during the first half of pregnancy. *Acta morph Neerl Scand* 4: 180–193.
- Van Lennep E. (1963). The placenta of the one-humped camel (*Camelus dromedarius* L) during the second half of gestation. *Acta morph Neerl Scand* 5:373–379.
- Wathes DC, Wooding FB. (1980). An electron microscopic study of implantation in the cow. *Am J Anat* 159:285–306.
- Wooding FB, Flint APF. (1994). Placentation. In: *Lamming GE (ed) Marshall's Physiology of Reproduction*. Chapman & Hall, London, pp. 233–429.
- Wooding FB, Morgan G, Jones GV, Care AD. (1996b). Calcium transport and the localisation of calbindin-D9 k in the ruminant placenta during the second half of pregnancy. *Cell Tissue Res* 285:477–489.
- Wooding FB; Ozturk, M; Skidmore, JA; Allen, WR. (2003). Developmental changes in localization of steroid synthesis enzymes in camelid placenta. *Reproduction*, 126:239-47.