



Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Carrera de Tecnología Médica



“Análisis Morfológico del Útero Durante la Absorción Embrionaria en un Modelo Animal de Aborto Espontáneo”

Seminario de Grado
presentado en conformidad a los requisitos para obtener
el Grado Académico de
“Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”

Autores: Sebastián Marcelo Astorga Valdivieso.

Pamela Lisset Godoy Brash

Profesor Guía: Dr. Sebastián San Martín Henriquez

Co-Guía: Makarena Andrea González Quijada

2007

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a nuestras familias por todo lo que nos han entregado durante toda nuestra vida, siendo siempre pilares fundamentales para seguir adelante y lograr lo que somos hoy.

A mi madre Mónica por guiarme siempre por el camino correcto, respetar mis decisiones y darme el apoyo que necesitaba durante toda mi vida.

A mi padre David por ser siempre mi amigo y estar a mi lado aconsejándome y guiándome durante este largo camino.

A mi madre Isabel; por tu infinito amor, dedicación y apoyo incondicional que día a día sentí conmigo.

A mi padre Luis; por sus enseñanzas durante todos mis años de estudio, dedicación amor, consejos y fuerza para enfrentar mis decisiones.

A mi hermana Elizabeth por las pequeñas cosas que alegran mis días y por siempre estar dispuesta a ayudarme en todo lo que fuera posible, sabes que siempre estaré contigo.

A nuestro profesor guía Dr. Sebastián San Martín por creer en nosotros, siempre incentivarnos a crecer más, por su dedicación diaria y voluntad de entregar todo lo necesario para que la realización de este seminario fuera posible.

A las Drs. Sandra Blois y Petra Arck de la Universidad de Berlín-Alemania, por todas las facilidades en la recolección del material biológico y su disposición hacia nuestro grupo de trabajo para invitarnos a trabajar en este proyecto de investigación.

A Makarena Gonzalez por estar siempre dispuesta a ayudar y ser una compañera en el laboratorio, aportando con sus ideas e invirtiendo tiempo en nuestro proyecto.

A Maritza Maldonado y Edgardo Rojas por brindarnos una agradable e inolvidable práctica profesional, por entregarnos sus conocimientos, por su excelente voluntad y amistad.

A nuestra profesora Jimena Le Roy por todas las enseñanzas que nos ha dejado, en lo académico y en la vida.

A nuestro compañero Victor Carriel por facilitarnos material de estudio y responder nuestras dudas, siempre dando sus consejos sin esperar nada a cambio.

A nuestra amiga Ambart Covarrubias por su dedicación y compañía, por confiar en nosotros y entregarnos su amistad sincera.

Al Laboratorio de Ciencias Morfológicas del Departamento de Anatomía Patológica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso en el cual desarrollamos nuestro seminario.

A nuestros padres por su cariño, comprensión y apoyo incondicional en las decisiones de nuestras vidas.

A nuestro amor que me hace imposible definir lo fundamental que ha sido durante estos años al ir de la mano.

Resumen.

El aborto espontáneo es una patología obstétrica que afecta a millones de parejas en edad fértil en el mundo. Consideraciones éticas, han dificultado la determinación del o los agentes etiológicos que puedan estar involucrados en esta problemática. Alteraciones en el ambiente uterino pueden influir sobre el desarrollo embrionario y placentario afectando la viabilidad del embrión *in útero* y ser un factor importante en la interrupción espontánea de la gestación en etapas tempranas.

En la actualidad, existe un modelo animal de ratón de aborto espontáneo, que dadas las similitudes en los proceso de implantación y placentación con nuestra especie, centra la atención de investigadores que buscan ampliar los conocimientos respecto a los mecanismos morfológicos y moleculares que anteceden al aborto, sin ser esclarecidos en su totalidad hasta la fecha.

Estos antecedentes nos han impulsado a plantearnos como objetivo de tesis, caracterizar, desde un punto de vista morfológico, los sitios de implantación, desarrollo embrionario y desarrollo inicial de la placenta en un modelo animal de aborto espontáneo.

El modelo animal utilizado corresponde a ratones de la cepa CBA/J♀ x DBA/2J♂, establecida como modelo de aborto espontáneo. Como control fueron utilizados ratones de la cepa CBA/J♀ x Balb/c♂ los cuales no presentan alteraciones reproductivas. Los animales fueron sacrificados en los días 6,5 a 10,5 de la gestación y los úteros procesados por métodos morfológicos convencionales. Cortes seriados fueron teñidos con hematoxilina-eosina y las imágenes observadas y capturadas con ayuda de un microscopio acoplado con una cámara digital.

Al realizar un análisis detallado de los úteros y embriones, se visualizaron algunas características morfológicas que evidenciaron el proceso de absorción embrionaria, como falta del desarrollo y presencia de células del sistema inmune en los sitios de implantación.

La absorción embrionaria asociada al modelo animal estudiado, presenta alteraciones morfológicas que pueden ser evidenciadas con técnicas histológicas de rutina.

Palabras claves: Ratón, Útero, Aborto Espontáneo, Embrión.

ÍNDICE

Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Reproducción en roedores	2
1.1.1 Morfología del aparato genital de roedores hembras	2
1.1.2 Apareamiento y fecundación	5
1.1.3 Desarrollo embrionario de ratón	6
1.1.3.1 Primeras divisiones celulares	6
1.1.3.2 Compactación y formación del macizo celular interno	7
1.1.3.3 Blastulación	9
1.1.4 Implantación	10
1.1.4.1 Gastrulación	14
1.1.4.2 Organogénesis temprana	14
1.1.5 Decidualización	15
1.1.6 Desarrollo de la placenta	18
Capítulo 2: Objetivos	22
2.1 Objetivo General	22
2.2 Objetivos Específicos	22
Capítulo 3: Materiales y Métodos	23
3.1 Animales	23
3.2 Procesamiento	24
3.2.1 Corte y tinción	24
3.2.2 Programa Computacional	26
Capítulo 4: Resultados	27
4.1 Gestación Normal	27
4.1.1 Día 6.5 Gestación normal	27
4.1.2 Día 7.5 Gestación normal	29
4.1.3 Día 8.5 Gestación normal	30
4.1.4 Día 10.5 Gestación normal	32
4.2 Modelo de Aborto Espontáneo	34
4.2.1. Día 6.5 Aborto Espontáneo	34
4.2.2. Día 7.5 Aborto Espontáneo	37
4.2.3. Día 8.5 Aborto Espontáneo	39
4.2.4. Día 10.5 Aborto Espontáneo	42
Capítulo 5: Discusión	45
Capítulo 6: Conclusiones	49

Capítulo 7: Bibliografía	50
Anexo A	55
Anexo B	59
Anexo C	65
Anexo D	70
Anexo E	75

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Se ha calculado que más del 40% de las concepciones no logran progresar a embarazos reconocibles; de las que lo logran, un 15% terminan en aborto espontáneo clínicamente manifiesto. El aborto espontáneo ocurre entre las semanas 12 y 22 y posee variadas lesiones histopatológicas reconocibles. Las lesiones inflamatorias agudas sugerentes de infección ascendentes son las más frecuentes (56%), principalmente corioamnionitis (53%), funisitis (25%), perivellostitis (21%) y síndrome de infección del saco amniótico (14%). Le siguen en frecuencia lesiones relacionadas con síndromes malformativos (9%) las que incluyen lesiones sugerentes de cromosomopatías y otras malformaciones. Las lesiones placentarias no inflamatorias corresponden a un 7% y finalmente hidrops fetal a un 5%. El porcentaje restante corresponde a pérdidas por factores desconocidos, que podrían estar relacionados con el ambiente uterino o la falta de desarrollo de la unidad feto-placentaria.

A pesar de la importancia que presenta el establecimiento de defectos estructurales a nivel uterino o placentario, principalmente en pacientes que presentan abortos a repetición, existen pocos antecedentes y publicaciones científicas que describan cuales son las alteraciones morfológicas en estos tejidos en condiciones de aborto. Sumado a lo anterior, consideraciones éticas impiden realizar estudios experimentales que permitan describir este proceso desde un punto de vista morfológico. Es por ello que a través del estudio morfológico del útero durante la absorción embrionaria en un modelo animal de aborto espontáneo, podremos generar una hipótesis del fenómeno que pueda ser homologada a otros mamíferos como el hombre. Como principal modelo experimental en estos estudios se ha utilizado el ratón, ya que presenta ciertas similitudes con el ser humano principalmente en los períodos iniciales de la gestación. Además, se sabe que los roedores poseen altas tasas de reproducción, sin embargo, existen ciertas cepas de ratones cuyas cruces producen una alta tasa de abortos espontáneos que oscila entre el 25% y 30%, porcentaje semejante al observado en humanos. Esperamos que la realización de este proyecto nos permita comprender de manera profunda los cambios ocurridos en el útero de

ratones con alta tasa de aborto espontáneo y a la vez, evidenciar diferencias morfológicas que permitan reconocer etapas precoces del proceso abortivo.

1.1 REPRODUCCIÓN EN ROEDORES

1.1.1 Morfología del Aparato Genital de Roedores Hembras

En los roedores, al igual que en el ser humano, el aparato reproductor de las hembras está compuesto por ovarios, oviductos (el equivalente a las Trompas de Falopio en las mujeres), útero, vagina y glándulas anexas.

Los ovarios son un órgano par y se ubican en el polo postero-lateral del riñón; se conectan a la pared dorsal de la cavidad abdominal por una proyección del peritoneo llamada mesovario, el cual forma una bolsa alrededor del ovario. La pared del mesovario está constituida por tejido conectivo laxo vascularizado con algunas fibras de músculo liso y cubierta por mesotelio en su cara interna y externa.

La cápsula y el ovario se conectan por el hilio, región por donde vasos sanguíneos y nervios entran en el parénquima ovárico.

La superficie externa del ovario está compuesta por un epitelio cúbico llamado epitelio germinal, el cual está cubierto por la túnica albugínea. Internamente se puede reconocer una corteza y una médula. La región medular está formada por tejido fibroso que se conecta con el hilio. La corteza ovárica está formada por un estroma bien vascularizado que contiene células intersticiales, cuerpos lúteos y folículos en distintos grados de desarrollo (Conti, 2001).

El oviducto es un tubo contorneado que conecta el espacio periovárico con los cuernos del útero; la región próxima a la bolsa ovárica se conoce como infundíbulo, la segunda porción se conoce como ampolla y, finalmente, en su tercera porción el istmo que se conecta a la pared uterina.

El útero en roedores se caracteriza por estar formado por dos cuernos largos que se fusionan en un pequeño cuerpo uterino formando un cervix único que se proyecta en la vagina. El útero se conecta a la pared dorsal a través de un ligamento que lleva inervación e irrigación llamado mesocervix (Figura 1.1) (Conti, 2001).

El endometrio corresponde a la mucosa uterina, la cual está formada por epitelio cilíndrico simple, células ciliadas y células secretoras no ciliadas, sostenidas por una membrana basal formada por tres regiones distintas: 1) lámina lúcida, 2) lámina densa y 3) lámina fibroreticular. Al igual que en la mujer, existen invaginaciones en la mucosa llamadas glándulas tubulares que carecen de células ciliadas. A diferencia de la mujer, existe una serie de cambios iterativos que se conoce como el *ciclo sexual* o *estral* y a falta de preñez, sus fases son:

- 1) Un breve lapso de preparación total para la reproducción, acompañado de deseo sexual (*estro*);
- 2) Un período de regresión y disminución de las hormonas ováricas circulantes (*metaestro*),
- 3) Un período de descanso (*diestro*), seguido de
- 4) Un período de cambios preparatorios activos (*proestro*) que conducirán al siguiente estro, (Han-Sel y Convey, 1983).

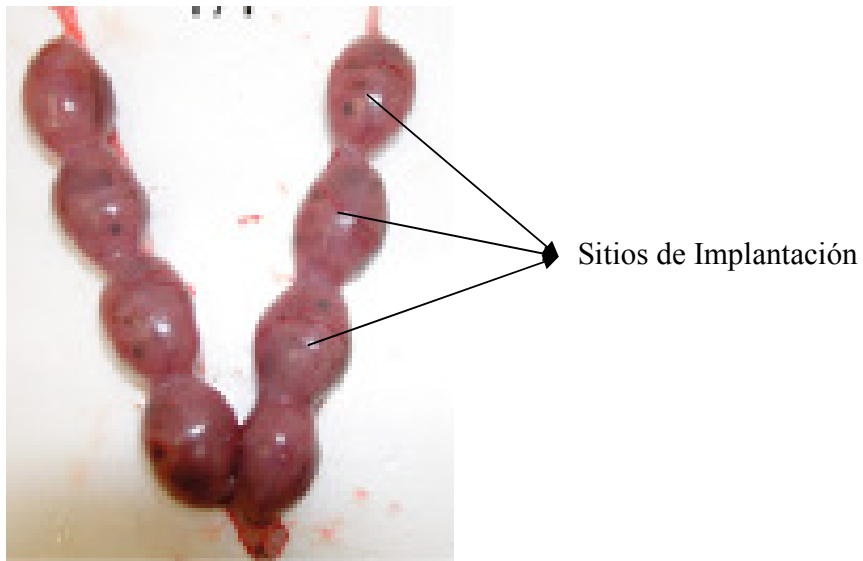


Figura 1.1. Útero bicorneo de ratón, donde se aprecian 8 sitios de implantación.

El endometrio se encuentra rodeado por el miometrio, una capa muscular que se compone de una capa circular interna y una longitudinal externa. El miometrio está cubierto por una serosa que se continúa directamente con el mesometrio (Figura 1.2) (Greca et al., 2000).

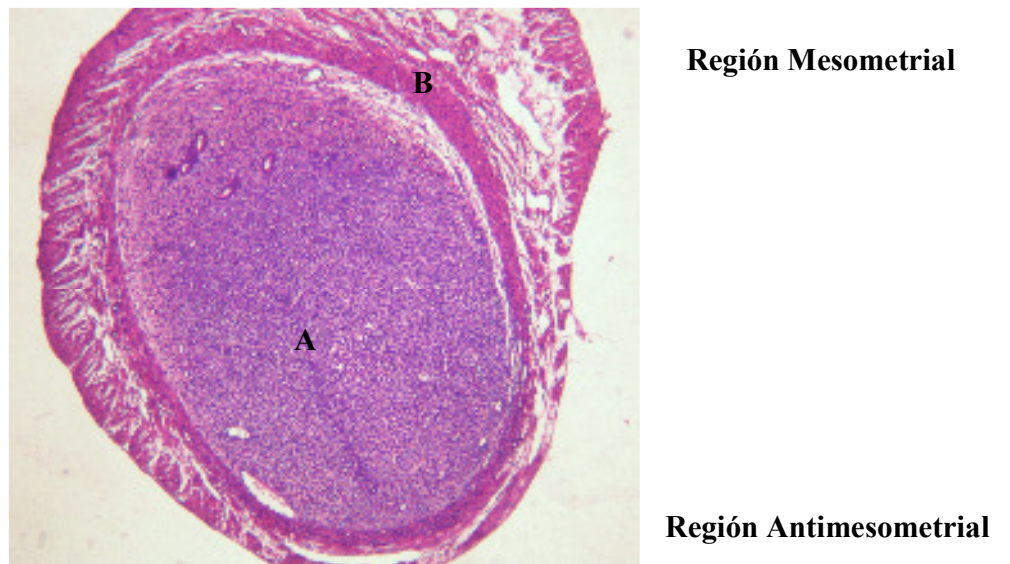


Figura 1.2. Corte transversal de un útero de ratón. Se aprecia el (A) endometrio, (B) Miometrio(H-E, 5x)

1.1.2 Apareamiento y Fecundación

La hembra de ratón copula solamente durante el estro, cuando el óvulo es susceptible de ser fecundado. Para comprobar que ha tenido lugar un acoplamiento satisfactorio, se observa la presencia de un tapón vaginal en la hembra, es decir, un coágulo de un fluido procedente de las vesículas seminales del macho que cubre el orificio vaginal. Más de un 90% de las hembras que lo presentan alcanzan gestaciones a término.

Luego de que los espermatozoides son introducidos en la vagina, éstos se dirigen al ámpula del oviducto. Antes de fecundar, los espermatozoides deben sufrir un proceso de maduración en el útero y oviducto de la hembra, proceso conocido como capacitación, el cual es provocado por sustancias bioquímicas del tracto genital femenino que otorgan a los espermatozoides la capacidad de liberación de enzimas del acrosoma, en un proceso denominado reacción acrosómica. La reacción acrosómica resulta de una pérdida progresiva de la membrana plasmática de la cápsula acrosómica y la liberación de enzimas hidrolíticas almacenadas en la vesícula acrosomal lo cual permite que el espermatozoide penetre la zona pelúcida del ovocito (Gomendio et al., 2006).

La fertilización del óvulo por el espermatozoide implica dos procesos secuenciales: a) adhesión y penetración de la zona pelúcida y b) unión y fusión con la membrana plasmática del óvulo (Damsky et al., 1993). La fecundación activa al óvulo y se forman los pronúcleos masculino y femenino, los que luego se fusionan en un proceso conocido como singamia. La singamia restaura el número diploide de cromosomas de la especie y una vez finalizada la fecundación, esta nueva célula denominada cigoto, experimenta una serie de mitosis sucesivas con lo cual se establecen las primeras blastómeras (Pizzari, 2006).

1.1.3 Desarrollo embrionario en ratones

1.1.3.1 Primeras divisiones celulares

La primera división celular del embrión de ratón es total, pero ligeramente desigual. Se cree que el plano de división atraviesa las posiciones que ocuparon los centros de los pronúcleos. La primera división celular comienza en el ámpula del oviducto unas 24 horas después de la fecundación y continúa durante 2 ó 3 días, incluso si el embrión entra en el útero. El tiempo que transcurre desde que tiene lugar la fecundación hasta que comienza la primera división celular varía de 17 a 57 horas según las diferentes cepas de ratones (Conti, 2001).

Las siguientes divisiones celulares tienen lugar en intervalos de tiempo cada vez más cortos y pronto dejan de ser sincrónicas. La cuarta división celular conduce a la formación de una masa redondeada compacta de células con el aspecto de una mora que se conoce como mórula. Las mórulas pueden encontrarse en la entrada del útero o en la parte superior de éste. Las siguientes divisiones celulares ocurren cada vez con más frecuencia (Conti, 2001).

A medida que transcurren las primeras divisiones, el tamaño de las células va disminuyendo progresivamente. Las células hijas resultantes son cada vez menores, de tal forma que la mórula no es mucho mayor que el cigoto. No obstante se produce un aumento del tamaño del núcleo, así la relación anormal núcleo/citoplasma del cigoto alcanza valores normales. El volumen de los núcleos aumenta, los cromosomas se condensan y se observan nucleolos debido al aumento en la actividad de síntesis proteica.

1.1.3.2 Compactación y formación del macizo celular interno (embrioblasto)

Los primeros indicios de diferenciación celular del embrión ocurren durante el establecimiento del linaje del trofoblasto, lo cual ocurre en la etapa de 8 células cuando los blastómeros maximizan su contacto “célula-célula”, un proceso denominado compactación. Esto establece, luego de la siguiente división celular, un grupo de células externas que se diferenciarán para formar el trofoectodermo del blastocisto, rodeando un centro de células propias, denominado macizo celular interno (Damsky et al., 1993).

La compactación es la primera etapa de diferenciación celular producida en mamíferos, generando el macizo celular interno y el trofoblasto (Figura 1.3) (Ziomek & Johnson, 1980).

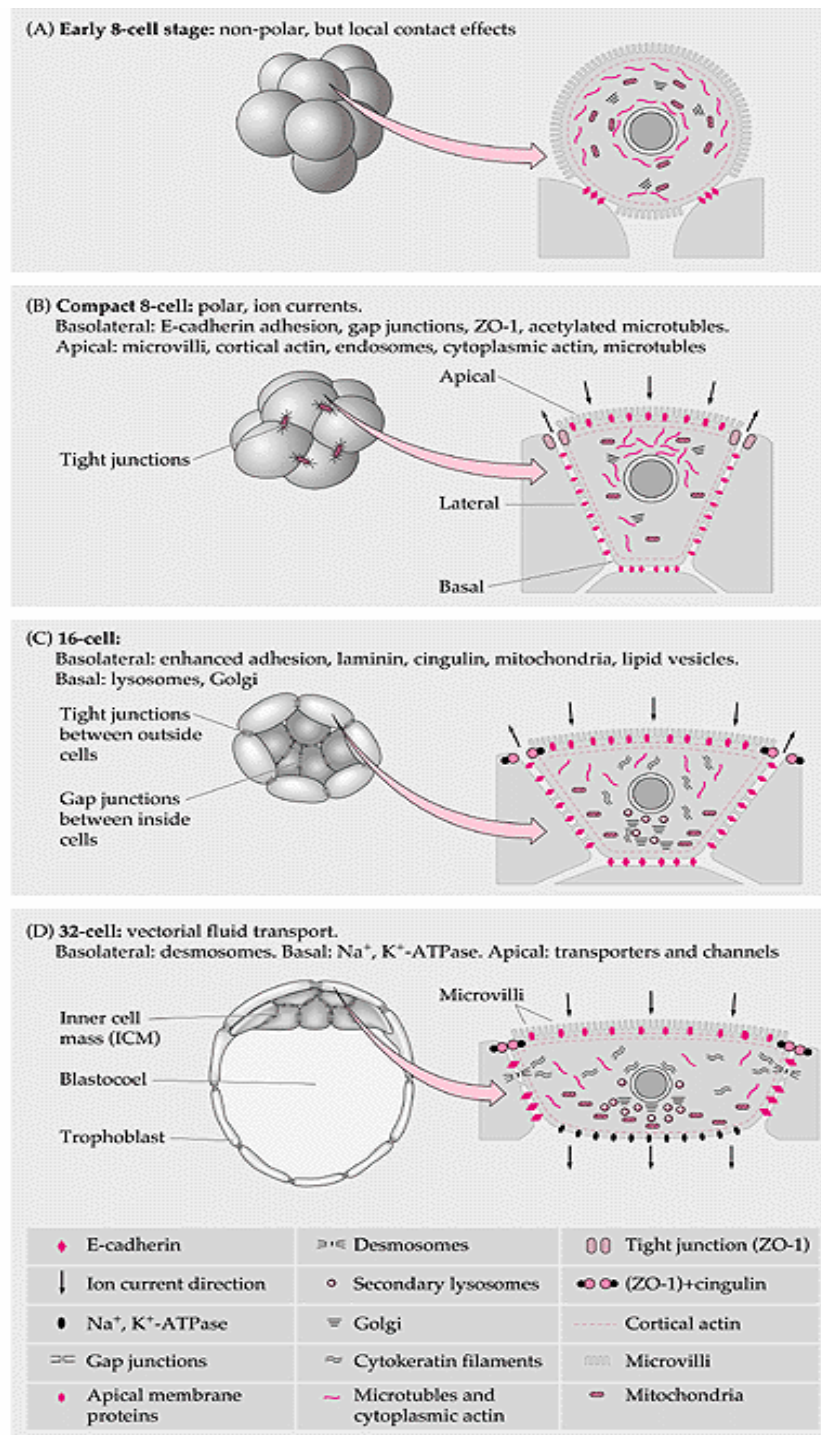


Figura 1.3. Compactación y formación de embrioblasto. (A,B) embrión de 8 células, (C) mórula de 16 células, (D) blastocito de 32 células. El lado Izquierdo representa al embrión en plano transversal. El dibujo del lado muestra un detalle de las células del trofoectoderma. (Flemming 1992 - Gilbert 2006).

1.1.3.3 Blastulación

En el paso de 32 a 64 células, la mórula adquiere una cavidad con forma de hendidura de posición excéntrica rellena de fluido. Las células más electrodensas de la mórula, mayores y poligonales se agrupan en el centro formando un nódulo, mientras que las periféricas, más claras, más pequeñas y ligeramente aplanadas, se ordenan en una capa externa alrededor del macizo celular interno. Entre ambos grupos de células se originan orificios por la entrada de líquido, los cuales confluyen y forman una cavidad única, el blastocele. En este proceso de blastulación, el blastocele crece, pero el protoplasma total no aumenta, ya que el embrión no tiene capacidad de absorber ningún nutriente.

La mórula, hasta este momento, se ha convertido en una vesícula con una pared de una sola capa de células alineadas llamada trofoblasto que cierra el blastocele, excepto en un punto donde se ha formado un nódulo celular, la masa celular interna o nódulo embrionario.

En el ratón, así como en otros mamíferos, el embrión propiamente dicho se desarrolla a partir del macizo celular interno, mientras que el trofoblasto se diferenciará a células relacionadas con el establecimiento de la placenta.

El blastocele, el trofoblasto y la masa celular interna sufren cambios que preparan la implantación y son desencadenados por un aumento de la hormona luteinizante. En este momento el blastocito se desprende de la zona pelúcida, transformándose en una estructura pegajosa y ligeramente ovoide. Esta acción incluye además un aumento de tamaño y un movimiento ondulatorio rítmico (Conti, 2001).

Las células del trofoblasto continúan sintetizando ADN y se observan como células gigantes en el área de contacto con el epitelio uterino. En una camada de ratón es posible ver varios estadios de progreso de sus distintos individuos, así como el edema del endometrio y la decidua.

1.1.4 Implantación

La implantación es una compleja secuencia de eventos que comienza con la adquisición de una posición modificada del embrión en el útero como resultado de la adherencia de éste al lumen epitelial.

Luego de ser transportado a través del oviducto, el blastocito normalmente pasa un período de alrededor de 24-48 horas suspendido en la cavidad uterina. Durante este tiempo, los blastocitos son distribuidos en los cuernos uterinos producto de los movimientos del miometrio (Boving, 1971).

En roedores, al igual que en otros mamíferos que desarrollan placenta hemocorial, luego de la adherencia se inicia la invasión del endometrio por parte del trofoblasto.

El inicio de la implantación requiere de ciertas características: 1) que el trofoblasto o subpoblaciones de éste hayan alcanzado un estado de “invasividad” y, paralelamente 2) que el endometrio haya alcanzado un estado de “receptividad”. Esta receptividad se produce con la reducción del grosor del glicocalix de las células epiteliales uterinas (Anderson et al., 1986, 1990; Enders and Schlafke, 1977; Morrison Potter 1984, 1990; Morris et al 1988; Potter and Morris 1990).

Según Carson et al. 1990, en el ratón, el trofoblasto se adhiere mediante moléculas de heparan sulfato a receptores expresados en la membrana apical del epitelio uterino durante la fase receptiva. El inicio de la implantación requiere que el trofoblasto adhiera el lado apical de su membrana plasmática hacia la superficie apical de la membrana plasmática del epitelio uterino.

En el desarrollo, las células pueden expresar dos fenotipos principales y variar entre éstos: 1) el fenotipo mesenquimático/fibroblástico que es compatible con células de movimiento individual y 2) el fenotipo epiteloide que se caracteriza por células que expresan polaridad ápico-basal asociadas fuertemente con uniones celulares. La aplicación de este concepto ha llevado a creer que el trofoblasto modifica su típica organización

epitelial cuando comienza a invadir; debe expresar moléculas de adhesión célula-célula o receptores atípicos en el lado apical de su membrana, cambiando el espectro de expresión de moléculas de adhesión y alterando su aparato de motilidad (Denker, 1993).

La receptividad es mantenida por sólo un período limitado, que define la “ventana de la implantación” (Psychoyos, 1973, 1986, 1988; Psychoyos and Casimiri, 1980). Mientras la receptividad del endometrio es regulada por hormonas esteroidales del ovario y cambios en la tasa de estrógeno/progesterona, la invasividad del trofoblasto es lograda cuando ha alcanzado un cierto estado de diferenciación (Psychoyos, 1986, 1988; Martel et al., 1987; Psychoyos and Martel, 1990).

En la mayoría de los roedores esta zona es degradada enzimáticamente por componentes de la secreción uterina (Rosenfeld and Joshi, 1977) y proteasas secretadas por las células trofoblásticas además de una serie de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal unido a heparina (HB-EGF) (Das et al., 1994). Previo a su adhesión en la superficie epitelial, el blastocito se posiciona cerca del extremo antimesometrial de la cripta de implantación, en el lado opuesto al lumen del mesometrio. La orientación del blastocito es constante a su masa interna; ésta siempre apunta (enfrenta) al mesometrio precediendo a la reacción decidual, mientras que en el epitelio uterino aún no se observa ninguna respuesta (Figura 1.4).

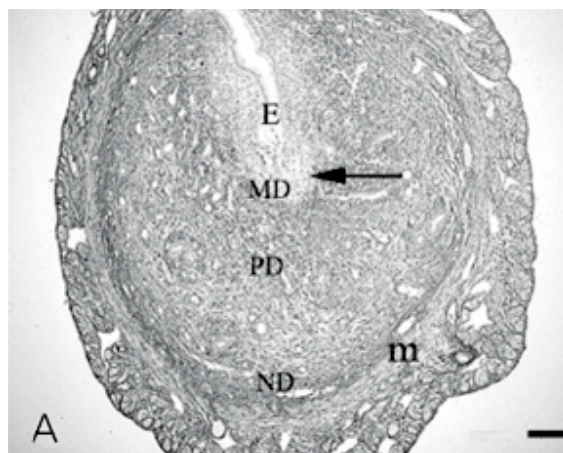


Figura 1.4. Corte transversal de un útero de ratón al día 5° de gestación. E = embrión; m = miometrio; MD = decidua madura; PD = predecidua; ND = estroma no decidualizado. Barra 100 μ m. (San Martín et al, 2003)

La implantación puede ser dividida en distintas etapas; la primera se conoce como *aposisión* y corresponde a la primera interacción estructural que ocurre entre células del embrión y células maternas. Ésta se caracteriza por el aumento del contacto entre las microvellosidades de la superficie del trofoblasto y la superficie apical del epitelio uterino. La oclusión del lumen y las interdigitaciones de las microvellosidades son conocidas como la reacción de adhesión (Nilsson, 1966).

La segunda etapa es conocida como *adhesión* en la cual la superficie del trofoblasto y las células epiteliales del lumen han perdido sus microvellosidades y ahora siguen paralelas una a las otras en una forma ondulada y separadas sólo por un estrecho espacio de menos de 20 nm (Schlafke and Enders, 1975).

En ratas y ratones se ha establecido que la adhesión y la continuación de la implantación dependen de la secreción de estrógeno que actúa en un endometrio preparado por progesterona (Shelesnyak et al 1963; Finn and Martin, 1970,1972, Psychoyos, 1973; Finn, 1977; Glasser and Clark, 1975).

En roedores, la adhesión del blastocito es seguida por la penetración del epitelio uterino por el trofoblasto (Figura 1.5). Se reconocen tres modelos principales de penetración: por intrusión, por fusión o por desplazamiento (Enders, 1972; Schlafke and Enders, 1975). El último es el modelo predominante de penetración en los roedores de laboratorio y consiste en que grupos completos de células epiteliales del útero se separen de su membrana basal y de sus células vecinas, degenerando y siendo fagocitadas por el trofoblasto (Schlafke et al., 1985).

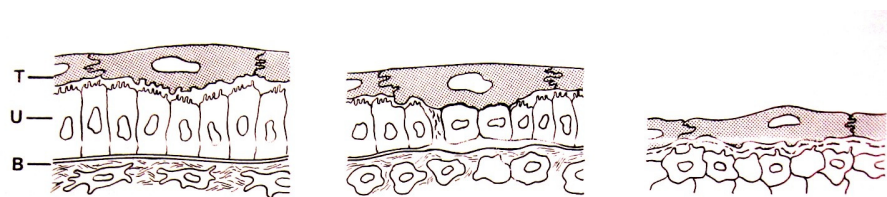


Figura 1.5. Diagrama que muestra el modelo de penetración del trofoblasto a través del epitelio uterino. T = trofoblasto, U = epitelio uterino, B = membrana basal. (Denker, 1993).

Luego de que el trofoblasto hace contacto con la lámina basal epitelial ocurre un “período de descanso” antes de que la lámina basal sea alcanzada (Enders and Schlafke, 1967). En ratones, en la mañana del 6º día de gestación, el trofoblasto está en contacto directo con la decidua y acúmulos de material granular remanente de la lámina basal se encuentran presentes entre células trofoblásticas y deciduales.

La invasión del tejido conectivo endometrial, cuya región subepitelial ha sido transformada en tejido decidual, corresponde al siguiente paso de la implantación en roedores. La invasión resulta principalmente por la acción de las células gigantes del trofoblasto. Ésta comienza a organizarse como una red alrededor de la región mural y abembrionaria. Las células gigantes penetran entre células deciduales, las cuales forman una capa avascular estrecha alrededor del embrión denominada decidua primaria. La acción de las células gigantes también se extiende a vasos sanguíneos fuera de la decidua primaria, penetrando entre células endoteliales y substituyendo a algunas de éstas. Desde este momento la sangre materna empieza a circular a través de espacios en la red de células gigantes (Welsh and Enders, 1987). Todos estos eventos ocurren en el endometrio antimesometrial el cual es el sitio de la unión inicial del embrión.

En roedores, el desarrollo de la placenta es consecuencia del crecimiento del cono ectoplacentario, la diferenciación de sus células y de una asociación con las células de origen alantoideo. El cono ectoplacentario ocupa el polo embrionario y, por lo tanto, la placenta se formará en el lado mesometrial del útero. El embrión en desarrollo queda dentro de una cripta de la mucosa uterina y su crecimiento no es posible hasta la implantación ya que no dispone de aporte nutricional. Por ello, la masa embrionaria total se mantiene estable aún existiendo un aumento del número de células las cuales son cada vez de menor tamaño pero que conforman importantes cambios: el blastocele que se conoce ahora como la cavidad amniótica ha crecido; la masa celular interna que se conoce como escudo embrionario se ha dividido transversalmente en una capa exterior de ectodermo extraembrionario, una capa subyacente de grandes células de ectodermo embrionario y una zona central de células del endodermo proximal. Desde estas células se extiende hacia el extremo opuesto del blastocele el endodermo distal (Conti, 2001).

1.1.4.1 Gastrulación

La gastrulación es la formación de tres capas germinativas a partir del epiblasto. Estas son ectodermo, mesodermo y endodermo. La parte de la masa celular interna cercana al blastocele dará lugar al endodermo y las células restantes formarán el ectodermo. Ambas capas embrionarias se forman mientras tiene lugar la implantación en el útero.

1.1.4.2 Organogénesis temprana

A los 7.5 días de gestación el embrión comienza la diferenciación orgánica. Entre el ectodermo engrosado y el endodermo aparece la notocorda, y el mesénquima se extiende a los lados de esta estructura llenando espacios entre las otras dos hojas germinativas. Al 7° día el ectodermo anterior a la línea primitiva y por encima de la notocorda se engrosa formando la placa neural y al 8° día se forma una depresión, llamada surco neural. Estas estructuras configuran el eje anteroposterior del embrión. Del mesénquima situado en el límite posterior de la línea primitiva y hacia la parte anterior el alantoides crece en el exocele, el cual hacia el 8° día de gestación se fusiona con el corion.

El mesénquima al 8° día forma un agregado adyacente a la notocorda y se organiza en los pares de somitas, los cuales por su apariencia lineal y cronológica se consideran un aspecto importante en el cálculo de la edad del embrión (Conti, 2001). Al 8° día, el nefrótomo surge como precursor del sistema excretor y el sistema circulatorio deriva de los islotes sanguíneos; agregados de células del mesénquima en el mesodermo esplacnopleural. A los 7.5 días de gestación el amnios cubre la superficie dorsal del embrión y lo rodea,

excepto por el cordón umbilical, el cual lo mantendrá sujeto flotando en el líquido amniótico.

1.1.5 Decidualización

La implantación en roedores está acompañada por marcados cambios en el endometrio que consisten en modificaciones en la forma, organización y metabolismo de las células estromales residentes en el tejido conectivo endometrial. Así, fibroblastos son transformados en células epiteloides, denominadas células deciduales. Los fibroblastos del endometrio son diferentes a aquellos de otras partes del cuerpo, ya que los últimos no reaccionan a la presencia del embrión de la misma forma (Herr et al., 1978).

La decidualización en roedores tiene características importantes: 1) Los fibroblastos endometriales deben ser adecuadamente preparados por los esteroides ováricos; 2) Bajo condiciones naturales esto ocurre sólo alrededor del embrión implantando, dejando regiones del endometrio entre embriones donde no ocurre decidualización (sitios de interimplantación), 3) Puede ser inducida artificialmente en ausencia de embrión, resultando la formación de un tejido muy similar a la verdadera decidua; 4) Existe un período definido durante el cual puede ser inducida la gestación o pseudogestación en animales; y 5) Da como resultado la morfogénesis de un nuevo tejido en un mamífero adulto normal (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

La decidualización comienza en la región estromal inmediatamente alrededor de la cripta mucosa en la cual el embrión se implantó, esto quiere decir, inicialmente antimesometrial y subepitelial (Mossman, 1987). Las primeras células deciduales están ya presentes cuando el epitelio es desplazado y el trofoblasto alcanza la lámina basal. La decidualización luego se extiende antimesometrialmente hacia el miometrio, y unos pocos

días después una reacción visible puede también ser observada en el lado mesometrial del endometrio.

La primera modificación estructural observada en células estromales es la reorganización de sus nucleolos, los que desarrollan componentes granulares y fibrilares bien definidos (Lundkvist, 1978). Otras modificaciones consisten en el incremento del tamaño celular y la disminución en la cantidad de espacio extracelular en el estroma afectado. Las células deciduales también exhiben: 1) un aumento en su contenido de organelas involucradas en la síntesis de macromoléculas, 2) una acumulación de lípidos, glicógeno y filamentos intermedios, y 3) el establecimiento de uniones intercelulares.

Se han descrito varias regiones en el útero de la rata del día 10 de gestación, en la cual la decidualización alcanza su nivel máximo de complejidad, estas serían: la decidua antimesometrial, la cripta decidual, una región de células ricas en glicógeno y una región de células del estroma indiferenciadas (Welsh & Enders, 1985).

En el endometrio antimesometrial, la primera área decidual que empieza aparentemente durante la implantación es la capa estrecha inmediatamente rodeando el embrión. Ésta es llamada decidua primaria o zona decidual primaria (Krehbiel, 1937; Parr and Parr, 1989).

La zona decidual primaria (mientras existe) esta rodeada por una región de células deciduales completamente transformadas siendo las células dominantes de la decidua antimesometrial. Aquellas células localizadas externamente a la decidua primaria tienen rasgos morfológicos que son intermediarios entre células deciduales maduras y fibroblastos. Estas células son denominadas células predeciduales.

Una de las más importantes características fisiológicas de la zona decidual primaria es que parece ser avascular (Roger et al. 1982). La zona decidual primaria contiene capilares y vénulas, pero estos vasos están colapsados y no contienen sangre (Christofferson and Nilsson, 1988). También se ha establecido que las células deciduales pueden actuar como una barrera al paso de macromoléculas lo que serviría para proteger al embrión frente a la exposición de microorganismos, IgG maternas y células inmunocompetentes (Parr and Parr, 1989).

Las células deciduales antimesometriales transformadas completamente son poliédricas, tienen núcleos eucromáticos y están estrechamente unidas. Su nucleolo, aparato de Golgi y mitocondrias son prominentes y usualmente tienen muchos filamentos intermedios, resultando en una notable disminución en el volumen relativo del espacio extracelular. Esto va acompañado por una ampliación del espacio vascular, proporcionando a la decidua una apariencia de glándula endocrina.

Como se mencionó anteriormente, la mucosa uterina reacciona a la invasión del embrión a los 4.5 o 5 días de gestación, a través de un proceso de transdiferenciación de los fibroblastos endometriales en células deciduales. En la zona decidual se distinguen a) *decidua basal*, situada en la región mesometrial, b) *decidua capsular* que rodea al embrión, c) *decidua marginal* o zona de transición entre las dos anteriores y finalmente, revistiendo el resto del útero y d) *decidua parietal*, sin contactarse con ningún blastocito (Conti, 2001).

Al inicio de la decidualización en el ratón (día 5), la superficie de células deciduales que participan actualmente en las uniones intercelulares, es bastante pequeña. Al 6º día largas áreas desarrollan uniones estrechas, lo opuesto se observa el día 8 de gestación, cuando la mayor parte de uniones intercelulares son macula adherente.

El proceso de decidualización avanza de forma más lenta en el lado mesometrial que en el endometrio antimesometrial. Mientras que la decidua antimesometrial está presente desde la mañana del quinto día de gestación en el ratón, la decidua mesometrial no se observa hasta el final del día 7. Sin embargo modificaciones en las células del estroma subepitelial pueden ser detectadas ultraestructuralmente en el día 5.

Las primeras células deciduales han sido observadas al día 5 de gestación alrededor del extremo antimesometrial en las criptas de implantación que contienen al embrión. Las células del estroma transformadas alrededor del embrión están muy alargadas y adheridas. Al día 7 de gestación, células deciduales maduras ocupan una amplia área del endometrio de los sitios de implantación. Gran parte de la superficie de estas células poseen uniones intercelulares. El espacio extracelular en el área de células deciduales maduras se observa estrecho en estos días. A diferencia del endometrio de animales nulíparos, la región decidualizada, especialmente la madura, es ocupada por una población heterogénea de gruesas y delgadas fibras colágenas.

1.1.6 Desarrollo de la placenta.

La función principal de la placenta es permitir al feto y su madre interactuar para promover el crecimiento fetal y viabilidad preservando el bienestar materno. Esto se hace posible a través del desarrollo de regiones especializadas donde las células de los dos individuos se asocian e interactúan entre ellas (Georgiades, 2001).

La placenta asegura el mantenimiento de una gestación normal debido a la síntesis y secreción de hormonas (Pijnenborg et al., 1981). Se ha demostrado recientemente que el fibrinógeno es esencial para una unión exitosa del blastocito y mantenimiento de la placentación (Iwaki et al., 2002).

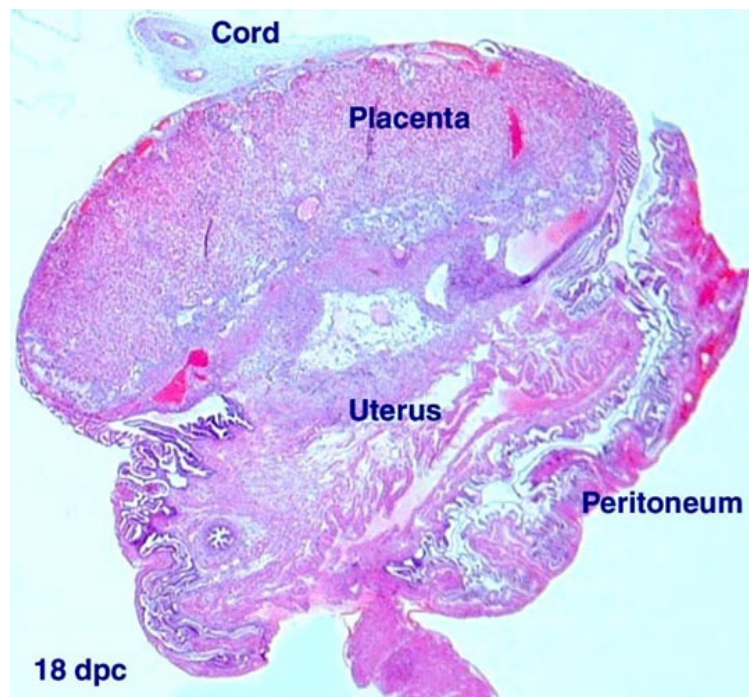
Aquella etapa de desarrollo placentario donde se ha establecido la circulación utero-placentaria se denomina “placenta definitiva”. Anterior a esta etapa, el embrión suele nutrirse de secreciones de las glándulas uterinas. Estos nutrientes están disponibles para el feto por acción fagocítica de las células anteriormente mencionadas, lo cual es transferido por el saco vitelino (Georgiades, 2001).

El saco vitelino absorbe nutrientes de la sangre materna a través de canales capilares de la decidua que gradualmente forman senos entre las células gigantes primarias y la membrana de Reichert (Malassine et al, 2003), una tercera membrana protectora que es exclusiva de los roedores; ésta se desarrolla de la superficie interna del trofoblasto desde algunas células endodérmicas a los 6.5 días de gestación. Es una lámina fina formada por una capa exenta de células, homogénea, acidófila y resistente que supone una cubierta protectora para el embrión y debe tener una importancia transitoria para el recambio de nutrientes.

La conversión del nódulo embrionario o masa celular interna en escudo embrionario consiste en un proceso que requiere una transposición de células, requisito imprescindible para el desarrollo posterior (desarrollo del mesodermo, notocorda y tubo neural). El proceso difiere en los distintos animales y va acompañado tempranamente de la formación del mesodermo. En los roedores el material celular destinado a la formación del

embrión propiamente dicho debe desplazarse más hacia el interior de la vesícula blastodérmica, mientras se desarrolla el escudo embrionario (Conti, 2001).

El escudo embrionario tiene en el ratón forma de cilindro y queda dividido en dos regiones: 1) la región dorsal, que es ectodermo extraembrionario y da lugar a las estructuras extraembrionarias y 2) la región ventral, que corresponde al ectodermo embrionario y da lugar a varias estructuras del embrión propiamente dicho. Una cavidad proamniótica aparece en el centro del ectodermo embrionario, seguida de una cavidad similar en el ectodermo extraembrionario. Las dos cavidades se unen formando un lumen alargado y estrecho. La cavidad cerrada por el endodermo es el origen del saco vitelino y se denomina también cavidad complementaria (Georgiades, 2001).



*Figura 1.6. Corte transversal de placenta al final de la gestación en rata (H-E)
(Benirschke, 2005).*

La placenta de roedores como la rata y el ratón es dividida en tres regiones principales:

En el ratón la zona de unión es también conocida como la zona basal (Muntener & Hsu, 1977) inmediatamente bordeando la superficie materna de la zona de unión existe una

zona discontinua de células gigantes derivadas del trofoblasto, éstas son conocidas como “células secundarias gigantes del trofoblasto” y derivan del trofoectodermo polar y mural.

El laberinto es una región que posee vasos sanguíneos maternos y fetales y es un sitio de interacción. Por estos vasos sanguíneos o canales circula sangre independientemente de la madre y del feto y, sin embargo, permite un intercambio fisiológico entre estos dos organismos (Brosens et al., 1967). El cordón umbilical, una colección de venas y arterias fetales que conectan los fetos con la placenta y a través del cual sangre fetal entra y sale de la placenta, está adherido al centro de la superficie fetal (Steven, 1975).

El área del disco placentario localizada a continuación del laberinto en el sitio de implantación y conecta la placenta a la decidua es conocida como espongiotrofoblasto. Este tejido está compuesto en gran cantidad por células gigantes. Estas células son más compactas en la interface entre la capa de células gigantes periféricas y el laberinto. (Benirschke, 2005).

Como hemos descrito, la reproducción en mamíferos depende de una serie de eventos coordinados a nivel celular y tisular, que se inicia con el establecimiento de estructuras especializadas que permitan la interacción entre los tejidos maternos y fetales. En condiciones normales este fenómeno se inicia con la implantación y finaliza con el parto, sin embargo, un porcentaje importante de estas gestaciones no llegan a término. La interrupción de la gestación puede ser determinada por una serie de trastornos, tanto de las condiciones del feto como de la madre. Junto a lo anterior, se ha descrito en los últimos años, que el mantenimiento de la gestación en condiciones normales, depende de un control adecuado del sistema inmune materno, establecido por la tolerancia inmunológica hacia el feto.

El conocimiento de cómo ocurre la interacción entre los tejidos maternos y fetales permanece aún poco esclarecido. Mayores informaciones en este aspecto, permitirán comprender lo que ocurre con las pérdidas embrionarias en el inicio de la gestación.

Durante la gestación, el feto, expresa antígenos paternos, los cuales están en contacto directo con la circulación materna. Esta extraña relación requiere de una acción inmunomodulatoria especial, una vez que el feto es protegido del ataque y del rechazo del

sistema inmune materno. Este enigma es referido como la paradoja inmunológica de la gestación, y a través de los años muchos, científicos han tratado de dar una explicación a como este fenómeno ocurre durante la gestación.

Uno de los modelos actualmente disponibles para estudiar los factores relacionados con los trastornos de la interfase materno-fetal, fue originalmente descrito por Clark y col (1980). En este modelo, hembras CBA/J cuando cruzadas con machos DBA/J2 (CBA/JxDBA/J2) presentan una absorción embrionaria cercana al 40%, con un promedio entre el 20% y 30% al día 12 de la gestación. Este modelo ha sido utilizado para analizar varios mecanismos que puedan estar relacionados con la sobrevida y muerte del embrión en desarrollo (Duclos et al, 1996, Blois et al, 2005). La mayoría de las informaciones que han sido generadas por el estudio en este modelo animal, se han focalizado en determinar la presencia semialogénica del feto y su relación con la tolerancia inmunocompetente de la madre, y como la respuesta inmunitaria materna puede estar relacionada con la sobrevida fetal.

Las causas y mecanismos relacionados con la pérdida embrionaria en este modelo animal no han sido aún esclarecidos, sin embargo, se ha observado un elevado porcentaje de macrófagos infiltrados en la interfase materno fetal de estos animales (Duclos et al, 1996; Blois et al, 2005).

El análisis morfológico asociado a este modelo animal, permitiría identificar en forma temprana marcadores de pérdida embrionaria y así contribuir a la comprensión de los mecanismos relacionados con este proceso patológico.

CAPITULO 2: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar, desde un punto de vista morfológico, los sitios de implantación, desarrollo embrionario y desarrollo inicial de la placenta en un modelo animal de aborto espontáneo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aplicar técnicas morfológicas convencionales para la descripción morfológica de los sitios de implantación, desarrollo embrionario y desarrollo inicial de la placenta en un modelo de aborto espontáneo entre los días 6,5 y 10,5 de la gestación.
- Comparar los resultados obtenidos del modelo de aborto espontáneo con un modelo animal normal.
- Caracterizar marcadores morfológicos que permitan identificar el fenómeno de absorción embrionaria en forma temprana.

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 ANIMALES:

Para nuestra investigación, fueron utilizados úteros de ratones provenientes de la Universidad de Berlín, Alemania. El modelo animal utilizado corresponde a ratones de la cepa CBA/J♀ x DBA/2J♂, cepa que ha sido establecida como modelo de aborto espontáneo. Como control normal de gestación utilizamos ratones de la cepa CBA/J♀ x Balb/c♂, los cuales no presentan alteraciones reproductivas. Estos animales fueron mantenidos en el bioterio de Experimentación Animal de la Universidad de Berlín bajo condiciones de fotoperíodo controlado (12 horas luz, 12 horas oscuridad) con agua y comida *ad libitum*. Para preñar los ratones, fueron puestas 3 hembras en contacto con un macho reproductor durante la noche. Al día siguiente, fue evaluada la presencia de tapón vaginal, lo que es considerado como un signo positivo de cópula. El día que se observó el tapón vaginal fue considerado como el 1º día de la gestación (dg).

3.2 PROCESAMIENTO:

3.2.1 Corte y tinción:

Fueron utilizados úteros en gestación de los días 6.5, 7.5, 8.5 y 10.5 de ambas cruza de ratones (cruza abortiva y cruce normal). Todos los úteros fueron fijados en solución de methacarn (metanol, cloroformo y ácido acético, 6:3:1) por 4 horas a 4°C. Luego los tejidos fueron deshidratados en alcohol absoluto, aclarados en xilol y embebidos en parafina a 58 °C.

Los moldes en parafina, con sitios de implantación en cantidades variables, fueron cortados a 5 µm de espesor en micrótomo y los cortes obtenidos fueron observados al microscopio óptico para verificar el plano de corte. Los moldes fueron cortados hasta obtener la secuencia completa de un embrión por molde.

La totalidad de cortes obtenidos por cada día de gestación, fueron adheridos a portaobjetos individuales cubiertos con solución Poly-L-lysine 0.1% (Sigma-Aldrich) e identificados con numeración secuencial, la totalidad de las láminas variaba en un rango entre 20 y 100 unidades, dependiendo del día de gestación y tamaño del embrión. Posteriormente, fueron secados durante una hora en estufa a 60° C.

Fueron seleccionados los portaobjetos numerados según los múltiplos de 3 para los días de gestación 6.5 y 7.5 y según los múltiplos de 5 para los días 8.5, y 10.5 y posteriormente procesados adecuadamente para la técnica Hematoxilina-Eosina., estos colorantes fueron preparados en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas, utilizando los reactivos convencionales, con el objetivo de analizar la morfología de aquellos úteros normales y en proceso de absorción, según el siguiente protocolo:

- 1.-Desparafinación en Xilol, 3 cambios de 10 minutos c/u.
- 2.- Hidratación en Alcohol de 100°, 2 cambios 5 minutos c/u.
- 3.- Hidratación en Alcohol de 95°, 2 cambios 5 minutos c/u.
- 4.- Hidratación en Alcohol de 80°, 5 minutos
- 5.- Lavado en agua destilada.
- 6.-Contraste nuclear con Hematoxilina de Harris 20 segundos.
- 7.- Lavado en agua corriente, 10 minutos.
- 8.- Lavado en agua destilada, 20 dippings.
- 9.- Deshidratación en Alcohol de 95°, 2 cambios 20 dippings c/u.
- 10.-Contraste con Eosina Alcohólica al 2%, 30 segundos.
- 11.- Deshidratación en Alcohol de 100°, 2 cambios 20 dippings c/u.
- 12.-Xilol para aclarar, 3 cambios.
- 13.- Montaje con Bálsamo de Canadá.

Las imágenes fueron analizadas y capturadas en un microscopio Zeiss Axioskop 2 Plus de campo claro con cámara fotográfica digital Canon Power Shot G5 incorporada, perteneciente a la Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso.

Todas las técnicas fueron realizadas en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas del Departamento de Anatomía Patológica y miembro del Centro de Investigación en Biología de la Reproducción de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

3.2.2 Programa Computacional:

Con el fin de realizar una secuencia de imágenes del útero y embrión en los distintos planos de profundidad del molde, fueron obtenidas imágenes al microscopio óptico de la secuencia de al menos un sitio de implantación desde la aparición del embrión hasta su desaparición posterior. Con este fin se realizó un video de formato AVI con el programa Pro Show Producer 3.0 (Copyright Photodex Corporation) , en el cual fueron insertadas las imágenes secuenciadas en el mismo plano de corte; las imágenes fueron posicionadas indicando al embrión al centro del video, el cual dependiendo del día de gestación y el tamaño del embrión contó con un número de imágenes que varió de 8 a 40.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 GESTACIÓN NORMAL

4.1.1 Día 6.5 Gestación Normal

En los cortes transversales de útero pertenecientes a esta edad gestacional, es posible distinguir miometrio y endometrio, observándose además, reacción decidua, decidua madura, predecidua y zona no decidualizada hacia el miometrio (Figura A.1). En la decidua antimesometrial, que corresponde a una zona no vascularizada, la reacción decidua alcanza la mitad del espesor del endometrio. Las observaciones del desarrollo embrionario en este modelo animal, en el correspondiente día de gestación, nos permiten ubicarlo en la etapa TS 8 (Tabla Anexo E, Figura D.2).

La decidua madura se encuentra formada por células grandes, globosas, de relación núcleo/citoplasma 1:1 y unidas entre sí por escasa matriz extracelular. En ocasiones son binucleadas y presentan núcleo basófilo con 1 a 3 nucleolos prominentes. Se observan además algunas células con material picnótico fuertemente basófilo en su citoplasma (Figura A.3).

En la zona embrionaria se aprecian células del trofoblasto mural y, adyacentes al embrión, se observan células epiteliales en degeneración y cuerpos apoptóticos de núcleos celulares condensados y altamente basófilos que corresponden a las primeras células deciduales.

La predecidua, una zona transitoria entre decidua madura y zona no decidualizada, se encuentra formada por células de menor tamaño que las deciduales y de relación núcleo/citoplasma 1:1. En esta zona se aprecian células binucleadas con 2 a 4 nucleolos, unidas entre sí estrechamente y rodeadas por escasa matriz extracelular (Figura A.4), a

diferencia de la zona no decidualizada, donde se observan fibroblastos de citoplasma menos acidófilo y núcleos alargado (Figura A.5).

Rodeando el sitio de implantación de embrión, se observan células gigantes del trofoblasto de relación núcleo/citoplasma 2:1, que poseen prolongaciones de su citoplasma, núcleos basófilos y con 2 a 3 nucleolos. Se observa además, el macizo celular interno conformado por células cúbicas y de núcleo central levemente basófilo que posee de 1 a 2 nucleolos. El macizo se encuentra rodeado por la membrana de Reichert, la cual tiene la particularidad de ser acelular y acidófila (Figura A.2). En el macizo celular interno se observa una capa unicelular del endodermo, de forma cúbica que rodea al ectodermo, el cual está formado por células pequeñas, cilíndricas, de escaso citoplasma y núcleo basófilo que posee un nucleolo.

Se diferencian estructuras tanto extraembrionarias como embrionarias. En las estructuras extraembrionarias, se observa una capa unicelular que corresponde al endodermo visceral rodeando a las células del ectodermo. En las estructuras embrionarias, se observa el endodermo primitivo, formado por una capa de células cúbicas que rodean a las células cilíndricas del epiblasto, las cuales se disponen en dirección a un lumen conocido como cavidad proamniótica.

Se aprecian además células del trofoblasto polar, pequeñas, de relación núcleo/citoplasma 1:1 las cuales poseen 1 ó 2 nucleolos y se conectan a la decidua mesometrial a través del cono ectoplacentario, el cual se encuentra rodeado de sangre materna.

En relación a la decidua mesometrial, la reacción decidual alcanza la mitad del espesor del endometrio, centrífugamente desde el sitio de implantación hacia el miometrio. En la zona abembrionaria se observan lagunas de sangre materna, células deciduales en degeneración y cuerpos apoptóticos (Figura A.6).

Se observa en esta zona, que la decidua madura está constituida por células grandes y globosas que presentan una relación núcleo/citoplasma 1:1, núcleo basófilo y en ocasiones binucleadas con 1 a 3 nucleolos prominentes. Estas células además se encuentran muy unidas entre sí debido a la escasa matriz extracelular que las rodea (Figura A.3).

Al analizar la zona predecidual, se observan células similares a las presentes en la zona antimesometrial, aunque en la zona mesometrial se observan mayor cantidad de células binucleadas (Figura A.4).

La zona no decidualizada, en tanto, se distingue por presentar fibroblastos de citoplasma menos acidófilo y núcleo alargado (Figura A.5).

4.1.2 Día 7.5 Gestación Normal

En los cortes transversales de úteros correspondientes a 7.5 dg, la reacción decidual alcanza gran parte del grosor del endometrio hacia el miometrio de forma centrifuga, dejando una pequeña zona no decidualizada escasa y siempre adyacente a la circular del miometrio. Además es posible apreciar la presencia de la nueva luz uterina (Figura A.7). En los distintos sitios de implantación observados encontramos cambios leves en el desarrollo embrionario. Como principal diferencia significativa se señala la aparición de una estructura embrionaria correspondiente al pliegue amniótico y a la cavidad exocelómica, lo cual corresponde a una etapa posterior en el desarrollo embrionario TS 10, siendo aquí descrito el embrión en TS 9 (Figura D.3).

En la decidua antimesometrial, gran parte del espesor del endometrio está constituido por decidua madura. Cercano al sitio de implantación del embrión, se aprecian múltiples cuerpos apoptóticos.

Por fuera de la membrana de Reichert, que rodea completamente al embrión (excepto en la zona del cono ectoplacentario), se observa una región con material sanguíneo que incluye linfocitos y neutrófilos (Figura A.8), la laguna se continua en la decidua con múltiples células gigantes del trofoblasto.

También es posible diferenciar zonas extraembrionarias y embrionarias. En la primera, se aprecia un engrosamiento de la capa ectodérmica y de la endodérmica, siendo un posible indicio del inicio del pliegue amniótico. No se aprecia claramente la línea primitiva entre las células ectodérmicas en formación pero es posible observar el cono ectoplacentario y restos del trofoblasto polar., en cambio, se observa ectodermo en la capa

interna de la pared y una capa única de endodermo embrionario rodeándolo. Las células que antes conformaban el epiblasto (ahora ectodermo) se observan ahora más cúbicas y algo menos basófilas. También aparecen claramente las cavidades proamnióticas extraembrionarias y embrionarias, y es posible observar mayor cantidad de células ectodérmicas y endodérmicas en gastrulación (Figura A.12).

Entre las regiones extraembrionaria y embrionaria del ectodermo, se aprecia mesodermo.

En la decidua mesometrial se distingue decidua madura, predecidua y zona no decidualizada.

La decidua madura presenta células con un leve aumento en el número de núcleos (multinucleaciones frecuentes) y en el número de nucleolos. Se observan además, células gigantes del trofoblasto y lagunas de sangre materna, que en su interior presentan múltiples células de estirpe leucocitario (Figura A.9).

Por otro lado, la predecidua presenta células predeciduales características y múltiples lagunas pequeñas de sangre (Figura A.10).

En esta edad de gestación, la zona no decidualizada es escasa.

4.1.3 Día 8.5 Gestación Normal

La reacción decidual en esta etapa de la gestación, alcanza gran parte del grosor del endometrio hacia miometrio de forma centrifuga, dejando una pequeña zona no decidualizada escasa y siempre adyacente a la circular del miometrio (ver figura A.13). Las observaciones del desarrollo embrionario en este modelo animal, en el correspondiente día de gestación, nos permiten ubicarlo en la etapa TS11 (Figura D.4)

La decidua antimesometrial se observa angosta y presenta células grandes multinucleadas que poseen hasta cinco nucleolos.

La decidua madura, en su parte cercana al embrión, presenta múltiples células gigantes del trofoblasto, células deciduales en degeneración y células leucocitarias. Las células deciduales se presentan grandes y de múltiples núcleos de gran tamaño (Figura A.14).

Las características observadas en la zona de predecidua y en la zona no decidualizada, son similares a las descritas anteriormente, sin embargo, esta última zona se presenta en escasa proporción.

En relación al embrión, se observa un grupo correspondiente a células mesodérmicas que ocupan exclusivamente la cavidad exocelómica. Una delgada línea bilaminar de células, con un núcleo y escaso citoplasma, que protruye hacia las 2 cavidades. Esta capa bilaminar, que compone el amnios y genera así la cavidad amniótica hacia el polo antimesometrial, está compuesta en el polo embrionario por ectodermo y, en el polo contrario, por endodermo.

Desde el plano frontal al embrión es posible dividir a éste en 3 cavidades, las cuales se aprecian en este día de gestación. La superior (es decir, en el polo mesometrial) es denominada cavidad ectoplacentaria y es producto de la formación del corion y lo que posteriormente será la capa coriónica de la placenta. El corion está formado por 2 zonas, la mesodérmica y la endodérmica. La mesodérmica corresponde a células más bien cilíndricas de una disposición pseudoestratificada con núcleo alargado y central el cual desplaza al citoplasma hacia los polos de la misma. La capa endodérmica es prácticamente unicelular con de escaso citoplasma y un núcleo que se exhibe hacia la cavidad exocelómica adyacente (Figura A.14).

Se aprecia el inicio de una nueva estructura de origen mesodérmico, lo que corresponde al alantoides (Figura A.15), estructura que posteriormente se relacionará con la placenta y el cordón umbilical. Sus células se presentan pequeñas, de escaso citoplasma eosinófilo y núcleo regular con un nucleolo. El alantoides se visualiza unido a la pared embrionaria a través de mesodermo, el cual posteriormente formará el saco vitelino (Figura 4.3).

En la decidua mesometrial, se aprecia decidua madura, predecidua y zona no decidualizada.

La decidua madura presenta células deciduales maduras con múltiples lagunas de sangre materna que ahora se hacen tortuosas y sinusoidales, persistiendo el material leucocitario.

La predecidua presenta células predeciduales características y múltiples lagunas de sangre pequeñas (Figura A.14).

En esta edad gestacional, la zona no decidual es escasa.

4.1.4 Día 10.5 Gestación Normal

El corte transversal al embrión, permite apreciar las estructuras primitivas de lo que luego conformarán los diferentes órganos. Además, es posible diferenciar claramente el amnios, el corion y sus cavidades (extraembrionarias), y distinguir la aparición y notoria diferenciación de las distintas capas que componen la placenta (Figura A.19). Las observaciones del desarrollo embrionario en este modelo animal, en el correspondiente día de gestación, nos permiten ubicarlo en la etapa TS 15 (Figura D.5)

En este estadio de la gestación, la zona antimesometrial, evidencia una ausencia completa de decidua madura y predecidua, quedando sólo una escasa capa de zona no decidualizada (fibroblastos endometriales) la cual, posterior al término de la gestación, restaurará el tejido endometrial. Adyacente al corion, hacia el miometrio, se observa una capa de tejido conformado principalmente por células gigantes del trofoblasto las cuales se rodean de material sanguíneo que incluye polimorfos nucleares neutrófilos (Figura A.20).

En la zona mesometrial, se aprecia un estadio temprano en el desarrollo de la placenta, sin embargo, es posible apreciar todas las capas constituyentes de ésta.

La cavidad coriónica se rodea por el corion que está conformado por una capa unicelular de células cúbicas. En la cavidad coriónica, el embrión se encuentra rodeado por el amnios. El corion presenta múltiples agrupaciones celulares que incluyen mesénquima embrionario, el que dará origen a células sanguíneas nucleadas y basófilas (Figura A.25).

En este día del desarrollo se observa luz del tubo neural que formará el cerebro; lo rodean células cilíndricas pseudoestratificadas, de escaso citoplasma y núcleo basófilo con 1 a 3 nucleolos. Adyacentes a éstas, se observan células del mesénquima de la cabeza, de núcleo basófilo con 1 a 3 nucleolos y con prolongaciones citoplasmáticas.

Se observan a cada lado del tubo neural, dos cavidades correspondientes al sistema cardiovascular que se encuentran rodeadas por epitelio cilíndrico pseudoestratificado (Figuras A.26 y A.27).

Se observa además un segmento correspondiente a tubo neural de la espina dorsal, rodeado por células del mesénquima paraxial y a cada lado del tubo se distinguen somitas formados por epitelio cilíndrico pseudoestratificado.

También se distinguen los arcos faríngeos primarios, compuestos por células redondas de relación núcleo/citoplasma 1:2, con núcleo que posee de 1 a 2 nucleolos y citoplasma eosinófilo.

Además, se distinguen lumen visceral, dos cavidades del corazón y células sanguíneas primarias dentro de éste.

En la placenta, se distingue la capa coriónica, laberinto, espongiotrofoblasto y decidua basal hacia miometrio.

Adyacente a la cavidad coriónica, formada principalmente por células fuertemente basófilas con un núcleo grande y múltiples nucleolos, se aprecian células gigantes secundarias, las cuales provienen del trofoectodermo y sinusoides sanguíneos, los que son formados por células del trofoblasto y que luego formarán una barrera entre la sangre materna y el tejido embrionario, el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto (Figuras A.21 y A.22). Como fue mencionado, el corion está formado principalmente por mesodermo extraembrionario.

En dirección mesometrial se continúa la placenta en el laberinto, el cual está formado por células de citoplasma acidófilo y núcleo regular que posee 1 a 2 nucleolos. En estas células de origen ectoplacentario, se aprecian vacuolas probablemente de glucógeno

(Figuras A.23, A.24). Dentro del parénquima se aprecian múltiples sinusoides que forman una red vascular con el objetivo del intercambio de gases y nutrientes.

El espongiotrofoblasto está formado por células del estroma uterino, de relación núcleo/citoplasma 1:1, poseen núcleo levemente basófilo de 1 a 3 nucleolos y están rodeadas por lagunas de sangre materna.

La decidua basal, está compuesta por células morfológicamente parecidas a las predeciduales y no decidualizadas.

4.2 MODELO DE ABORTO ESPONTANEO

4.2.1 Día 6.5 Aborto Espontáneo

4.2.1.1 Útero N° 1

En este día del modelo de aborto espontáneo fueron observados dos distintos estadios del desarrollo.

Se observó en el corte transversal del útero, miometrio, endometrio y sitio de interimplantación. La nueva luz uterina penetra hacia el endometrio conectándose con la laguna de sangre adyacente a la zona abembrionaria, se observa la reacción decidual constituida por ¿decidua madura, predecidua y zona no decidualizada en contacto con el miometrio (Figura B.1).

En la decidua antimesometrial, gran parte del espesor está constituido por decidua madura., con células globosas, núcleos basófilos, muy unidas entre sí y con escasa matriz extracelular (Figura B.3).

En la zona embrionaria se observan cuerpos apoptóticos, células gigantes del trofoblasto y células en degeneración.

La predecidua está formada por células de menor tamaño muy unidas entre sí y con escasa matriz, de relación núcleo citoplasma 1:1, el núcleo se observa excéntrico y menos basófilo presentando de 1 a 2 nucleolos (Figura B.4).

En la zona no decidualizada se observan fibroblastos de características normales (Figura B.5).

En el embrión, se observan células del trofoblasto polar, como ectoplacentario y macizo celular interno rodeado por la membrana de Reichert.

Las células que conforman el macizo celular interno son cúbicas, presentan de 1 a 3 nucleolos y muy escaso citoplasma. Adyacente al embrión se observan células gigantes del trofoblasto mural.

Se distinguen diferencias entre las zonas extraembrionarias y embrionarias, diferenciándose endodermo visceral de endodermo primitivo, conformados ambos por células cúbicas, de nucleolo prominente y núcleos más basófilos que aquellas que conforman el ectodermo. Se distingue la cavidad proamniótica en su región embrionaria y extraembrionaria.

En la decidua mesometrial, la reacción decidual alcanza la mitad del espesor del endometrio, centrifugamente desde el sitio de implantación hacia el miometrio.

La decidua madura está formada por células muy unidas entre sí con escasa matriz extracelular, son grandes, globosas, de citoplasma de aspecto vacío, núcleos irregulares, excéntricos y menos basófilos que aquellas células deciduales antimesometriales.

En la zona abembrionaria se observa una gran laguna de sangre materna que inunda al cono ectoplacentario, a distal presenta cuerpos apoptóticos y células en degeneración.

La predecidua y la región no decidualizada están formada por células de aspecto similar a aquellas de la zona antimesometrial.

4.2.1.2 Útero N° 2

Se observa el corte transversal del útero con miometrio, endometrio y sitio de interimplantación, se observa reacción decidual, decidua madura, predecidua y zona no decidualizada en contacto con el miometrio (Figura B.7, D.1)

En la decidua antimesometrial, gran parte del espesor está constituido por decidua madura.

La decidua madura está formada por células globosas con citoplasma de aspecto vacío, núcleos basófilos, muy unidas entre sí y con escasa matriz.

En la zona embrionaria se observan cuerpos apoptóticos, células gigantes y células en degeneración.

La predecidua, está formada por células de menor tamaño muy unidas entre sí y con escasa matriz extracelular, de relación núcleo citoplasma 1:1, el núcleo se observa excéntrico y menos basófilo presentando de 1 a 2 nucleolos.

En la zona no decidualizada, se observan fibroblastos de características normales pero de citoplasma de aspecto vacío.

En el embrión no se observan células del trofoblasto polar, se observa como ectoplacentario, cavidad proamniótica, epiblasto y endodermo primitivo. Adyacente al embrión se observan células gigantes del trofoblasto mural.

Rodeando al macizo celular interno se aprecia una laguna de sangre con algunas células leucocitarias. Se sospecha retraso en el desarrollo del embrión (Figura B.8 y B.9).

En la decidua mesometrial, la reacción decidual alcanza la mitad del espesor del endometrio, centrífugamente desde el sitio de implantación hacia el miometrio, se observan abundantes lagunas de sangre y en ellas infiltrado leucocitario.

La decidua madura, está formada por células muy unidas entre sí con escasa matriz extracelular, grandes, globosas, de citoplasma de aspecto vacío, núcleos irregulares, excéntricos y menos basófilos que aquellas células deciduales antimesometriales, entre las células deciduales se observan algunas en degeneración.

La predecidua y zona no decidualizada, está formada por células de aspecto similar a aquellas de la zona antimesometrial.

4.2.2 Día 7.5 Aborto Espontáneo

Se observó un corte transversal del útero, con miometrio, endometrio y sitio de interimplantación, se observa reacción decidual, decidua madura, predecidua y zona no decidualizada hacia el miometrio (Figura B.10).

En la decidua antimesometrial,, la reacción decidual alcanza la mitad del espesor del endometrio.

La decidua madura, está formada por células unidas entre sí con escasa matriz extracelular, son células grandes, globosas, de relación núcleo citoplasma 1:1, núcleo basófilo, en ocasiones binucleadas, de 1 a 3 nucleolos prominentes, se observan además lagunas de sangre con infiltrado leucocitario (Figura B.11). Adyacente al sitio de implantación se aprecian cuerpos apoptóticos de núcleos celulares condensados, altamente basófilos, y células deciduales en degeneración.

La predecidua está formada por células de menor tamaño, de relación núcleo citoplasma 1:1, se aprecia mayor cantidad de binucleaciones, de 2 a 4 nucleolos, las células se encuentran estrechamente unidas entre sí rodeadas por escasa matriz extracelular (Figura B.12). La predecidua constituye una zona transitoria entre decidua madura y zona no decidualizada.

En la zona no decidualizada se observan fibroblastos de citoplasma menos acidofilo y núcleo alargado(Figura B.13).

En la zona previa a la aparición del embrión se observan células del trofoblasto mural, rodeándolas se aprecian lagunas de sangre, cuerpos apoptóticos y células deciduales en degeneración.

Se observan células del trofoblasto polar en gran cantidad invadiendo hacia mesometrio, aún se observan lagunas de sangre, infiltrado leucocitario y cuerpos apoptóticos. Se identifica la membrana de Reichert (Figura B.14).

Se distinguen claramente las estructuras embrionarias y extraembrionarias.

Estructuras extraembrionarias: Se distinguen con claridad células pertenecientes al endodermo visceral, son células cúbicas, de núcleo basófilo que posee 1 a 2 nucleolos, la capa endodérmica rodea a las células del ectodermo extraembrionario que se encuentran en mitosis.

Estructuras embrionarias: Se distingue endodermo parietal rodeando a las células del ectodermo, las que dan a la cavidad proamniótica. Se observa un inicio en la gastrulación, distinguiéndose las primeras células mesodérmicas.

En la decidua mesometrial la reacción decidual ocupa la mayor parte del espesor del endometrio, centrífugamente desde el sitio de implantación hacia el miometrio. Se observan lagunas de sangre materna, ocupando el 50% de la región mesometrial.

En la decidua madura se observan células grandes, globosas, de relación núcleo citoplasma 1:1, núcleo basófilo, en ocasiones binucleadas, de 1 a 2 nucleolos prominentes, muy unidas entre sí con escasa matriz extracelular.

Entre las células deciduales se observan lagunas de sangre con infiltrado leucocitario, cuerpos apoptóticos y células en degeneración. En la zona abembrionaria se observan cuerpos apoptóticos de células deciduales entre lagunas de sangre. Adyacente a las células del trofoblasto se observa una gran laguna de sangre materna.

En la predecidua se observan células similares a aquellas de la zona antimesometrial, presentando mayor cantidad de binucleaciones.

En la zona no decidualizada se observan fibroblastos, de citoplasma menos acidófilo y núcleo alargado.

4.2.3 Día 8.5 Aborto Espontáneo

4.2.3.1 Útero N° 1

En éste día del desarrollo embrionario fueron observados úteros que poseían embriones siguiendo un desarrollo normal y un útero en especial con signos de reabsorción embrionaria.

Se observó un corte transversal de útero, con miometrio y un endometrio ocupado por lagunas. Se distinguen decidua madura, predecidua y zona no decidualizada (Figura B.16).

Como principal diferencia observada en los distintos embriones en el día 8.5 de gestación cabe destacar que en uno de ellos no se observó desarrollo del alantoides.

En decidua antimesometrial, la reacción decidual ocupa la mayor parte de esta zona.

En la zona abembrionaria se observan elementos de origen leucocitario, principalmente neutrófilos y linfocitos entre las células deciduales.

La decidua madura, está formada por células grandes, globosas, de relación núcleo citoplasma 1:1, núcleo basófilo, en ocasiones binucleadas, se distinguen trinucleaciones, de 1 a 3 nucleolos, muy unidas entre sí, con escasa matriz extracelular.

La predecidua es escasa, formada por células de menor tamaño, de relación núcleo citoplasma 1:1, de 1 a 2 nucleolos, estrechamente unidas con escasa matriz. (Figura B.19)

La zona no decidualizada, es también escasa, formada por fibroblastos normales, se observan algunas glándulas. (Figura B.20)

En el embrión, se distinguen células del trofoblasto polar y mural con prolongaciones citoplasmáticas de tamaño aumentado, en la parte abembrionaria, rodeando al embrión y entre pequeñas lagunas de sangre. Rodeando al embrión se observa infiltrado leucocitario, se distinguen algunas células redondas con material picnótico fuertemente

basófilo en su citoplasma. En la zona abembrionaria se observa un aumento en la cantidad de neutrófilos. Se distingue también membrana de Reichert rodeándolo (Figura B.17).

Se diferencian claramente las zonas extraembrionaria y embrionaria.

Zona extraembrionaria: Se distinguen células de endodermo visceral rodeando a aquellas del ectodermo, se observan cúbicas con características normales. En este momento la antigua cavidad proamniótica se ha diferenciado en tres cavidades. Células de ectodermo y mesodermo embrionario que forman el corion, separan la cavidad ectoplacentaria de la cavidad exocelómica.

Zona embrionaria: Se distinguen del exterior a interior células del endodermo, mesodermo y ectodermo. Dos capas celulares, una correspondiente a mesodermo y otra a ectodermo, que forman el amnios, separa la cavidad amniótica de la exocelómica.

En aquellos embriones que se distinguía alantoides, éste estaba formado por células ciliadas pseudo estratificadas, en su interior células de escaso citoplasma y escasa matriz extracelular, de núcleo central y nucleolo prominente, presentando algunas binucleaciones.

La decidua mesometrial se observa formada en su totalidad por lagunas con escasa sangre.

En la decidua madura las células deciduales se encuentran entre sinusoides que ocupan toda la región mesometrial acercándose éstos a la zona más próxima del embrión. Se observa aumento del infiltrado inflamatorio, en gran parte de la zona mesometrial, se observa una gran laguna de sangre con infiltrado principalmente compuesto por linfocitos y neutrofilos. (Figura B.18)

En la predecidua, las células son de aspecto similar a aquellas de la zona antimesometrial.

En la zona no decidualizada las células son de aspecto similar a aquellas de la zona antimesometrial.

4.2.1.1 Útero N° 2

Corte transversal de útero, se distingue miometrio y endometrio. Se distinguen decidua madura, predecidua y zona no decidualizada.

En la decidua antimesometrial, la reacción decidual ocupa la mayor parte de esta zona, además próxima al sitio de implantación en la región antimesometrial se observa una laguna de sangre.

La decidua madura, está formada por células grandes, globosas, de relación núcleo citoplasma 1:1, núcleo basófilo, en ocasiones binucleadas, se distinguen trinucleaciones, de 1 a 3 nucleolos, muy unidas entre sí, con escasa matriz extracelular.

La predecidua es escasa, formada por células de menor tamaño, de relación núcleo citoplasma 1:1, de 1 a 2 nucleolos, estrechamente unidas con escasa matriz.

La zona no decidualizada es también escasa, formada por fibroblastos normales, se observan algunas glándulas.

En la zona del embrión, la laguna de sangre ha aumentado de tamaño y en su interior se distinguen dos capas de origen embrionario, formadas por células cúbicas de núcleo levemente basófilo con gránulos de material fuertemente basófilo en su interior.

Adyacente a ambas capas celulares, se distingue una laguna delimitada por una membrana acelular y altamente acidófila, probablemente la membrana de Reichert, en su interior se distinguen linfocitos, cuerpos apoptóticos y neutrofilos. Rodeado la laguna de sangre se distinguen algunas células de gran tamaño multinucleadas.

Se observa un acumulo de células pequeñas redondas de escaso citoplasma y nucleolo prominente.

Se distinguen alrededor células gigantes del trofoblasto, un contenido hemático con neutrofilos, también se observan cuerpos apoptóticos.

4.2.4 Día 10.5 Aborto Espontáneo

4.2.4.1 Útero N° 1

En la zona antimesometrial, de exterior a interior se identifica miometrio compuesto por las capas longitudinal externa y circular interna, luego se distingue un epitelio cilíndrico que recubre la nueva luz, más cercano a la cavidad coriónica se visualiza la zona no decidualizada.

En el embrión, se distingue una gran cavidad coriónica rodeada por el corion, el cual está conformado por una capa unicelular de células cúbicas, algunas en su interior poseen las primeras células sanguíneas embrionarias nucleadas. En la cavidad coriónica se encuentra el embrión rodeado por el amnios (Figura B.25).

Se distingue luz del tubo neural rodeado por células propias de éste que formarán el cerebro, son células cilíndricas pseudoestratificadas, estrechamente unidas, de escaso citoplasma y núcleo basófilo que posee 1 a 3 nucleolos, además se distinguen células que conforman el mesénquima de la cabeza, de núcleo basófilo que posee 1 a 3 nucleolos, unidas entre sí por abundantes prolongaciones de su citoplasma. Además se distinguen entre ellas algunos vasos sanguíneos

Se observan dos cavidades correspondientes a la vesícula óptica, una a cada lado del tubo neural, ambas rodeadas por epitelio cilíndrico pseudoestratificado.

Se distinguen bajo estas cavidades células correspondientes a los arcos faríngeos, células redondas que poseen de 1 a 2 nucleolos, de citoplasma más acidófilo que aquellas que las rodean correspondientes al mesénquima de la cabeza.

También se distinguen los arcos faríngeos, compuestos por células redondas de relación núcleo citoplasma 1:2, núcleo que posee de 1 a 2 nucleolos y citoplasma eosinófilo.

Se observa además un segmento correspondiente a tubo neural de la espina dorsal, rodeado por células del mesenquima paraxial y a cada lado del tubo se distinguen somitas formados por epitelio cilíndrico pseudoestratificado

Se distinguen además en este día del desarrollo del embrión; lumen visceral, dos cavidades del corazón y células sanguíneas primarias dentro de éste.

Con relación a la placenta, se distinguen capa coriónica, laberinto, espongiotrofoblasto y decidua basal hacia miometrio.

Capa coriónica: Formada principalmente por células fuertemente basofílicas de gran núcleo y múltiples nucleolos, se observan además células gigantes secundarias, las que provienen de trofoectodermo y sinusoides sanguíneos, que son formados por células del trofoblasto y que luego formaran una barrera entre la sangre materna y el tejido embrionario; el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto. El corion esta formado principalmente por mesodermo extraembrionario.

El laberinto, se observa formado por células de citoplasma acidófilo y núcleo regular que poseen 1 a 2 nucleolos, en estas células se aprecian vacuolas, de glicógeno probablemente y son células de origen ectoplacentario. Múltiples sinusoides se aprecian en el parénquima formando una red vascular con el objetivo del intercambio de gases y nutrientes (Figura B.26).

El espongiotrofoblasto, se encuentra formado por células del estroma uterino, de relación núcleo citoplasma 1:1, núcleo levemente basófilo de 1 a 3 nucleolos, rodeadas por lagunas de sangre materna.

La decidua basal, está compuesta por células morfológicamente parecidas a las predeciduales y no decidualizadas.

4.2.4.2 Útero N° 2

En la zona antimesometrial, de exterior a interior se identifican capas musculares de miometrio, zona no decidualizada, algunas células predeciduales y un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, a continuación se observan células gigantes del trofoblasto de núcleo hipercromático con material picnótico altamente basófilo en su interior, de abundante citoplasma y prolongaciones citoplasmáticas. Entre estas células y el epitelio se observan lagunas sanguíneas con infiltrado inflamatorio, principalmente linfocitos y neutrófilos.

En el embrión, se distinguen estructuras embrionarias y un pseudogranuloma, ambos rodeados por el amnios no muy bien delimitado y este a su vez por el corion.

El corion se distingue como una capa unicelular cúbica que posee células embrionarias sanguíneas primarias adyacentes a éstas.

El amnios se observa como una membrana mas bien continua rodeando las estructuras embrionarias y el granuloma (Figura B.27).

Estructuras embrionarias:

Se distinguen con facilidad estructuras correspondientes al tubo neural, en algunas zonas se diferencia un epitelio cilíndrico pseudoestratificado y en otras zonas se distinguen células de escaso citoplasma muy unidas entre sí que poseen de 1 a 3 nucleolos (Figura B.28).

Se distinguen también cercanas al tubo neural células mesenquimáticas. Se distingue una estructura similar al arco faríngeo y algunas células probablemente correspondiente a músculo cardíaco en desarrollo con células sanguíneas embrionarias primarias nucleadas en su interior.

Entre ambos tubos neurales se distingue una estructura que ocupa aproximadamente un cuarto del espacio de la cavidad corionica, compuesta principalmente por células gigantes del trofoblasto entre lagunas sanguíneas que se encuentran rodeando un acumulo de células correspondientes a un infiltrado inflamatorio, principalmente neutrófilos, basófilos, monocitos y cuerpos apoptóticos (ver figura B.29), además se distinguen células

pequeñas redondas de escaso citoplasma, estrechamente unidas y tejido conectivo compuesto por fibroblastos (Figura B.30).

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Descripciones morfológicas asociadas a trastornos de absorción embrionaria sólo han sido determinadas a partir del día 13.5 de la gestación (Blois et al, 2005), no siendo encontrados estudios que permitan describir alteraciones de la interfase materno-fetal en etapas tempranas. Nuestros resultados han identificado alteraciones que pueden corresponder a signos morfológicos predictores de absorción embrionaria en este modelo animal.

La falta de tolerancia inmunológica y el rechazo subsecuente del feto son complicaciones que pueden desencadenar un aborto, patología que afecta en un 15% a 40% de los embarazos en humanos.

Según la revisión de la literatura, visualmente aquellos embriones abortivos no son diferentes de aquellos normales, en apariencia y tamaño, durante etapas tempranas de la gestación (Blois et al, 2005), sin embargo en nuestro análisis fueron encontradas ciertas alteraciones en el embrión, asociadas a un retraso en el crecimiento, detección de la falta del desarrollo de ciertas estructuras como el alantoides y una intensa infiltración de células inmunocompetentes. Se ha descrito que embriones en proceso de absorción pueden ser observados ya en el día 8 de gestación y claramente identificados en el día 9 (Zheng et al, 1993), lo cual apoya nuestros resultados obtenidos en el día 8.5 de gestación, identificándose estructuras embrionarias, que no corresponden morfológicamente a un embrión normal, inmersas en una laguna de sangre y rodeadas por linfocitos, cuerpos apoptóticos y neutrófilos.

Como se ha descrito, una implantación exitosa del blastocito, además de un temprano desarrollo placentario son el resultado de un complejo mecanismo regulatorio, el cual debe integrar la fisiología materna y fetal, garantizando la nutrición del feto.

La interacción entre moléculas de adhesión del tipo ICAM-1 expresada en el epitelio uterino y endotelio, células presentadoras de antígeno y su ligando un tipo específico de integrina (LFA-1) en la interfase materno-fetal, pueden estar involucrados en la absorción embrionaria. La interacción entre ICAM-1 y LFA-1 incrementa la migración de células proinflamatorias al sitio de implantación, promoviendo una maduración de células dendríticas en la decidua (Blois et al, 2005). Esta información concuerda con los

resultados obtenidos en la presente investigación y expuestos en las imágenes B.24 y B.29, en las que se hace especial énfasis a la gran cantidad de células inmunocompetentes que han migrado a la región embrionaria.

Otra causa de una migración abundante de células de estirpe leucocitario es el stress, el cual interfiere en la reproducción de forma negativa, alterando el sistema inmune, la implantación y el crecimiento fetal.

Mastocitos y macrófagos son células que producen entre otros el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), un factor proinflamatorio que esta aumentado en condiciones de stress, y por lo tanto relacionado con la absorción embrionaria (Arck et al, 1995). Es importante destacar que también en otros estudios, se ha demostrado la participación de macrófagos y sus productos citolíticos, tales como el oxido nítrico y el $TNF\alpha$ en la etiología de la perdida embrionaria temprana (Duclos et al. 1996).

Como anteriormente mencionamos, iniciamos nuestro proyecto esperando encontrar indicaciones morfológicas en el modelo de aborto espontáneo que caracterizaran el desarrollo de una involución temprana del embrión, así como retrasos en el desarrollo de las estructuras embrionarias o de soporte, tales como, pliegue amniótico, alantoides, placenta, etc. La revisión bibliográfica realizada, nos indicaba que a partir del día 13.5 de gestación era posible evaluar microscópicamente rasgos propios de reabsorción embrionaria (Blois et al, 2005), sin embargo, no existen estudios morfológicos previos realizados en los días 6.5 a 10.5 dg que permitan distinguir cambios iniciales en útero o embrión.

La infiltración de macrófagos y su activación celular se ha identificado por el incremento de la expresión de protooncogenes y la producción de productos citotóxicos, relacionados a la perdida embrionaria temprana (Duclos et al, 1996), sin embargo no es extraño encontrar este tipo celular en la gestación normal, aunque en menor cantidad.

En modelos animales con pérdida embrionaria temprana, células NK (un tipo especial de linfocitos), macrófagos y posiblemente linfocitos T son atraídos a la interfase materno-fetal, mientras que durante una gestación normal, pocos de estos linfocitos son encontrados en estos sitios. Es relevante mencionar que tanto en el modelo de gestación normal como en los casos de aborto espontáneo con gestaciones normales,, la ubicación topográfica de las células leucocitarias se encontraban en la zona de lagunas sanguíneas y adyacentes a la decidua madura, y no dentro de la membrana de Reichert.

En los casos de los úteros con signo de absorción embrionaria del modelo de aborto espontáneo, el infiltrado inflamatorio fue observado principalmente dentro de la cavidad coriónica, en contacto directo con los tejidos embrionarios.

Células del tipo NK son observadas en el sitio de implantación en etapas tempranas de la gestación en modelos animales de aborto (Gendron et al , 1988), lo cual confirma nuestros hallazgos al observar el infiltrado inflamatorio en los casos de abortos espontáneos en especial en el período de 10.5 días.

Existen células linfocitarias conocidas como granulocitos de la glándula metrial (GMG), que pueden provenir de la misma línea que las células NK (implicadas en aborto espontáneo) y se encuentran en cantidades abundantes en el útero de roedores durante la gestación. Estas células se localizan de preferencia en la interfase materno-fetal y expresan proteínas proteolíticas (Zheng et al, 1993). Recientemente una población de células positivas para la marcación con asialo-GM1 (marcación positiva para las células GMG) en el modelo de aborto espontáneo, ha sido encontrada (Croy et al, 1985).

El aumento de citoquinas ha sido considerado como un importante mecanismo en la determinación de la sobrevivencia del feto en el útero materno, ya que han sido involucradas en el desarrollo embrionario, implantación, crecimiento y diferenciación del trofoblasto (Clark et al, 1999).

En mamíferos ha sido ampliamente demostrada la producción de citoquinas por las células deciduales, tales como la IL-4, IL-10 y TGF- β los que favorecen la mantención de la gestación (Clark et al, 1999).

La cruce de las cepas CBA/J x DBA/2J ha sido asociada a un aumento en los niveles de citoquinas a nivel local y en la periferia del embrión. En humanos la interleuquina-6 (IL-6), producida por monocitos y expresada por células gigantes del trofoblasto, ha sido reportada elevada en condiciones de aborto espontáneo y su presencia ha sido relacionada con el modelo de aborto (Zenclussen et al, 2003).

La ausencia de algunas estructuras en días tempranos de la gestación nos lleva a cuestionarnos si estos embriones habrían sido absorbidos posteriormente, de haber seguido su gestación natural. La complementariedad con otras técnicas morfológicas como inmunohistoquímica o microscopia electronica pueden ofrecernos mayores informaciones respecto a los fenómenos estudiados, sin embargo, las observaciones realizadas con la técnica de Hematoxilina-Eosina, nos permiten identificar aspectos del desarrollo embrionario que pueden ser de gran valor para extrapolar los resultados obtenidos a la condición humana.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

1.- Se visualizaron algunas diferencias en los días 6.5 y 7.5 dg del modelo de aborto espontáneo, que sugieren ser signos de algún tipo de retraso en el desarrollo embrionario.

2.- En concordancia con la literatura, nuestro estudio identificó aspectos morfológicos relacionados con la absorción embrionaria en estadios tempranos de la gestación, siendo observados claramente en los días 8.5 dg y 10.5 dg.

3.- Podrían ser definidos como signos de absorción embrionaria, la discontinuidad de la Membrana de Reichert, la presencia de infiltrado inflamatorio en su interior acompañado de material necrótico embrionario y materno, además de la visualización de estructuras embrionarias que no corresponden a la morfología normal.

4.- En los úteros de aborto espontáneo fue encontrado un abundante infiltrado de células inmunocompetentes, las cuales son concordantes a lo descrito en la literatura.

5.- No se observaron diferencias morfológicas de importancia en la decidua, ni en la placenta temprana entre los modelos animales estudiados.

Este seminario constituye el primer estudio morfológico en un modelo de aborto espontáneo en etapas tempranas de la gestación, lo cual significa un aporte a los conocimientos obtenidos hasta el momento en relación a este modelo animal.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA.

ABRAHAMSOHN PA, ZORN TMT (1993) *Implantation and decidualization in rodents*. The journal of experimental zoology. Biol. Reprod 266:603-628.

ANDERSON TL, OLSON GE, HOFFMAN LH (1986) *Stage specific alterations in the apical membrane glycoproteins of endometrial epithelial cells related to implantation in rabbits*. Biol. Reprod.34:701-720

ANDERSON TL, SIMON JA, 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.) H.-W. Denker and J.D. Aplin, eds. Plenum Medical Book Comp., New York, pp. 273-284

ARCK P, MERALI F, STANISZ A (1995) *Stress-Induced Murine Abortion Associated with Substance P-Dependent Alteration in Cytokines in Maternal Uterine Decidua*. BIOLOGY OF REPRODUCTION **53**, 814-819.

BEER AE (1986) *New horizons in the diagnosis, evaluation and therapy of recurrent spontaneous abortion*. Clin Obstet Gynaecol. Mar; 13(1):115-24

BENIRSCHKE K. (2005) *comparative placentation*. htm: <http://medicine.ucsd.edu/cpa/homeefs.html>

BLOIS S, TOMETTEN M, KANDIL J (2005) *Intercellular Adhesion Molecule-1/LFA-1 Cross Talk Is a Proximate Mediator Capable of Disrupting Immune Integration and Tolerance Mechanism at the Feto Maternal Interface in Murine Pregnancies*. The Journal of Immunology pp 1820-1829

BOVING BG (1971) *Biomechanics of implantation In: The biology of the Blastocyst*. R.J Blandau, ed. The University of Chicago Press, Chicago, pp 423-442

BORLAND RM, TASCIA RJ (1974) *Activation of a Na positive dependent amino acid transport system in preimplantation mouse embryos*. Dev. Biol., 36: 169-182.

BOUE J, BESSIS R (1990) *Morphological aspects of lethal chromosome errors* Reprod Nutr Dev.; Suppl 1:89s-94s. French

BRENT RL, GORDON WE, BENNETT WR, BECKMAN DA (1993) *Reproductive and teratologic effects of electromagnetic fields*. Reprod Toxicol. Nov-Dec;7(6):535-80.

BROSENS I, ROBERTSON W B, DIXSON HG (1967). *The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy*. J path bact, 93: 569-579.

BROWDER L, ERICKSON C, JEFFERY W (1991) *Developmental biology*, 3rd edn. Saunders College Publishing, Chicago pp 328-393

CHRISTOFFERSON RH, NILSSON BO (1988) *Morphology of the endometrial microvasculature during early placentation in the rat*. Cell Tissue Res., 253: 209-220

CLARK DA, MCDERMOTT MR, SZEWCZUK MR (1980). *Impairment of host-versus-graft reaction in pregnant mice. III. Selective suppression of cytotoxic T-cell generation correlates with soluble suppressor activity and with successful allogeneic pregnancy*. Cell Immunol ; 52:106-118.

CLARK, D. A., P. C. ARCK, AND G. CHAOUAT. (1999). *Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level.* Am. J. Reprod. Immunol. 41:5.

CONTI C (2001) *Revisión anatómica y funcional del aparato reproductor del ratón.* En: Serie Ponencias. Manual de Técnicas básicas de criopreservación de gametos y embriones de ratón. Ed. Ciemat. Avda. Complutense, 22.Madrid.

CROY BA, GAMBEL P, ROSSANTJ, WEGMANN TG (1985). *Characterization of murine decidual natural killer (NK) cells and their relevance to the success of pregnancy.* Cell Immunol; 93:315-326.
11. Gendron RL, Baines MG. Infiltrating

DAMSKY C, SUTHERLAND A, FISHER S (1993) *Extracellular matrix 5: Adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation.* The FASEB J. 7: 1320-1329.

DENKER HW (1993) *Implantation: A cell Biological Paradox.* The journal of experimental zoology, 266:541-558

DUCIBELLA T, DF ALBERTINI, ANDERSON E, BIGGERS JD (1975) *The preimplantation mammalian embryo: Characterization of intercellular junctions and their appearance during development.* Dev. Biol. 45. 231-250.

DUCLOS A, HADDAD E, CHALIFOUR L (1996) *Embryo Infiltration by Maternal Macrophages Is Associated with Selective Expression of Proto-Oncogenes in a Murine Model of Spontaneous Abortion.* Biology of Reproduction 54, 1088-1095.

ENDERS AC , SCHLAFKE S (1967) *A morphological analysis of the early implantation stages in the rat.* Am. J.Anat. 12: 185-226.

ENDERS AC (1972) *Mechanisms of implantation of the blastocyst.* In: Biology of Reproduction. Basic and Clinical studies III. J.T. Velardo & B.A. Karprow, eds. Pan American Congress of Anatomy, New Orleans, pp 313-334.

ENDERS AC, SCHLAFKE S (1977) *Alteration in uterine luminal surface at the implantation site.* J. Cell Biol., 75:70a.

ERICKSON C (1990) *Cell migration in the embryo and adult organism.* Cell biol 2:67-74

FINN CA, MARTIN L (1970) *The onset of progesterone secretion during pregnancy in the mouse.* J. Reprod. Fertil., 25: 299-300.

FINN CA (1977) *The implantation reaction.* In: biology of the uterus.R.M. wynn, ed. Plenum Press, New York, pp 245-308.

FINN CA, MARTIN L (1972) *Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus.* Biol. Reprod. 7:82-86

FLEMING T P (1992) *Trophectoderm biogenesis in the preimplantation mouse embryo.* In T. P. Fleming, (ed.) Epithelial Organization and Development. Chapman and Hall, London, pp. 111-134.

GENDRON RL, BAINES MG (1988). *Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice.* Cell Immunol ; 113:261-267.

GEORGIADIS P, FERGUSON-SMITH A C, BURTON G.J (2001). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta 3-19 Department of anatomy, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge, CB2 3DY, UK.*

GILBERT S (2006) *Developmental Biology, Eighth Edition*. Published by Sinauer Associates. Htm: <http://8e.devbio.com/>

GLASSER SR , CLARK JH (1975) *A determinant role for progesterone in the development of uterine sensitivity to decidualization and ovo-implantation*. In: *The Developmental Biology of Reproduction*. C.L Markert and J. Papaconstantinou, eds. Academic Press, New York, pp. 311-345

GOMENDIO M, MARTIN-COELLO J, CRESPO C, MAGANA C, ROLDAN ER (2006). *Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa*. Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 10;103(41):15113-7. Epub 2006 Sep 21.

GRECA C, NADER H, DETRICH C, ABRAHAMSOHN P A , ZORN TMT (2000) *Ultrastructural cytochemical characterization of collagen-associated proteoglycans in the endometrium of mice*. Anat Rec 259:413-423, 2000. © 2000 Wiley-Liss, Inc.

HERR JC, HEDIGER PM, SCOTT JR, ANDERSON JW, CURET LB, MOSSMAN HW (1978) *Decidual cells in the human ovary at term. Incidence, gross anatomy, and ultrastructural features of merocrine secretion*. Am . J. Anat., 152: 7-28.

HILLMAN N, SHERMAN H I, GRAHAM C F (1972). *The effects of spatial arrangement of cell determination during mouse development*. J. Embryol. Exp. Morphol. 28: 263–278.

HOMEIER B P (2005) *Miscarriages* htm: http://kidshealth.org/parent/en_espanol/medicos/miscarriage_esp.html

IWAKI T, SANDOVAL-COOPER M, PAIVA M, KOBAYASHI T, PLOPLIS VA, CASTELLINO FJ: (2002) *Fibrinogen stabilizes placental-maternal attachment during embryonic development in the mouse*. Amer. J. Pathol. 160:1021-1034,

KLINE J, STEIN Z, STROBINO B, SUSSER M, WARBURTON D (1977) Surveillance of spontaneous abortions. Power in environmental monitoring. Am J Epidemiol. Nov;106(5):345-50.

KREHBIEL RH (1937) *Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata*. Physiol. Zool., 10: 212-233.

LUNDKVIST O (1978) *Ultrastructural studies of the endometrial stromal cells in rats during estradiol-induced implantation after an experimental delay*. Biol. Reprod., 18:306-316

MAGNUSON T, JACOBSON JB, STACHPOLE CW (1978) *Relationship between intercellular permeability and junction organization in the preimplantation mouse embryo*. Dev. Biol., 67:214-224.

MALASSINE A, FRENDO JL, EVAÏN-BRION D (2003) *A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model*. Hum Reprod Update. Nov-Dec;9(6):531-9

MINTZ B (1970). *Clonal expression in allophenic mice*. Symp. Internat. Soc. Cell Biol. 9: 15.

MOSSMAN HW (1987) *Vertebral fetal membranes*. Rutgers University Press, New Brunswick. 383 pp.

MORRIS JE, POTTER SW (1984) *A comparison of developmental changes in surface charge in mouse blastocysts and uterine epithelium using DEAE beads and dextran sulfate in vitro*. Dev. Biol., 103:190-199.

- MORRIS JE, POTTER SW, GAZA-BULSECO G (1988) *Estradiol-stimulated turnover of heparan sulfate proteoglycan in mouse uterine epithelium*. J.Biol.Chem.,263:4712-4718
- MORRIS JE, POTTER SW (1990) *An in vitro model for studying interactions between mouse trophoblast and uterine epithelial cells. A brief review of in vitro systems and observations on cell-surface changes during blastocyst attachment*. In: Trophoblast Invasion and Endometrial Receptivity. Novel Aspects of the Cell Biology of Embryo Implantation. (Trophoblast Research, Vol4.) H.W. Denker and J.D. Aplin, eds Plenum Medical Book Comp., New York.pp 51-69
- MORTON NE, CHIU D, HOLLAND C, JACOBS PA, PETTAY D (1987) *Chromosome anomalies as predictors of recurrence risk for spontaneous abortion*. Am J Med Genet. Oct;28(2):353-60. Review.
- MUNTENER M, HSU YC, (1977) *Development of trophoblast and placenta of the mouse*. Acta anat 98. 241-252.
- NILSSON O (1966) *Structural differentiation of luminal membrane in rat uterus during normal and experimental implantation*. Z. Anat. Entwickl., 125: 152-159.
- PARR MB, PARR EL (1974) *Uterine luminal epithelium: Protrusions mediate endocytosis not apocrine secretion in the rat*. Biol. Reprod., 11:220-233.
- PARR MB, PARR EL (1989) *The implantation reaction*. In: Biology of the uterus. R.M. Wynn and W.P.Jollie, eds. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 233-277
- PÉREZ SÁNCHEZ A(2003) *Ginecología* 3a. ed Santiago : Mediterráneo.
- PIJNENBORG R, ROBERTSON W H, BROSENS I, DIXON G (1981). *Trofoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy*. Placenta,1, 3-19.
- PIZZARI T (2006) *Of mice and sperm*. Edward Grey Institute of Ornithology, Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, United Kingdom
- PSYCHOYOS A (1973) *Endocrine control of egg implantation*. In: Handbook of Physiology. R.O. Greep E.B Astwood, and S.R Geiger, eds. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 187-215
- PSYCHOYOS A (1986) *Uterine receptivity for nidation*.Ann N Y Acad Sci.;476:36-42.
- PSYCHOYOS A, SARANTIS L, ROCHE D, (1988) *Displacement of receptivity for nidation in the rat by the progesterone antagonist RU 486: a scanning electron microscopy study*.Hum Reprod. Feb;3(2):251-5.
- REINUS S (1967) *Ultrastructure of blastocyst attachment in the mouse*. Cell tissue Res., 152: 525-542.
- ROGERS PAW, MURPHY CR, GANNON BJ (1982) *Changes in the spatial organization of the uterine vasculature during implantation in the rat* J. Reprod Fertil., 65:211-214
- ROSENFELD MG, JOSHI MS (1977) *A possible role of a specific uterine fluid peptidase in implantation in the rat*. J Reprod Fertil. Sep; 51(1):137-9.
- SAN MARTIN S,SOTO-SUAZO M. , ZORN TMT (2003) *Distribution of versican and hyaluronan in the mouse uterus during decidualization*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 36 (8): 1067,.
- SCHLAFKE S , ENDERS AC (1975) *Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation*. Biol. Reprod., 12:41-65.
- SCHLAFKE S, WELSH AO, ENDERS AC (1985) *Penetration of the basal lamina of the uterine luminal epithelium during implantation in the rat*. Anat. Rec., 212:47-56

SHELESNYAK MC, KRAICER PF, ZEILMAKER GH (1963) *Studies on the mechanism of nidation. I. The estrogenic surge of pseudopregnancy and progravity and its role in the process of decidualization*. Acta Endocrinol., 42:225-235.

STEVEN D (1975). *Anatomy of the placental barrier*. In Comparative placentation (ed). London academic press.

TOOLE B (1981) *Glycosaminoglycans in morphogenesis*. In: Hay E (ed) cell biology of extracellular matrix, Plenum press, New York pp 259- 289

TOOLE B, TRELSTAD R (1971) *hyaluronate production and removal during corneal development in the chick*. Dev Biol 26: 28-35

TOOLE B (1991) *proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation*. In: Hay E (ed) cell biology of extracellular matrix, Plenum press, New York pp 259- 289

VALLE & SCIARRA (1988) Intrauterine adhesions: hysteroscopic diagnosis, classification, treatment, and reproductive outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 1988 Jun;158(6 Pt 1):1459-70.

WARD, M (1948) *The early development and implantation of the golden hamster. Cricetus auratus, and the associated endometrial changes*. Am. J. Anat., 82: 231-276.

WELSH AO, ENDERS AC (1985) *Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration*. Am. J. Anat., 172:1-29

WELSH AO , ENDERS AC (1987) *Trofoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of rat*. Anat. Rec., 217:203-219.

ZIOMEK C A , JOHNSON M H (1980). *Cell surface interactions induce polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction*. Cell 21: 935-942. (USA).

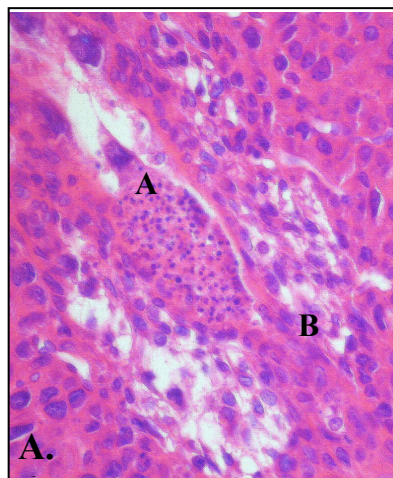
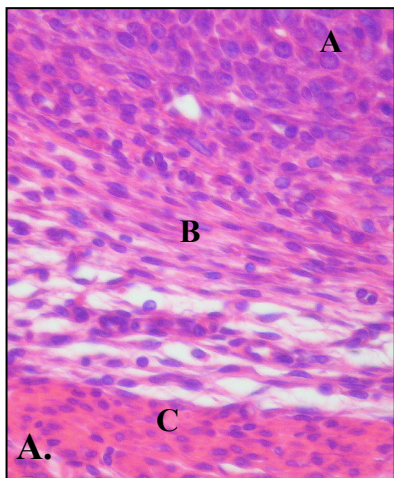
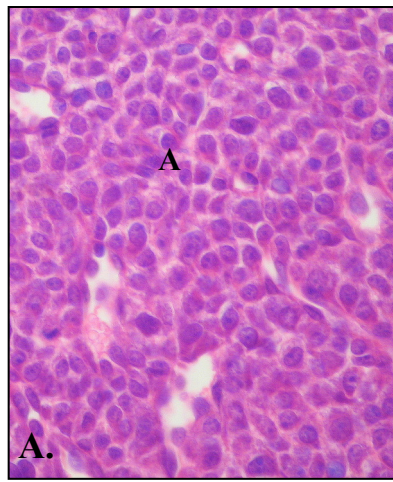
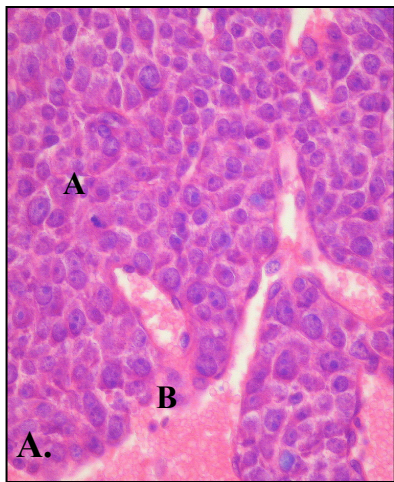
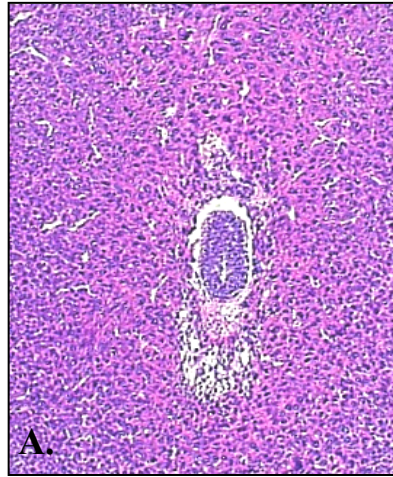
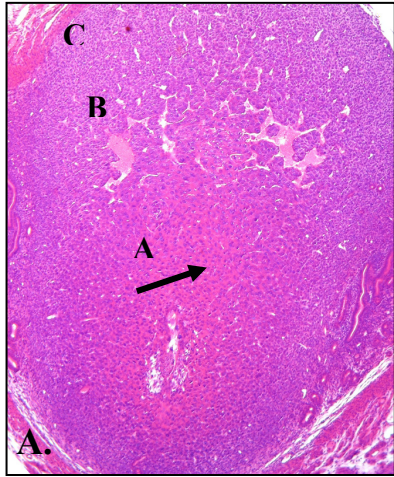
ZENCLUSSENA A, BLOIS S , STUMPO R (2003) *Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface*. Cytokine 24: 150-160.

ZHENG LI MOU, OJCIUS DAVID M, JOHN DING-E YOUNG (1993). *Perforin-Expressing Cells during Spontaneous Abortion*. The Rockefeller University, 3 New York, New York 10021
Institut Pasteur, 4 INSERM U.277, 75724 Paris Cedex 15, France.

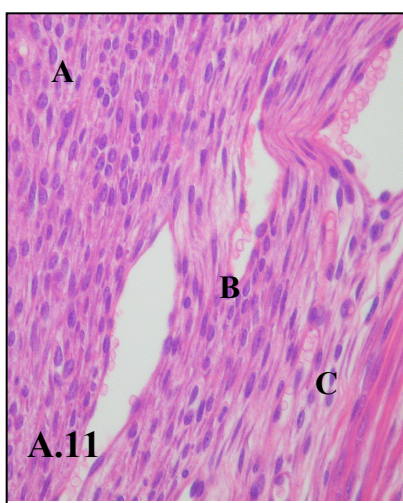
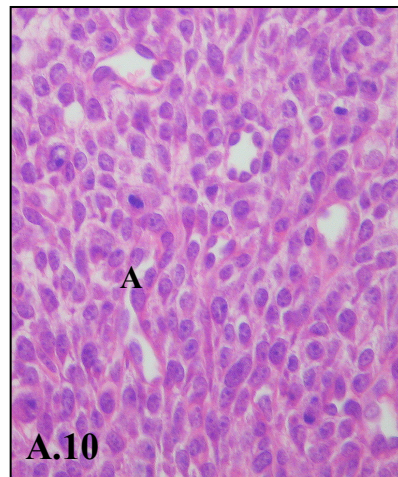
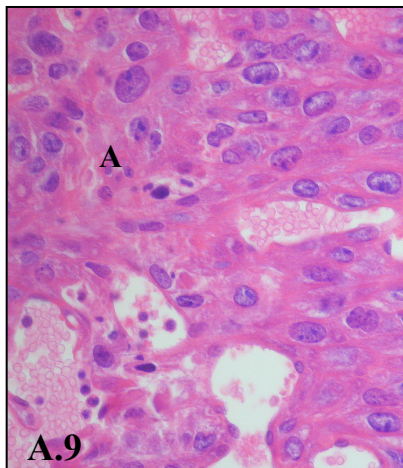
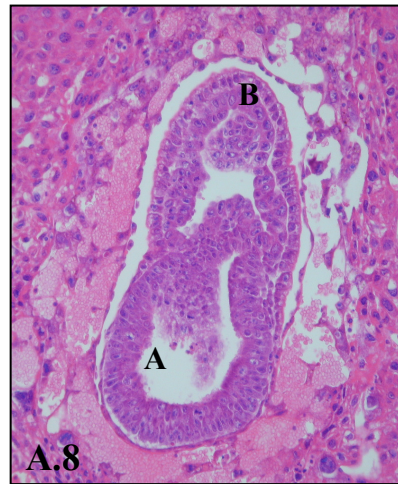
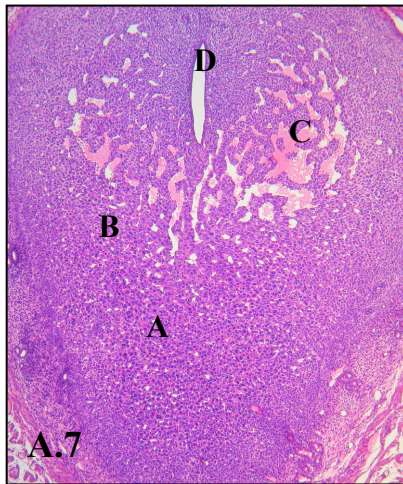
ANEXO A

A. Gestación normal

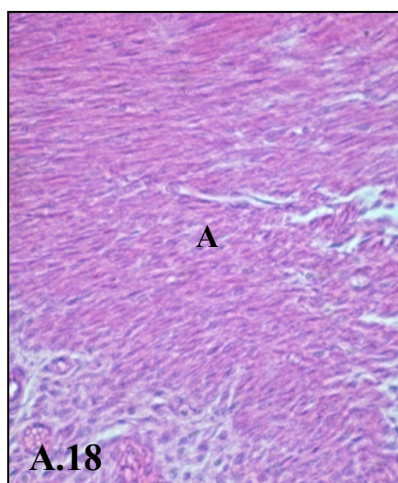
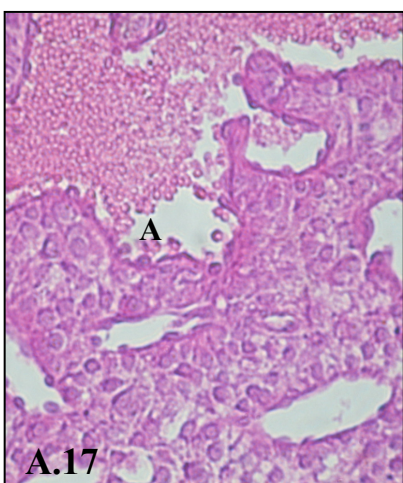
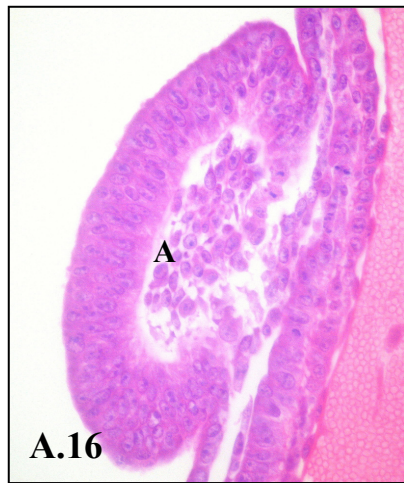
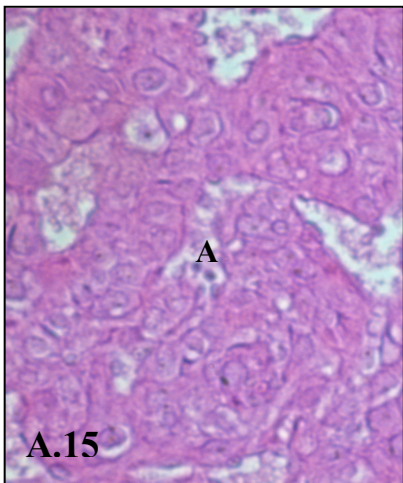
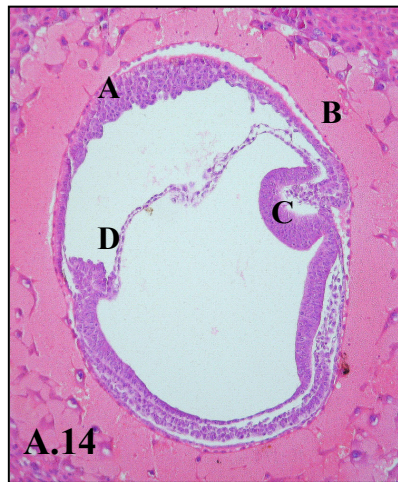
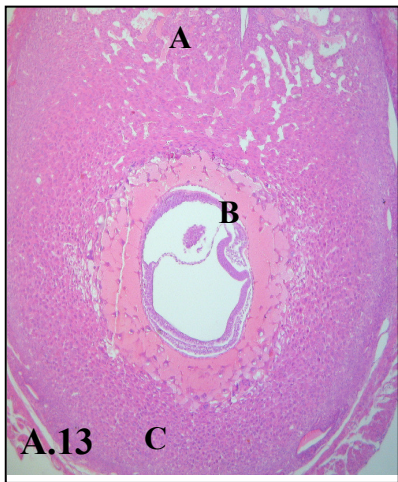
6.5 DOP Gestación normal



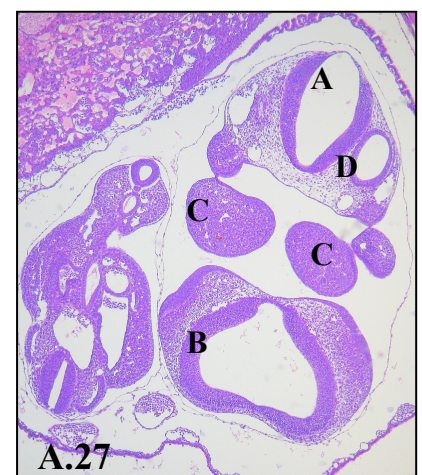
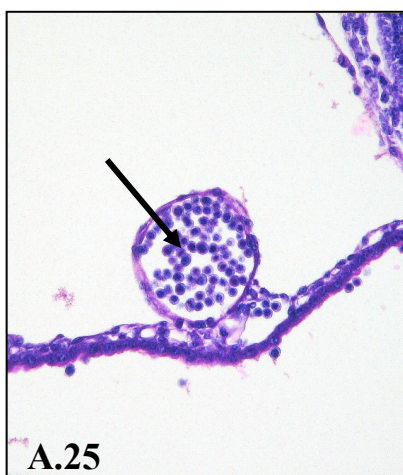
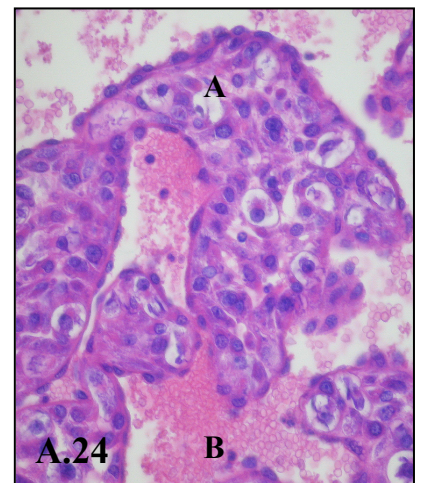
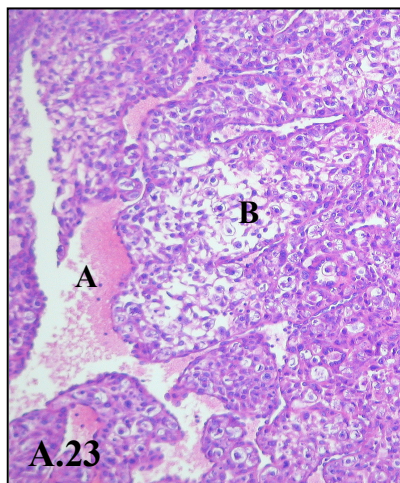
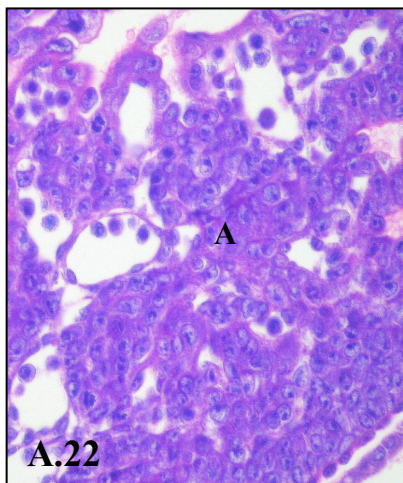
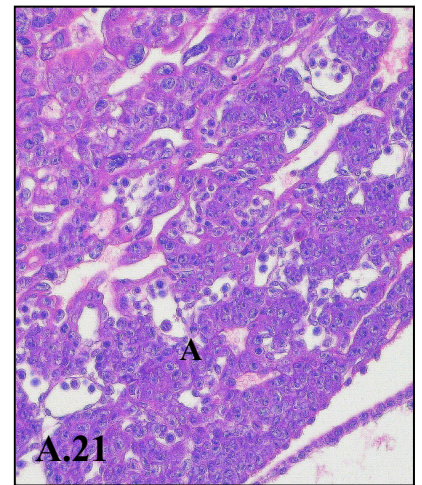
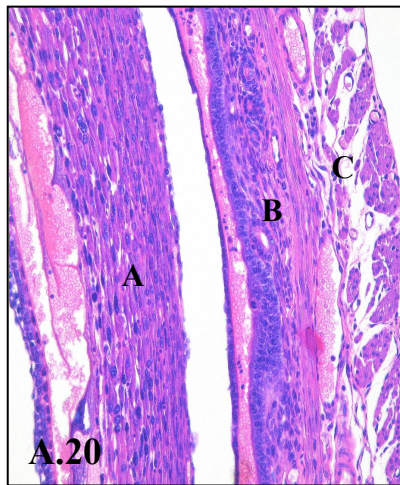
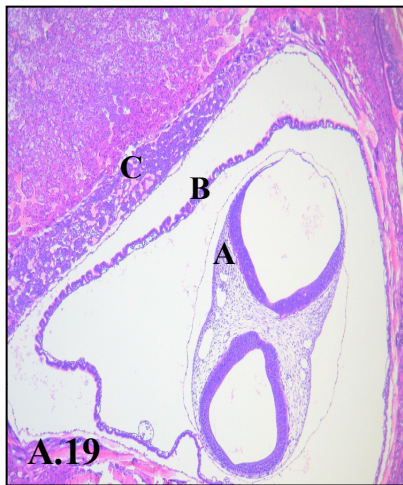
7.5 DOP Gestación normal



8.5 DOP Gestación normal

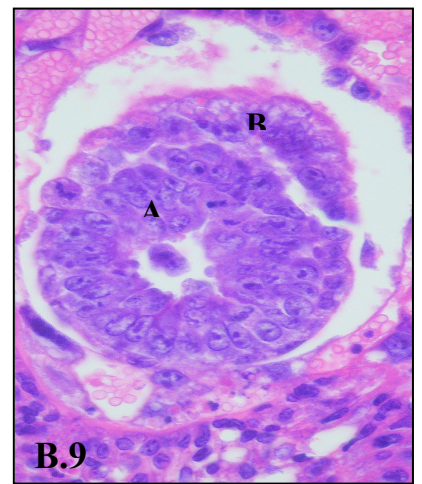
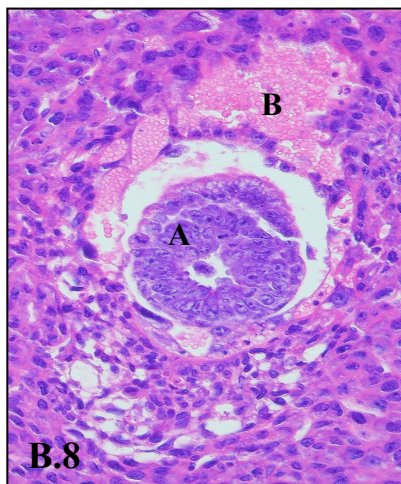
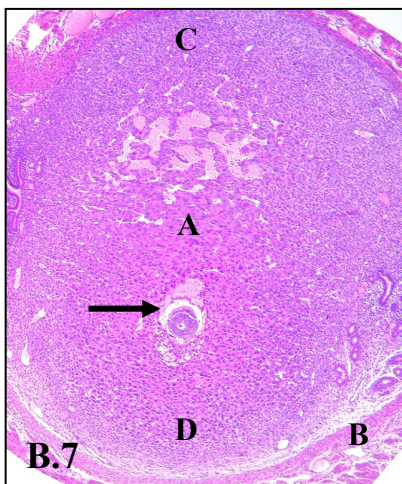
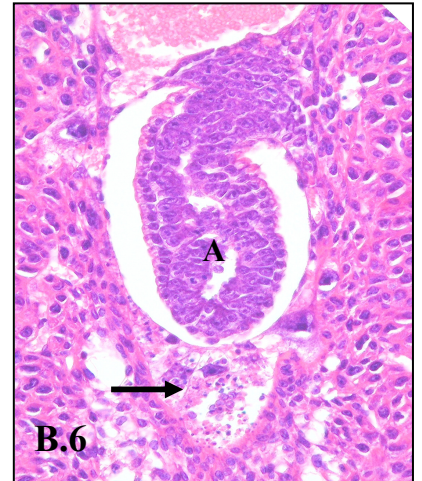
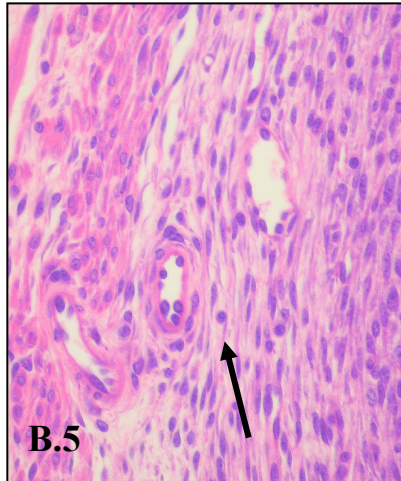
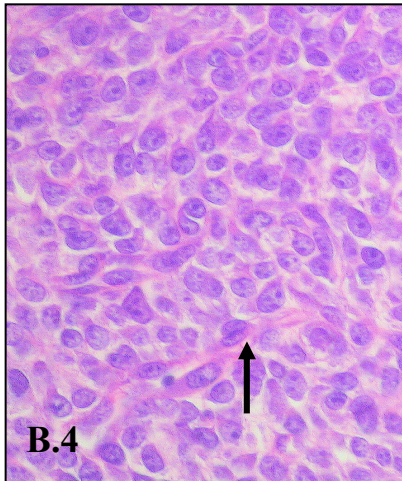
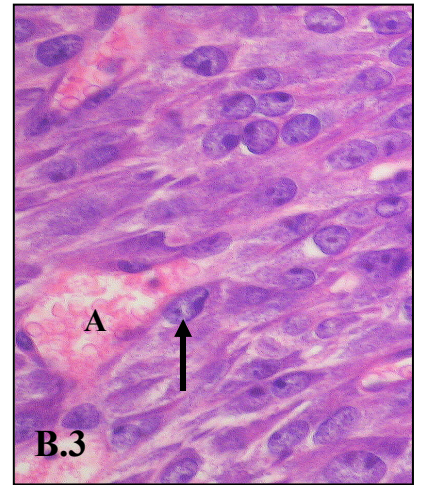
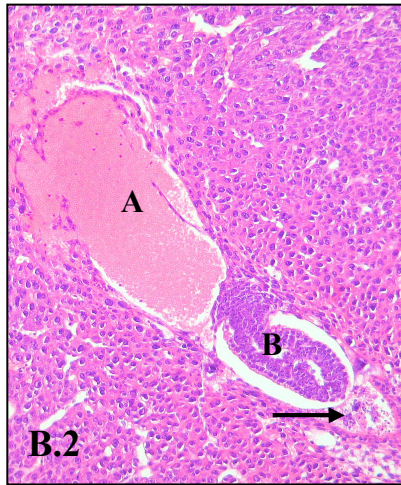
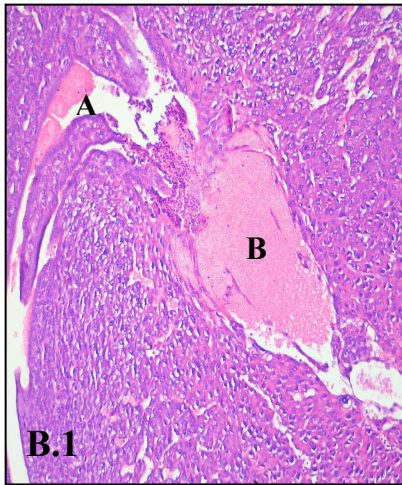


10.5 DOP Gestación normal

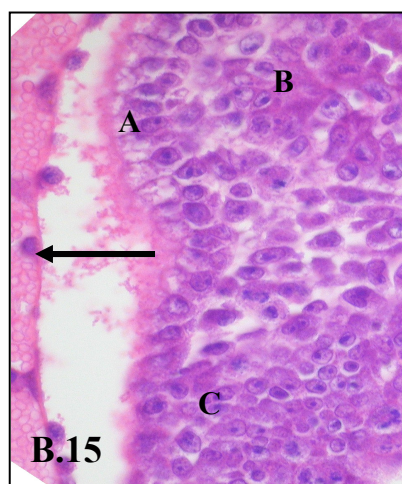
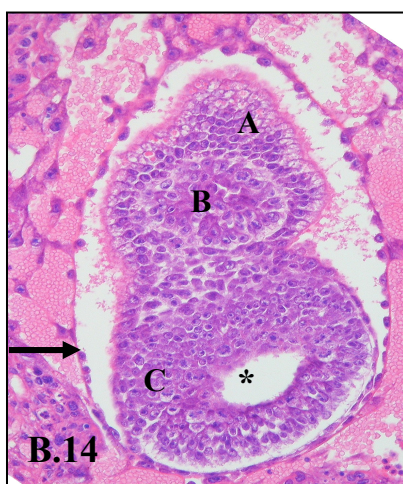
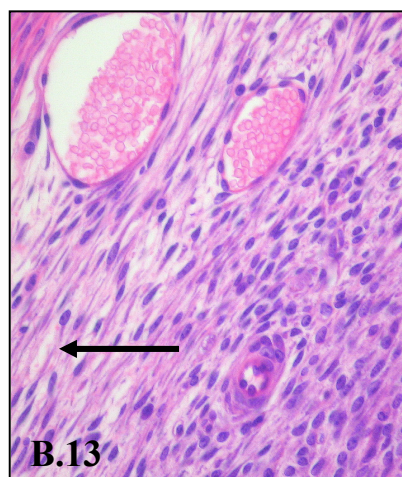
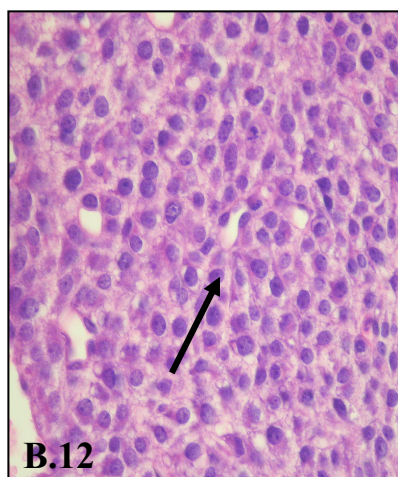
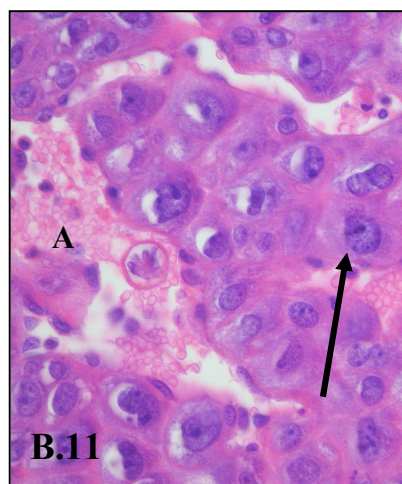
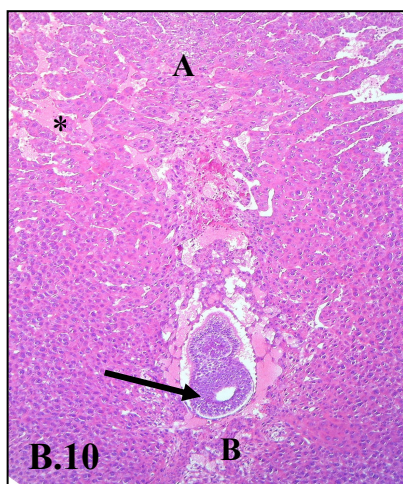


B. Modelo de Aborto espontáneo

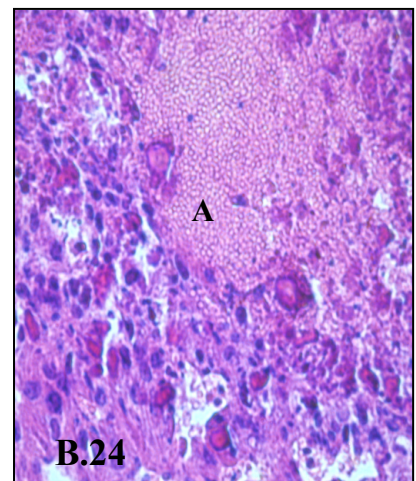
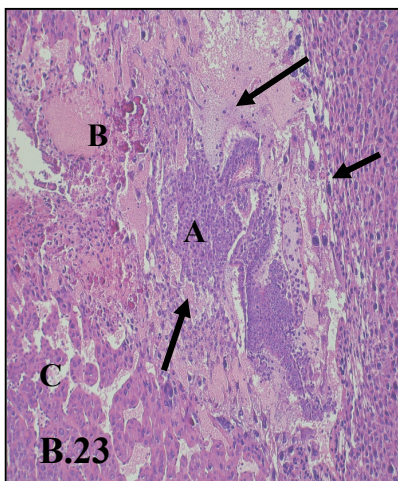
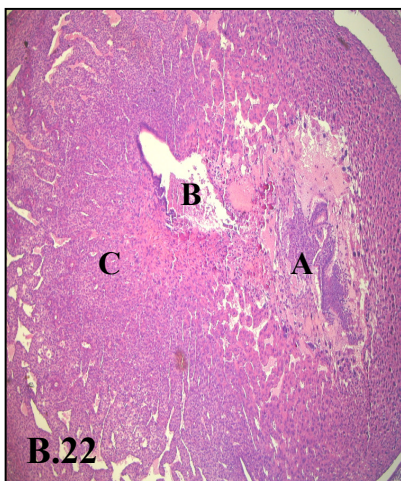
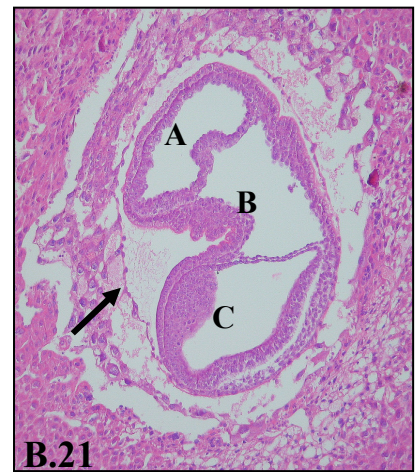
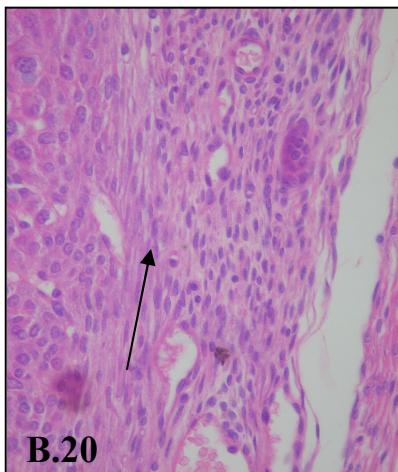
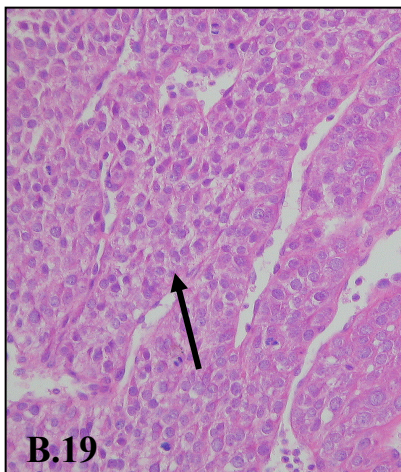
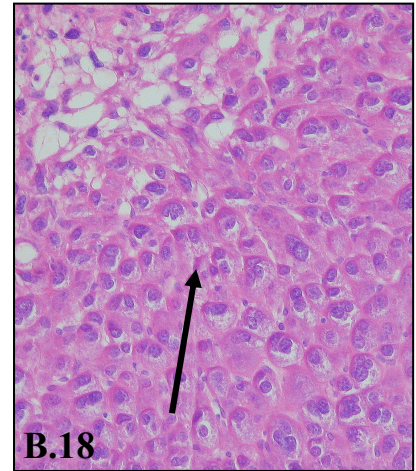
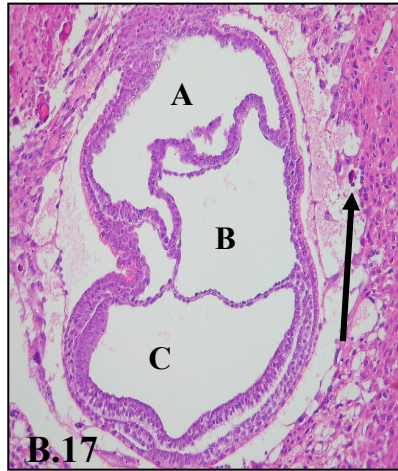
6.5 DOP Modelo de aborto espontáneo



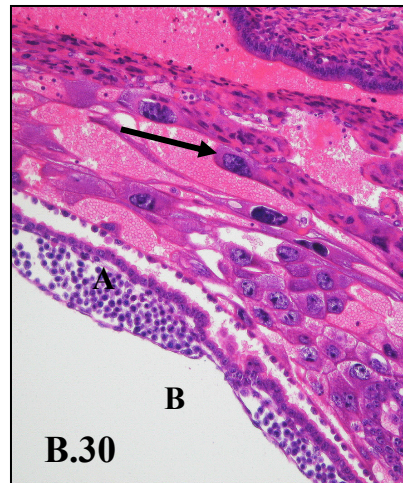
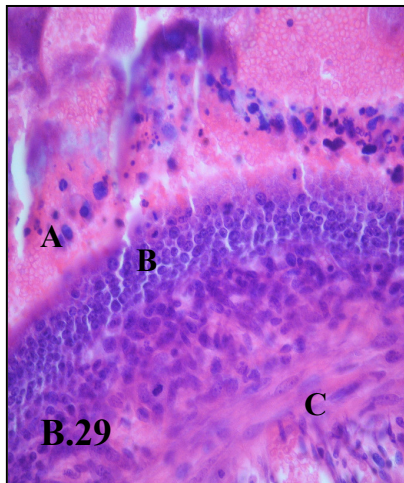
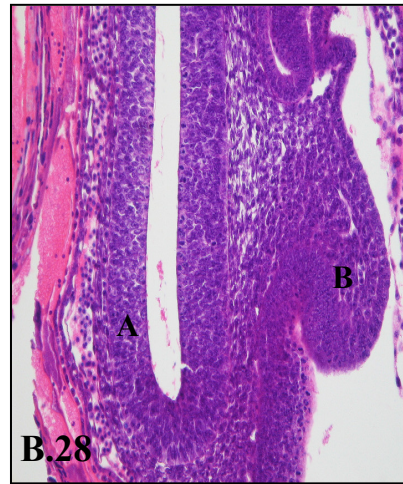
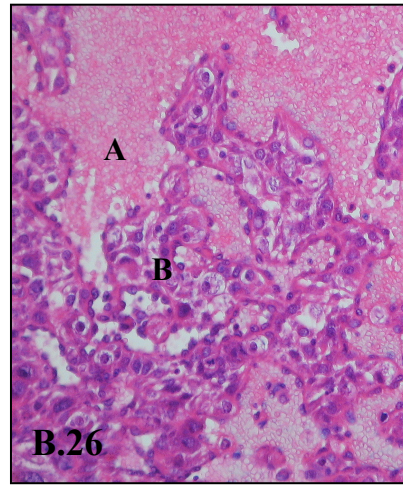
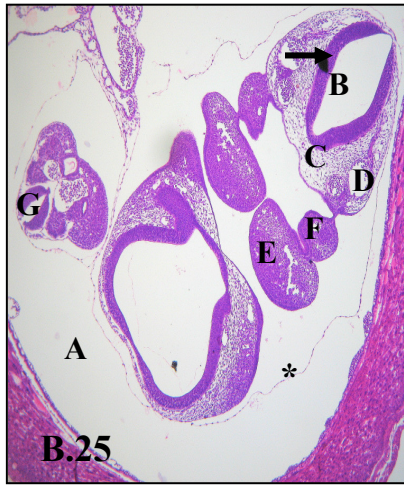
7.5 DOP Modelo de aborto espontáneo



8.5 DOP Modelo de aborto espontáneo



10.5 DOP Modelo de aborto espontáneo



ANEXO C

Descripción de Imágenes

A. Gestación Normal

Corte Transversal

- A.1. Útero de 6.5 días de gestación, se observa reacción decidual, decidua madura (A), predecidua (B) y zona no decidualizada (C) y lagunas sanguíneas (H-E)
- A.2. Útero de 6.5 días de gestación normal se aprecia el embrión en el día 6.5 de gestación, presentando basofilia y disposición en bicapa. (H-E)
- A.3. Útero de 6.5 días de gestación, se aprecia decidua madura (A), lagunas de sangre materna (B). Las células deciduales poseen escaso citoplasma, un gran núcleo y escasa matriz extracelular. (H-E 40x)
- A.4. Útero de 6.5 días de gestación normal se observa la zona predecidual (A), representa la transición entre la decidua madura y la zona no decidualizada.(H-E)
- A.5. Útero de 6.5 días de gestación, se observa predecidua (A), zona no decidualizada (B) y miometrio (C). La zona no decidualizada esta formada por fibroblastos endometriales alargados.(H-E)
- A.6. Útero de 6.5 días de gestación, se aprecia un acumulo de cuerpos apoptoticos en la zona abembrionaria (A), probablemente de las células epiteliales en apoptosis y las primeras células deciduales en degeneración (B).(H-E)
- A.7. Útero de 7.5 días de gestación,, se aprecia reacción decidual, decidua madura (A), predecidua (B), lagunas sanguíneas (C) y la nueva luz uterina (D). (H-E)
- A.8. Útero de 7.5 días de gestación, se observa el embrión, con sus zonas embrionarias (A) y extraembrionarias (B), nótese las células gigantes del trofoblasto (flecha) las cuales forman una laguna alrededor del embrión permitiéndole a éste crecer y nutrirse. (H-E)
- A.9. Útero de 7.5 días de gestación, se aprecia la decidua madura (A) y algunos linfocitos dentro de las lagunas sanguíneas (flecha).(H-E)
- A.10. Útero de 7.5 días de gestación, se observa predecidua, nótese los espacios en el tejido, los que mas adelante se rellenaran con sangre.(H-E)
- A.11. Útero de 7.5 días de gestación, se aprecia predecidua (A), zona no decidualizada (B) y miometrio (C). (H-E)
- A.12. Útero de 7.5 días de gestación, se detalla la zona embrionaria, el ectodermo (A), la cavidad proamniotica (B) y el endodermo (C).(H-E)

- A.13. Útero de 8.5 días de gestación, se aprecia decidua Mesometrial (A), embrión (B) y decidua antimesometrial.(H-E)
- A.14. Útero de 8.5 días de gestación, se observan las estructuras correspondientes al día de gestación, corion (A), cono ectoplacentario (B), alantoides en formación (C) y amnios (D).(H-E)
- A.15. Útero de 8.5 días de gestación, se observa decidua madura (A).
- A.16. Útero de 8.5 días de gestación, detalle del inicio del desarrollo del alantoides. (H-E)
- A.17. Útero de 8.5 días de gestación, se observa predecidua (A).
- A.18. Útero de 8.5 días de gestación, se observa zona no decidualizada (A).
- A.19. Útero de 10.5 días de gestación, se observa el embrión a nivel del encéfalo (A), el corion (B), la capa corionica (C) y el laberinto placentario (D).(H-E)
- A.20. Útero de 10.5 días de gestación, se aprecia la región Antimesometrial del endometrio, observándose la decidua basal (A), la zona no decidualizada muy escasa (B) y el miometrio (C). (H-E)
- A.21. Útero de 10.5 días de gestación, se observa la capa corionica y su basofilia evidente (A). (H-E)
- A.22. Útero de 10.5 días de gestación, se aprecia la capa corionica en gran aumento, células sanguíneas primitivas han invadido los capilares y sinusoides.(H-E)
- A.23. Útero de 10.5 días de gestación, se aprecia una arteria de sangre materna (A) la zona del laberinto (B) se ve algo menos acidofila, probablemente por el glicógeno que ha ocupado parte del citoplasma de las células que lo componen. (H-E)
- A.24. Útero de 10.5 días de gestación, detalle del laberinto (A) se aprecian las células de aspecto vacío (flecha), como se observa en la imagen la sangre materna aun contiene componentes leucocitarios (B), (H-E)
- A.25. Útero de 10.5 días de gestación, detalle del mesénquima primitivo en el corion, el cual forma las primeras células sanguíneas embrionarias (flecha).(H-E)
- A.26. Útero de 10.5 días de gestación, se observa el lumen neural (A), el intestino primitivo (B). (H-E)

A.27. Útero de 10.5 días de gestación, se observa el lumen neural (A), el futuro cerebro (B), los arcos faríngeos primarios y secundarios (C), y la vesícula óptica (D) rodeando al lumen nervioso que será ocupado por el órgano sensorial. (H-E)

B. Modelo de aborto espontáneo

Corte Transversal

B.1 Útero 6.5 de gestación, se distingue la nueva luz uterina (A) conectándose con la laguna de sangre (B) (H-E).

B.2 Útero 6.5 de gestación, se observa laguna de sangre (A), cuerpos apoptóticos (flecha) y embrión (B) (H-E).

B.3 Útero 6.5 de gestación, se observan células deciduales (flecha) y algunas lagunas de sangre (A). (H-E)

B.4 Útero 6.5 de gestación, se observan células predeciduales (flecha) (H-E).

B.5 Útero 6.5 de gestación, se observan células no decidualizadas, fibroblastos (flecha) (H-E).

B.6 Útero 6.5 de gestación, se aprecia embrión (A) y cuerpos apoptóticos (flecha) (H-E).

B.7 Útero 6.5 de gestación, se aprecia endometrio (A), miometrio (B), zona mesometrial (C), zona antimesometrial (D) y embrión (flecha) (H-E).

B.8 Útero 6.5 de gestación, TS 7, se observan; embrión (A), lagunas de sangre (B) e infiltrado leucocitario (flecha) (H-E).

B.9 Útero 6.5 de gestación, TS 7, se observan epiblasto (A) y endodermo primitivo (B) (H-E).

B.10 Útero 7.5 de gestación, se observa zona mesometrial (A), zona antimesometrial (B), embrión (flecha) y algunas lagunas de sangre materna (asterisco) (H-E).

B.11 Útero 7.5 de gestación, se observan células deciduales maduras (flecha) y lagunas de sangre con infiltrado leucocitario (A) (H-E)

B.12 Útero 7.5 de gestación, se observan células predeciduales (flecha) (H-E)

B.13 Útero 7.5 de gestación, se observan células no decidualizadas, fibroblastos (flecha) (H-E)

B.14 Útero 7.5 de gestación, se distingue membrana de Reichert (flecha), endodermo visceral (A), ectodermo extraembrionario (B), ectodermo embrionario (C) y cavidad proamniótica (asterisco) (H-E).

B.15 Útero 7.5 de gestación, se distingue membrana de Reichert (flecha), endodermo visceral (A), ectodermo extraembrionario (B) y ectodermo embrionario (C) (H-E).

B.16 Útero 8.5 de gestación, se distingue zona mesometrial (A), zona antimesometrial (B), embrión (C) y lagunas de sangre (D) (H-E)

B.17 Útero 8.5 de gestación, se distinguen 3 cavidades; cavidad ectoplacentaria (A), cavidad exocelómica (B) y cavidad amniótica (C), además de células gigantes del trofoblasto (flecha) (H-E)

B.18 Útero 8.5 de gestación, se distinguen células deciduales de la decidua madura (flecha) (H-E).

B.19 Útero 8.5 de gestación, se distinguen células predeciduales (flecha). (H-E)

B.20 Útero 8.5 de gestación, se distinguen células no decidualizadas, fibroblastos (flecha). (H-E)

B.21 Útero 8.5 de gestación, se distingue membrana de Reichert (flecha), 3 cavidades; cavidad ectoplacentaria (A), cavidad exocelómica (B), cavidad amniótica (C), células gigantes del trofoblasto (asterisco). (H-E).

B.22. Útero 8.5 de gestación, se observa el embrión en reabsorción (A), laguna de sangre (B), y decidua madura (C) (H-E).

B.23. Útero 8.5 de gestación, se aprecia el embrión en reabsorción (A) lagunas de sangre (B) con infiltrado inflamatorio (flecha) y decidua basal (C). Nótese la ausencia completa de estructuras correspondientes al modelo normal. (H-E).

B.24. Útero 8.5 de gestación, se aprecia el detalle del embrión en reabsorción. Se observan lagunas de sangre (A), cuerpos apoptóticos fuertemente basófilos e infiltrado inflamatorio (H-E).

B.25 Útero 10.5 de gestación, se observan cavidad coriónica (A), amnios (asterisco), tubo neural (flecha), luz del tubo neural (B), mesenquima de la cabeza (C), vesículo óptico (D), arcos faríngeos primarios (E), arcos faríngeos secundarios (F) y tubo neural de la espina dorsal (G) (H-E).

B.26 Útero 10.5 de gestación, se observan múltiples sinusoides (A) rodeados por células de origen ectoplacentario (B) (H-E).

B. 27 Útero 10.5 de gestación, se observan cavidad coriónica (A), amnios (asterisco), tubo neural (B), luz del tubo neural (C), mesenquima de la cabeza (D), arco faríngeo (E) y un pseudogranuloma (F) (H-E).

B.28 Útero 10.5 de gestación, se distingue tubo neural (A) y arco faríngeo (B). (H-E)

B.29 Útero 10.5 de gestación, se distinguen al interior del pseudogranuloma, cuerpos apoptóticos (A), células sanguíneas primarias (B) y elementos en necrosis (C) (H-E).

B.30 Útero 10.5 de gestación, se distinguen células gigantes del trofoblasto (flecha), células sanguíneas primarias (A) y cavidad coriónica (B) (H-E).

ANEXO D

D. Esquemas

D.1 6.5 DOP Modelo Aborto Espontáneo

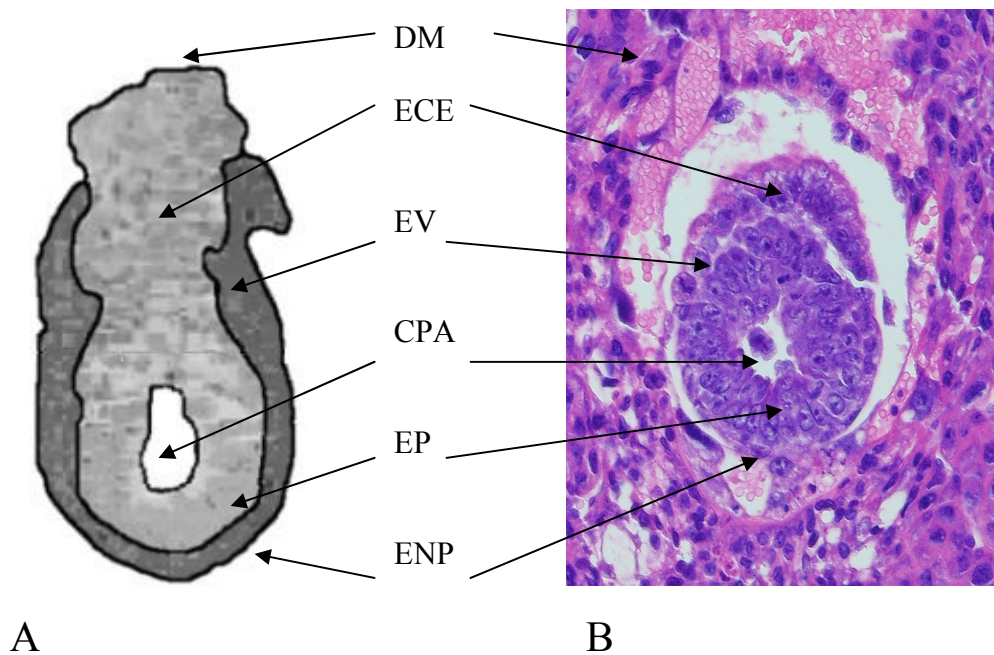


Figura D.1. El esquema ilustra la Theiler Stage 7, la cual es correspondiente al corte histológico del modelo animal de aborto espontáneo en el día 6.5 DOP. Se observa decidua madura (DM), ectodermo extraembrionario (ECE), endodermo visceral (EV), cavidad pro amniótica (CPA), epiblasto (EP), endodermo primitivo (ENP). (Imagen A de <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>)

D.2 6.5 DOP Gestación normal

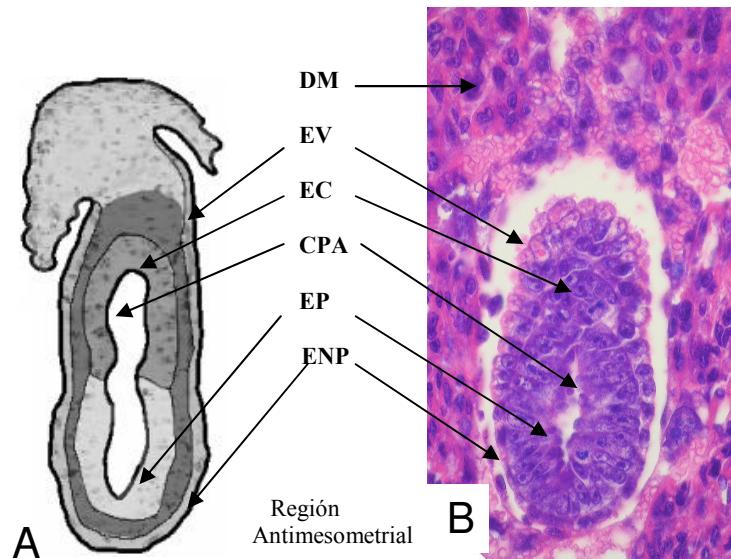


Figura D.2. A la izquierda se observa un esquema de embrión en 6.5 DOP, TS 8 y a la derecha el corte histológico correspondiente. Se aprecia, decidua madura (DM), endodermo visceral (EV), ectodermo (EC), cavidad proamniótica (CPA), epiblasto (EP) y endodermo primitivo (ENP). (Imagen A de <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>)

D.3 7.5 DOP Gestación normal

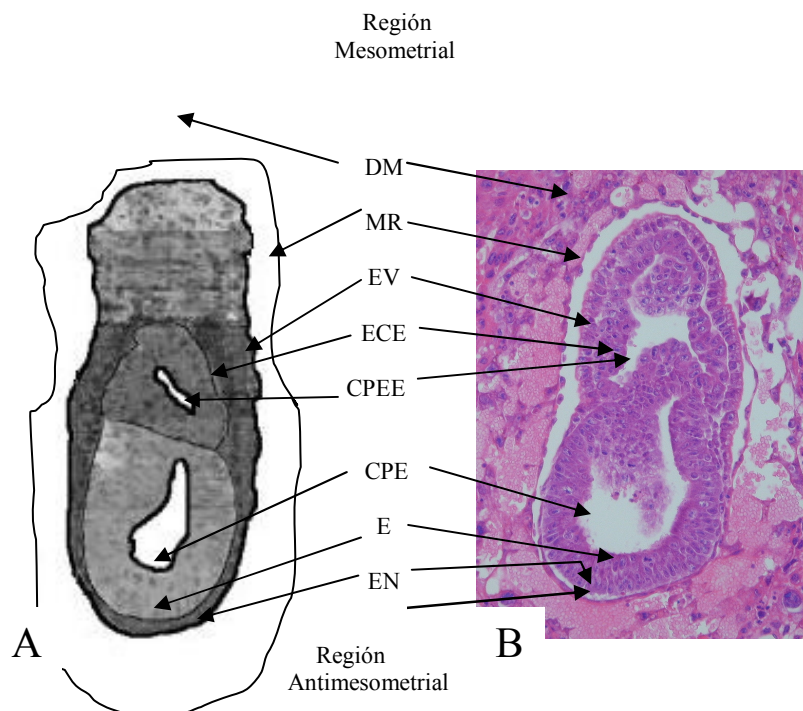


Figura D.3. A la izquierda se observa un esquema de embrión en 7.5 DOP, TS 9 y a la derecha el corte histológico correspondiente. Se aprecian decidua madura (DM), membrana de Reichert (MR) endodermo visceral (EV), ectodermo extraembrionario (ECE), cavidad proamniótica extraembrionaria (CPEE), cavidad proamniótica embrionaria (CPE,) ectodermo (E), endodermo (EN). (Imagen A de <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>)

D.4 8.5 DOP Gestación normal

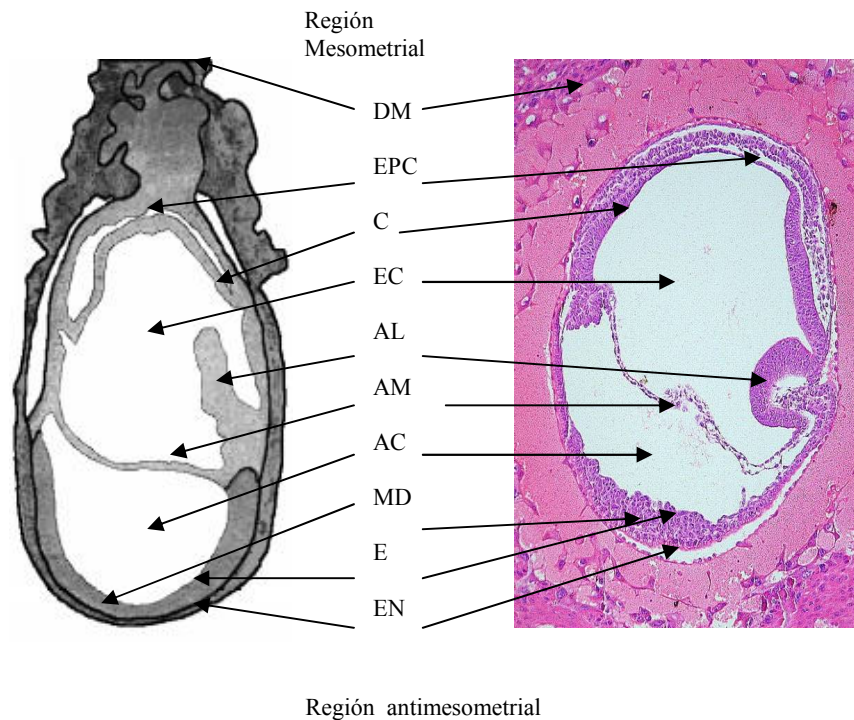


Figura D.4. Desarrollo embrionario a los 8.5 días de gestación. Se observa decidua madura (DM), cavidad ectoplacentaria (EPC), corion (C), cavidad exocelómica (EC), alantoides en formación (AL), amnios (AM), cavidad amniótica (AC); en la región embrionaria el inicio de la gastrulación forma las 3 capas ectodermo (E), mesodermo (MD) y endodermo (EN). (Imagen A de <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>)

D.5 10.5 DOP Gestación normal

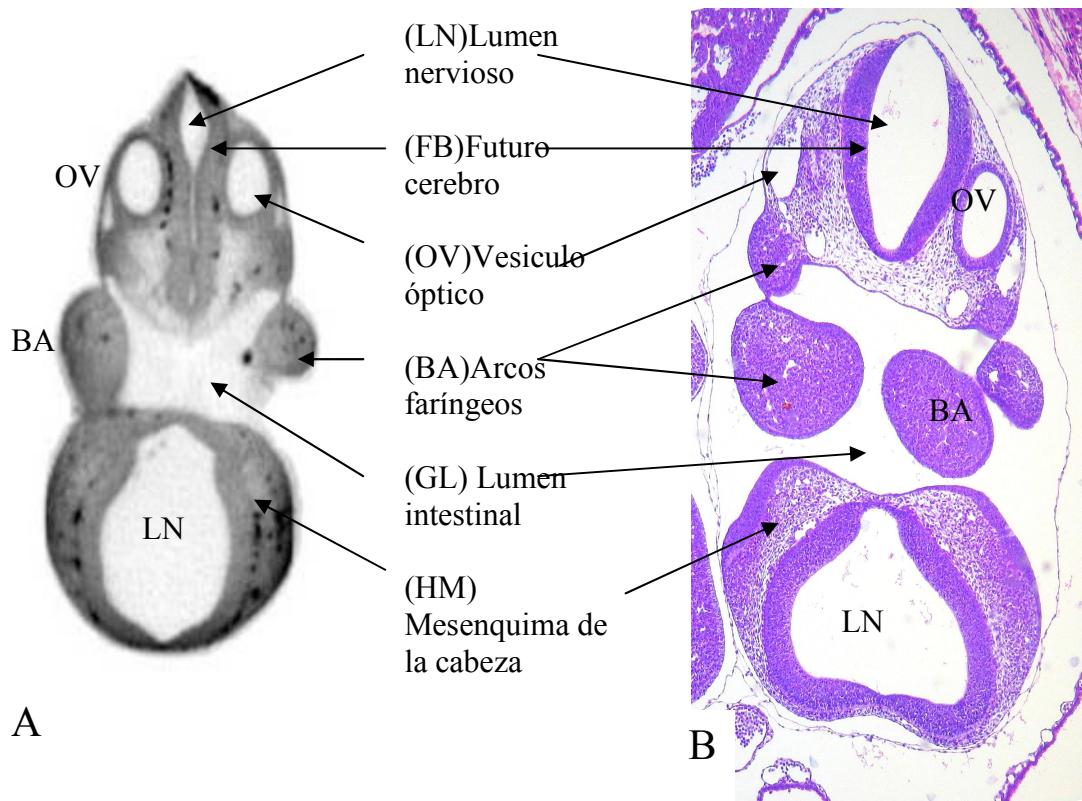


Figura D.5. Esquema del desarrollo temprano de los órganos a nivel de la cabeza. Se observan dos lúmenes nerviosos (LN) que luego serán ocupados por el encéfalo, el ectodermo que posteriormente formara el cerebro (FB), vesículos ópticos (OV), arcos faríngeos (BA), el lumen intestinal (GL) y el mesenquima de la cabeza (HM). (Imagen A de <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>)

ANEXO E

Tabla del desarrollo embrionario según las “Theiler Stages”

Theiler Stage	dpc (range) ²	Nº Somitas	Nº Células	(C57BLx CBA)F1 Ratón
1	0-0.9 (0 -2.5)		1	Huevo de una célula
2	1 (1 -2.5)		2-4	Huevo en división
3	2 (1-3.5)		4-16	Morula
4	3 (2-4)		16-40	Blastocito , Aparición de la masa celular interna
5	4 (3-5.5)			Blastocito (zona libre)
6	4.5 (4-5.5)			Adhesión del blastocito , endodermo primario cubre la superficie de la masa celular interna.
7	5 (4.5-6)			Implantación y formación del embrión ovoide . Aparece el cono ectoplacentario, epiblasto, el endodermo primario se continúa con el trofoectodermo mural. Células viscerales cúbicas.
8	6 (5-6.5)			Diferenciación del embrión ovoide Sitio de implantación de 2x3mm. La región del cono ectoplacentario es invadida por sangre materna, se forman Mb. De Reichert y cavidad proamniótica. Se diferencian regiones extraembrionarias y embrionarias.
9	6.5 (6.25-7.25)			Linea primitiva , avanza la reacción endometrial, el cono ectoplacentario es invadido por sangre, ectodermo extraembrionario, eje embrionario visible. El lumen de la cripta uterina ha desaparecido.
9a				Previo a la formación de la línea primitiva (ES) , inicio de la gastrulación, primeras evidencias de mesodermo.

10	7 (6.5-7.75)			Durante la formación de la línea primitiva (MS) , empieza a formarse el pliegue amniótico.
10a				Luego de la formación de la línea primitiva cavidad exocelomica.
10b				Luego de la formación de la línea primitiva primera aparición del alantoides, , oclusion del amnios
11	7.5 (7.25-8)			Placa neural , desarrollo de la cabeza, amnios completo
11a				Luego de la placa neural , elongación del alantoides
11b				Pliegue de la cabeza
11c				Pliegue de la cabeza) , invaginacion del intestino anterior
12	8 (7.5-8.75)	1-4		1-4 somitas , alantoides se extiende, 1er arco branquial, corazon empieza a formarse, foregut pocket visible, preotic sulcus (etapa de 2-3 somitas)
12a		5-7		5-7 somitas , alantoides contacta el corion al final de TS12 ausencia del 2do arco, <i>>7 somitas</i>
13	8.5 (8-9.25)	8-12		Rotación del embrión , 1er arco branquial posee componentes maxilares y mandibulares, 2do arco presente 3er arco ausente
14	9 (8.5-9.75)	13-20		Formacion y oclusion anterior. neuroporo, 3er arco branquial visible
15	9.5 (9-10.25)	21-29		Formación del neuroporo posterior. , cerebro delantero subdivisión de las vesiculas