

Momificación fetal: alteración del colágeno placentario en cerdas

Fetal mummification: alteration of placental collagen in sows

DOI: <https://doi.org/10.63207/ai.v8i15.162>

Andrea Cristofolini ^{1,2,3*}; Mariana Fiorimanti ^{1,3}; Keisy Gómez^{1,2,3}; Tomás Porcel de Peralta⁴; Cecilia Merkis ^{1,3}.

1. Área de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. CONICET. Argentina.
3. Instituto de Ciencias Veterinarias (INCIVET). Universidad Nacional de Río Cuarto-CONICET, Río Cuarto. Córdoba, Argentina.
4. BIOFARMA S.A. Granja Experimental El Pilato, Carnerillo, Córdoba, Argentina.

Resumen. El objetivo fue determinar en placentas porcinas de fetos momificados, la localización de colágeno de acuerdo con grosor de sus fibras. Se procesaron placentas de cerdas mestizas procedentes de criaderos del sur de la provincia de Córdoba. Se seleccionaron las unidades fetoplacentarias con presencia de fetos momificados, recolectándose placentas de 60 y 90 días de preñez. Cortes histológicos se colorearon con la tinción histoquímica modificada de Picrosirius red y se examinaron con microscopio de polarización, lo que permite diferenciar colágeno Tipo I (birrefringencia naranja amarillenta a naranja y rojo) y Tipo III (birrefringencia verde o verdosa-amarillenta). La disposición de las fibras de colágeno I y III su espesor y distribución de la birrefringencia se analizaron mediante el valor de High Score y se evaluaron estadísticamente comparando con estudios previos realizados en placentas de fetos viables. Se determinó una asociación entre la condición placentaria y la presencia de fibras según su espesor en ambos estadios gestacionales. En placentas de fetos momificados, las fibras de colágeno tipo I eran escasas y estaban rodeadas de abundantes fibras dispersas de colágeno tipo III. Un óptimo microambiente placentario es esencial para el desarrollo de procesos fisiológicos que intervienen en el mantenimiento de la preñez. Una matriz extracelular con una composición y distribución del colágeno alteradas induciría cambios en el microambiente incompatibles con el normal desarrollo de la gestación y la viabilidad fetal.

Palabras clave: porcinos, placenta, matriz extracelular, momificación.

Abstract. The objective was to determine in porcine placentas of mummified fetuses the location of collagen according to the thickness fiber. Placentas from crossbred sows from farms in the south of the province of Córdoba were collected after delivery and were processed. The fetoplacental units with mummified fetuses were selected and the gestational age was determined. Placentas of 60 and 90 days of pregnancy were collected. Histological sections were stained with the modified histochemical stain Picrosirius red and were examined under polarizing microscope, which allows differentiation of Type I collagen (yellowish orange to orange-red birefringence) and Type III (green or greenish-yellowish birefringence). The arrangement of I and III collagen fibers, their thickness and birefringence distribution were analyzed using the High Score value and statistically evaluated in comparison with previous studies performed on placentas of viable fetuses. An association was established between placental condition and the presence of fibers according to their thickness. In placentas of mummified fetuses type I collagen fibers were poor and surrounded by abundant type III. An optimal placental microenvironment is essential for the development of physiological processes involved in maintaining pregnancy. An extracellular matrix with altered collagen composition and distribution would induce changes in the microenvironment incompatible with the normal pregnancy development and fetal viability.

Keywords: porcines, placenta, extracellular matrix, mummification.

Artículo recibido: 08 de mayo de 2025 . Artículo aceptado: 30 de junio de 2025.

*Autora para correspondencia: Dra. Andrea L. Cristofolini. Ruta Nacional 36 - Km. 601. Código Postal X5804BYA, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 3584249564. acristofolini@ayv.unrc.edu.ar

En la cerda, la mortalidad fetal que ocurre entre el día 35 y el término de la gestación, ocasiona, en promedio, la pérdida de más de un lechón por camada (Van der Lende y Van Rens, 2003). Durante el desarrollo prenatal, el proceso de osificación comienza muy temprano en la etapa fetal, debido a la presencia de tejido óseo calcificado, los fetos muertos no son reabsorbidos por la cerda, sino que sufren un proceso de momificación. Estos fetos momificados finalmente son expulsados junto con el resto de la camada. Aunque los fetos momificados se han asociado a enfermedades infecciosas (Borges *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2015), también se han determinado varios factores no infecciosos, como el tamaño de la camada y la capacidad uterina, entre otros (Trollet, 2005; Fernández *et al.*, 2019). Durante la gestación, luego de la implantación del embrión porcino, el crecimiento, desarrollo y viabilidad posterior del feto dependen de una correcta y eficiente formación placentaria (Soraci, 2012). Debido al tipo de placentación epiteliochorial y el carácter politoco de la especie, es esencial un óptimo microambiente placentario para sostener las demandas nutricionales de los *concepti* (Cristofolini *et al.*, 2018; Johnson *et al.*; 2021). La matriz extracelular es fundamental para guiar el comportamiento celular, siendo el colágeno fibrilar su principal componente (Liu *et al.*, 2021). El estudio de la organización de una matriz que contiene colágeno resulta útil para comprender ciertas condiciones fisiopatológicas (Rittié, 2017; Gómez *et al.*, 2024). El objetivo de este estudio fue estudiar la distribución y disposición de las fibras colágenas tipo I y III en cortes histológicos de placentas de cerdas con fetos momificados, a través de la tinción histoquímica modificada de Picrosirius red examinados con microscopio de polarización.

Se procesaron placentas de cerdas mestizas (Naima) de gestaciones a término, provenientes de la Granja Experimental El Pilato, BIOFARMA S.A., Carnerillo, Córdoba (32.9° S 64.0° O). Las madres fueron consideradas libres de enfermedad de acuerdo con la examinación clínica y *post-mortem*. Las placentas recogidas luego de su expulsión fueron lavadas con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco) que contenía 10.000 U/ml de penicilina G sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomina y 2,5 µg/ml de fungizona (Gibco) y mantenidas a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Se asistieron 13 partos y se obtuvieron y examinaron 133 unidades

fetoplacentarias porcinas, las que fueron examinadas, recolectándose 5 unidades fetoplacentarias con presencia de fetos momificados (PI/FM). Se tomó la longitud céfalocaudal de esos fetos y se determinó la edad gestacional a través de la fórmula: días de gestación (DG)= longitud cefalocaudal (LCC) cm x 3 + 21, donde 3 y 21 son constantes (Fiorimanti *et al.*, 2018). Se determinó que 3 unidades fetoplacentarias provenían de gestaciones de 60 días de preñez, y 2 de 90 días. Las muestras de tejido placentario fetal de 6 mm³ se fijaron en formol tamponado al 10 % y se procesaron a través de la técnica histológica convencional (Fiorimanti *et al.*, 2024). La evaluación de la distribución de las fibras colágenas se realizó a través de la tinción modificada de Picrosirius red, un procedimiento histoquímico selectivo que permite observar con un microscopio de polarización la birrefringencia emitida. Las membranas fetales fueron incubadas con hematoxilina de Weigert/etanol 95° (Solución A-Biopack®, Argentina) y cloruro férrico (Solución B-Biopack®, Argentina) durante 30 min. Posteriormente, se realizó un lavado de 10 min. con agua corriente. Se agregó la solución de Picrosirius red (Direct red 80/ácido pícrico saturado) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego lavar con agua ácida (2 lavados de 10 min. cada uno). Los cortes fueron deshidratados en etanol al 100 %, aclarados con xilol y montados con Entellan (Merck, Alemania). La observación se realizó con el microscopio óptico de luz polarizada Eclipse- E- 600- POL (Nikon Instruments INC, Melville, NY, USA). Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón). Al utilizar ópticas de polarización con ejes polares cruzados, se detecta la birrefringencia emitida por el complejo de unión entre las fibras de colágeno y las moléculas de Picrosirius red, las que se unen espacialmente de manera paralela a la fibra aumentando su natural birrefringencia. Los colores observados representan el tipo de colágeno presente y una medida de su espesor, así como de la densidad de su empaquetamiento y disposición (Sanchis *et al.*, 2011). La birrefringencia emitida por las fibras de colágeno tipo I y III se presenta en color verde, amarillo o naranja, en secuencia del grosor creciente de las mismas (Rittié, 2017). Se evaluaron 10 campos al azar por placenta de fetos momificados (PI/FM), utilizando un objetivo de 20x, determinando la

disposición de las fibras colágenas según su grosor. La intensidad de birrefringencia se identificó cualitativamente asignando las siguientes categorías: (1) pobre, (2) abundante y (3) cuantiosa. La semicuantificación se determinó mediante el análisis de la distribución de intensidad de birrefringencia, a través del valor High Score (HS) (Fiorimanti *et al.*, 2018), definido como $HS: \sum P_i (i + 1)$, donde para cada color observado, "i" es la intensidad de birrefringencia y "P_i" el porcentaje de birrefringencia. Los resultados obtenidos se compararon con los de placentas de fetos viables de la misma edad gestacional (Pl/FV). Posteriormente se analizaron estadísticamente con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020). Los resultados se consideraron significativos con un valor de $p \leq 0,05$.

Se determinó en el tejido placentario de fetos momificados (Pl/FM), en ambos períodos analizados, una abundante birrefringencia naranja y cuantiosa birrefringencia verde, presente en el mesénquima fetal. Se observó, en particular, una disposición más densa de las fibras de colágeno en las membranas fetales, especialmente alrededor de los vasos sanguíneos, presentando un aspecto fibrilar compacto (Figura 1 A y C). Por el contrario, en placentas de fetos viables (Pl/FV) la disposición de las fibras de colágeno del mesénquima fetal era laxa, caracterizada por cuantiosa birrefringencia naranja y amarilla, y pobre birrefringencia de fibras verdes (Figura 1 B y D).

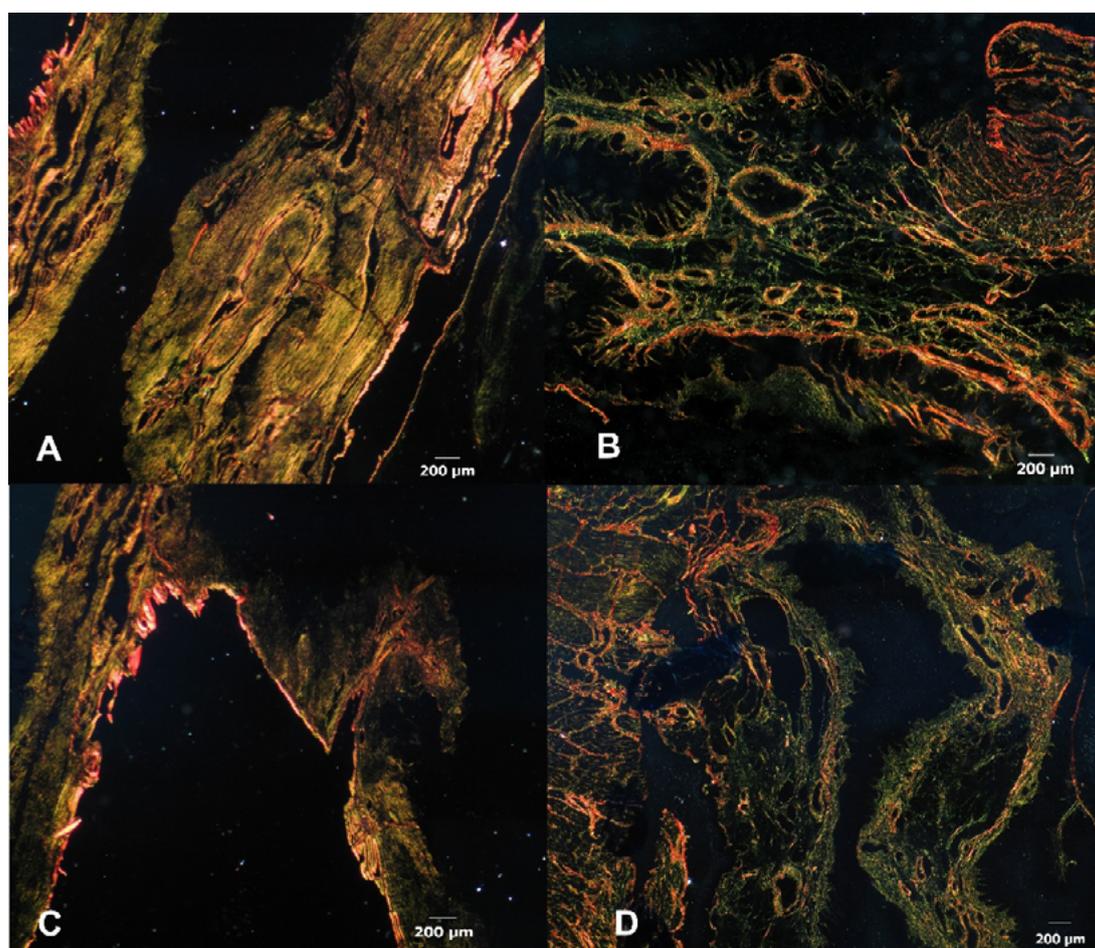


Figura 1. Tinción histoquímica modificada de Picrosirius red observada al microscopio de polarización. Disposición y distribución de las fibras de colágeno en placentas de fetos momificados (Pl/FM) (A y C) y en placentas de fetos viables (Pl/FV) (B y D). A y B corresponden a gestaciones de 60 días; C y D corresponden a gestaciones de 90 días. Escala: 200 µm.

El análisis estadístico de la variable porcentaje total de fibras de colágeno no mostró diferencias significativas entre PL/FM y PL/FV. Sin

embargo, se observó una tendencia en las membranas fetales de Pl/FM, a expresar un mayor porcentaje de colágeno (Figura 2).

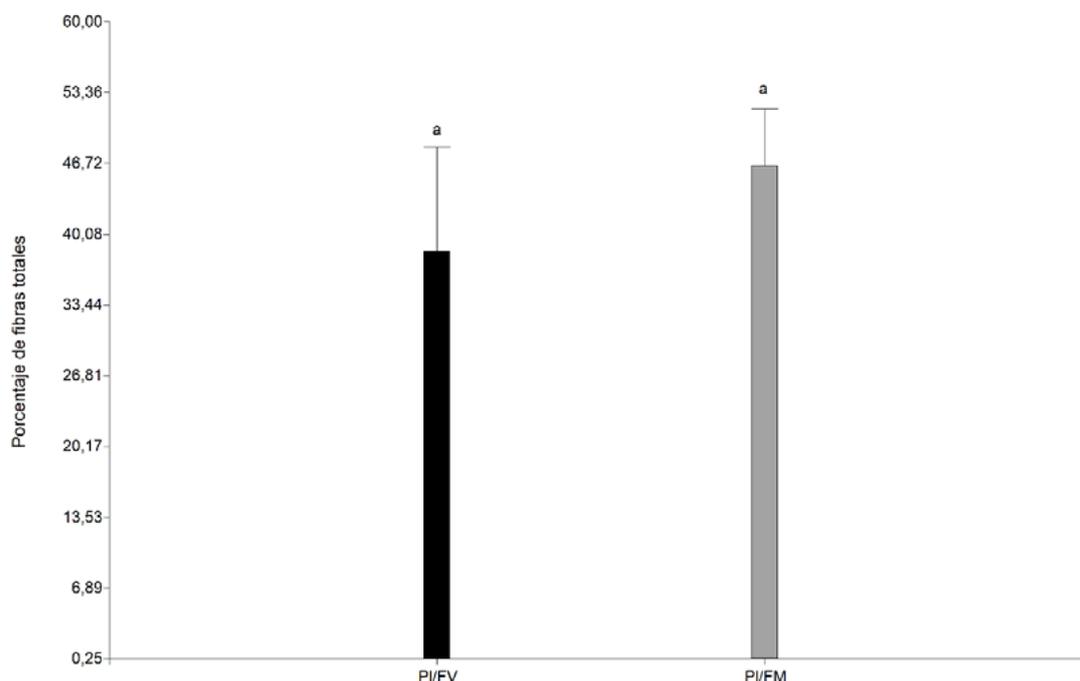


Figura 2. Análisis del porcentaje total de fibras de colágeno en placentas de fetos momificados (Pl/MV) vs placenta de fetos nacidos vivos (Pl/FV). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

La asociación entre la condición placentaria (Pl/FM o Pl/FV) y la presencia de fibras colágenas según su tipo y espesor (verdes, amarillas o naranjas) determinó que, en las PL/FM el por-

centaje de fibras delgadas (verdes) ($p = 0,029$) y de fibras gruesas (naranja) ($p = 0,0027$) fue significativamente mayor, mientras que para las fibras amarillas no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figura 3).

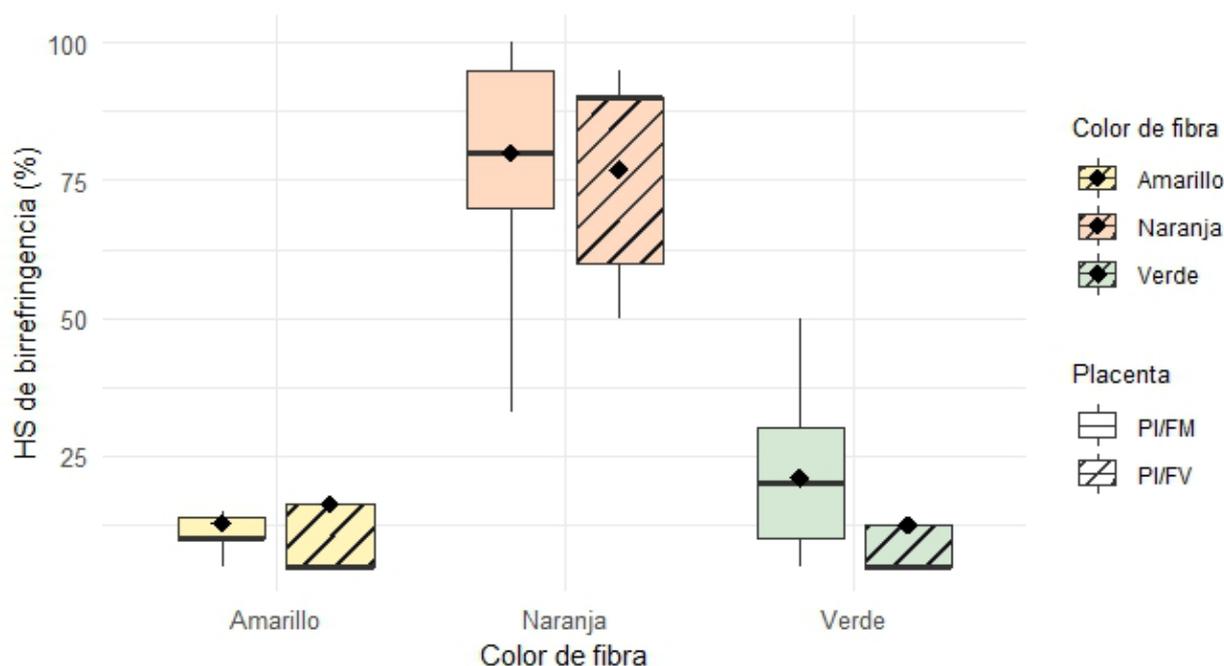


Figura 3. Asociación entre la condición placentaria (Pl/FM o Pl/FV) y las fibras de colágeno de acuerdo con el High Score (HS) de birrefringencia. Birrefringencia amarilla corresponde a fibras de mediano espesor; birrefringencia naranja corresponde a fibras gruesas; birrefringencia verde corresponde a fibras delgadas. [*] representa diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p \leq 0,05$).

El desarrollo placentario requerido para llevar a término la gestación, está íntimamente asociado, no sólo con la proliferación de células placentarias, sino también con la producción de matriz extracelular (Rozario y DeSimone, 2010; Gómez *et al.*, 2024). En estudios previos, en placentas de fetos nacidos vivos hemos observado en la matriz extracelular placentaria, un aumento del colágeno a medida que avanza la gestación (Sanchis *et al.*, 2011). Dicho colágeno actúa directamente como un constituyente esencial de la matriz proporcionando sostén al sistema vascular y glandular en desarrollo (Bonnans *et al.*, 2014).

Diversos autores han postulado que las fibras de colágeno que emiten birrefringencia verde se corresponden con fibras inmaduras de colágeno tipo III mientras que, las amarillas y naranjas con fibras maduras de colágeno tipo I (Cury *et al.*, 2016; Rittie, 2017; Liu *et al.*, 2021). En nuestro estudio determinamos la escasa presencia de elementos fibrilares maduros y bien definidos, rodeados de abundantes fibras inmaduras dispuestas de manera dispersa en el tejido placentario. De manera tal que, una matriz extracelular conformada especialmente por fibras de colágeno tipo III les otorgaría a estas placentas, una estructura desorganizada, incapaz de sostener el desarrollo de procesos fisiológicos esenciales para el mantenimiento de la gestación en curso. Estos hallazgos, en placentas de fetos momificados, se encuentran estrechamente asociados a procesos de vascularización defectuosos determinados en estudios en proceso (datos no publicados).

En coincidencia con otros autores (Rittié, 2017; Liu *et al.*, 2021) consideramos que la tinción histoquímica modificada de Picrosirius red es una herramienta eficaz para revelar la presencia y la organización de las fibras de colágeno en los tejidos. Asimismo, es un procedimiento de evaluación económico, simple y confiable que permite demostrar los cambios en el patrón de distribución del colágeno. En conclusión, en este estudio caracterizamos de manera específica el colágeno de la matriz extracelular placentaria en fetos momificados, así como también identificamos la asociación entre la condición placentaria y el tipo de fibras presentes.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a BIOFARMA S.A. Granja Experimental El Pilato, Carnerillo, Córdoba, empresa adoptante del PICT-T/UNRC/012/2022.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto, PICT-T/UNRC/012/2022.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15(12): 786-801. doi: 10.1038/nrm3904
- Borges, V., Bernardi, M., Bortolozzo, F., Wentz, I. (2005). Risk factors for stillbirth and foetal mummification in four Brazilian swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 70: 165-176.
- Cristofolini, A., Fiorimanti, M., Campos, M., Sanchis, E., Diaz, T., Moschetti E., Merkis, C. (2018). Morphometric study of the porcine placental vascularization. *Reproduction in Domestic Animal*. 53(1): 217-225. doi: 10.1111/rda.13095
- Cury, D.P., Dias, F.J., Miglino, M.A., Watanabe I.S. (2016). Structural and ultrastructural characteristics of bone-tendon junction of the calcaneal tendon of adult and elderly Wistar rats. *Public Library of Science One*. 11(4): e0153568. doi:10.1371/journal.pone.0153568.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. (2020). *InfoStat versión 2020*. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Fernández, S.D., Amanto, F., Diéguez, S. (2019). Estrategias nutracéuticas que impactan sobre las pérdidas intrauterinas del feto porcino. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Argentina. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/handle/123456789/2122>
- Fiorimanti, M.R., Cristofolini, A.L., Gómez, K.P., Turiello, M.P., Bozzo, A.A., Barbeito, C.G., Merkis, C.I. (2024). Macroscopic and microscopic characterization of term placentas from nu-

- tritionally restricted goats. *Small Ruminant Research*. 233, 107232. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107232>.
- Fiorimanti, M.R., Rabaglino, M.B., Cristofolini, A.L., Merkis, C.I. (2018) Immunohistochemical determination of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 I placentas of sows at 30, 60 and 114 days of gestation and validation through a bioinformatic approach. *Animal Reproduction Science*. 195: 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.001>
- Gómez, K., Fiorimanti, M., Cristofolini, A., Benzoni, A., Luján, M., Luján, O., Barbeito, C., Merkis, C. (2024). Caracterización del colágeno placentario fetal en cabras restringidas nutricionalmente durante la etapa prepuberal. *Investigación Veterinaria*. 26: 1-9. <https://doi.org/10.62168/invet.v26i1.42>
- Johnson, G., Bazer, F., Seo, H. (2021). The early stages of implantation and placentation in the pig. Geisert, R.D and Spencer T.E (eds) In: Placentation in Mammals, *Advances in Anatomy, Embriology and Cell Biology*. 234: 61-90. https://doi.org/10.1007/978-3-030-77360-1_5
- Liu, J., Xu, M.Y., Wu, J., Zhang, H., Yang, L., Lun, D.X., Hu, Y.C., Liu, B. (2021). Picrosirius-Polarization Method for Collagen Fiber Detection in Tendons: A Mini-Review. *Orthopaedic Surgery*. 13(3): 701-707. doi: 10.1111/os.12627.
- Rittié, L. (2017). Method for picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. *Methods in Molecular Biology*. 1627: 395-407.
- Rozario, T., DeSimone, D.W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Development Biology*. 341(1): 126-40. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.026.
- Sanchis, E., Cristofolini, A., Taglialegna, A., Merkis, C. (2011). Moléculas de la matriz extracelular placentaria y uterina durante la preñez porcina. *International Journal of Morphology*. 29(4): 1438-1443.
- Silva, G.S., da Costa Lana M.V., Días, G.B., da Cruz, R.A., Lopes, L.L., Machado, G., Corbellini, L.G., Gava, D., Souza, M.A., Pescador, C.A. (2015). Case-control study evaluating the sow's risk factors associated with stillbirth piglets in Midwestern in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 47(2): 445-9. doi: 10.1007/s11250-014-0745-8.
- Soraci, A. 2012. Importancia práctica de los cambios fisiológicos en la alimentación del lechón. En UniRio Editora, Memorias XIº Congreso Nacional de Producción Porcina (CNPP11), las XVII Jornadas de Actualización Porcina (XVII JAP) y el VIº Congreso del Mercosur de Producción Porcina. Realizado en la ciudad de Salta entre 14 al 17 de agosto de 2012, Salta. Argentina. 43-50.
- Trolliet, J. C. (2005). Productividad numérica de la cerda factores y componentes que la afectan. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_porcina/00-produccion_porcina_general/09-productividad_numerica_cerda.pdf
- Van der Lende, T., Van Rens, D. (2003). Critical periods for fetal mortality in gilts identified by analysing the length distribution of mummified fetuses and frequency on non-fresh stillborn piglets. *Animal Reproduction Science*. 75:141-150.