



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO DE LA GESTACIÓN DE BORREGAS
DOMÉSTICAS INSEMINADAS CON BORREGO
CIMARRÓN Y DOMÉSTICO, MEDIANTE
CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA,
MORFOMETRÍA E HISTOLOGÍA
PLACENTARIA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
BENJAMÍN CALDERÓN ROBLES

TUTOR: OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA
COMITÉ TUTORAL: MARIO PÉREZ MARTÍNEZ
FERNANDO GUAL SILL

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
1. Taxonomía de los borregos	5
1.2 Estudios genéticos evolutivos en la placentación de mamíferos	7
1.3 Uso de híbridos como herramienta para la conservación de especies en peligro de extinción	8
2. Características reproductivas del borrego doméstico y Cimarrón	9
2.1 Participación de las citocinas endometriales en la implantación embrionaria	11
2.2 Aspectos de la placentación en rumiantes	15
2.3 Morfogénesis y función de las membranas fetales	17
2.4 El papel de las células binucleadas en la fisiología placentaria	21
2.5 Función endocrina de la placenta: Síntesis de Progesterona	22
2.6 Maduración de la placenta y apoptosis	24
2.7 Mecanismos desencadenantes del parto	26
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. OBJETIVOS	30
General	30
Específicos	30
V. HIPÓTESIS	31
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	32
1. Animales.	32
2. Sincronización y monta dirigida o inseminación artificial.	32
3. Ultrasonografía de imagen y tiempo real.	33
4. Cuantificación de progesterona plasmática.	33
5. Morfometría de las crías.	34
6. Morfometría de las placentas.	34
7. Procesamiento y tinción histológica.	35
8. Análisis Estadístico.	36

VII. RESULTADOS	37
1. Duración de la gestación.	37
2. Cuantificación de progesterona plasmática.	37
3. Características morfométricas de las placentas.	39
4. Anatomía de las placentas.	41
5. Características morfométricas de las crías al nacimiento	48
6. Características histológicas de los cotiledones	50
VIII. DISCUSIÓN	55
IX. CONCLUSIÓN	61
X. LITERATURA CITADA	62

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Características morfométricas de las placentas de borrego doméstico, Cimarrón y su híbrido.	40
Cuadro 2. Características morfométricas de los cotiledones de las placentas de gestaciones domésticas, Cimarrón e híbridas.	41
Cuadro 3. Longitud cráneo-caudal, craneal, caudal y de las extremidades de borregos domésticos, híbridos y Cimarrón al nacimiento	49
Cuadro 4. Número de células binucleadas, vasos sanguíneos y sus respectivos diámetros en los cotiledones de las placentas de borrego doméstico, híbrido y Cimarrón	51

Lista de figuras

Figura 1. División en cuadrantes de las placentas, y medidas de largo y ancho.	35
Figura 2. Diámetro de los cotiledones.	35
Figura 3. Perfil de progesterona plasmática a partir de la semana siete (día 45) de borregas gestantes con borrego doméstico e híbrido (doméstico x Cimarrón).	38
Figura 4. Perfil de progesterona plasmática a partir de la semana siete (día 45) de borregas gestantes con borrego doméstico e híbrido con crías únicas y gemelares.	39
Figura 5. Fotografía de placenta de borrego doméstico.	42
Figura 6. Fotografía de placenta de borrego doméstico que presenta al cuerno no gestante.	43
Figura 7. Fotografía de placenta de borrego doméstico.	43
Figura 8. Fotografía de placenta de borrego doméstico.	44
Figura 9. Fotografía de placenta de borrego Cimarrón.	44
Figura 10. Fotografía de placenta de borrego Cimarrón.	45
Figura 11. Fotografía de placenta de borrego Cimarrón.	45

Figura 12. Fotografía de placenta de borrego Cimarrón.	46
Figura 13. Fotografía de placenta de borrego híbrido (doméstico x Cimarrón).	46
Figura 14. Fotografía de placenta de borrego híbrido (doméstico x Cimarrón).	47
Figura 15. Fotografía de placenta de borrego híbrido (doméstico x Cimarrón).	47
Figura 16. Peso de las crías al nacimiento.	48
Figura 17. Fotografía de borregos híbridos y domésticos.	49
Figura 18. Fotografía de una cría de borrega Cimarrón y de la madre acicalándola inmediato al parto y cría con más tiempo de nacido.	50
Figura 19. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en cotiledón de borrego doméstico.	52
Figura 20. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en cotiledón de borrego doméstico.	52
Figura 21. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en placenta de borrego Cimarrón.	53
Figura 22. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en placenta de borrego Cimarrón.	53
Figura 23. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en placenta de borrego híbrido (doméstico x Cimarrón).	54
Figura 24. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en placenta de gestación híbrida (doméstico x Cimarrón).	54

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a las personas que han hecho que los momentos difíciles sean vistos como oportunidades. Pero en especial a dos personas que me han impulsado a seguir adelante: mi amada esposa Ximena y a nuestra hermosa bebita Rebeca.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar gracias a Dios por la hermosa oportunidad de haber realizado esta Maestría, porque siempre me sostuvo y me dio fortaleza en los tiempos de tribulación.

Agradezco el apoyo de mi esposa Ximena sobre todo su paciencia y a ese hermoso regalo de Dios que es Rebeca, gracias hija porque me enseñas a ser mejor cada día. También agradezco el gran apoyo de mis padres José y Martha, y de mi hermano Agustín, porque siempre estuvieron al pendiente de mí.

Quiero agradecer al Dr. Carlos González-Rebeles quien me enseñó más que solo conocimientos, me enseñó a ser mejor persona.

Agradezco al Dr. Octavio Mejía por la oportunidad de formar parte de este gran proyecto, al Dr. Fernando Gual por su apoyo y al Dr. Mario Pérez por su paciencia para conmigo, además de la amistad que me brindo y de las enseñanzas que jamás olvidaré. También a mi Maestro Fernando Borderas, por su gran apoyo, su amistad y sus sabios consejos.

Se agradece al Técnico en histología Francisco López López, adscrito al Laboratorio de Investigación en Biología Tisular de la Reproducción "Rosa Emilia Lavielle" del depto. de Morfología de la FMVZ-UNAM, el apoyo brindado en el procesamiento de los tejidos utilizados en esta tesis y al MVZ Santiago Aja Guardiola, profesor titular adscrito al depto. de Morfología de la FMVZ-UNAM, el apoyo y asesoría brindada para la preparación de las placentas utilizadas en la parte del estudio anatómico de esta tesis.

Agradezco el apoyo a la Dirección General de Zoológicos de la Ciudad de México y al Zoológico de Chapultepec "Alfonso L Herrera" de la Ciudad de México por el apoyo brindado en la recolección de semen y la recuperación de las placentas de Cimarrón y en especial al M en C Saúl Soto y a la Dra. Xóchitl Ramos.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada durante este posgrado (219148/207369).

Se agradece al PAPIIT por el financiamiento al proyecto IN217209-3

RESUMEN

El objetivo en este trabajo es utilizar una gestación interespecie de borregas domésticas (*Ovis aries*) inseminadas con borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*), como modelo para conocer y describir algunas interacciones materno fetales, a través del monitoreo de las concentraciones de progesterona y de la descripción de la morfología e histología placentarias. Con este propósito se usaron 7 borregas domésticas inseminadas con semen de Cimarrón y 5 borregas domésticas con semen de doméstico. A partir del día 45 de la gestación se obtuvieron muestras de sangre para la cuantificación de progesterona; al parto las crías se pesaron y midieron así como las placentas respectivas; se obtuvo el número, peso y diámetro los cotiledones y algunos cotiledones se fijaron para su estudio histológico. Algunas placentas se trataron con resina MF300 para apreciar su vascularización. También se pudieron obtener medidas morfométricas de dos crías de borrego Cimarrón y tres placentas. Se encontró mayor concentración de progesterona en las borregas con crías domésticas a partir de la semana 17 en comparación con las de crías híbridas ($P < 0.05$), el largo de las placentas, el peso y diámetro de los cotiledones fue menor en las placentas de crías híbridas comparadas con los otros dos grupos ($P < 0.05$), de manera cualitativa se observó menor grosor y vacularización en las placentas de las crías híbridas en comparación con los otros dos grupos, además de que la crías híbridas presentaron un menor tamaño y peso en comparación con las crías domésticas ($P < 0.05$) y se encontró un menor número de células binucleadas en las microfotografías del grupo de borregos híbridos comparación con los grupos doméstico y Cimarrón ($P < 0.05$), por lo que podemos concluir que las características morfométricas de las placentas y de las crías híbridas fueron diferentes a las de borrego doméstico y Cimarrón, por lo que suponemos que las diferencias en las gestaciones interespecie tuvieron un efecto en la función placentaria que se pudo haber reflejado en las características morfométricas de las crías y posiblemente en la secreción de progesterona.

ABSTRACT

The aim in this work is to use a gestation interspecies of domestic sheep (*Ovis Aries*) inseminated with bighorn sheep (*Ovis canadensis*), like a model to know and to describe some fetal-maternal interactions, through monitoring of the progesterone concentrations and the description of the placental morphology and histology. With this propose were used 7 domestic ewes inseminated with semen of bighorn sheep and 5 domestic ewes with semen of domestic sheep. As of day 45 of the pregnancy blood samples for the quantification of progesterone were obtained; to the afterbirth the lambs weighed and measured as well as the respective placental; obtained the number, weight and diameter cotyledons and some cotyledons were fixed for their histological study. Some placentas were dealt with resin MF300 to appreciate their vascularization. Also morphometrics measures of two lambs of bighorn sheep and three placental could be obtained. Was greater concentration of progesterone in the ewes with domestic lambs as of week 17 in comparison with those of hybrid lambs ($P < 0,05$), the length of the placental was smaller like the weight and diameter of cotyledons in the placental hybrid lamb compared with the others two groups ($P < 0,05$), of qualitative way was observed minor thickness and vascularization in the placental of the hybrid lamb in comparison with the others two groups, in addition the hybrid lambs presented a so minor large and weight in comparison with the domestic lambs ($P < 0,05$) and was a smaller number of binucleates cells in the photomicrographs of group of hybrid lambs in comparison with the groups domestic and bighorn sheep ($P < 0,05$), reason why we can conclude that the morphometrics characteristics of the placental and the hybrid lamb were different from those from domestic and bighorn sheep, reason why can suppose that the differences of the interspecific pregnancies had an effect in the placental function that could possibly have been reflected in the morphometrics characteristics of the lambs and the progesterone secretion.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de técnicas de reproducción asistida, como lo son la inseminación artificial y la transferencia de embriones en fauna silvestre, han sido contempladas por diferentes autores como herramientas para su conservación (Bennett y Foster, 1985; Bunch y Workman 1991; Coonrod et al., 1994; Lasley et al., 1994; Cognie, 1999).

En cuanto a la transferencia de embriones, en diversos estudios se han transferido dentro de un mismo género, embriones de una especie silvestre amenazada o en peligro de extinción a receptoras domésticas o de otra especie que no lo está. Por ejemplo, de cebras (*Equus burchelli*) y caballos Przewalskii (*E. przewalskii*) a yeguas (*E. caballus*) y burras (*E. assinus*) domésticas; de Gaur (*Bos gaur*) a vacas domésticas (*Bos taurus*); o de Bongo (*Tragelaphus euryceros*) a Eland (*Tragelaphus oryx*) (Stover et al., 1981; Bennett y Foster, 1985; Dresser et al., 1985; Fernández et al., 1999). A este tipo de gestaciones entre diferentes especies de un mismo género, se les conoce como gestaciones interespecie o interespecíficas (Santiago et al., 2001). También se ha propuesto el uso de hembras híbridas como receptoras de los embriones de la especie amenazada (Anderson, 1988; Coonrod et al., 1994; Lasley et al., 1994; Santiago et al., 2001; Mejía et al, 2008; Folch et al., 2009).

En la actualidad existen abundantes ejemplos de gestaciones interespecíficas, pero estas gestaciones híbridas tan solo representan algunos éxitos ocasionales ya que las barreras naturales, o los mecanismos de aislamiento impiden la fertilización o un desarrollo viable del producto (Anderson, 1988). Además, una limitante de los estudios sobre la gestación es la dificultad para realizar muestreos sin comprometer la integridad del producto y/o de la madre (Santiago et al., 2001).

El uso de metodologías poco invasivas, como la cuantificación de las concentraciones de hormonas como la progesterona, permite obtener información sobre la fisiología de la gestación. A su vez, la morfometría y la histología de la

placenta facilitan la descripción detallada de sus estructuras en diferentes especies (Hansen, 1998; Geres *et al.*, 2000; Strmsnik *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 2003; Schmidt, 2005).

Dentro de las determinaciones de hormonas durante la gestación, la concentración de progesterona puede ser un indicador confiable de un exitoso reconocimiento y mantenimiento de la gestación, así como del adecuado desarrollo del embrión; ya que esta hormona juega un papel esencial en el control de la secreción de nutrientes por la madre, así como en la producción de los factores de crecimiento y de los factores inmunosupresores que son requeridos por el producto (Hamon y Heap, 1990; Hansen, 1998; Wallace *et al.*, 2003). Desde hace ya varios años es común el medir las concentraciones de hormonas en sangre, mediante técnicas de inmunoensayo enzimático como el radioinmunoanálisis (RIA), ya que da una perspectiva del comportamiento hormonal en las diferentes etapas reproductivas de los animales (Taylor *et al.*, 1982; González, 1998; Santiago *et al.*, 1999).

En la gestación, la placenta es el órgano que transporta nutrientes y productos de desecho, y permite el intercambio gaseoso entre la madre y la cría. Facilita la producción y secreción de hormonas, la expresión de factores que evitan el rechazo inmunológico y forma una barrera protectora para el producto. Por consecuencia, un desarrollo óptimo en la formación de la placenta es esencial para el desarrollo y sobrevivencia del producto (Taylor *et al.*, 1982; Hamon y Heap, 1990; Challis, 1998; Hansen, 1998; Santiago *et al.*, 1999; Riley *et al.*, 2000; Battaglia y Regnault, 2001; Wallace *et al.*, 2003; Schmidt, 2005).

El uso de técnicas que describan la morfología y la histología del desarrollo de la placenta, son herramientas importantes para entender la fisiología reproductiva, la comunicación madre-placenta-feto, y la interacción inmunológica de la placenta con el ambiente uterino. Dentro de estas técnicas se encuentran los estudios morfométricos e histológicos de la placenta, con los cuales se ha obtenido, por ejemplo, información acerca de su angiogénesis, así como de la importancia de ésta en el intercambio gaseoso y nutricional. El empleo de estas

técnicas permite observar durante la gestación, algunos mecanismos fisiológicos de adaptación ante situaciones estresantes, y facilita la búsqueda de factores de crecimiento o inmunológicos, que intervienen en el desarrollo y crecimiento de la placenta (Poitras *et al.*, 1986; Krebs *et al.*, 1997; Peninga y Longo, 1998; Sharkey, 1998; Krajnlaakova *et al.*, 1999; Reynolds y Palmer, 2001; Wlison, 2001; Miles *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2005; Parraguez *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2006).

Se conoce que una de las principales consecuencias de un inadecuado desarrollo placentario es la disminución en el peso del feto, ya que el aporte nutricional y de oxígeno se ven a su vez reducidos (Reynolds *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006). La insuficiencia placentaria en ovejas ha sido asociada con una depresión substancial en el crecimiento cardiaco del feto, debida a la supresión en la proliferación y maduración de los cardiomiocitos (Louey *et al.*, 2007).

Particularmente en gestaciones interespecies, se ha informado que los embriones son usualmente tolerados en el ambiente uterino durante el estadio de blastocisto. Después de este grado de desarrollo, la mortalidad embrionaria que se presenta puede ser un indicador de la importancia de las células placentarias y de su interacción con el endometrio materno para lograr un exitoso mantenimiento de la gestación (Anderson, 1988).

Una característica en la placentación de los rumiantes, es que el sincitiotrofoblasto se distingue por la presencia de células binucleadas, que migran hacia la superficie apical del trofoblasto y se unen con las células del epitelio uterino (Wooding, 1980; Galan *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2006; Braun *et al.*, 2007). De estas células se deriva el lactógeno placentario y la prolactina relacionada a la proteína 1 (PRP-1), las cuales son miembros de la familia de las hormonas de crecimiento. Un segundo grupo de proteínas derivadas de las células binucleadas, son las glucoproteínas asociadas a la gestación (PAG) (Galan *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2007). En las células binucleadas del cotiledón, se ha localizado específicamente la enzima endotelial óxido nítrico sintetasa (eNOS), la cual sintetiza el óxido nítrico usado como un

potente vasodilatador (Galan *et al.*, 2001). Las células binucleadas, forman entre un 15-20% de las células del trofodermo ovino, pero su número decrece conforme se acerca el final de la gestación (Penninga y Longo, 1998). Al parecer, este tipo de células tienen las funciones primarias de formar el sincitio trofoblasto necesario para la implantación y el crecimiento del placentoma, así como la producción y liberación de proteínas y de hormonas esteroideas (Borowicz *et al.*, 2007; Sammin *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo describe algunos de los fenómenos indispensables para el mantenimiento y desarrollo de la gestación, con la finalidad de determinar si las hibridaciones, producto de una gestación interespecífica entre borregos domésticos y silvestres, pueden ser consideradas en la conservación de una especie como el borrego Cimarrón.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Taxonomía de los borregos

Los borregos domésticos (*Ovis aries*) y silvestres son considerados como mamíferos ungulados pertenecientes al orden *Artiodactyla*, a la familia *Bovidae* y al género *Ovis* (Wilson y Reeder, 1993). Sin embargo, debido a que la taxonomía de los borregos silvestres es aún confusa y controversial, no se puede precisar cuál o cuáles de las numerosas especies silvestres pudieron ser el ancestro común para algunos ovinos silvestres o domésticos; o cuáles de manera particular, han contribuido a la formación de alguna raza determinada, en el caso de los domésticos. Es más, aún entre algunos ovinos silvestres que se encuentran hoy en día, no se ha podido determinar a detalle las relaciones filogenéticas que existen entre ellos. Esto se debe principalmente a que a lo largo del tiempo se ha considerado la existencia de un diferente número de especies y subespecies silvestres, tanto en Europa, Asia y América (Gutierrez-Espeleta *et al.*, 2000; Hiendleder *et al.*, 2002; Bunch *et al.*, 2006).

Así, existían clasificaciones taxonómicas basadas únicamente en datos morfológicos, otras que consideraron también el número cromosómico y la distribución geográfica, y otras mucho más recientes y precisas que utilizan además análisis moleculares para establecer la cercanía filogenética, a partir del estudio de secuencias de DNA mitocondrial (Gutierrez-Espeleta *et al.*, 2000; Hiendleder *et al.*, 2002; Bunch *et al.*, 2006).

Dentro de las clasificaciones que han sido más utilizadas, estaría la propuesta por Vorontsov *et al.*, (1972) (citado en: Hiendleder *et al.*, 2002), quienes reconocieron de acuerdo con la morfología cuatro especies silvestres con diferentes subespecies, entre las que se encontrarían los *Ovis musimon*; los *Ovis vignei bochariensis* y *Ovis vignei arka*; los *Ovis ammon ammon*, *Ovis ammon darwini*, *Ovis ammon nigrimontana* y *Ovis ammon collium*; así como una doméstica denominada *Ovis aries*. Nadler *et al.*, (1973) (citado en: Hiendleder *et*

al., 2002) basaron su clasificación de los ovinos silvestres en el número cromosómico y la distribución geográfica, reconociendo únicamente cuatro especies; los denominados Muflones de Europa y Asia, que abarcaba a los *Ovis musimon* y a los *Ovis orientalis* ($2n=54$); los asiáticos Urial ($2n=58$), incluyendo a todos los considerados como *Ovis vignei*; los también asiáticos Argali ($2n=56$), con todos los *Ovis ammon*; y una última que abarcaba a los de ambos extremos del estrecho de Bering (Anfiberingeos) denominada Dall ($2n=54$), que contemplaba a los *Ovis dalli* y a los *Ovis canadensis* del norte de América y a los asiáticos *Ovis nivicola*. Posteriormente se demostraría que el número cromosómico del *Ovis nivicola* era diferente ($2n=52$) (Korobystina et al., 1974 citado en: Hiendleder et al., 2002). En 1991 Geist reagrupó a los ovinos silvestres en seis especies, entre las cuales se encontraban los *Ovis vignei*, *Ovis orientalis*, *Ovis ammon*, *Ovis nivicola*, *Ovis dalli* y *Ovis canadensis* (Hiendleder et al., 2002; Bunch et al., 2006).

A pesar de la diferencia en el número de cromosomas, muchas especies del género *Ovis* han podido hibridarse de forma natural en donde se traslapan sus hábitats, así como en cautiverio y producido crías fértiles (Hiendleder et al., 2002). Así, existen zonas naturales en el norte y sureste de Irán, donde se encuentran individuos híbridos Muflón x Urial, con números intermedios de 55 a 57 cromosomas. Estos datos se han interpretado como soporte de una especie única Mufloniforme, denominada *Ovis orientalis*, que abarcaría a las poblaciones silvestres de Muflones y Urial. Por eso, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN), esencialmente ha adoptado la clasificación de sólo tres especies para los borregos silvestres de Europa y Asia, las cuales serían los *Ovis orientalis*, los *Ovis ammon* y los *Ovis nivicola* (Hiendleder et al., 2002).

El borrego Cimarrón presenta el mismo número de cromosomas ($2n=54$), que el borrego doméstico (*Ovis aries*), el borrego Muflón (*Ovis musimon*), el borrego Rojo Armenio (*Ovis orientalis*) y el borrego Dall (*Ovis dalli*) (Delgadillo et al., 2003). Particularmente en el caso del borrego Cimarrón, clasificado como *Ovis canadensis*, se han considerado seis subespecies, basadas principalmente en

mediciones craneales. Así, Cowan en 1940 (citado en: Gutierrez-Espeleta *et al.*, 2000) propuso la existencia de las siguientes subespecies: la de las Montañas Rocosas (*Ovis canadensis canadensis*), la de California (*Ovis canadensis californiana*), y las cuatro subespecies desérticas *Ovis canadensis nelsoni*, *Ovis canadensis mexicana*, *Ovis canadensis cremnobates* y *Ovis canadensis weemsi*.

Sin embargo, es posible que para el manejo y la conservación del borrego Cimarrón se deban reconsiderar esta clasificación, ya que Gutierrez-Espeleta *et al.*, (2000) examinaron la morfometría craneal, el DNA mitocondrial y la variación en algunas aloenzimas, encontrando una variación genética baja y por tanto la inexistencia de diferencias significativas entre las cuatro subespecies desérticas. Por lo cual sugirieron que estas cuatro subespecies podrían ser reconocidas como una sola subespecie politépica, la cual denominaron *Ovis canadensis nelsoni*.

1.2 Estudios genéticos evolutivos en la placentación de los mamíferos

Elliot y Crespi (2006) han aportado evidencia de una marcada inhabilidad en los mamíferos para evolucionar en híbridos, se puede relacionar en gran parte por el grado de invasividad que presente su placenta. Los mamíferos con placentaciones poco invasivas como la sindesmocorial y la epiteliocorial, tienen menor habilidad para desarrollar gestaciones híbridas, en comparación con aquellos mamíferos que tienen una placentación invasiva como la hemocorial. Elliot y Crespi (2006) sugieren que la respuesta inmune materna es suprimida en mayor grado en los animales que presentan placentación invasiva, en comparación con los animales que tienen placentación poco invasiva. También el tipo de placentación poco invasiva, ha sido asociada con un fuerte incremento en la regulación a la baja de la respuesta inmune adaptativa antígeno-específico, a favor de la respuesta inmune innata inflamatoria y con ello, la reducción en la superficie de la placenta de la expresión del antígeno del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

1.3 Uso de híbridos como herramienta para la conservación de especies en peligro de extinción

En diversos estudios, se han transferido dentro de un mismo género, embriones de una especie silvestre amenazada o en peligro de extinción, a receptoras de otra especie con inventarios estables o en crecimiento, o a su contraparte doméstica. Por ejemplo, de cebras (*Equus burchelli*) y caballos Przewalskii (*E. przewalskii*) a yeguas (*E. caballus*) y burras (*E. assinus*) domésticas; de Gaur (*Bos gaurus*) a vacas domésticas (*Bos taurus*); o de Bongo (*Tragelaphus euryceros*) a Eland (*Tragelaphus oryx*) (Stover *et al.*, 1981; Bennett y Foster, 1985; Dresser *et al.*, 1985; Fernández *et al.*, 1999). A este tipo de gestaciones entre diferentes especies de un mismo género, se les conoce como gestaciones interespecie o interespecíficas (Santiago *et al.*, 2001).

El desarrollo de la transferencia de embriones en diversas especies de fauna silvestre, se ha visto limitada por la inexistencia de receptoras compatibles (Elliot y Crespi, 2006). En el caso de especies dentro del género *Ovis*, cuya duración de la gestación es similar, por ejemplo entre Muflones (*Ovis musimon*) y borregas domésticas (*Ovis aries*), con gestaciones de 153 días y 149 días respectivamente, se han obtenido crías viables mediante la transferencia de embriones de muflón a domésticas (Garde *et al.*, 1995). También se ha logrado la producción de crías de borrego Rojo Armenio (*Ovis orientalis*), mediante la fertilización *in vitro* y la transferencia de los embriones a ovejas domésticas (Coonrod *et al.*, 1994). En cambio, en especies con gestaciones de diferente duración como serían los borregos Dall (*Ovis dalli*), cuya gestación dura en promedio 175 días, la transferencia de sus embriones a ovejas domésticas resultó en un primer ensayo en diagnósticos negativos de gestación, mientras que en un trabajo posterior la transferencia a las mismas receptoras, terminó con muertes embrionarias tempranas y pérdidas fetales, durante diferentes etapas de la gestación (Buckrell *et al.*, 1990). Por este motivo se ha propuesto el uso de

hembras híbridas como receptoras de los embriones de la especie amenazada (Anderson, 1988; Coonrod *et al.*, 1994; Lasley *et al.*, 1994; Folch *et al.*, 2009).

Estas gestaciones interespecíficas son modelos útiles para estudiar los mecanismos que permiten la sobrevivencia fetal, y también pueden ser usados para la conservación de especies en peligro de extinción (Anderson, 1988).

2 Características reproductivas del borrego doméstico y Cimarrón.

En cuestión reproductiva las borregas domésticas son poliéstricas estacionales, lo que significa que presentan varios celos durante una temporada del año y por tanto, una época de anestro o descanso sexual. Esta estacionalidad se rige principalmente por el fotoperiodo; la actividad estral inicia durante la época en la cual la duración de las horas luz del día son decrecientes. Otros factores que influyen son la raza y la nutrición (Hafez, 2002; Rosa y Bryant, 2003).

Las variaciones en el periodo de monta conciernen a ambos sexos. Sin embargo las variaciones en la actividad conductual y hormonal es menor en los machos que en las hembras. Mientras que en los machos la espermatogénesis y la actividad sexual no se detienen, en las hembras la ovulación y el ciclo estral se manifiesta durante periodos variables (Rosa y Bryant, 2003).

En la mayoría de las ovejas las fases del ciclo estral tienen una duración aproximada de dos días de proestro, entre uno y dos días de estro y la ovulación aproximadamente entre las 24 y 36 horas de iniciado el estro, tres días de metaestro y 10 días de diestro. Teniendo entonces el ciclo estral completo una duración promedio de 17 días, mientras que la gestación presenta 147 días en promedio (Hernández y Fernández, 1999; Hafez, 2002; Delgadillo *et al.*, 2003).

En el borrego Cimarrón no se conoce la edad exacta de la madurez sexual, aunque se ha reportado que los machos, con edades de entre seis y 17 meses, son fértiles. Estudios de natalidad y mortalidad en hembras Cimarrón sugieren que con un mínimo de 18 meses de edad, son capaces de mantener una gestación.

Aunque es común observar apareamientos de machos maduros con hembras menores de 18 meses, dichas observaciones sugieren que hembras menores a esta edad poseen suficientes hormonas para manifestar un comportamiento reproductivo de estro, pero que el nivel hormonal es insuficiente para iniciar la ovulación o mantener una gestación (Monson y Summer, 1990).

Hasta el momento no se conocen con detalle las fases del ciclo estral de las hembras de borrego Cimarrón (Monson y Summer, 1990). Se sabe que el ciclo estral es de alrededor de 28 días; y el comportamiento receptivo que es característico del estro, tiene una duración aproximada de 48 horas. El periodo de la gestación es de aproximadamente 179 días (Turner y Hansen, 1980; Shackleton *et al.*, 1984; Monson y Summer, 1990; Delgadillo *et al.*, 2003). Las borregas Cimarrón paren principalmente una sola cría, los partos gemelares son objeto de muchas conjeturas. Se ha observado en vida libre dos corderos que son criados por una misma hembra, pero no existe literatura que ofrezca datos que confirmen dicha versión. Naturalmente los partos gemelares pueden ocurrir en vida libre, pero este es un fenómeno poco frecuente (Monson y Summer, 1990; Shoenecker, 2004).

La gestación es un proceso muy complejo que se inicia a partir de la fusión del gameto femenino con el masculino, lo que da lugar a la formación de un cigoto. Tras divisiones celulares repetidas, y durante su transporte a lo largo del oviducto a la cavidad uterina, se transforma en un blastocisto el cual se caracteriza por un acúmulo de líquido en una cavidad llamado blastocele, además de una pared de epitelio simple llamado trofoblasto. Después ocurrirá el desarrollo embrionario y fetal, todo esto dentro del útero (Catchpole 1991; Sharkey, 1998; Hafez, 2002).

2.1 Participación de las citocinas endometriales en la implantación embrionaria

El proceso de implantación en los animales domésticos inicia durante el estadio de blastocisto. Guillomont (1995) ha propuesto diferentes fases en el proceso de implantación que incluyen:

- 1) Pérdida de la zona pelúcida
- 2) Pre-contacto y orientación del blastocisto
- 3) Aposición
- 4) Adhesión
- 5) Invasión endometrial. Sin embargo esta última etapa no ocurre en los rumiantes (Guillomont, 1995; Spencer *et al.*, 2004).

Pérdida de la zona pelúcida. El embrión entra al útero en estadio de mórula en el día 4 de gestación, para el día 6 el blastocisto se forma y la zona pelúcida se pierde entre los días 8 y 9. La pérdida de la zona pelúcida al parecer se logra por la ruptura y la salida del blastocisto, debido al crecimiento de éste, así como por la lisis que originan algunas proteasas uterinas y embrionarias (Spencer *et al.*, 2004).

Pre-contacto y orientación del blastocisto. El blastocisto parece ser posicionado e inmovilizado después de la pérdida de la zona pelúcida, y entre el día 9 al 14 no se observa contacto celular entre el trofoectodermo y el epitelio endometrial. La orientación del blastocisto no es al azar, representa una constante biológica en muchas especies, y el blastocisto se posiciona en la parte central del cuerno uterino en especies caracterizadas por una larga expansión de las membranas embrionarias, como es el caso de los ovinos (Spencer *et al.*, 2004). En el día 11 la forma esférica o ligeramente tubular del blastocisto, comienza a elongarse hasta una longitud de 25 cm o más, hasta el día 17. El embrión se localiza primero en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, se elonga hasta ocupar el cuerno contralateral en el día 13, y puede llenar más de la mitad de su longitud para el día 17 cuando ha ocurrido una sola ovulación. La elongación del

blastocisto es un mecanismo crítico para el desarrollo y regulación de la secreción del Interferón tau (INF τ) (Spencer *et al.*, 2004; Sammin *et al.*, 2008).

Aposición. La aposición del embrión envuelve al trofoectodermo, el cual se asocia estrechamente con el epitelio endometrial, seguido de una adhesión inestable. Después del día 14, la forma filamentosa del embrión parece ser inmovilizada en el lumen uterino. La elongación del blastocisto se mantiene en estrecho contacto con el epitelio endometrial y la aposición es acompañada de una reducción de las microvellosidades apicales que cubren el trofoectodermo. Esta reducción ocurre entre los días 13 a 15 en el caso de los embriones de ovejas. La aposición del blastocisto es asegurada por una interdigitación entre las proyecciones citoplasmáticas de las células del trofoectodermo y las microvellosidades del epitelio uterino. En la oveja, la aposición ocurre muy cerca a las células de la masa interna (Spencer *et al.*, 2004).

Adhesión. En día 16 el trofoblasto empieza por adherirse firmemente al epitelio endometrial. La interdigitación del trofoectodermo y el epitelio endometrial, ocurre tanto en las áreas carunculares como en las intracarunculares. Posteriormente, la adhesión del trofoectodermo en el epitelio endometrial progresa a lo largo del cuerno uterino y parece completarse alrededor del día 22 (Spencer *et al.*, 2004).

Para que la implantación se efectúe con éxito, son indispensables dos factores: la producción de un blastocisto capaz de implantarse y al mismo tiempo el desarrollo del endometrio y que éste sea capaz de recibirlo. (Sharkey, 1998; Viganò *et al.*, 2003; Betancourt *et al.*, 2006).

La regulación de estos dos factores está principalmente a cargo de las hormonas esteroides ováricas: estrógenos y progesterona. Después de la fijación del embrión, empieza un proceso por el cual el endometrio se prepara para el desarrollo de la placenta. Los factores involucrados en esta conversación entre el embrión y el endometrio incluyen prostaglandinas, leucotrienos, factores de crecimiento y citocinas (Sharkey, 1998; Viganò *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2004; Betancourt *et al.*, 2006).

En condiciones normales el embrión expresa antígenos paternos, pero éste no es rechazado por el sistema inmunológico de la madre. Estudios en ratones y humanos han demostrado que los mecanismos inmunomoduladores están presentes durante el periodo perimplantación. El embrión escapa de la destrucción por células efectoras del sistema inmunológico, primero por la expresión atípica del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), en donde la HLA-G protege la invasividad del trofoblasto contra el ataque de los linfocitos citotóxicos y las células NK (Vigano *et al.*, 2003; Betancourt *et al.*, 2006).

En los ovinos se ha observado la participación de IGF-I e IGF-II y sus respectivos receptores, los cuales se han localizado en el endometrio y en el embrión. Se conoce que IGF-I estimula el crecimiento del embrión durante su transporte por el oviducto, mientras que IGF-II participa en el desarrollo placentario (Betancourt *et al.*, 2006). En los equinos se ha visto que el IGF-II participa en la implantación y en la placentación; mientras que la proteína unidora de IGF 3 (IGFBP3), se expresa a partir del día 10 de la gestación, siendo al parecer su principal función la de agrandar al embrión equino (Betancourt *et al.*, 2006).

En los rumiantes el interferón-tau (IFN- τ), conocido también como trofoblastina o proteína trofoblástica-1 (TP-1), se ha considerado como la molécula encargada de emitir las señales de reconocimiento de la gestación, ya que actúa de manera paracrina en el epitelio del endometrio y en el epitelio glandular, inhibiendo la transcripción de los genes de receptores hacia estrógenos y oxitocina *in vivo*, lo que previene la luteólisis. El pico de expresión de esta molécula en la oveja, se da justamente dos días antes de que se lleve a cabo la implantación. Además, el IFN- τ inhibe la proliferación celular y también exhibe un efecto antiviral (Catchpole, 1991; Guillomont, 1995; Spencer *et al.*, 2004; Betancourt *et al.*, 2006; Sammin *et al.*, 2008), mientras que *in vitro*, se ha observado que estimula la secreción endometrial de PGE (Weems, 2007). También se ha observado que la progesterona es necesaria para el funcionamiento del IFN- τ , ya que actúa de manera conjunta para generar una acción antiluteolítica al estimular también la síntesis de dicha proteína (Betancourt *et al.*, 2006).

Dentro de los mecanismos que permiten el desarrollo de la gestación encontramos una amplia red de moléculas conocidas como citocinas. Se sabe que las citocinas comprenden un componente primario en la comunicación y señalización entre células uterinas, incluyendo a los leucocitos residentes, a las células epiteliales, endoteliales y estromales, y al *conceptus*. Dentro de este papel interlocutor de las citocinas, no sólo está el de la inmunidad local, sino que se extiende a procesos de remodelación para lograr el desarrollo adecuado del *conceptus* (Robertson y Seamark, 1994).

Se ha observado que citocinas asociadas con el crecimiento y sobrevivencia fetal, son miembros de la familia de Linfocitos Th2, mientras que las citocinas asociadas con la limitación del crecimiento e identificadas como deletéreas para la gestación, son miembros de la familia de linfocitos Th1 (Robertson y Seamark, 1994, Challis, 1998; Sammin *et al.*, 2008). Las células cebadas o mastocitos son células que se encuentran regularmente en los procesos inflamatorios, su producción está controlada por la acción de la Interleucina 9 (IL-9), reforzada por la IL-3. La IL-9 es producida especialmente por los linfocitos Th2. Los mediadores liberados por los mastocitos producen vasodilatación e incremento en la permeabilidad vascular (Tizard, 2002; Rojas, 2007).

La gestación representa una paradoja inmunológica, ya que el producto se puede considerar como un aloinjerto, pero que no es rechazado (Anderson, 1988; Bainbridge, 2000; Elliot y Crespi, 2006), ya que a pesar de que el sistema inmune necesita ser modulado para evitar el rechazo del embrión, también debe estar activo para crear un ambiente estéril en donde se llevará a cabo la gestación (Anderson, 1988; Bainbridge, 2000).

El ovario y la placenta regulan a la baja la activación del sistema inmune lo suficiente para permitir la propagación de la unidad feto-placenta en el ambiente uterino. Esta carencia de rechazo inmunológico de la unidad feto-placenta, por parte de la madre es de crucial importancia para la sobrevivencia de las crías (Siiteri y Stites, 1982; Bainbridge, 2000, Rojas, 2007).

La placenta juega un papel importante en mantener el feto. Esto se observó en un estudio realizado sobre la gestación de una cría híbrida, entre una cabra y una oveja, donde el trofoblasto de la gestación híbrida tuvo una deficiencia en la habilidad para mantener una respuesta inmunosupresiva en el ambiente de la interfase feto- materno, existiendo una infiltración excesiva de linfocitos, lo que lleva a la muerte fetal (Roth *et al.*, 1991). Al final de la gestación y durante el proceso del parto, se va perdiendo esta tolerancia inmunológica debido a la disminución de la influencia hormonal que mantenía al aloinjerto. Durante estos procesos existieron diversos mecanismos de retroalimentación positiva, y una interacción endocrina, paracrina y autocrina en la unidad feto-placenta-materna (Siiteri y Stites, 1982).

2.2 Aspectos de la placentación en rumiantes

La placenta es un conjunto de capas celulares que separan la sangre materna de la sangre fetal, en la que se reconoce una estructura bimodal formada por la placenta fetal y la placenta uterina. El feto y la placenta juntos se conocen como *conceptus*. El correcto desarrollo de la placenta en los mamíferos es crítico para determinar la disponibilidad de nutrientes en el desarrollo del feto, la regulación en el intercambio gaseoso y la remoción de productos de desecho (Battaglia y Regnault, 2001; Reynolds y Redmer, 2003; Miles *et al.*, 2004).

La placenta se caracteriza por un intercambio eficiente de varias sustancias entre la circulación materna y la fetal, que optimiza el crecimiento y el desarrollo del feto. La eficiencia en el intercambio placentario es influenciada por su morfología (Penninga y Longo, 1998; Parraguez *et al.*, 2006; Sammin *et al.*, 2008). La placenta es bien conocida por su adaptación estructural a ciertos agentes que inducen estrés, lo que le permite realzar su capacidad de intercambio y así optimizar el desarrollo del producto (Penninga y Longo, 1998; Riley *et al.*, 2000; Parraguez *et al.*, 2006). La placenta ovina a término es descrita como alanto-

corionica y amnio-coriónica, con múltiples y separados placentomas, los cuales tienen una interdigitación vellosa (Penninga y Longo, 1998; Sammin *et al.*, 2008).

La placenta en los rumiantes se clasifica de acuerdo con las diferentes características que presenta.

- Criterio anatómico: con base en la forma en la cual se distribuyen las vellosidades del corion.

Cotiledonaria: presenta ramilletes aislados de vellosidades coriónicas ramificadas llamados cotiledones, éstos se unen a eminencias ovales preformadas llamadas carúnculas, y a esta unidad funcional se le conoce con el nombre de placentoma. En los ovinos la forma del placentoma es cóncavo (Schmidt, 2005; Sammin *et al.*, 2008).

- Criterio histológico: basado en el número de membranas que separan al producto de la madre.

Epiteliocorial o sindesmocorial: epiteliocorial debido a que permanecen intactas las tres capas del útero, y sindesmocorial debido a que las células del trofoblasto se fusionan con las células del epitelio uterino. (Penninga y Longo, 1998; Schmidt, 2005; Sammin *et al.*, 2008).

- Según el grado de destrucción de la mucosa uterina.

Adecidua: los componentes fetales se entrelazan con el tejido uterino relativamente intacto, del cual se separa sin mucho quebranto (Schmidt, 2005; Sammin *et al.*, 2008).

- Interdigitación feto-materna.

Vellosa. La placenta se clasifica como vellosa si cada vellosidad y su ramificación es independiente una de la otra (Schmidt, 2005; Sammin *et al.*, 2008).

- Interrelación del flujo sanguíneo materno-fetal.

Sistema corriente cruzada: los capilares maternos y fetales están arreglados de manera que cruzan uno con el otro. La eficacia en la difusión pasiva es mejor que en la forma multivellosa, pero menos eficiente que en la contracorriente (Leiser *et al.*, 1997; Schmidt, 2005).

Sistema contracorriente: los capilares maternos y fetales están arreglados de manera paralela uno del otro pero tienen un flujo opuesto. Para la difusión pasiva éste es el arreglo vascular más efectivo (Leiser *et al.*, 1997; Schmidt, 2005).

El placentoma es la unidad principal de intercambio entre el feto y la madre (Krebs *et al.*, 1997; Peninga y Longo, 1998; Reynolds *et al.*, 2005; Parraguez *et al.*, 2006; Braun *et al.*, 2007). Las características morfológicas de esta unidad se han relacionado a diversos factores, como son: nutrición, altura sobre el nivel del mar, síntesis de hormonas y factores al final de la gestación. Se ha visto que estos cambios en la morfología se han relacionado con las características del producto al nacimiento, principalmente en la ganancia de peso (Krebs *et al.*, 1997; Peninga y Longo, 1998; Parraguez *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2006; Braun *et al.*, 2007). Dentro de las características anatómicas del cotiledón se ha demostrado que el hilio o depresión central tiene una función primordial en el intercambio con la madre, ya que es en esta zona donde se realiza el intercambio vascular y la fagocitosis de los eritrocitos maternos (Burton *et al.*, 1976; Krebs *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 2005; Braun *et al.*, 2007)

2.3 Morfogénesis y función de las membranas fetales

El corión se desarrolla a partir del trofoblasto, el cual se diferencia en una capa interna de células mononucleares (citotrofoblasto) y una capa externa de células multinucleadas (sincitiotrofoblasto) en el cual se desarrollan vellosidades en el exterior. Después se une con el alantoides formando el corioalantoides, que es la estructura que se pone en contacto con el endometrio para formar la placenta fetal (Hernández y Fernández 1999).

El alantoides se constituye del endodermo, cubierto por una capa vascular de mesodermo. El alantoides va creciendo y llenándose de fluidos, poniéndose estrechamente en contacto con el corion. La capa externa del alantoides está muy

vascularizada y en ella se forman las arterias y las venas umbilicales (Hernández y Fernández, 1999)

El amnios está constituido por tejido ectodérmico, originando una vesícula a partir de un pliegue del corion y un saco que rodea completamente al feto. El saco amniótico está lleno de fluido y en él “flota” el embrión, actuando como un mecanismo protector que funciona como amortiguador hidráulico. Otra función importante es evitar que el feto se adhiera a esta membrana, además de funcionar como solución bactericida y líquido lubricante (Hernández y Fernández, 1999).

La vasculogénesis es definida como una diferenciación de novo de las células endoteliales del mesodermo, derivada de precursores llamados angioblastos o hemangioblastos, lo cual representa células endoteliales embrionarias sin organización. Una vez que está formado el angioblasto, comienza a reagruparse y organizarse de forma capilar. Una vez que esta red vascular embrionaria es formada, los nuevos vasos capilares se forman exclusivamente por el proceso de angiogénesis, el cual incluye un proceso de ramificación o bifurcación de los capilares existentes o de las vénulas inmediatas postcapilares (Reynolds y Redmer, 2001; Borowicz, 2007).

El proceso de angiogénesis refiere a la formación de nuevo tejido vascular, y éste es un proceso crítico para el desarrollo y crecimiento normal del producto. La importancia de la circulación placentaria ha sido ampliamente reconocida y se ha relacionado en gran medida con el peso fetal, el tamaño de la placenta, y el flujo uterino y umbilical. La densidad vascular de la placenta materna tiene un crecimiento lento a través de la gestación. En contraste, la densidad vascular de los cotiledones permanece relativamente constante hasta la mitad de la gestación, y se incrementa rápidamente durante el último tercio de la gestación, en asociación con el dramático crecimiento fetal (Reynolds y Palmer 2001). El incremento de la resistencia vascular placentaria puede reducir flujo umbilical y la liberación de nutrientes al feto (Galan, 2001).

Aunque son numerosos los factores implicados en este proceso, en investigaciones recientes realizadas con ratones knockout se han identificado los

principales factores de la regulación angiogénica; entre los que se encuentran el factor de crecimiento endoteliovascular (VEGF) y sus principales receptores tirosina cinasa (FLT1 y KDR), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), la angiopoietina (ANG) y sus receptores (TEK), la óxido nítrico endotelial sintetasa (eNOS) y su receptor óxido nítrico, la gualinato ciclasa soluble (GU-CY1B3), y el factor inductor de hipoxia (HIF1A) (Reynolds y Redmer, 2001; Borowicz *et al.*, 2007).

El VEGF es crítico para la formación vascular y es requerido en la iniciación de la formación de los vasos sanguíneos, tanto en la vasculogénesis como en la angiogénesis. El VEGF induce la proliferación de las células endoteliales, promueve la migración celular e induce la permeabilidad de los vasos sanguíneos. La disrupción en ambos alelos del gen de VEGF en ratones resulta en un pobre desarrollo vascular, y la disrupción de uno solo de los alelos conlleva muerte embrionaria, debido a severas anormalidades vasculares en la placenta y en el producto (Borowicz *et al.*, 2007).

Borowicz *et al* (2007) observaron que la concentración de RNAm del VEGF fue un importante mediador de la angiogénesis, y se encontró mayor cantidad en el lado fetal que en el materno en el último tercio de la gestación (Borowicz *et al.*, 2007). Recientes estudios han reportado que el VEGF y el FGF son los mayores factores de crecimiento en la placenta, gracias a que estas dos familias probablemente cuentan con la mayor actividad unión-heparina por el ovario y por los tejidos placentarios (Reynolds y Palmer 2001). Se ha visto que el VEGF no solo es importante para el desarrollo de la placenta y del endotelio endometrial, sino también para el desarrollo del producto (Reynolds y Palmer, 2001). Tanto el VEGF como el FGF han sido implicados en la estimulación endotelial de la producción de óxido nítrico (Reynolds y Palmer, 2001). En cuanto a los receptores del VEGF, el KDR (VEGFR-2) parece ser el principal mediador de los efectos de VEGF en el crecimiento y la permeabilidad placentaria, mientras que el FLT1 (VEGFR-1) puede tener un papel negativo actuando como señuelo del receptor o

suprimiendo la señalización de KDR (Yancopoulos *et al.*, 2000; Borowicz *et al.* 2007).

En cuanto a la Angiopoietina 1 y 2 (ANGPT1; ANGPT2), se conoce que se unen al mismo receptor TEK con la misma afinidad. La ANGPT1 es requerida para la remodelación, estabilización y maduración del desarrollo de los vasos sanguíneos, y en combinación con VEGF incrementa el diámetro luminal. La elevada expresión del RNAm de la ANGPT1 en la placenta fetal en comparación con la materna, puede contribuir para el desarrollo de una densa y ramificada red capilar en el cotiledón al final de la gestación (Borowicz *et al.*, 2007).

El FGF es un mitógeno y un factor quimiotáctico de las células endoteliales, y también estimula la producción endotelial de colagenasas y plasminógenos. En experimentos *in vitro* se ha demostrado que la señalización de FGF2 contribuye a la formación de vasos sanguíneos, tal como ocurre durante la diferenciación hemangioblástica, la migración y proliferación de las células endoteliales y el ensamblaje capilar durante la vasculogénesis *in vivo*. Además estimula la proliferación de la arteria uterina y de las células endoteliales de las arterias fetales (Reynolds y Palmer, 2001).

También se ha visto que el FGF estimula la diferenciación de las capas embrionarias germinativas, especialmente del mesodermo embrionario. Otro papel del FGF es amplificar la respuesta angiogénica del endometrio en presencia de los tejidos embrionarios, así como en la diferenciación de los tejidos vascular y no vascular derivados del mesodermo (Reynolds y Palmer, 2001).

El factor inductor de hipoxia (HIF1A) es una proteína reguladora, que desencadena una respuesta coordinada de angiogénesis y artereogénesis induciendo la expresión de VEGF, FLT1, KDR, ANGPT2, Tie-1, eNOs y muchos factores más. La hipoxia es un importante estímulo para la expansión de la cama vascular (Penninga y Longo, 1998).

El óxido nítrico (NO) es un mensajero intracelular y es crítico en la modulación local del flujo sanguíneo (Borowicz *et al.*, 2007). La enzima óxido nítrico sintetasa (eNOs) es encontrada en las células endoteliales y éstas

producen óxido nítrico, resultando en la dilatación de los vasos sanguíneos. La eNOs cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina con un óxido nítrico como producto, mientras que el óxido nítrico activa el guanilato ciclasa soluble para producir cGMP, lo que da por resultado la vasodilatación (Galan, 2001).

La enzima óxido nítrico sintetasa ha sido localizada en el sincitiotrofoblasto y en el endotelio vascular en humanos y en ovejas, predomina también en el cotiledón, en donde presenta una concentración 14 veces mayor en comparación con la carúncula (Galan, 2001).

2.4 El papel de las células binucleadas en la fisiología placentaria.

El principal sitio de unión materno fetal es el sincitiotrofoblasto, que en la placenta de los rumiantes se caracteriza por la presencia de células binucleadas. Estas células componen entre un 15 a un 20 % del total de las células, y se forman por división celular pero sin citocinesis, a partir de las células mononucleadas (Braun, 2007). Las células binucleadas migran hacia la superficie apical del trofoblasto y se unen con las células del epitelio uterino (Wooding, 1980; Galan, 2001; Ward et al., 2002; Carvalho et al., 2006; Braun et al., 2007; Sammin *et al.*, 2008). De estas células deriva el lactógeno placentario y la prolactina relacionada a la proteína 1 (PRP-1), las cuales son miembros de la familia de las hormonas del crecimiento. Un segundo grupo de proteínas derivadas de las células binucleadas son las glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG) (Galan, 2001; Ward et al., 2002; Braun et al., 2007; Sammin *et al.*, 2008) además de que se ha localizado específicamente la enzima óxido nítrico sintetasa en estas células. Las células binucleadas se consideran análogas a las células gigantes del citotrofoblasto de las placentas humanas (Galan, 2001). Las células binucleadas migran hacia trofoblasto para formar la unión híbrida del sincitio materno-fetal, y parecen tener dos funciones primarias; 1) formar el sincitiotrofoblasto necesario para la implantación y el crecimiento placentario, y 2) producir y liberar hormonas

proteicas y esteroides a través de la exocitosis del contenido de los gránulos a la circulación materna, el cual incluye a los dos principales grupos de proteínas anteriormente mencionados, el lactógeno placentario y las glicoproteínas asociadas a la gestación (Galan, 2001; Ward et al., 2002; Schmidt, 2005; Carvalho et al., 2006; Braun *et al.*, 2007). Además, se considera que la fusión de las células binucleadas con el tejido materno, puede ser un exitoso camino para permitir el acceso a la circulación materna, al tiempo que se evita un ataque por los linfocitos de la madre (Schmidt, 2005).

2.5 Función endocrina de la placenta: Síntesis de progesterona

En la oveja, la placenta es el principal sitio de síntesis de progesterona durante la gestación, y el cuerpo lúteo puede no ser requerido a partir del día 50 de la misma (Su *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2007; Mondragon *et al.*, 2007; Weems *et al.*, 2007).

Sin embargo, la localización a nivel celular de la síntesis de progesterona es aún controversial, ya que algunos estudios de células binucleadas en ovinos y bovinos, indican que la síntesis de progesterona se lleva a cabo por estas células y que es independiente de las células mononucleadas del trofoblasto. Sin embargo en un estudio inmunohistoquímico realizado en células mononucleadas del trofoblasto de ovejas se localizó a la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, mientras que en otro realizado en estas mismas células pero en bovinos se encontró al citocromo P450_{scc}, lo que indicaría que son las células mononucleadas las que tienen las enzimas y no las células binucleadas (Lea *et al.*, 2007).

El paso determinante en la síntesis de progesterona por la placenta, es la conversión de colesterol a pregnenolona por el citocromo P450_{scc} (CYP11A1), en una reacción que requiere electrones, los cuales se obtienen a través de la conversión de adrenoxina reductasa a adrenoxina. La pregnenolona es convertida a progesterona mediante la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa,

localizada en la mitocondria. La síntesis de progesterona depende del transporte del colesterol de la membrana externa a la interna de la mitocondria donde se localiza el citocromo P450_{scc}, y este transporte es controlado, en el caso de la placenta ovina, por la proteína de transporte de esteroidogénesis aguda (StAR), la cual no ha sido localizada en la placenta humana (Su *et al.*, 2004; Tuckey, 2005; Lea *et al.*, 2007).

La progesterona es una hormona que está directamente relacionada con la gestación, debido a sus múltiples efectos sobre la diferenciación del estroma endometrial, el control de la secreción endometrial de moléculas que nutren al embrión en etapas tempranas, en la secreción uterina de moléculas inmunomoduladoras locales, entre otros, que determinan el éxito o fracaso de la gestación (Manalu-Sumaryadi, 1998; Davies *et al.*, 2004).

En las ovejas al inicio de la gestación la progesterona es secretada únicamente por el cuerpo lúteo, pero conforme la gestación avanza la placenta se convierte en la principal fuente de progesterona (Lea *et al.*, 2007; Mondragon *et al.*, 2007). Así, en las ovejas la placenta comienza la secreción de progesterona alrededor del día 50 de la gestación, la cual es suficiente para mantenerla (Weems *et al.*, 2007).

Durante el ciclo estral la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, es regulada por la hormona luteinizante (LH) y conforme la gestación avanza la concentración de LH en la sangre va disminuyendo. En adición, la hipofisectomía de ovejas gestantes al día 50 de la gestación no termina con ella. En cambio *in vitro*, la secreción de progesterona lútea en ovejas en el día 90 de la gestación es regulada por la prostaglandina E (PGE), pero no por la LH, por lo que Weems *et al.* (2007) concluyeron que la regulación de la progesterona placentaria puede estar regulada por la PGE₁ y/o PGE₂.

Se ha observado que ovejas que mantienen una gestación múltiple presentan mayores concentraciones de progesterona, en comparación de aquellas que tienen una gestación única. De igual forma, se ha informado que las concentraciones de progesterona son similares en las primeras semanas de

gestación (0-7), sin importar el número de crías (5.3 ± 0.3 , 6.2 ± 0.7 , 6.6 ± 0.5 ng/ml, con 1, 2 y 3 crías respectivamente), pero que conforme avanza la gestación (semana 8-20), la diferencia en las concentraciones promedio de progesterona son notorios entre las gestaciones múltiples y las de una sola cría, observándose que los de crías múltiples son mayores a los de cría única, pero no existe diferencia entre las gestaciones con dos y tres crías (16.9 ± 1.4 , 25.3 ± 1.5 , 26.8 ± 2.5 ng/ml, con 1, 2 y 3 crías respectivamente) (Manalu-Sumaryadi, 1998).

Algunos reportes indican que las altas concentraciones de progesterona pueden movilizar más ácidos grasos y glucosa de las reservas de la circulación materna, lo que puede ser utilizado por el producto a través de la placenta, para así tener un mayor crecimiento (Manalu-Sumaryadi, 1998). De igual manera, un mayor desarrollo de la placenta produce más lactógeno placentario y otras hormonas con actividad mitogénica, lo que favorece el desarrollo del producto (Manalu-Sumaryadi, 1998).

2.6 Maduración de la placenta y apoptosis

La maduración placentaria incluye la degeneración del corión, alteraciones del tejido conectivo y del epitelio materno y especialmente, un detrimento significativo en las células epiteliales de la carúncula y de las células binucleadas del trofoblasto (Martins *et al*, 2004).

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso activo, en el cual células superfluas o disfuncionales son eliminadas para mantener la función normal del tejido (Tizard, 2002; Barrio *et al*, 2003; Martins *et al*, 2004; Shawn, *et al*, 2005; Rojas, 2007). Se ha descrito la apoptosis como un fenómeno normal en la placenta, sobre todo en el último tercio (Barrio *et al*, 2003; Shawn, *et al*, 2005), pero también puede envolver patologías relacionadas a enfermedades en la gestación, tales como la pre-eclampsia y el crecimiento intrauterino restringido

(RCIU), cuando hay mayor incidencia de la apoptosis en la placenta (Barrio *et al*, 2003; Shawn, *et al*, 2005).

El crecimiento intrauterino restringido es una patología heterogénea caracterizada por una disrupción en el crecimiento fetal, el cual no es capaz de alcanzar el tamaño genéticamente determinado, causado por múltiples factores fetales, placentarios y de origen fetal. Esta patología está relacionada con muerte neonatal, enterocolitis necrosante, y síndrome de estrés respiratorio (Knobil, 2006). La pre-eclampsia es un trastorno multisistémico del embarazo y puerperio, que complica aproximadamente al 6 a 8% de todos los embarazos, caracterizado principalmente por hipertensión, proteinuria etc. Ambas patologías se caracterizan por isquemia en las placentas (Knobil, 2006; Roberts y Post, 2008).

El desarrollo normal de la placenta es dependiente de la diferenciación e invasión del trofoblasto. El aumento de apoptosis en el tejido placentario es el resultado de factores etiológicos que conducen a RCIU o mecanismos compensatorios debido a un transporte defectuoso de nutrientes o de gases. Uno de los factores etiológicos es la hipoxia. La placenta reacciona al estrés hipóxico aumentando el número de células apoptóticas (Barrio *et al*, 2003; Shawn *et al.*, 2005). La apoptosis puede ser iniciada por la vía extrínseca a través de la ruta de los receptores de muerte, ó por la vía intrínseca por la ruta de la mitocondria, los principales ejecutores de la apoptosis son las caspasas (Shawn *et al.*, 2005).

Las células apoptóticas han sido identificadas en ambos compartimentos, tanto en el fetal como en el materno durante la gestación, y la presencia de estas células puede ser relacionada con el estado de desarrollo de la placenta, incluyendo la adhesión y la invasión del trofoblasto, la transformación de las arterias espirales y el parto (Shawn *et al.*, 2005).

También se ha mostrado en humanos que durante la gestación la apoptosis tiene un papel importante en la tolerancia inmune, ya que se cree que la expresión del ligando Fas (FasL) en el trofoblasto humano es un mecanismo que protege frente a la acción lítica de las células inmunes. (Jerzak y Bischof, 2002; Shawn *et al.*, 2005). Los macrófagos presentes en la interfase materno-fetal ayudan a la

sobrevivencia del trofoblasto, gracias a la remoción de las células apoptóticas y a la producción de citocinas y factores de crecimiento (Shawn *et al.*, 2005).

2.7 Mecanismos desencadenantes del parto

El parto es el proceso mediante el cual el producto es expulsado del ambiente uterino hacia el medio externo. Esto conlleva una compleja interacción entre factores fetales, placentarios y maternos (Weiss, 2000; Knobil, 2006).

El factor fetal parece jugar el papel principal en esta secuencia de eventos, tanto en los factores endocrinos como en los mecánicos (Weiss, 2000; Knobil, 2006). La maduración del eje hipófisis suprarrenal en el feto, se inicia unos siete días antes del parto, incrementando la circulación de la hormona adrenocorticotrópica fetal de la corteza suprarrenal fetal, dando como resultado un incremento en la producción de cortisol (Challis, 1998; Knobil, 2006). Este incremento en la producción de cortisol resulta en la disminución de la producción de progesterona e incrementa la síntesis de estrógenos por la placenta, junto con un incremento en la producción de prostaglandinas por los tejidos maternos y fetales que resulta en la labor y liberación del producto. (Weiss, 2000; Knobil, 2006).

El cortisol es el responsable de la maduración de muchos órganos, incluyendo los pulmones y los riñones, y es crítico en el desarrollo normal y programación del cerebro (Weiss, 2000; Knobil, 2006).

El dramático incremento del cortisol fetal encontrado en la oveja y en la cabra hacia el final de la gestación, puede activarse o inducirse por las enzimas involucradas en la síntesis de esteroides. A este respecto, la actividad de la aromatasa en la placenta ovina se incrementa hacia el final de la gestación, como los corticosteroides fetales se elevan, las enzimas 17 α hidroxilasa y la c-17, 20 liasa son activadas, y por lo tanto, la placenta empieza a incrementar su capacidad de síntesis de estrógenos, lo que tiene como resultado una disminución

en la progesterona y un incremento de los estrógenos (Mondragón *et al.*, 2007; Sammin *et al.*, 2008).

Sin embargo, el momento del parto es un tema controversial, ya que aún no se tiene la seguridad de quien origina la señal para su inicio. Se sabe que el feto provee señales a la placenta, las cuales parecen designar el aseguramiento de éste en un estado funcional apropiado, por lo que se ha manejado el concepto de reloj, abarcando este concepto los mecanismos que determinan la duración de la gestación (Challis, 1998; Weiss, 2000; Knobil, 2006). Así, investigaciones realizadas en mono Rhesus, han demostrado que el tiempo de gestación es de alrededor de 167 días. Sin embargo, si el feto es removido en el día 110, el tiempo de la expulsión de la placenta ocurre hasta el día 195 aproximadamente. De nueve animales en los cuales los fetos fueron removidos, en cuatro de ellos la placenta fue expulsada espontáneamente, mientras que en cinco la placenta tuvo que ser removida por cesárea, por lo cual se concluyó que el reloj reside en el feto (Challis, 1998). Desafortunadamente en este experimento no se realizó una evaluación de la función histológica de la placenta. Sin embargo, las concentraciones de progesterona plasmática continuaron similares después de la fetoectomía en los controles y en los animales experimentales (Challis, 1998).

Para examinar los mecanismos moleculares en fetos de ovejas en diferentes tiempos de la gestación, se utilizó hibridación *in situ* de la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y de la propiomelacortina (POMC), que son precursores de la hormona adenocorticotrópica (ACTH) (Challis, 1998). Los estudios mostraron que el RNAm de la CRH estuvo presente en la región parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo en el día 80, mientras que las concentraciones de CRH se incrementaron entre los días 80 y 120. El RNAm de POMC estuvo presente en el *pars intermedia* y en el *pars distalis* de la hipófisis fetal, aproximadamente en el día 70 de la gestación, mientras que los niveles de POMC en el *pars intermedia* siempre excedieron aquellos del *pars distalis*, alcanzando su máximo nivel en el día 100 para permanecer elevados el resto de la gestación. Las cantidades de POMC en el *pars distalis* se incrementaron progresivamente sobre

el día 120 de la gestación, mostrando un incremento al término (Matthews y Challis, 1995 citado en: Challis, 1998).

Estudios *in vivo* del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal fetal (HHA), mostraron que éste es activado en respuesta a un estrés fisiológico como la hipoxia, lo que sugiere que el reloj hipotético se localiza en el feto a nivel del hipotálamo, y probablemente del hipocampo y otros centros dentro del sistema límbico. Con base en estos estudios, se hipofisectomizaron ovejas gestantes en el inicio del tercer tercio, y se administró ACTH en cantidades suficientes para mantener íntegra la funcionalidad adrenal. El tratamiento permitió que dichas ovejas presentaran una gestación de 148 días, similar al grupo control, mientras que en un grupo tratado únicamente con solución salina, el nacimiento de las crías tuvo que realizarse por cesárea en el día 161 (Challis, 1998).

Diferentes estudios sugieren que la prostaglandina E_2 (PGE_2) de la placenta de los borregos, puede tener varias actividades regulatorias en el feto (Thorburn, 1991 citado en: Challis 1998), ya que la PGE_2 inhibe los movimientos respiratorios y altera la función pancreática. La infusión exógena de PGE_2 en el feto, causa un incremento significativo en la concentración de cortisol en el plasma, en el momento en el cual las glándulas adrenales del feto no parecen responder a la acción estimuladora de la ACTH. También se ha demostrado que la administración repetida de bolos con PGE_2 en el feto ovino, acortan la longitud de la gestación. Las concentraciones de PGE_2 se elevan en el plasma de ovejas intactas al tiempo del parto de igual manera que el incremento del cortisol, por lo que en resumen, el parto de las ovejas es asociado normalmente con la maduración del eje HHA y con el incremento del cortisol fetal en plasma. A su vez, se ha sugerido que en la placenta la PGE_2 incrementa la expresión de la enzima P450C17 (Louis *et al.*, 1976; Jacobs *et al.*, 1994, Young *et al.*, 1996; citados en: Challis, 1998).

Otros estudios en ovejas y monos, proveen evidencia en contra de un reloj placentario *per se*, y soportan más el hecho de un tiempo de parto en el feto, a nivel de la hipófisis y/o de las adrenales, los cuales determinan el tiempo de gestación. Sin embargo, el desarrollo fetal es influenciado por la placenta y el

momento del parto puede ser afectado por factores como la secreción de PGE₂, de la hormona CRH y de la ACTH placentaria (Louis *et al.*, 1976; Jacobs *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1996 citados en: Challis, 1998).

III. JUSTIFICACIÓN

El modelo de gestación interespecie entre borrego Cimarrón y doméstico puede proporcionar conocimientos acerca de las interacciones materno fetales que permiten el desarrollo del producto, y el conocer estas interacciones nos ayudará a entender mejor los mecanismos de adaptación de las gestaciones interespecie.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Utilizar una gestación interespecie como la que se presenta en borregas domésticas (*Ovis aries*) inseminadas con borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*), como un modelo para conocer y describir algunas interacciones materno fetales, a través del monitoreo de las concentraciones de progesterona y de la descripción de la morfología e histología placentarias.

Objetivos específicos

Determinar en borregas domésticas gestantes con borregos domésticos e híbridos las concentraciones plasmáticas de progesterona semanalmente, a partir del día 45 de la gestación y hasta su término.

Determinar en placentas obtenidas de la gestación de borregas gestantes con borregos doméstico, híbrido y Cimarrón la morfometría de los cotiledones placentarios: número, tamaño (diámetro y área) y peso.

Determinar la morfometría (peso corporal y longitud) de las crías al nacimiento de gestaciones de borrego doméstico, híbrido y Cimarrón.

Determinar en placentas obtenidas de borregas domésticas gestantes con borrego doméstico, híbrido y Cimarrón la histoarquitectura de los cotiledones y el número de linfocitos, mastocitos y células binucleadas.

V. HIPÓTESIS

Una gestación interespecie, obtenida a partir de borregas domésticas (*Ovis aries*) inseminadas con semen de borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*), presenta particularidades morfométricas en la interacción materno fetal, que repercuten en la síntesis de progesterona a lo largo de la gestación y en las características morfo funcionales de la placenta.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

Se usaron 20 ovejas domésticas que se dividieron en 2 grupos, el grupo Doméstico (I) con 5 borregas raza Dorset que recibieron monta dirigida con un semental de la misma raza, y el grupo Híbrido (II) con 15 borregas raza Dorset que se inseminaron intrauterinamente con semen congelado de borrego Cimarrón, previamente evaluado (Mejía *et al*, 2008). Durante el trabajo se lograron obtener tres placentas de borrego Cimarrón y medidas morfométricas de dos crías por lo que se considero como grupo Cimarrón (III)

2. Sincronización y monta dirigida o inseminación artificial.

Las borregas de los grupos Doméstico e Híbrido se sincronizaron con esponjas vaginales con 40 mg de acetato de fluorogestona (CIDR, Pharmacia & Upjohn México) durante 12 días, y a su retiro se inyectaron intramuscularmente 200 UI de gonadotropina coriónica equina (Folligon, Intervet México). Las borregas del grupo I recibieron monta natural a las 12 y 24 horas de haber sido detectadas en celo, mientras que las del grupo II se inseminaron a tiempo fijo, alrededor de 60 horas después del retiro del progestágeno, con 70 millones de espermatozoides en un volumen de 0.25 ml. Para inseminar a las borregas se tranquilizaron con hidrocloreuro de xilacina (Rompún, Bayer México) vía intramuscular, a una dosis de 0.45 mg/kg de peso y como anestésico se administró 1 mg/kg de peso de ketamina (Imalgen 1000, Rhône Mèrieux México) por vía endovenosa. Se hizo una pequeña incisión a la altura de la ingle derecha y dorsal a la ubre, por la cual se introdujo una aguja de Veress y se insufló la cavidad abdominal con aire ambiental. Una vez insuflada la cavidad se hicieron dos incisiones en la pared del abdomen, aproximadamente a 4 cm anteriores a la ubre y a cada lado de la línea

media y por la incisión del lado izquierdo se introdujo un trocar con cánula de 5 mm de diámetro y a través de ésta, se insertó un laparoscopio recto de 5 mm; mientras que por la otra incisión se colocó un segundo trocar con cánula de 5 mm, y a través de ésta mediante un bastón palpador, se acomodó el útero para posteriormente introducir la pistola de inseminación con la pajilla y la funda para depositar el semen en la luz del útero. (Amstrong y Evans, 1984).

3. Diagnóstico de gestación.

Mediante un equipo de ultrasonido de imagen y tiempo real con un transductor lineal de 5 Mhz (Esaote, Tringa linear Vet) se hizo el diagnóstico de gestación al día 45 de realizada la inseminación. Se revisaron ambos cuernos del útero, tratando de identificar líquido, placentomas y al producto. En las hembras en las que no se encontraron signos de gestación fueron retiradas del trabajo (Quintela *et al.*, 1999; Strmsnik *et al.*, 2002; Yotov, 2005).

4. Determinación de la concentración de progesterona plasmática.

Una vez confirmado el diagnóstico de gestación semanalmente a partir del día 45 se tomaron muestras de sangre de la yugular, con tubos vacutainer de 5 ml con heparina sódica; las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 2,500 rpm para la separación del plasma, mismo que se congeló para su posterior análisis. Las muestras se analizaron por medio de radioinmunoanálisis en fase sólida, por medio de un kit comercial Coat-A-Count Progesterona (Diagnostics Products Corporation USA) y se siguió la metodología recomendada en dicho kit. El coeficiente de variación intraensayo fue de 5.38% y la sensibilidad del ensayo es de 1ng/ml.

5. Morfometría de las crías.

Para caracterizar al híbrido obtenido de la cruce de borrego doméstico con Cimarrón, y compararlos con las especies originales, al parto las crías se pesaron; se midió la longitud cráneo-caudal; las extremidades anteriores se midió desde el suelo hasta la cruz (región inter-escapular); extremidades posteriores desde el suelo hasta la punta del ilion; longitud caudal desde la región anal hasta la punta de la cola (Romualdo *et al.*, 2004).

6. Morfometría de las placentas.

En el momento de la expulsión, las placentas se pesaron y se extendieron para medir el largo y el ancho, con el fin de caracterizar las placentas de cada grupo. Se contaron el número de cotiledones de cada placenta. Posteriormente la placenta se dividió en cuadrantes (figura 1) y dos lados (superior e inferior), con el fin de tomar muestras de cotiledones de todas las regiones de las mismas. Se tomaron tres cotiledones de cada cuadrante y de ambos lados y se hicieron dos mediciones de su diámetro (figura 2), y se pesaron. La medida del diámetro se dividió a la mitad y se multiplicó por πr^2 para obtener el área contacto del cotiledón (Parraguez *et al.*, 2006).

Con el propósito de describir la anatomía y vascularización de las placentas en cada grupo; las placentas obtenidas fueron congeladas a menos 30 °C. El día de su procesamiento fueron descongeladas en agua fría (a 3 °C), para evitar la ruptura y quemadura de las membranas, cuando estuvieron completamente descongeladas, se limpiaron con agua fría para quitar el exceso de sangre que tuvieran. Se preparo resina MF300 de acuerdo al fabricante (poliformas plásticas) y se tiño de color rojo para las arterias y de color azul a las venas; posteriormente se introdujo la resina lentamente en cada vena y arteria con una jeringa de 20ml y una aguja del número 16; una vez que se introdujo toda la

resina se tomaron fotografías para hacer las interpretaciones (Costa et al., 1997; Leiser et al., 1997).

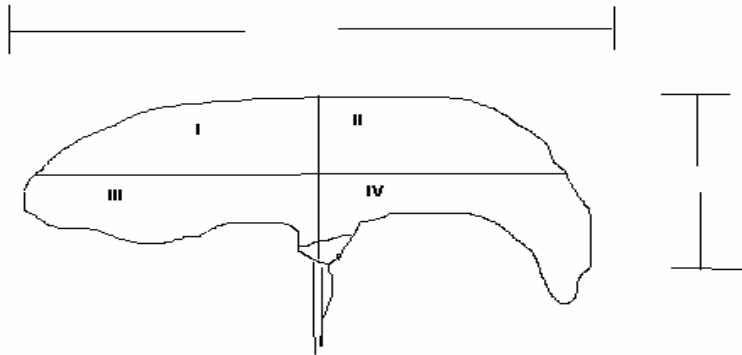


Figura 1. División en cuadrantes de las placentas, y medidas de largo y ancho.

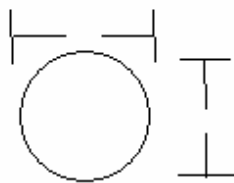


Figura 2. Diámetro de los cotiledones.

7. Procesamiento y tinción histológica

Los cotiledones se cubrieron con una gasa y se fijaron en solución de formol salino. Transcurrido el periodo de fijación, los fragmentos de tejido que incluyeran la depresión central se procesaron conforme a la técnica de inclusión en parafina en un histocinete automático. A continuación se efectuaron cortes semiseriados de 6 μm de grosor en un microtomo, algunos de los cuales se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, para la observación de la estructura histológica general del cotiledón, y otros con la tinción de Azul de Toluidina para evidenciar los linfocitos y células binucleadas (Tizard, 2002).

Se realizó el conteo de las células binucleadas y de los vasos sanguíneos con el objetivo 40x por campo en diez campos, y se tomaron las medidas del

diámetro de las células binucleadas y de los vasos sanguíneos en diez campos con el programa LSM 5 Image Browser (Carl Zeiss). Como criterios de inclusión de las células binucleadas, se contaron y midieron únicamente las estructuras en donde se observaran los dos núcleos con material citoplasmático y la membrana celular visible. En los vasos sanguíneos se midió el diámetro a aquellos con forma circular (Rodríguez et al., 2000).

8. Análisis estadístico.

Se calculó la estadística descriptiva de las variables bajo estudio: nivel de progesterona, longitud de la gestación, peso y longitud de las crías al nacimiento, número y tamaño de los cotiledones y células binucleadas.

Las concentraciones de progesterona se analizaron mediante un modelo mixto de mediciones repetidas. La longitud de la gestación, peso y longitud de las crías al nacimiento, así como número y tamaño de los cotiledones, se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias. Los datos obtenidos del conteo células binucleadas y vasos sanguíneos, se analizaron mediante pruebas de Kruskal-Wallis y pruebas de independencia; el diámetro de las células binucleadas y de los vasos sanguíneos se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Wayne, 2005).

Los valores informados son la media y el error estándar, la significancia es de ($P < 0.05$) y cuando exista diferencia pero que no sea significativa se indicará.

VII. RESULTADOS

1. Duración de la gestación.

De las 15 borregas domésticas inseminadas con semen de Cimarrón siete quedaron gestantes, de las cuales cinco tuvieron partos gemelares y dos una sola cría. En el caso de las gestaciones de borregas domésticas servidas con macho doméstico, las cinco hembras quedaron gestantes; dos tuvieron partos gemelares y tres una sola cría.

No se presentaron abortos y la duración de la gestación fue en promedio de 152 ± 1.41 días en el grupo de borregas con producto de borrego híbrido y 146 ± 2 en el grupo de borregas domésticas con producto de borrego doméstico, observándose una duración mayor en el grupo híbrido en comparación con el grupo doméstico.

2. Cuantificación de progesterona plasmática

Cuando las concentraciones de progesterona se analizaron bajo el efecto tipo de gestación (domésticos e híbridos), se observó que los valores fueron similares en ambos grupos de borregas hasta la semana 15. En la semana 16 se empezó a observar una diferencia en las concentraciones, notándose un aumento en el grupo gestante de domésticos. Sin embargo, fue a partir de la semana 17 en donde las diferencias fueron significativas (figura 3).

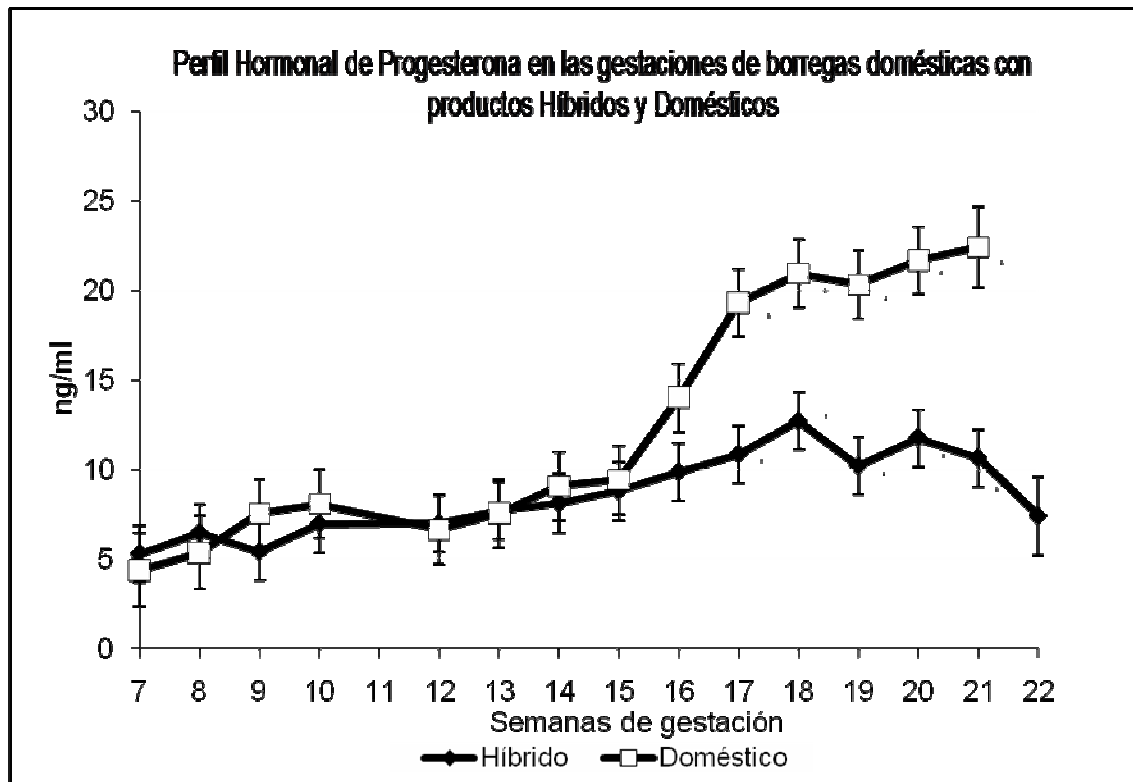


Figura 3. Perfil de progesterona plasmática a partir de la semana siete (día 45) de borregas gestantes con borrego doméstico e híbrido (doméstico x Cimarrón). * indica diferencias entre los valores dentro de las semanas (Media \pm EE).

Pero cuando las concentraciones se analizaron bajo el efecto número de crías por gestación, se observó que las concentraciones de progesterona en el grupo de borregas gestadas con borregos domésticos fueron mayores en las gestaciones gemelares en comparación con las de cría única a partir de la semana 16; mientras que en el grupo de borregas gestadas con semen de borrego Cimarrón, las concentraciones de progesterona fueron semejantes entre gemelares y únicas, sin existir diferencia hasta en la semana 22, en donde las borregas con crías únicas tuvieron una mayor concentración (figura 4).

Además se observó que a partir de la semana 16 las concentraciones de progesterona fueron mayores en las gestaciones gemelares con borregos domésticos comparadas con las gestaciones únicas y gemelares con borregos híbridos; en el caso de las gestaciones con borrego doméstico de cría única, se

observó que en las semanas 17 y 18 las concentraciones fueron mayores que en las borregas gestantes de crías únicas y gemelares con borregos híbridos (figura 4).

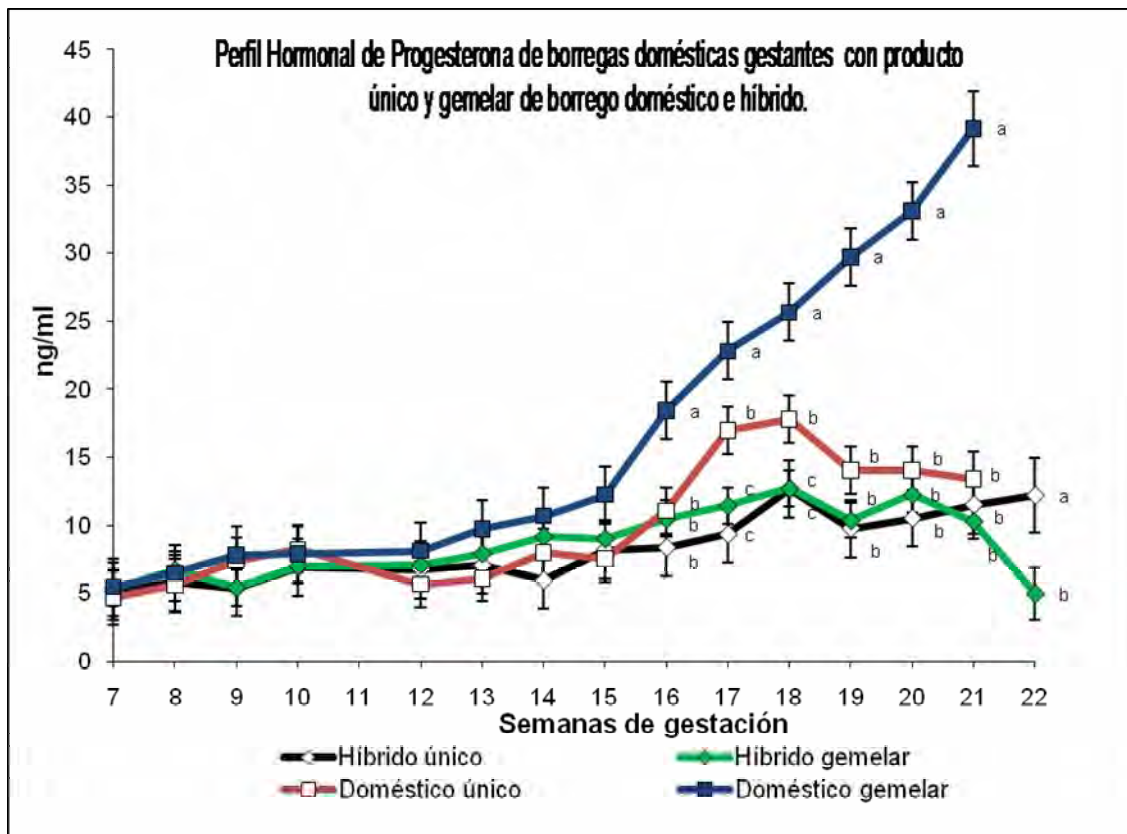


Figura 4. Perfil de progesterona plasmática a partir de la semana siete (día 45) de borregas gestantes con borrego doméstico e híbrido con crías únicas y gemelares. a,b,c literales distintas indica diferencias entre los valores dentro de las semanas (Media \pm EE).

3. Características morfométricas de las placentas

El peso de las placentas al parto no presentó diferencias entre los tres grupos (doméstico, híbrido y Cimarrón) (cuadro 1). El largo de las placentas en los tres grupos fue diferente, observándose una mayor longitud en las placentas de borregos domésticos, seguido de las placentas de borrego Cimarrón, y por último

las placentas de borregos híbridos. En lo que respecta al ancho de las placentas no se observó diferencia entre las placentas de productos de borrego doméstico al compararlas con las placentas de borrego Cimarrón, pero sí en comparación con el grupo de borrego híbrido que presentó un tamaño menor (cuadro 1).

Cuadro 1. Características morfométricas de las placentas de borrego doméstico, Cimarrón y su híbrido (Media \pm EE).

Grupo	Peso placenta (gr)	Largo (cm)	Ancho (cm)
Doméstico	568 \pm 13.13 ^a (7)	73 \pm 3.83 ^a (7)	26 \pm 1.86 ^a (7)
Híbrido	475.66 \pm 15.10 ^a (12)	39.25 \pm 2.21 ^b (12)	18.83 \pm 1.59 ^b (12)
Cimarrón	431 \pm 10.22 ^a (3)	56.5 \pm 2.5 ^c (3)	24.5 \pm 1.43 ^a (3)

a, b, c literales distintas indican diferencias dentro de las columnas (P< 0.05). Entre paréntesis está el número de placentas medidas.

Con respecto al número de cotiledones no hubo diferencias entre los grupos de borregos híbridos y domésticos, pero sí con el grupo de borrego Cimarrón, el cual presentó un mayor número de cotiledones (cuadro 2). Las placentas gemelares tuvieron un menor número de cotiledones (P<0.05), en comparación con las placentas de crías únicas (40.5 \pm 3 y 57.6 \pm 4, respectivamente). En cuanto al peso de los cotiledones, el grupo de borregos domésticos se observó diferencia en comparación con los grupos Cimarrón e híbrido, observándose un mayor peso en el primer grupo; mientras que para el diámetro y área de los cotiledones, los tres grupos presentaron diferencias, donde se observó un mayor diámetro y área en los cotiledones de borregos domésticos, seguido de los borregos Cimarrón y en último de los borregos híbridos (cuadro 2).

Cuadro 2. Características morfométricas de los cotiledones de las placentas de gestaciones domésticas, Cimarrón e híbridas (Media \pm EE).

Grupo	Número cotiledones por placenta	Peso cotiledones (gr)	Diámetro cotiledones (cm)	Área cotiledones (cm²)
Doméstico	44.71 \pm 3.31 ^a (7)	4.45 \pm 1.60 ^a (4)	3.47 \pm 1.0 ^a (4)	4.09 \pm 0.78 ^a (4)
Híbrido	45.16 \pm 3.89 ^a (12)	1.34 \pm 0.76 ^b (6)	1.97 \pm 0.69 ^b (6)	3.10 \pm 0.61 ^b (6)
Cimarrón	77.33 \pm 1.87 ^b (3)	1.64 \pm 0.77 ^b (3)	2.05 \pm 0.74 ^c (3)	3.51 \pm 0.63 ^c (3)

a,b,c literales distintas indican diferencias dentro de las columnas (P< 0.05). Entre paréntesis está el número de placentas medidas.

4. Anatomía de las placentas.

Las placentas de los tres grupos tuvieron características morfológicas similares. Los vasos umbilicales siguieron la curvatura de la bolsa corioalantoidea, los vasos arteriales y venosos así como sus ramas raramente tuvieron un trayecto similar. Sin embargo, en algunas ocasiones presentaron cierta proximidad en su origen (figuras 5, 6, 9, 10 y 13). Presentaron dos arterias y dos venas umbilicales, que salen una de cada lado (una arteria y una vena) y que vascularizan a los cotiledones, y también existió vascularización intercotiledonaria (figuras 7,12 y 15). Los cotiledones presentaron la vascularización de dos o más vasos, que entran a la depresión central (hilio) (figuras 8, 10 y 14).

Las placentas de las gestaciones gemelares estaban unidas por una región avascular de sus membranas. Todas las placentas presentaron en la parte distal presentaron la zona necrótica característica de este tipo de placentación (figura 9).

En las placentas de parto único, aunque no se tomó la medida, el lado que correspondía al cuerno no gestante era más largo que el del lado del cuerno gestante (figuras 5 y 9).

Aunque no se tomaron medidas y las características observadas son cualitativas, al comparar macroscópicamente las placentas de los tres grupos se observó en las placentas de borregos domésticos un mayor grosor de los vasos sanguíneos en comparación con los de las placentas de borrego Cimarrón e híbrido, también se apreció una mayor vascularización intercotiledonaria en las placentas de borrego doméstico en comparación con los otros dos grupos, pero se apreció mayor vascularización intercotiledonaria en las placentas de borregos Cimarrón al compararlas con las placentas de borregos híbridos (figuras 7, 12, 15).

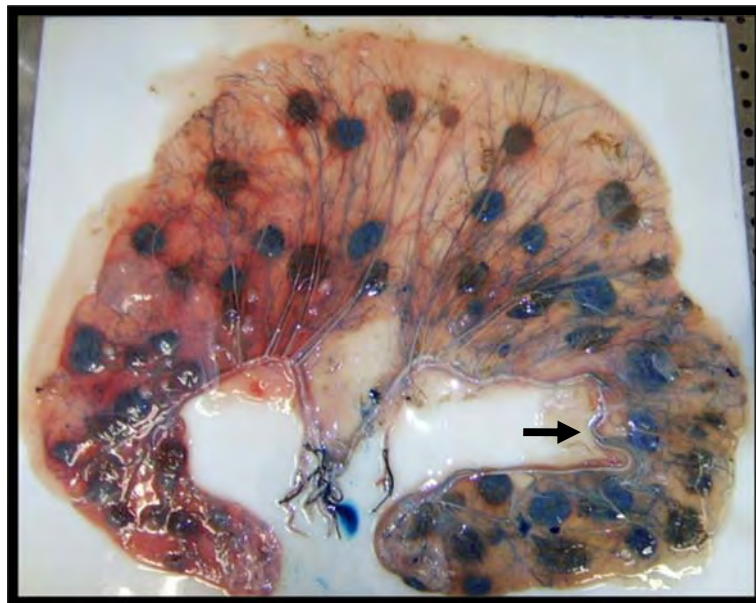


Figura 5. Fotografía de placenta de borrego doméstico. La flecha señala la extremidad de la placenta que corresponde al cuerno no gestante.

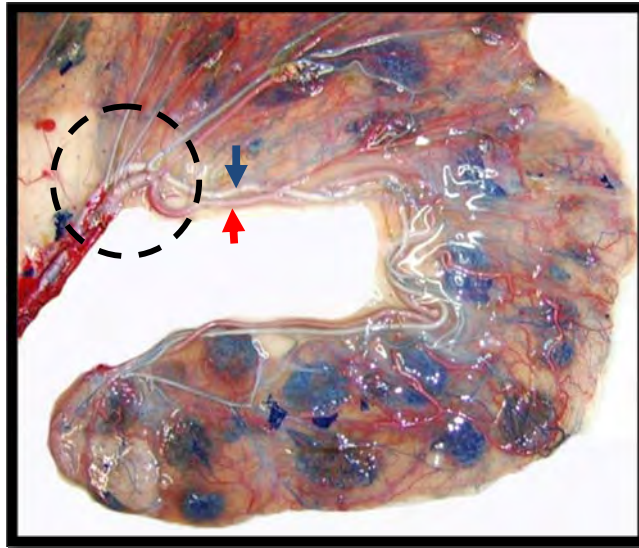


Figura 6. Fotografía de placenta de borrego doméstico que presenta al cuerno no gestante. Las flechas señalan la vena y la arteria placentarias. Dentro del círculo se observan las ramificaciones primarias, de origen muy cercano, que vascularizan hacia los cotiledones y la zona intercotiledonaria.

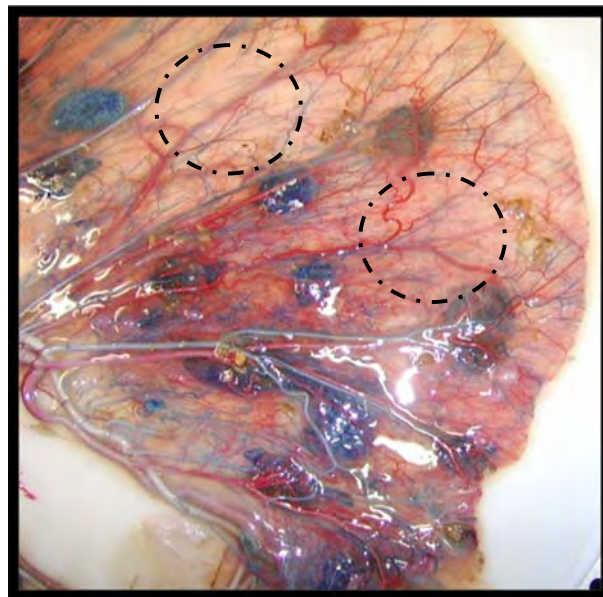


Figura 7. Fotografía de placenta de borrego doméstico. Se observan las arteriolas y vénulas distribuidas en los espacios intercotiledonarios(círculos).

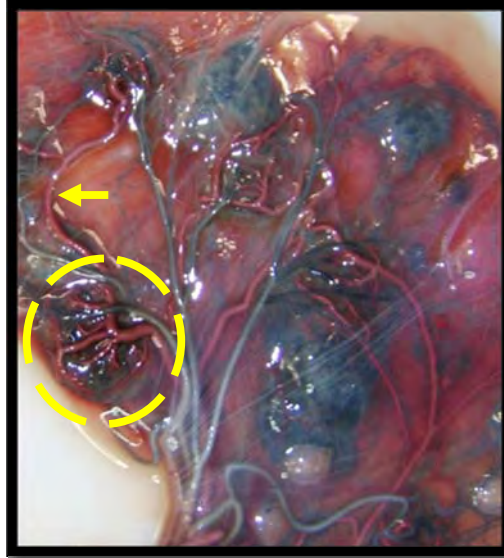


Figura 8. Fotografía de placenta de borrego doméstico. Dentro del círculo se observan las ramificaciones vasculares que se dirigen hacia la depresión central del cotiledón, y esa misma rama continúa hacia el cotiledón vecino en la parte superior de la foto (flecha).

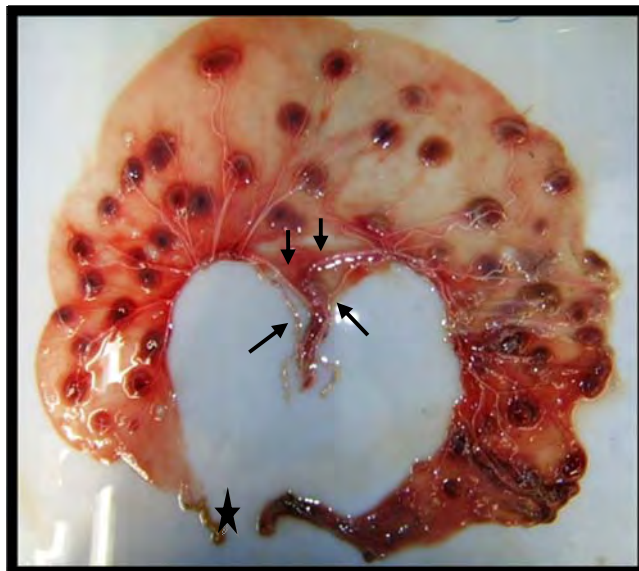


Figura 9. Fotografía de placenta de borrego Cimarrón. Las flechas indican cada una de las venas y arterias placentarias; en la parte distal izquierda de la placenta se observa la región necrótica (estrella).

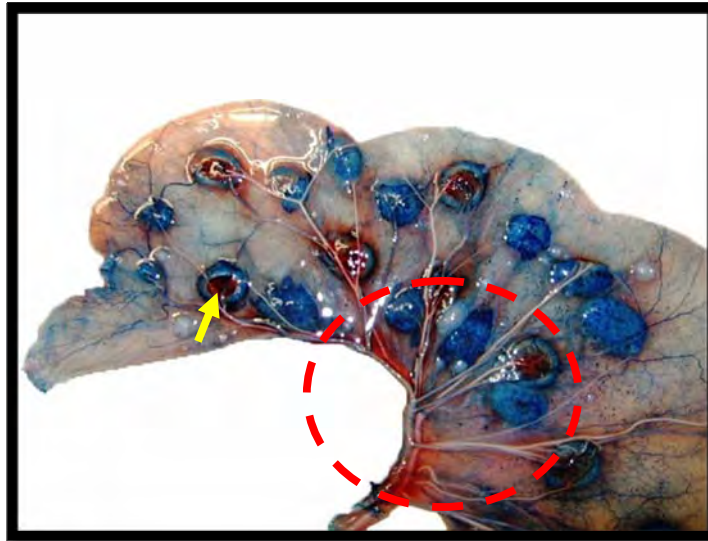


Figura 10. Fotografía de placenta de borrego Cimarrón. Se puede observar la depresión central de los cotiledones (flecha), así como las ramificaciones vasculares primarias hacia los cotiledones (círculo).

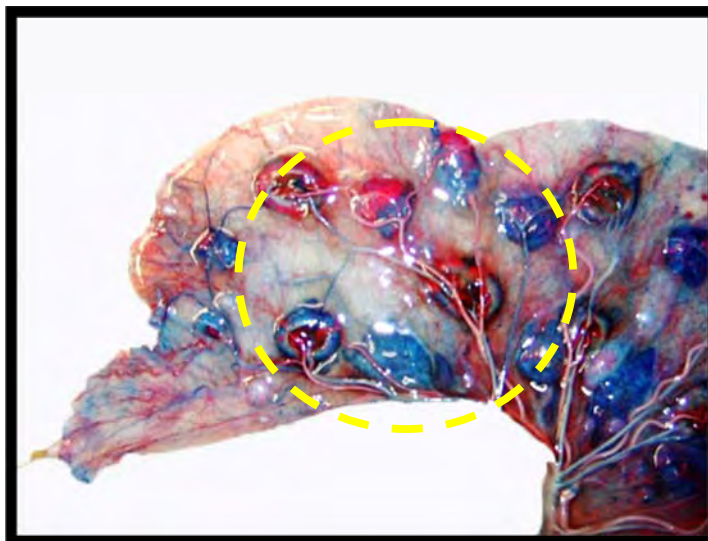


Figura 11. Fotografía de placenta de borrego Cimarrón. Se observa la vascularización de varios cotiledones por una sola arteria, que además se ramifica en la depresión central de un cotiledón, para vascularizar a otros cotiledones (círculo).



Figura12. Fotografía de placenta de borrego Cimarrón. Se observa la vascularización intercotiledonaria (círculos).

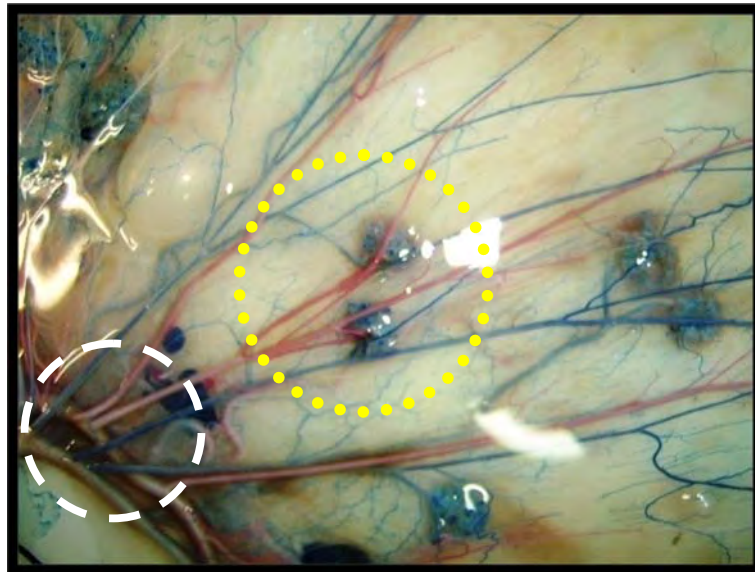


Figura 13. Fotografía de placenta de borrego híbrido (doméstico x Cimarrón). Se observan las ramas primarias que se dirigen hacia los cotiledones (círculo blanco), y su posterior ramificación para vascularizar otros cotiledones (círculo punteado amarillo).

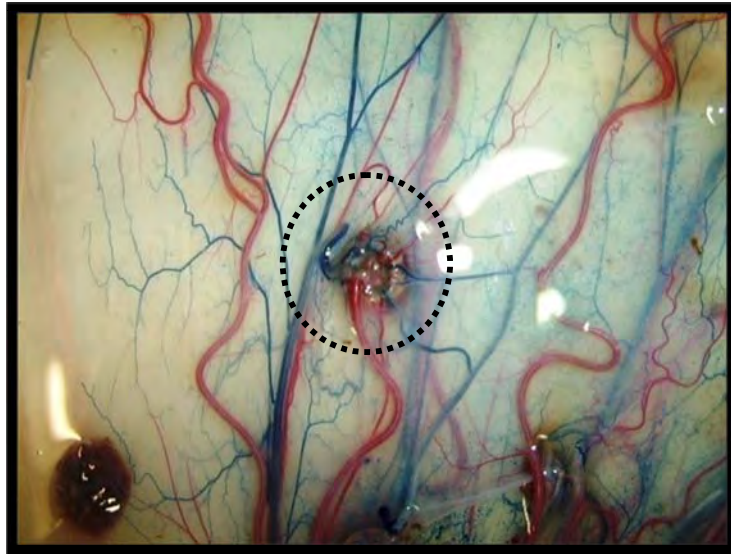


Figura 14. Fotografía de placenta de borrego híbrido (doméstico x Cimarrón). En el círculo se observan las ramificaciones de la arteria placentaria en la depresión central.

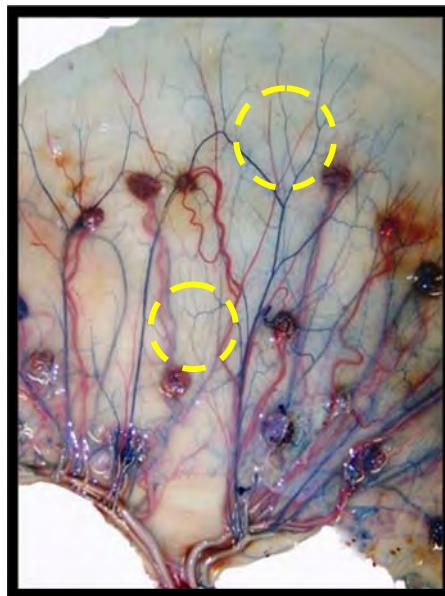


Figura 15. Fotografía de placenta de borrego híbrido (doméstico x Cimarrón). Se observa la vascularización la zona intercotiledonaria (círculos).

5. Características morfométricas de las crías al nacimiento.

El peso promedio de las crías al nacimiento de los borregos domésticos fue diferente al peso de las crías híbridas, observándose un menor peso en éstas últimas (figuras 16 y 17). En ninguno de los dos grupos se encontró diferencia entre los pesos de hembra y macho, ni entre crías únicas y gemelares.

Con respecto a las medidas morfométricas; de las características establecidas, el grupo de borregos domésticos fue mayor en todas en comparación con los borregos híbridos ($P < 0.05$) (cuadro 3); el caso del borrego Cimarrón sólo se obtuvieron las características morfométricas de dos crías (Cuadro 3 y figura 18).

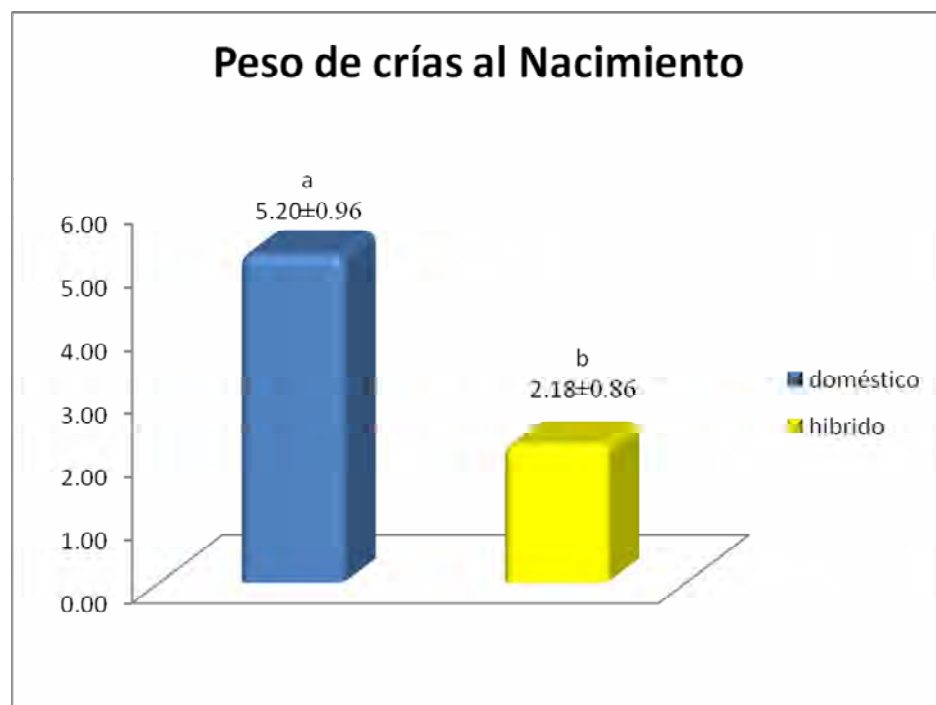


Figura 16. Peso de las crías al nacimiento. Grupos doméstico e híbrido (doméstico x Cimarrón).

Cuadro 3. Longitud cráneo-caudal, craneal, caudal y de las extremidades de borregos domésticos, híbridos y Cimarrón al nacimiento (Media \pm EE).

Grupo	Cráneo-caudal	Craneal	Caudal	Extremidades
Doméstico	49.66 \pm 2.65 ^a (6)	12.8 \pm 0.98 ^a (6)	20.1 \pm 2.0 ^a (6)	40.1 \pm 1.8 ^a (6)
Híbrido	35.91 \pm 3.98 ^b (11)	10.3 \pm 1.54 ^b (11)	9.6 \pm 1.82 ^b (11)	29.5 \pm 3.6 ^b (11)
Cimarrón	43.5 \pm 0.70 (2)	14 \pm 1.4(2)	3.5 \pm 0.70 (2)	37.3 \pm 0.88(2)

a, b literales distintas indican diferencias dentro de las columnas (P < 0.05). Entre paréntesis está el número de crías medidas.



Figura 17. Fotografía de borregos híbridos (a) y domésticos (b). En los primeros se observa el menor tamaño de la cola y manchas cafés. La forma del cráneo no es convexa como la de los borregos domésticos.

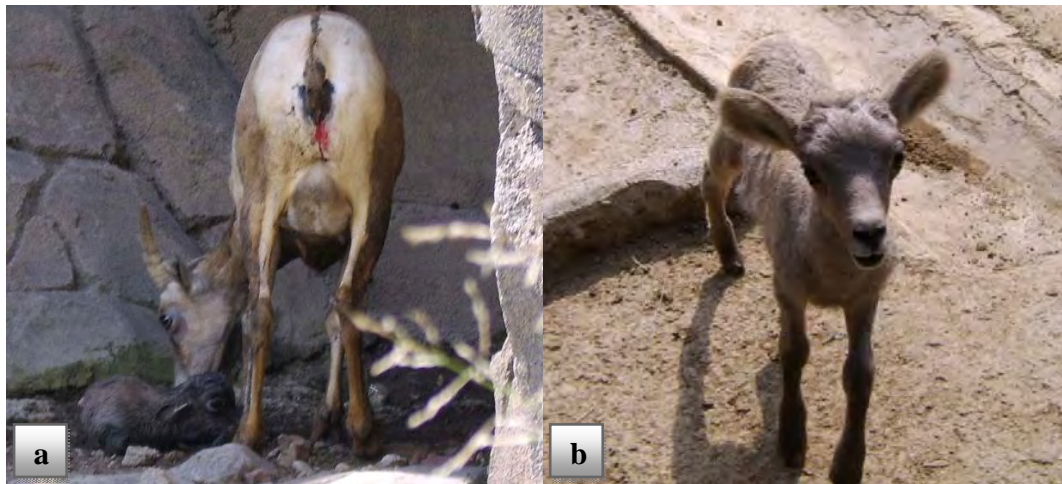


Figura 18. Fotografía de una cría de borrega Cimarrón y de la madre acicalándola inmediato al parto (a) y cría con más tiempo de nacido (b).

6. Características histológicas de los cotiledones

Los cotiledones vistos al microscopio presentaron una estructura constituida en su mayoría por tejido conectivo laxo (figuras 19- 23). En el hilio se observan los vasos sanguíneos corioalantoideos rodeados por tejido conectivo laxo. Inmediato a esta zona se observan las vellosidades primarias corioalantoideas con vasos sanguíneos, eritrocitos y el epitelio coriónico con pérdida de células epiteliales (figura 19). En el epitelio de los tres grupos se observaron zonas pigmentadas de color café oscuro (hemosiderina) que indican fagocitosis de eritrocitos por estas células (figuras 19, 21-23). En el caso de las placentas de gestaciones híbridas, existió una gran pérdida de células epiteliales, observándose casi siempre únicamente el tejido conectivo con una gran cantidad de eritrocitos (figura 23).

No se observaron células cebadas en ninguno de los cortes observados; sin embargo en las microfotografías se observaron células plasmáticas (células de rueda de carreta) (figura 24).

Las células binucleadas fueron observadas la mayoría de las veces de manera aislada, cercanas al epitelio coriónico o al tejido conectivo. Pocas veces se encontraron dos o tres células juntas (figura 20).

El número de células binucleadas fue diferente en los tres grupos, observándose un mayor número de células en el grupo con borrego doméstico, seguido del Cimarrón y al último con borrego híbrido. El diámetro de las células binucleadas fue diferente en el grupo de borrego Cimarrón ($P < 0.05$), comparados con el doméstico y el híbrido (cuadro 4).

En el conteo de los vasos sanguíneos no se encontraron diferencias estadísticas entre los tres grupos. Con respecto al diámetro de los vasos sanguíneos tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($P > 0.05$) (cuadro 4).

Cuadro 4. Número de células binucleadas, vasos sanguíneos y sus respectivos diámetros en los cotiledones de las placentas de borrego doméstico, híbrido y Cimarrón (Media \pm EE)

Grupo	No. Células binucleadas (10 campos)	Diámetro células binucleadas (μm)	No. Vasos sanguíneos (10 campos)	Diámetro vasos sanguíneos (μm)
Doméstico	1.43 \pm 0.16 ^a	21.9 \pm 1.64 ^a	2.5 \pm 0.29 ^a	66.9 \pm 6.25 ^a
Híbrido	0.63 \pm 0.06 ^b	20.9 \pm 1.54 ^a	2.09 \pm 0.16 ^a	68.9 \pm 5.94 ^a
Cimarrón	1.04 \pm 0.09 ^c	23.7 \pm 1.67 ^b	2.16 \pm 0.24 ^a	61.5 \pm 5.03 ^a

a, b, c literales distintas indican diferencias dentro de las columnas ($P < 0.05$).

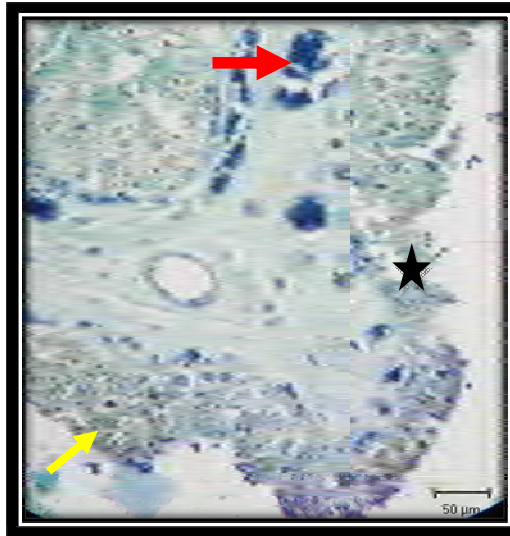


Figura 19. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en cotiledón de borrego doméstico. Se observa el tejido conectivo con vasos sanguíneos (flecha roja), el epitelio coriónico simple se observa con hemosiderina, que muestra la actividad fagocítica de eritrocitos maternos (flecha amarilla), y también se aprecia una zona con pérdida de células epiteliales (estrella) (Tinción AT, objetivo 40x).

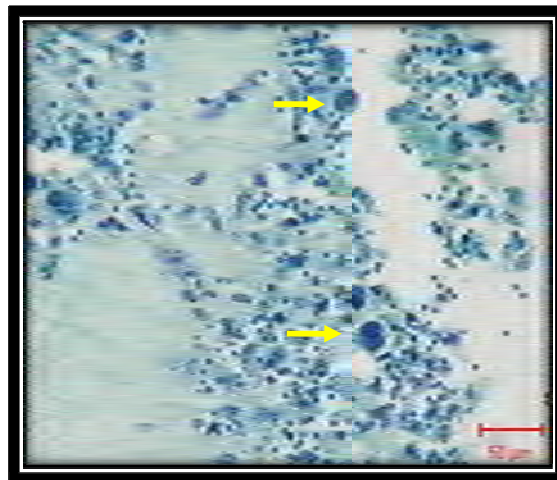


Figura 20. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en cotiledón de borrego doméstico. Se observan células binucleadas cercanas al epitelio y de forma aislada (flechas) (Tinción AT, objetivo 40x).

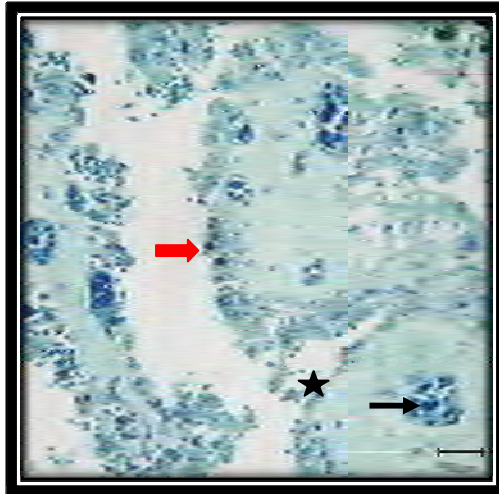


Figura 21. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en placenta de borrego Cimarrón. Se observa el tejido conectivo con vasos sanguíneos (flecha negra), el epitelio coriónico simple se observa con pigmento hemosiderina que muestra la actividad fagocítica de eritrocitos maternos (flecha roja), y también se aprecia una zona con pérdida de células epiteliales (estrella) (Tinción AT, objetivo 40x).

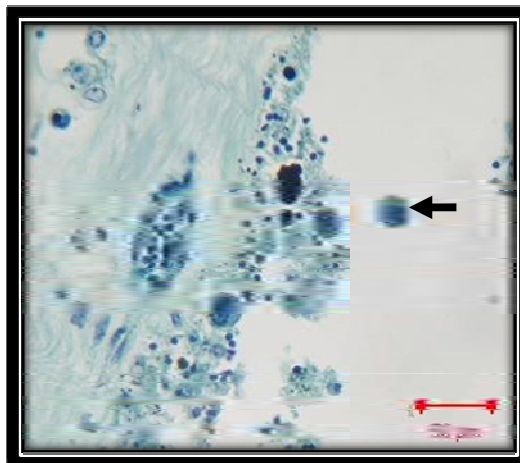


Figura 22. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en placenta de borrego Cimarrón. Se aprecia célula binucleada de manera aislada (flecha) (tinción AT, objetivo 40x).

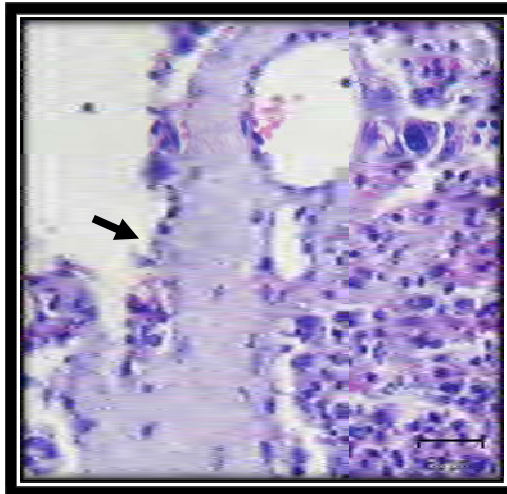


Figura 23. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en placenta de borrego híbrido (doméstico x Cimarrón). No se aprecian células del epitelio coriónico (flecha) (tinción HE, objetivo 40x)

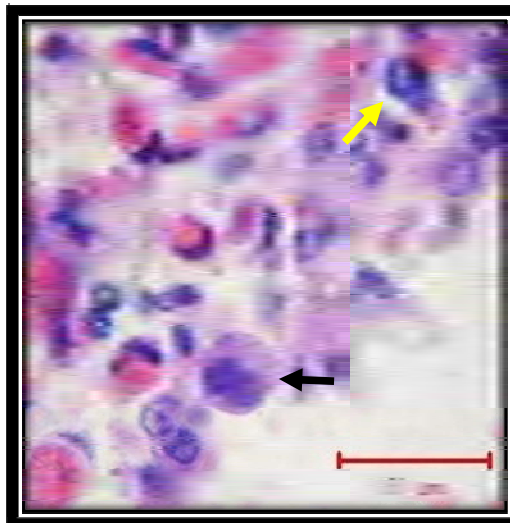


Figura 24. Microfotografía representativa de un corte histológico de vellosidad coriónica en placenta de gestación híbrida (doméstico x Cimarrón). Se observa una célula binucleada (flecha negra) y una célula plasmática (flecha amarilla) (Tinción HE, objetivo 100x).

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró que la duración de la gestación de borregas domésticas con productos híbridos fue mayor en comparación con las borregas domésticas gestantes de borrego doméstico. Con respecto a esta variable se sabe que los factores que la determinan son múltiples y entre los principales se encuentran: la raza, edad de la madre, número de parto, nutrición y genotipo fetal. Éste último se ha identificado que es el que determina en mayor proporción la duración de la gestación y dentro de éste el componente paterno es el factor que la define en mayor proporción (Challis, 1998; Hafez, 2003; Knobil, 2006). Por lo tanto, se infiere que el genotipo paterno modificó la duración en las gestaciones híbridas, ya que la duración de la gestación en el borrego Cimarrón es mayor que en el borrego doméstico.

También se observó que en el caso de las gestaciones gemelares de borregos domésticos que las concentraciones de la progesterona fueron mayores a partir de la semana 16 en comparación con las de una cría, esto coincide con lo publicado para las ovejas domésticas, en las cuales, durante las primeras semanas de la gestación las concentraciones de progesterona son similares sin importar si la gestación es múltiple o única, pero en las siguientes semanas las diferencias son significativas, siendo mayores las concentraciones en gestaciones múltiples (Manalu-Sumaryadi, 1998). En cambio esta característica no se observó en las gestaciones de borregas domésticas inseminadas con Cimarrón. Además se observó que a partir de la semana 16 las concentraciones de progesterona fueron mayores en las gestaciones gemelares de borrego doméstico comparadas con las de crías únicas y gemelares de borregas con crías híbridas; en el caso de gestaciones con crías únicas de borrego doméstico se observó en las semanas 17 y 18 mayor concentración en comparación con las gestaciones de crías únicas y gemelares de borregas con crías híbridas. Así relacionando los niveles de progesterona con el desarrollo feto-placenta, se puede inferir que el aumento en las concentraciones de progesterona y la diferencia en los valores entre los

grupos, coincide con el periodo de crecimiento exponencial de los placentomas y del producto (Reynolds *et al.*, 2005; Borowicz *et al.*, 2007). Por lo que, una placenta con mayor desarrollo, como fue el caso en las gestaciones de crías domésticas, podría favorecer la producción de una cantidad superior de progesterona y de diferentes factores de crecimiento (Manalu-Sumaryadi, 1998) y la otra situación sería por lo tanto, una placenta con menor desarrollo como lo encontrado en las de las gestaciones con borregos híbridos produce menor cantidad de progesterona.

Otra causa de la menor producción de progesterona por parte de las placentas de las crías híbridas en el presente trabajo puede ser el genotipo fetal, ya que se conoce que en gestaciones híbridas de equinos, el genotipo fetal afecta la secreción de la gonadotropina coriónica (eCG), ya que cuando una yegua gesta una cría híbrida producto de la monta con un burro, su producción es menor y su patrón de secreción es diferente (Allen *et al.* 2003). Además, muchos otros factores que no fueron medidos en este trabajo, pueden estar afectados en la síntesis de progesterona como lo es el StAR o la Prostaglandina E, los cuales se ha visto tienen un papel fundamental en la síntesis y secreción de progesterona (Lea *et al.*, 2007; Weems *et al.*, 2007).

En este trabajo se puede observar una relación entre la morfometría de la placenta y las características físicas de las crías al nacimiento. Así, la mayoría de las medidas morfométricas registradas en las placentas de las gestaciones domésticas, fueron superiores al compararlas con el grupo Cimarrón e híbrido, lo mismo para el peso y tamaño de las crías. Aunque en el caso del borrego Cimarrón no se pudo obtener el peso de las crías al nacimiento, se pudo apreciar que las crías eran más grandes que las crías híbridas pero de menor tamaño que las borrego doméstico.

Particularmente, las diferencias en cuanto el largo de las placentas, podrían estar relacionadas con el tamaño de las crías, ya que las placentas de las gestaciones domésticas fueron las de mayor longitud, seguidas de las placentas

de Cimarrón, y por último las placentas de las gestaciones híbridas. Patrón que se conservó en cuanto a la longitud cráneo-caudal de las crías.

El mayor número de cotiledones en las placentas de Cimarrón, comparadas con el menor número de cotiledones de las placentas de las gestaciones domésticas, pudiera ser un mecanismo que compense el tamaño y peso de los mismos entre diferentes especies. Schmidt (2005), encontró en placentas de bovinos domésticos, búfalos acuáticos y búfalos africanos, que cuando los cotiledones tienen una mayor longitud su número era menor. A diferencia, cuando los cotiledones tenían una menor longitud, presentaron un mayor número de cotiledones, por lo que lo consideró como un posible mecanismo compensatorio de la placenta.

De manera general las placentas de animales silvestres son difíciles de recuperar, debido a que la mayoría de los partos son en horas nocturnas y antes del amanecer. De tal suerte que el único dato al que se tuvo acceso en cuanto a placentas de borrego Cimarrón, (Benirschke, 2004) informa sobre una sola placenta, cuyo peso fue de 300 gr, midió 83 cm de largo y tuvo 53 cotiledones. En el presente trabajo se estudiaron tres placentas que en promedio pesaron 431 gr, midieron 56 cm de largo y tuvieron 77 cotiledones. Estas diferencias en cuanto a las características pudieran deberse a múltiples factores que desconocemos y que modifican la morfometría, como puede ser la subespecie, edad de la hembra, número de parto, altura, nutrición, etcétera.

En contraste, el número de cotiledones en las placentas de las gestaciones híbridas, fue semejante al del grupo doméstico. Sin embargo, el tamaño y el peso fueron significativamente diferentes, observándose un mayor tamaño en los de los domésticos, mientras que en comparación con los del Cimarrón, sólo existió diferencia en el diámetro, siendo mayor en este grupo. Así, estas diferencias en el tamaño de los cotiledones, pudieron deberse a los diferentes genotipos fetales, ya que por ejemplo, en las placentas de las gestaciones híbridas en equinos, el genotipo fetal tiene una marcada influencia en el desarrollo de la placenta,

particularmente sobre las dimensiones del corion (ancho y grosor), siendo menores en las de los híbridos (Allen *et al.*, 1993).

Con la inclusión de resina en las placentas se observó macroscópicamente una marcada diferencia en el grosor de las arterias, de las venas umbilicales, y en la vascularización intercotiledonaria, notándose mayor grosor y vascularización en las placentas de gestaciones domésticas, en comparación con las placentas de gestaciones de Cimarrón e híbrido. No obstante, el menor grosor y vascularización en las placentas de borrego Cimarrón podrían ser compensados con la duración de la gestación, ya que ésta es mayor que en los borregos domésticos (Delgadillo *et al.*, 2003).

En el caso de las placentas de las gestaciones híbridas, el menor grosor y vascularización, pudo haberse visto reflejado en el tamaño y peso de la crías al nacimiento, ya que al compararlas con las crías de gestaciones domésticas fueron menores. Por lo que suponemos que el transporte de nutrientes y oxígeno fue menor en las crías híbridas durante su gestación. Casos similares han sido apreciados en cerdas con gestaciones hipóxicas, las cuales se caracterizaron por la disminución en el diámetro de arterias y de las venas umbilicales; el peso de las crías fue bajo al nacimiento, además de verse afectado el desarrollo de todos sus órganos, y de éstos principalmente los del sistema respiratorio (González, 2007).

En el presente trabajo, el menor peso de las crías de gestaciones híbridas en comparación con las crías de gestaciones domésticas, pudo ser también consecuencia de las menores concentraciones de progesterona a lo largo de la gestación, ya que se sabe que existe un efecto de la progesterona en el incremento del peso de las crías hasta el nacimiento, y que este efecto puede ser mediado directamente por la expresión génica en las células estromales del útero, que resulta en la estimulación del crecimiento uterino y placentario (Manalu-Sumaryadi, 1998).

En las microfotografías de los cortes histológicos se observó un mayor número de células binucleadas en las placentas de gestaciones domésticas, en comparación con las placentas de las gestaciones de Cimarrón, y todavía mayor al

compararse con las de las placentas de las gestaciones híbridas. Las células binucleadas de las placentas de borrego Cimarrón tuvieron el mayor diámetro, en comparación con las de borregos domésticos e híbridos. A este respecto, en placentas de diferentes rumiantes domésticos (bovinos y ovinos) y silvestres (búfalos), se ha podido determinar que las células binucleadas son de suma importancia en el desarrollo de la placenta y del producto, ya que dentro de sus funciones se encuentran la secreción de factores de crecimiento, de factores angiogénicos, la formación del sincitio y el desarrollo de los cotiledones. Se sabe también que estas células son las responsables de la secreción de las glucoproteínas asociadas a la gestación, las cuales tienen funciones de inmunomodulación y transporte de péptidos durante la gestación, así como funciones relacionadas con el luteotropismo y la luteoprotección (Hradecky *et al.*, 1987; Schimidt 2005). Sin embargo, del presente trabajo no se obtiene información sobre su desarrollo durante la gestación de una cría doméstica o híbrida. Y se sabe que en días cercanos al parto, el número de estas células decrece a consecuencia de la elevación en las concentraciones de cortisol, por lo que sería importante evaluar las concentraciones de esta hormona desde el inicio del último tercio de la gestación, ya que también se ha visto que esta hormona afecta la morfología de los placentomas (Ward *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2006).

También se aprecia de manera cualitativa una menor cantidad de epitelio coriónico en las microfotografías de los cortes de cotiledones en las placentas de las crías híbridas, en comparación con los otros dos grupos, no obstante no podemos saber a que se debió dicha característica por lo que se propone investigar que mecanismos afectan esta característica, como podría ser el grado de apoptosis en la maduración placentaria (Martins *et al.*, 2004).

Es importante resaltar que a nivel microscópico no existió diferencia en el número de vasos sanguíneos ni en su diámetro, entre los diferentes tipos de placentas. Cabe resaltar que en las microfotografías analizadas, se observaron células plasmáticas o plasmocitos, aislados y cercanos al epitelio coriónico. En la literatura revisada no se encontró información sobre su localización en estas

estructuras, por lo que se considera que valdría la pena realizar más estudios para poder explicar su hallazgo. Estas células son las responsables de la secreción de anticuerpos en la respuesta inmune y son células residentes en el ambiente uterino. Sin embargo, los reportes indican que sólo se encuentran en eventos infecciosos, por lo que sería importante saber el papel que podrían desempeñar en la gestación (Pérez y Romano, 1996; Rojas 2008).

Del presente trabajo puede inferirse que la morfología placentaria puede expresarse en algunas características de las crías al nacimiento, y que a pesar que las placentas fueron a término y presentaban algunos cambios estructurales, pueden arrojar información valiosa. También sería importante poder evaluar las características de los placentomas y de las vellosidades coriónicas, ya que diferentes trabajos atribuyen diferencias en la duración de la gestación a esta característica morfológica, por ejemplo, Allen *et al.* (2003) concluyeron que la duración de la gestación puede ser mayor por efecto de la complejidad y ramificaciones de las vellosidades del corion, señalando que los microcotiledones eran menos ramificados en los yeguas en comparación con las burras. Abd-Elnaeim *et al* (2003) y Schimidt (2005), describieron que la interdigitación materno fetal era diferente entre algunos bóvidos domésticos y silvestres, con mayor o menor complejidad en sus patrones de interdigitación, y que ésta complejidad podía afectar la duración de la gestación, como un mecanismo compensatorio.

Finalmente y a manera únicamente descriptiva, en el caso de las características fenotípicas de los híbridos, se observó que presentaron características de ambas especies, como el color blanco de las borregas domésticas progenitoras, pero con manchas cafés, de color del borrego Cimarrón. La forma de la cabeza fue parecida a la del Cimarrón, en cuanto a su concavidad, y la cola fue más larga que la del Cimarrón, pero más corta que la de los borregos domésticos.

Con base a lo anteriormente discutido se propone la realización de estudios morfométricos e histológicos, que permitan evaluar el desarrollo de la placenta y del producto durante diferentes etapas de la gestación. De la misma manera sería

conveniente tratar de evaluar algunos de los factores reguladores de la síntesis de progesterona en la placenta, como podrían ser StAR o la prostaglandina E (PGE).

IX. CONCLUSIÓN

En resumen en el presente trabajo se observó que las gestaciones interespecie de borrego doméstico con borrego Cimarrón, presentaron características particulares en comparación con las gestaciones intraespecíficas.

De los hallazgos más destacables se observó un menor tamaño y peso en los cotiledones y en las crías al nacimiento de las gestaciones con crías híbridas, además de una menor concentración de progesterona en comparación con las borregas con crías domésticas, sobre todo en las semanas donde se ha publicado que existe un crecimiento exponencial en la unidad feto-placenta.

Con base en lo anterior podemos concluir que las características morfométricas de las placentas, tuvieron un efecto en la función placentaria que se reflejó en las características morfométricas de las crías al nacimiento como lo fue en la longitud, el peso y posiblemente en la secreción de progesterona.

La hibridación y las gestaciones interespecie como la presentada en este trabajo, son un modelo importante para estudiar la fisiología reproductiva general. Este tipo de gestaciones interespecie pueden ser un modelo para evaluar algunos mecanismos de adaptación que deben establecerse entre el útero y la unidad feto-placenta.

X. LITERATURA CITADA

Allen W R, Carter A M, Chavatte P P, Dantzer V, Enders A C, Freyer C, Leiser R and Miglino MA. 2003. Comparative placentation-a workshop report. *Placenta*. 24 (17): S100-S103.

Allen W R, Skidmore J A, Stewart F and Antczak D F. 1993. Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids. *J Reprod Fert*. 97: 55-60.

Amstrong D T and Evans G. 1984. Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *J. Reprod and Fert*. 71: 89-94.

Anderson G B. 1988. Interspecific pregnancy: barriers and prospects. *Biol Reprod*. 38; 1-15

Bainbridge D R J. 2000. Evolution of mammalian pregnancy in the presence of the maternal immune system. *Reviews Reproduction*. 5: 67-74.

Barrio E, Calvo M T, Romo A, Alvarez R, Gutierrez J I y Fernández L A. 2003. Crecimiento intrauterino restringido: estudio de la apoptosis en la placenta. *An Pediatr* ; 58 (suppl 2): 51-54.

Battaglia F C and Regnault T R H. 2001. Placental transport and metabolism of amino acids. *Placenta*. 22: 145-161

Bennett S D, and Foster W R. 1985. Successful transfer of a zebra embryo to a domestic horse. *Equine Vet J*; 3: 78-79 (Suppl).

Benirschke K. 2004. Domestic sheep. Comparative placentation. <http://placentation.ucsd.edu/>

Betancourt A M A, Flores P F I, Rosas V C, Pérez M M. 2006. Papel de las citocinas en la implantación embrionaria en maníferos domésticos. *Vet Mex*. 37 (3) 335- 350.

Borowicz P P, Arnold R D, Johnson L M, Grazul-Bilska T A, Redmer A D, Reynolds P L. 2007. Placental growth throughout the last two thirds of pregnancy in sheep: vascular development and angiogenic factor expression. *Biol Reprod*. 76; 259-267.

- Braun T, Li S, Moss JMT, Newnham JP, Challis RGJ, Gluckman DP, Sloboda MD. 2007. Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. *J of Endocrinology* 194; 337-347.
- Buckrell BC, Gartley CJ, Mehren KG, Crawshaw GJ, Johnson WH, Barker IK, Balke J, Coghill C, Challis JR, Groodrowe KL .1990. Failure to maintain interspecific pregnancy after transfer of dall's sheep embryos to domestic ewes. *J Reprod Fert* 98: 387- 394
- Bunch T D, and Workman G W. 1991. Artificial insemination of wild sheep. Desert Bighorn Council. Trans 20-21.
- Bunch T D, Wu C, Zhang Y P and Wang S. 2006. Phylogenetic analysis of snow sheep (*Ovis nivicola*) and closely related Taxa. *J of Heredity*. 97 (1); 21-30
- Burton GJ, Carole A S, Steven DH. 1976. Ultrastructural studies of placenta of the ewe: phagocytosis of erythrocytes by chorionic epithelium at the central depression of the cotyledon. *Q J of Exp Physiol*. 61: 275-286.
- Carvalho AF, Kilisch K, Miglino MA, Pereira FTV, Bevilacqua E. 2006. Binucleate trophoblast giant cells in the water buffalo (*Bubalos bubalis*) placenta. *J. of Morphol*. 267: 50-56.
- Catchpole H. R. 1991. Hormonal mechanisms in pregnancy and parturition. reproduction in domestic animals. Academic press. NY. pp 361-380
- Catchpole R H. 1991. Hormonal mechanisms in pregnancy and parturition. Reproduction in domestic animals. Ed Perry T Cupps. Academic Press USA. 361-380.
- Challis R G J. 1998. The placenta clock. *Trophoblast Research* 12: 361-374
- Cognie Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51(1):105-116.
- Coonrod S A, Flores-Foxworth G, Moreno J F, Westhusin M, Byrd S R, Kraemer D C . 1994. Birth of armenian red sheep (*Ovis orientalis*) lambs to domestic sheep (*Ovis aries*) following interspecific embryo transfer of IVM-IVF derived embryos. *Theriogenology* 41: 182 (Abstr).

Costa N W, Miglino M A, Arrivabene M y Martins de Carvalho. 1997. Investigación anatómica de las arterias placentarias de los ovinos. Rev Chil Anat. 15: 2

Davies S, Richardson M C, Anthony F W, Mukhtar D and Cameron I T. 2004. Progesterone inhibits insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production by explants of the fallopian tube. Mol Human Reprod. 10 (12): 935-939.

Delgadillo Calvillo A C, Mejía Villanueva O, Berruecos Villalobos JM, Vásquez Peláez CG. 2003. Estudio morfológico de los cromosomas del borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*), Tabasco o Pelibuey (*Ovis aries*) y su cruce. Vet Mex. 34 (1): 27-37

Dresser B L, Pope C E, Kramer L, Kuehn G, Dahlhausen R D, Maruska E J, Reece B, and Thomas W D. 1985. Birth of bongo antelope (*Tragelaphus euryceros*) to eland antelope (*Tragelaphus orix*) and cryopreservation of bongo embryos. Theriogenology 23: 190(Abstr)

E. Echevoyen a, J.F. Beckers e, A. Sa´nchez Bonastre f, X. Vignon

Elliot M G, and Crespi B J. 2006. Placental invasiveness mediates the evolution of hybrid inviability in mammals. Am Natura. 168 (1): 114-120.

Fernández Arias, A., Alabart, J. L., Folch, J., Beckers, J. F. 1999. Interspecies pregnancy of spanish ibex (*Capra pyrenaica*) fetus in domestic goat (*Capra hircus*) recipients induces abnormally high plasmatic levels of pregnancy-associated glycoprotein. Theriogenology. 51(8):1419-1430.

Folch J, Cocero M.J, Chesne P, Alabart J.L, Domínguez V, Cognie Y, Roche A, Fernández-Arias A , Martí J.I, Sánchez P. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. Theriogenology. 71: 1026-1034.

Galan HL, Regnault RHT, Le Crass DT, Tyson RW, Anthony RV. 2001. Cotyledon and binucleate cell nitric oxide synthase expression in an ovine model of fetal growth restriction. J Appl Physiol. 90; 2420-2426.

Garde J., S. Perez, M. Aguado, E. Ayllon, D. Garrido y V. Montoro. 1995. Live birth of hybrid (*O. musimon* x *O. aries*) lambs following intrauterine insemination in

domestic sheep with muflon semen obtained 40 hours postmortem. *Theriogenology*; 43(1): 1-372.

Geres D, Zubcic D, Sabo D, Pleli A, Dzaja P, Mihelic D and Müller G. 2000. Changes of progesterone concentrations in blood plasma of sows during periparturient period. *Veterinarski Arch.* 70 (1): 47-57.

González de Buitrago JM. Técnicas inmunoquímicas. En González de Buitrago JM, Arilla E, Rodríguez-Segade M, Sánchez A (eds). 1998. *Bioquímica Clínica*, 1ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid: 29-48.

growth restriction. *J Clin Pathol* 2008;61: 1254–1260.

Guillomot M. 1995. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fert. suppl.* 49, 39-51.

Gutierrez-Espleta, G. A., S. T. Kalinowski, W. M. Boyce, and P. W. Hedrick. 2000. Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: Implications for conservation. *Cons. Genet.* 1: 3-15.

Hafez E S E. 2002. Ovejas y Cabras. en: *Reproducción e inseminación Artificial en Animales*. 7th Ed. Interamericana, McGraw-Hill. 177-187

Hamon MH and Heap RB. 1990. Progesterone and oestrogen concentrations in plasma of barbary sheep (aoudad, *Ammontragus lervia*) compared with those of domestic sheep and goats during pregnancy. *J Reprod Fert.* 90: 207-211.

Hansen P J. 1998. Regulation of uterine immune function by progesterone—lessons from the sheep. *J Reprod Immun*; 40: 63-79.

Hernández P J E, Fernández R F. 1999. Ciclo reproductivo de la oveja. en : *Reproducción de siete especies domésticas*. 1 ed UAM-X.

Hiendleder S, Kaupe B, Wassmuth R and Janke A. 2002. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proc. R. Soc. Lond. B* (2002) 269, 893–904.

Hradecky P, Mossman H.W, and Stott G.G.1987. Comparative histology of antelope placentomes. *Theriogenology.* 29 (3): 693- 714.

- Jerzak M and Bischof P. 2002. Apoptosis en la placenta humana durante el primer trimestre: papel para mantener el privilegio inmune en la superficie materno-fetal y en el remodelado del trofoblasto. *E J Obs Gynecol and Reprod Biol.* 2: 142-146.
- Karp G. 2005. Apoptosis (muerte celular programada) en: *Biología Celular y molecular. conceptos y experimentos.* 4ª Ed. Interamericana. 710- 716.
- Krajnlaakova, E M, Bekeova, A. Lenhardt, V. Cigankova, I. Valocky, I. Maraaek. 1999. Microscopic analysis of the uterine endometrium in postparturient ewes. *Acta Vet Brno.*; 68: 9-12
- Krebs C, Longo LD, Leiser R. 1997. Term ovine placental vasculature: comparasion of sea level and high altitude conditions by corrosion cast and histomorphometry. *Placenta* 18: 43-51.
- Lasley BL, Loskutoff NM, Anderson GB. 1994. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in non-domestic species. *Theriogenology.*41: 119-132.
- Lea G. R, Wooding P, Stewart I, Hannah T. L, Morton S, Wallace K, Aitken P. R, Milne S. J, Regnault R. T, Anthony V. R, Wallace M. J. 2007. The expression of ovine placental lactógeno, StAR and progesterone-associated steroidogenic enzymes in placentae of overnourished growing adolescent ewes. *Reprod Research.* 133: 785-796.
- Leiser R, Krebs C, Ebert B, Dantzer. 1997. Placental vascular corrosion cast studies: a comparasion between ruminants and humans. *Micro Res Tech.* 38: 76-87.
- Louey S, Jonker S S, Giraud G D. and Thornburg KL. 2007. Placental insufficiency decreases cell cycle activity and terminal maturation in fetal sheep Caedimocytes. *J. Physiol.* published online Jan 18,
- Manalu W and Sumaryadi M Y. 1998. Maternal serum progesterone concentration during pregnancy and lamb birth weight at parturition in Javanese thin-tail ewes with different litter sizes. *Small ruminant res.* 30: 163-169.

- Martins V M V, Marques Junior, Vasconcelos A C, Martins E, Santos R L, Lima F P C. 2004. Placental Maturation and Expulsion in Holstein and Nelore Cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56(2):157-167.
- Mejía V O, Gual S F, Nuñez S J, Palma I M. 2008. Esquemas de sincronización y superovulación en ovejas domésticas (*Ovis aries*) como modelo para la transferencia de embriones en borregas Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*). *Perspectivas en Zoología Mexicana*. Cap 15. pp 187-203.
- Mejía V O, Ramos C D, Rivera R J, Ordáz L R, Palma I M. 2008. Congelación de semen de borregos cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) obtenido mediante electroeyaculación o postmortem. *Perspectivas en Zoología Mexicana*. Cap 16. pp 187-203.
- Miles J R, Farin, C E, Rodríguez K F, Alexander J E, and Farin P W. 2004. Angiogenesis and Morphometry of Bovine Placentas in Late Gestation from Embryos Produced In Vivo or In Vitro. *Biology Reproduction*.71; 1919-1926.
- Mondragon J. A, Ocadiz-Delgado R, Miranda C, Valencia J, Rosales A. M, Gariglio P, Romano M. C. 2007. Expression of P450-aromatase in the goat placenta throughout pregnancy. *Theriogenology*. 68: 646-653.
- Monson Gale and Summer. 1990. *The Desert Bighorn. Its Life History, Ecology and Management*. Tucson: The University of Arizona Press.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL-2001, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestre terrestre y acuática en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece para su protección. *Diario Oficial de la Federación*. México (DF): SEDESOL.
- Parraguez VH, Atlagich M, Díaz R, Cepeda R, González C. 2006. Ovine placenta at high altitudes: Comparasion of animals with different times of adaptation to hypoxic environment. *Animal Reproduction Science*. 5: 151-157
- Penninga L, Longo LD. 1998. Ovine placentoma morphology: Effect of high altitude, long term hypoxia. *Placenta*.19: 187-193.
- Pérez M M y Romano P M C. 1996. Interacción inmunoendocrina en el útero: papel de las hormonas esteroides sexuales. *Ciencia Vet* 7: 197-209.

Poitras B J, Miller R B, Wilkie B N, and. Bosu W T K. 1986. The Maternal to Fetal Transfer of Immunoglobulins Associated with Placental Lesions in Sheep. *Can J Vet Res*; 50: 68-73.

Quintela, L.A., C. Díaz, A.I. Peña, J. Becerra y P.G. Herradón. 1999. Diagnóstico precoz de gestación por ecografía transrectal en la oveja. *Arch Zootec.*; 48: 13-20

Reynolds L P, Borowicz P P, Vonnahme K A, Johnson M L, Grazul-Bilska A T, Redmer D A and Caton J S. 2005. Placental Angiogenesis in Sheep Models of Compromised Pregnancy. *J. Physiological. Topical Review.* 565 (1): 43-58.

Reynolds L P, Caton J, Redmer D A Grazul-Bilska A T, Vonnahme K A, Borowicz P P, Luther J S, Wallace J M, Wu G, and Spencer T E. 2006. Evidence for Altered Placental Blood Flow and Vascularity in Compromised Pregnancy. *J. Physiological. Topical Review*; 572 (1): 51-58.

Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the Placenta. *Biology Reproduction.* 2001; 64: 1033-1040

Riley S C, Webb C J, Leask R, McCaig F M and Howe. 2000. Involvement of Matrix Metalloproteinases 2 and 9, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases and Apoptosis in Tissue Remodelling in the Sheep Placenta. *Journal of Reproduction Fertility.* 118: 19-27

Roberts D J, Post M D. 2008. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine

Robertson A S, Seaman F R. 1994. The role of cytokines in gestation. *Critical Reviews in Immunology.* 14 (3&4): 239-292.

Rojas MW. 2007. Inflamación. en: *Inmunología de Rojas. Decimocuarta edición.* Corp para investigaciones biológicas. Colombia. 80-83; 236.

Romualdo J G, Sierra A C, Ortiz J R, Hernández J S. 2004. Caracterización morfológica del ovino pelibuey local en Yucatán, México. *Archivos Latinoamericanos de producción Animal.* Vol 1:4 (1). 26-31.

Rosa H.J.D. and Bryant M.J. 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research* 48: 155-171.

- Roth T L, White K L and Horohov D W. 1991. Suppression of sheep and goat lymphocyte proliferation by sheep, goat, and sheep x goat hybrid trophoblast tissue cultures. *J Animal Science*. 69: 4563- 4569.
- Sammin D, Markey B, Bassett H, Buxton D. 2008. The ovine placenta and placentitis-a review. *Vet Micro*. Article in press.
- Santiago M, J., González-Bulnes, A. Gómez-Brunet YA., Cocero M J, del Campo A. García-García R, and López-S A. 2001. Procedure for successful Interspecific embryo transfer from mouflon (*Ovis gmelini musimon*) to spanish merino sheep (*Ovis aries*). *J Zoo Wild Medicine*. 32 (3); 336-341.
- Santiago MJ, González-Bulnes, A. Gómez-Brunet YA. López-S. 1999. Evolución de los niveles de progesterona durante la gestación de la hembra de muflón (*Ovis gmelini musimon*). *Medicina Veterinaria*. 16: 134-141.
- Schmidt Susane. 2005. Morphology of peri-partal placentomes and post-partal foetal membranes in African Buffalo (*Syncerus caffer*) and comparative aspects with cattle (*Bos Taurus*).. Thesis of master. University of Pretoria. South Africa.
- Shackleton, D.M., R.G. Peterson, J. Haywood, and A. Bottrell. 1984. Gestation period in *Ovis canadensis*. *Journal of Mammalogy* 65: 337-338.
- Sharkey Andews. 1998. Citokines and implantation. *Reviews of Reproduction. Journals of Reproduction and Fertility*. 3: 52-61.
- Shawn L S C, Vikki M A, Gil M. 2005. The Role of Apoptosis in the Regulation of Trophoblast Survival and Differentiation During Pregnancy. *Endocrine reviews*. 1-75.
- Shawn L S-C, Vikki M A and Gil M. 2005. The role of the apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine reviews*.
- Siiteri, K P and Stites P D. 1982 Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biology of Reproduction*. 26: 1-14.
- Spencer E T, Johnson A G, Bazer F W, Burghardt C R. 2004. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Review. Reproduction*. 128: 657-668.

- Stover J, Evans J, and Dolensek EP. 1981. Inter Species embryo Transfer from the Gaur to Domestic Holstein. *Proc Am Assoc Vets.* 122-124.
- Strmsnik L M, Pogacnik N, Cebulj K M, Kosec M. 2002. Examination of oestrus cycle and early pregnancy in sheep using transrectal ultrasonography. *Slov Vet Res.*39 (1): 47-58.
- Su X. Y, Carey C. L, Rose C. J. 2004. Ontogeny of StAR and ACTH-R Genes in Ovine Placenta. *Placenta.* 25: 658-663.
- Taylor M J, Webb R, Mitchell M D, Robimson J S. 1982. Effect of Progesterone Withdrawal in Sheep during Late Pregnancy. *Journal of Endocrinology.*; 92: 85-93.
- Tizard I R. 2002. Hipersensibilidad tipo I. en: *Inmunología Veterinaria.* Sexta Edicion. Mc graw Hill Mexico.: 334-339
- Tuckey C R. 2005. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta.* 26: 273-281.
- Turner, J.C. and C.G. Hansen. Reproduction. In: G. Monson and L. Sumner, eds. 1980. *The Desert Bighorn: Its Life History, Ecology, and Management.*. Tucson: The University of Arizona Press. 370. 145-151
- Vigano P, Mangioni S, Pompei F and Chiodo I. 2003. Maternal-conceptus Cross Talk – A review. *Placenta* 24; S56-S61.
- Wallace J M, Bourke D A, Da Silva P and Aitken R P. 2003. Influence of Progesterone Supplementation during the First Third of Pregnancy and Placental Growth in Overnourished Adolescents Ewes. *Reproduction.* 126: 481-487.
- Ward J W, Forhead A J, Wooding F B P, Fowden A L. 2006. Functional significance and Cortisol Dependence of the Gross Morphology of Ovine Placentomes During Late Gestation. *Biol Reprod.* 74: 137-145.
- Ward JW, Wooding FBP, Fowden AL. 2002. The effects of cortisol on the binucleate cell population in the ovine placenta during late gestation. *Placenta.* 23: 451-458.
- Wayne W D. 2005. *Bioestadística: Bases para el análisis de las ciencias de la salud.* Cuarta Edición. Limusa México. Pp 295-359; 601-700.

- Weems S. Y, Kim L, Tsuda V, Yin C, Weems W. C. 2007. What regulates placental steroidogenesis in 90-day pregnant ewes? Prostaglandins & other Lipids Mediators. 84: 54-65.
- Weiss Gerson. 2000. Endocrinology of parturition. The Journal of endocrinology & metabolism. 85: 12: 4421-4425.
- Wilson DE, Reeder, D.M. 1993. Mammalian species of the world: a taxonomic and geographic reference. Smithsonian Institution Press. Washington, D.C. EUA.
- Wilson M. E. 2001. Role of placental function in mediating conceptus growth and survival J. Anim. Sci.; 80 (E. Suppl. 2):E195–E201.
- Wooding FBP. 1980. Electron microscopic localization of binucleate cells in the sheep placenta using-phosphotungstic acid. Biology Reprod.; 22: 357-365.
- Yancopoulos D G, Davis S, Gale W N, Rudge S J, Wiegand J S and & Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature. 407. 242-248.
- Yancopoulos D G, Davis S, Gale W N, Rudge S J, Wiegand J S, Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature. 407. 242-248.
- Yotov S. 2005. Diagnostic of Early Pregnancy in Stara Zagora Dairy Sheep Breed. Bulgarian J Vet Med; 8 (1): 41-45.