

# Caracterización del colágeno placentario fetal en cabras restringidas nutricionalmente durante la etapa prepuberal

## Characterization of fetal placental collagen in nutritionally restricted goats during the prepubertal stage

GÓMEZ, KP<sup>1,3</sup>; FIORIMANTI, MR<sup>3</sup>; CRISTOFOLINI, AL<sup>1,3</sup>; BENZONI, A<sup>2</sup>; LUJÁN, M<sup>2</sup>; LUJÁN, O<sup>2</sup>;  
BARBEITO, CG<sup>3,4</sup>; MERKIS, CI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología Animal. <sup>2</sup>Departamento de Clínica Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. <sup>3</sup>CONICET. <sup>4</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata.

### RESUMEN

El objetivo del trabajo fue identificar mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión y la técnica de picosirius red, la presencia y disposición de colágeno en placentas fetales a término, provenientes de un modelo de restricción nutricional. Se tomaron muestras de cotiledones placentarios para el análisis de la estructura tisular y vascular mediante la coloración tricrómica de Masson y para el análisis de la morfología y disposición de colágeno mediante microscopía electrónica de transmisión y picosirius red. En placentas fetales restringidas, se observaron vasos de mayor tamaño en relación con placentas controles. En ellas, predominaron las fibras colágenas verdes y anaranjadas, delgadas y gruesas respectivamente. En las muestras placentarias controles se detectaron fibras anaranjadas y amarillas, gruesas e intermedias respectivamente. Las hembras restringidas nutricionalmente expresaron adecuación en el desarrollo de la red vascular placentaria, y revelaron cambios en la expresión y disposición de las fibras colágenas, particularmente de las fibras más gruesas, fundamentales para mantener la resistencia e integridad placentaria a lo largo de la gestación. Dichas diferencias morfológicas entre los tratamientos demostraron que la hembra caprina es capaz de afrontar ambientes adversos mediante mecanismos de adaptación metabólicos y fisiológicos.

**Palabras clave:** (subalimentación), (caprinos), (placenta), (vascularización)

## SUMMARY

The objective of the work was to identify, through optical microscopy, transmission electron microscopy and the picrosirius red technique, the presence and disposition of collagen in term fetal placentas, coming from a nutritional restriction model. Samples of placental cotyledons were taken for analysis of tissue and vascular structure using Masson's trichrome staining and for analysis of collagen morphology and arrangement using transmission electron microscopy and picrosirius red. In restricted fetal placentas, larger vessels were observed in relation to control placentas. In them, green and orange collagen fibres predominated, thin and thick respectively. In the control placental samples, orange and yellow, thick and intermediate fibres were detected, respectively. Nutritionally restricted females expressed adequacy in the development of the placental vascular network, and revealed changes in the expression and arrangement of collagen fibres, particularly the thicker fibers, essential for maintaining placental resistance and integrity throughout gestation. These morphological differences between treatments demonstrated that female goats are capable of facing adverse environments through metabolic and physiological adaptation mechanisms.

**Keywords:** (underfeeding), (goats), (placenta), (vascularization)

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la producción caprina, las etapas de pre-servicio, servicio, gestación y lactancia son consideradas períodos críticos que deben contemplarse para garantizar un nivel productivo satisfactorio<sup>10</sup>. Una alimentación errática y deficiente, donde el alimento no cubre los requerimientos nutricionales del animal, deriva en una baja tasa reproductiva/ productiva<sup>12,14</sup>.

La gestación caprina dura en promedio alrededor de 150 días<sup>26</sup>. Durante las últimas seis semanas de preñez, se produce un aumento exponencial del 70 % del crecimiento fetal, con lo cual también lo hacen las necesidades nutricionales<sup>5</sup>. Un buen estado nutricional materno asegura el nacimiento de una cría fuerte, y una posterior lactancia en cantidad y calidad suficiente<sup>7,10,11</sup>.

La placenta es esencial para llevar a cabo el suministro eficiente de nutrientes y oxígeno de la madre al feto y asegurar así, el éxito de la preñez<sup>24</sup>. Por lo tanto, para garantizar el correcto desarrollo fetal, es necesario que, mediante dicho órgano altamente vascularizado, ocurra un correcto transporte entre la circulación materna y fetal<sup>5, 16</sup>. Procesos como la neovascularización y vasculogénesis hacen posible el aumento del flujo sanguíneo placentario<sup>1, 3</sup>. En caprinos, la angiogénesis placentaria comienza en etapas tempranas de la preñez, se trata de un proceso fundamental para la implantación del embrión, crecimiento y desarrollo normal del feto, como así también, para el rendimiento reproductivo animal<sup>23</sup>.

Para llevar a cabo dicho proceso, deben ocurrir cambios fisiológicos e histológicos que conlleven a la formación de una adecuada red

vascular<sup>8</sup>. Para la neovascularización se requiere una correcta matriz extracelular placentaria que proporcione sostén<sup>16</sup>. Dentro del conjunto de macromoléculas que constituyen su arquitectura se encuentra el sistema de colágeno, constituido fundamentalmente por proteínas fibrilares (colágeno tipo I y tipo III) con diferentes localizaciones en el tejido materno-embionario<sup>20</sup>. Las diferentes fibras de colágeno son las principales componentes estructurales de las membranas placentarias. Durante la gestación es necesario que las mismas sean lo suficientemente fuertes y elásticas para soportar un estiramiento del doble de su tamaño en estadíos tardíos de preñez y simultáneamente resistir los movimientos fetales<sup>18</sup>. La tinción con picrosirius red vista bajo microscopía de luz polarizada, es uno de los métodos de excelencia para evaluar la organización de las fibras de colágeno en los tejidos<sup>15</sup>. Se trata de una de las técnicas histoquímicas más aplicadas, y se fundamenta en las propiedades birrefringentes del colágeno. Representa un método que nos permite interpretar la organización de la matriz extracelular, como así también la orientación de las fibras colágenas en diversos tejidos conectivos en condiciones normales o patológicas<sup>17</sup>.

Por otra parte, en condiciones extensivas como las que prevalecen en nuestro país, con limitaciones estacionales de calidad y cantidad de alimento, la nutrición y consecuente tasa de crecimiento de las hembras, como así también el estado metabólico logrado, puede incidir sobre el normal desarrollo placentario y por lo tanto

sobre la eficiencia productiva y reproductiva en caprinos<sup>5,9,22</sup>. Bajo un sistema de subalimentación es de vital importancia determinar si la restricción energética en la hembra prepuberal afecta el normal desarrollo placentario cuando ésta desarrolle gestaciones futuras<sup>4,22,23</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue identificar mediante la técnica de picrosirius red, microscopía electrónica de transmisión y la coloración tricrómica de Masson, la presencia y disposición funcional de diferentes fibras de colágeno en placentas caprinas a término provenientes de un modelo de restricción nutricional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron 10 cabrillonas prepúberes nacidas en primavera, de 4 meses de edad y de aproximadamente 12 kg de peso vivo, de la zona de Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 33° 08' S, 64° 20' O, bajo condición de fotoperiodo natural<sup>3</sup>.

### Modelo de restricción alimentaria

En el ensayo de restricción alimentaria durante la etapa peri puberal y posterior realimentación, los animales fueron asignados a dos grupos que recibieron diferentes tratamientos: C: grupo control, compuesto por animales con consumo de materia seca (CMS) a voluntad y R: grupo restringido, integrado por animales sometidos a una restricción del 30 % del consumo potencial logrado en las hembras del grupo C. La dieta estuvo compuesta por una mezcla 70:30 de heno de alfalfa picado y grano de maíz molido, logrando una concentración energética de 2.4 Mcal/kg MS. Los animales del grupo R fueron mantenidos en restricción un periodo de 250 días, luego del cual fueron alimentados a voluntad hasta la segunda estación reproductiva. Luego de comprobar la ciclicidad de todas las hembras, se realizó el servicio por monta natural. La totalidad de las hembras fueron preñadas y las placentas fueron recolectadas inmediatamente después de la parición.

### Obtención de placentas

Las placentas fueron lavadas con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco, USA), manteniéndolas a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Se estableció el número cotiledonario, y se tomaron aleatoriamente muestras de 5 cotiledones por placenta fetal de la zona central, los cuales fueron colocados en formol tamponado

al 10 %. Además, se tomaron muestras de otros 5 cotiledones por placenta fetal de la zona central, los mismos se colocaron en glutaraldehído tamponado al 2,5 % para el posterior análisis por microscopía electrónica de transmisión.

### Análisis de la estructura tisular, vascular y colágena

**Técnica histológica convencional para microscopía óptica.** Las muestras de placenta fetal se fijaron en formol tamponado al 10 % y se procedió con la técnica histológica de rutina. Los tejidos fueron cortados en un micrótopo IEC Minetome en delgadas láminas de 5 a 6 µm.

**Coloración tricrómica de Masson.** Los cortes se colorearon según lo expresado por Clark<sup>2</sup> en 1981, para el análisis por microscopía óptica de la estructura tisular y vascular placentaria.

**Picrosirius red.** Para el estudio de las fibras de colágeno de acuerdo con su grosor, se utilizó la coloración específica de picrosirius red. Al utilizar ópticas de polarización con ejes polares cruzados, las fibras colágenas emiten birrefringencia, los colores observados representan una medida del grosor del colágeno presente, así como de la densidad de su empaquetamiento y disposición espacial<sup>18</sup>. Para llevar a cabo dicha técnica, los cortes de cotiledones fueron coloreados con hematoxilina de Weigert, durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó un lavado de diez minutos con agua corriente. Se agregó la solución de rojo de sirio dejándolos durante 1 hora. A continuación, se realizaron dos lavados con agua ácida. Se deshidrataron y lavaron con etanol al 100 % y xilol respectivamente, se montaron con Entellan (Merck, Alemania) para ser observados en el microscopio óptico de luz polarizada Eclipse-E- 600- POL (Nikon Instruments INC, USA). La adquisición de imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón)<sup>20</sup>. Mediante esta técnica las fibras colágenas se colorearon en verde, amarillo, naranja o rojo, en orden creciente al grosor de fibras colágenas.

**Técnica convencional de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).** Las muestras placentarias fetales de 1-1,5mm<sup>3</sup> fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5 % en solución tampón fosfato y en tetróxido de osmio al 1 %. La deshidratación se realizó en batería de acetona de concentraciones crecientes. Las muestras fueron incluidas en EMBED 812 (EMS®, Hatfield, USA) a 60 °C. Una vez obtenidos los tacos, se realizaron cortes ultrafinos con cuchilla de diamante (60-80 nm). Los mismos, fueron cargados en grillas de cobre

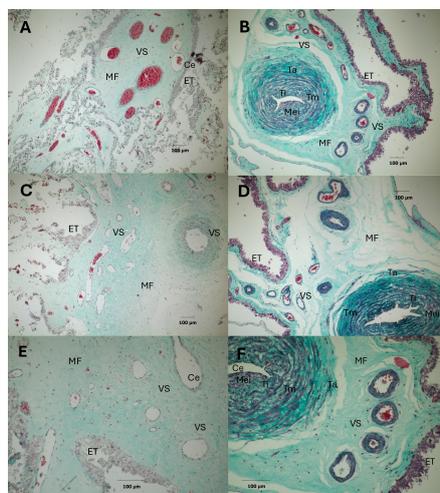
y contrastados con acetato de uranilo (solución saturada al 50 %, diluido 1:1 con acetona absoluta al momento de usar) y citrato de plomo (3 %). La observación se realizó a través de un microscopio electrónico de transmisión Elmiskop 101 (Siemens, Alemania) y la adquisición de imágenes mediante un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 Ex II (JEOL, Japón).

**Análisis estadístico.** Los resultados obtenidos en la técnica de picrosirius red fueron expresados en forma semicuantitativa, en función del color de fibra colágena identificada: verde, amarillo, naranja o rojo, siendo verde las fibras colágenas más finas, amarillo y naranja aquellas de grosor intermedio, y rojo las más gruesas<sup>19</sup>. La intensidad de marcación de las moléculas se realizó a través del valor High Score, definido como  $HS: \sum Pi (i + 1)$ , donde "i" es la intensidad de marcación y, "Pi" es el porcentaje de marcación. Para ello, se evaluaron 10 campos al azar por placenta (utilizando el objetivo de 20 X), determinando la disposición de las fibras colágenas según su grosor y la distribución de la birrefringencia, mediante el valor de High Score (HS)<sup>8</sup>. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el software InfoStat<sup>6</sup>, mediante un ANOVA con un test *a posteriori* LSD-Fisher para evaluar la dependencia de las fibras colágenas analizadas con respecto al tratamiento asignado, usando un diseño completamente al azar. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar para cada tratamiento. Los resultados se consideraron significativos con un valor de  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### Análisis de la estructura vascular en placentas caprinas sometidas a restricción nutricional mediante la técnica tricrómica de Masson

El estudio vascular sobre placentas a término provenientes del ensayo de restricción nutricional prepuberal y posterior realimentación, reveló que las placentas cuyas hembras fueron restringidas nutricionalmente, presentaron vasos sanguíneos de gran tamaño en la proximidad a la zona arcada de las vellosidades coriónicas (Figura 1- B, D, F). Particularmente, se observó un predominio de arterias y arteriolas, las cuales se caracterizaron por la expresión de una intensa coloración verdosa en su capa más externa (adventicia). Esta coloración adquirida se relaciona a la presencia de fibras elásticas. Las mismas, fueron delimitadas en compañía de estrías de color rojo correspondientes a fibras de colágeno. La túnica adventicia se conformó particularmente de fibrillas colágenas, fibras elásticas y fibroblastos. Hacia el interior de esta región, en dirección a la luz vascular, fue posible observar en la túnica media, una moderada coloración verdosa correspondiente a fibras de elastina, estas acompañaban a las células musculares, las cuales fueron identificadas con tonalidades de rosa y violeta. En cuanto a la lámina íntima, en ella se distinguió una delgada membrana elástica en tonalidades de verde subyacentes a las células endoteliales (Figura 1- B, D, F). Además, en las muestras placentarias, fue posible apreciar la presencia de vénulas dispersas, las mismas presentaban una pared vascular mayormente laxa con respecto a las arteriolas (Figura 1-B). A su vez, aquellos vasos sanguíneos más pequeños (capilares) se dispusieron en estrecha relación con el epitelio trofoblástico fetal (Figura 1-B, D, F). Por su parte, en placentas control la red vascular a término, se caracterizó por presentar numerosas y pequeñas estructuras vasculares distribuidas uniformemente a lo largo de todo el mesénquima fetal (Figura 1- A, C, E).

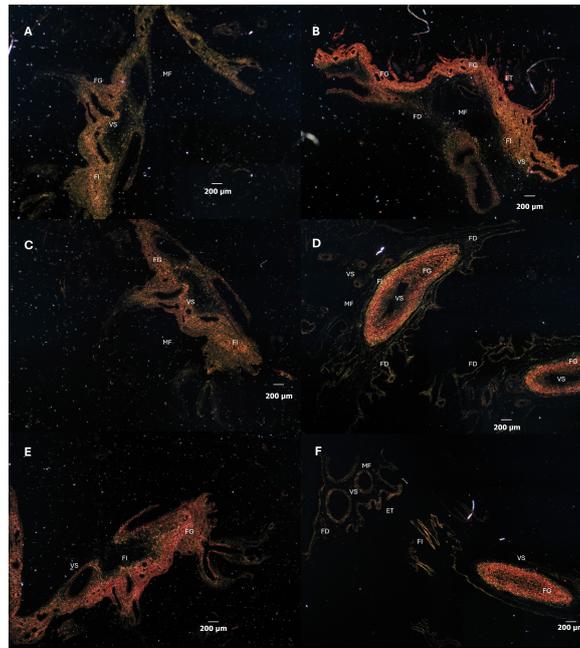


**Figura 1.** Placentas caprinas a término provenientes de un ensayo de restricción nutricional y posterior realimentación coloreadas mediante la técnica tricrómica de Masson. A, C: Placentas control de 150 días, (100 X). E: Placenta control de 150 días, (200 X). B, D: Placentas restringidas de 150 días, (100 X). F: Placenta restringida de 150 días, (200 X). MF: Mesénquima fetal; VS: Vasos sanguíneos; ET: Epitelio trofoblástico; Ce: Células endoteliales; Ta: Túnica adventicia; Tm: Túnica media; Ti: Túnica íntima. Mei: Membrana elástica interna. Escala A-F: 100  $\mu$ m.

**Identificación de diferentes fibras colágenas en placentas fetales sometidas a restricción nutricional mediante la técnica de picrosirius red**

En placentas fetales control, se determinó el predominio de fibras anaranjadas y amarillas, gruesas e intermedias respectivamente, dispuestas zonalmente a lo largo del mesénquima fetal (Figura 2- A, C, E). Las placentas restringidas

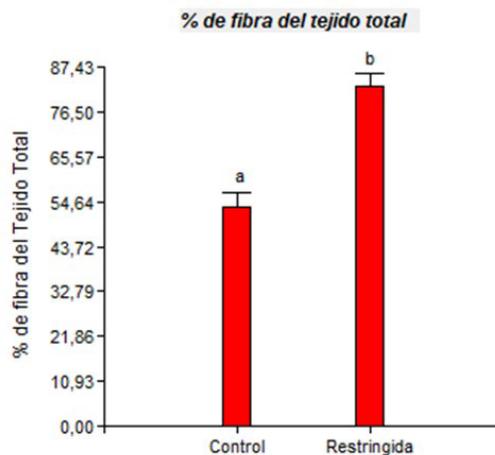
revelaron preponderantemente fibras colágenas en tonalidades de verde y anaranjado-rojizo, es decir delgadas y gruesas respectivamente (Figura 2- B, D, F). Estas fibras presentaron mayor extensión a lo largo del mesénquima fetal, particularmente las fibras gruesas, se posicionaron en estrecha relación a los vasos sanguíneos, subyacente a cada uno de ellos (Figura 2- D, F).



**Figura 2.** Placentas caprinas a término provenientes de un ensayo de restricción nutricional y posterior realimentación coloreadas mediante la técnica de picrosirius red. A, C, E: Placentas control 150 días. B, D, F: Placentas restringidas 150 días. Fibras delgadas identificadas en color verde, fibras intermedias en amarillo, y fibras gruesas en color anaranjado rojizo. ET: Epitelio trofoblástico. MF: Mesenquima fetal. VS: Vasos sanguíneos. FD: Fibras delgadas. FI: Fibras intermedias. FG: Fibras gruesas. Escala A-F: 200 μm.

El análisis estadístico del porcentaje total de fibras evidenció diferencias significativas entre placentas control y placentas restringidas. Mientras que, la asociación entre la condición placentaria y la presencia

de fibras según su grosor, evaluada mediante la prueba de Chi cuadrado, determinó en placentas restringidas, un mayor porcentaje de fibras gruesas ( $p < 0,05$ ), respecto a las placentas controles (Figura 3) (Tabla 1).



**Figura 3.** Análisis estadístico de muestras placentarias caprinas, ensayo de restricción nutricional. Porcentaje de fibra total tisular. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

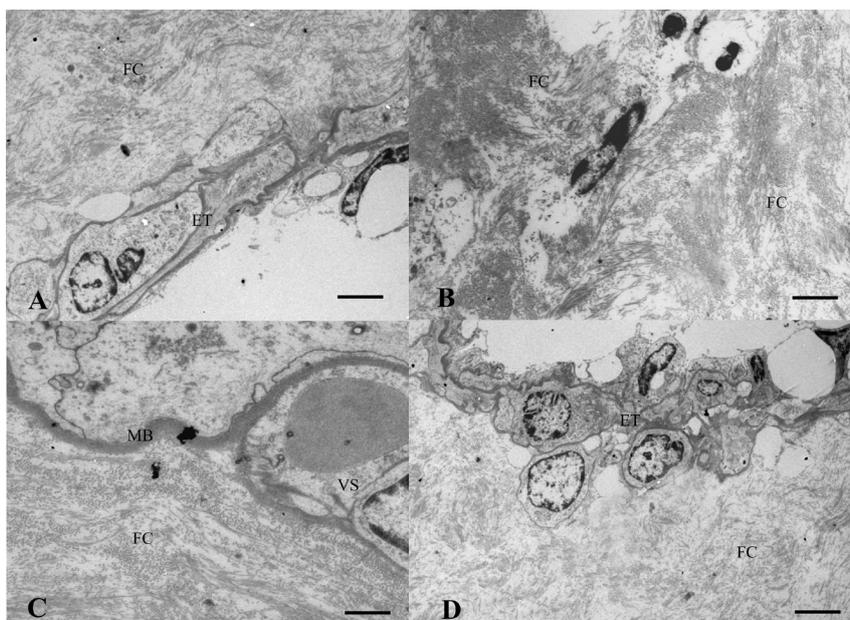
**Tabla 1.** Frecuencias absolutas y relativas para los diferentes colores de fibra en los diferentes tratamientos. En donde placentas controles expresan mayor porcentaje de fibras en color verde y amarillo, (delgadas e intermedia respectivamente). Mientras que placentas restringidas revelan mayor porcentaje de fibras verdes y anaranjadas, (delgadas y gruesas respectivamente).

Frecuencias absolutas.				Frecuencias relativas.			
Color De fibra	Control	Restringida	Total	Color de fibra	Control	Restringida	Total
Amarillo	7	5	12	Amarillo	35,00	21,74	27,91
Naranja	6	10	16	Naranja	30,00	43,48	37,21
Verde	7	8	15	Verde	35,00	34,78	34,88
Total	20	23	43	Total	100	100	100

**Análisis de morfología y disposición de las diferentes fibras colágenas mediante la técnica de TEM.**

La Figura 4 muestra ultramicrofotografías de placentas fetales caprinas. En ellas, es posible visualizar en detalle las vellosidades fetales, donde discurren abundantes estructuras vasculares en íntima relación con la membrana basal del epitelio trofoblástico, dicho epitelio se dispone en estrecho contacto a diferentes fibras colágenas (Figura 4- A). El análisis mediante microscopia electrónica de transmisión reveló

en detalle la ultraestructura de diferentes fibras colágenas; las cuales se distribuyeron densamente a lo largo del mesénquima fetal. Aquellas fibras más delgadas se organizaron finamente en forma de red (Figura 4- D). Por su parte, las fibras colágenas más gruesas se agruparon para formar fibras colágenas mayores; las mismas se dispusieron densamente agrupadas en paquetes (Figura 4- B, C). Este sistema de organización de ambos tipos de fibras es fundamental para desempeñar un papel estructural en la matriz placentaria.



**Figura 4.** Análisis de ultraestructura placentaria mediante TEM en cortes placentarios caprinos provenientes de un ensayo de restricción nutricional. FC: Fibras colágenas. MB: Membrana basal. VS: Vasos sanguíneos. ET: Epitelio trofoblástico.

## DISCUSIÓN

La madurez del aparato reproductivo de la hembra y el inicio de la actividad sexual es altamente dependiente del grado de desarrollo corporal y en el cual, una buena alimentación juega un rol fundamental<sup>5,14</sup>.

La cabra ha logrado adaptarse a zonas agroecológicas no óptimas, mediante mecanismos conductuales y fisiológicos, que les permiten consumir alimento y producir en condiciones limitantes para otras especies<sup>13,22</sup>. La capacidad de reducir el metabolismo como medida adaptativa, le permite sobrevivir incluso después de periodos prolongados de disponibilidad limitada de alimentos y llevar a cabo bajo estas condiciones su actividad productiva/ reproductiva<sup>9; 11; 21</sup>. El presente ensayo indicó que en las placentas fetales provenientes de hembras que fueron sometidas a restricción nutricional, poseen vasos sanguíneos de mayor tamaño con respecto a placentas de hembras controles. La técnica tricromica de Masson puso en evidencia la existencia de un predominio de arterias y arteriolas a lo largo del mesénquima fetal, mientras que en hembras controles hubo preeminencia de capilares dispersos<sup>25</sup>. Estos resultados podrían revelar lo expresado por Silanikove y su grupo investigador<sup>21,22</sup>, quienes desarrollan en sus trabajos el estudio de la característica habilidad de la especie caprina en expresarmecanismos de adaptación fisiológica ante escenarios no óptimos para otras especies de producción. Procesos que incluyen no solo adaptación metabólica, sino también en la histoarquitectura de diferentes tejidos para mantener y llevar a cabo de manera eficaz sus funciones biológicas.

Por otro lado, la tinción de picrosirius red se utilizó para evaluar las diferentes fibras de colágeno placentarias, para lo cual, las placentas de hembras control, revelaron un predominio de fibras anaranjadas y amarillas, gruesas e intermedias, respectivamente, dispuestas zonalmente a lo largo del mesénquima fetal, mientras que placentas de hembras restringidas nutricionalmente presentaron fibras reticulares en tonalidades de verde y fibras colágenas

anaranjadas - rojizas, es decir delgadas y gruesas respectivamente. En concordancia a lo expresado por Rittié<sup>19</sup>, comprobamos que existe una relación entre el color expresado por la fibra de colágeno y su grosor, fibras más gruesas en tonalidades de naranja corresponden a fibras colágenas tipo I, mientras que aquellas más delgadas, en tonos de verde coinciden con colágeno tipo III. En ensayos realizados con yeguas se vió que las fibras reticulares, en tonalidades de verde estaban formadas predominantemente por colágeno tipo III, desempeñando un papel de apoyo, distribuyéndose finamente en forma de red<sup>17</sup>. Por su parte, en nuestro trabajo, el colágeno fibrilar tipo I unido al rojo de sirio se presenta en tonalidades de anaranjado y rojizo brillante, estas fibras están densamente agrupadas en paquetes, desempeñando un papel estructural y promoviendo la conexión entre diferentes estructuras<sup>17</sup>. Este sistema de organización de ambos tipos de fibras es fundamental para desempeñar un papel estructural en la matriz placentaria. Dicha función, es de vital importancia si se considera que durante la preñez es necesario que las membranas fetales sean lo suficientemente fuertes y elásticas para resistir un estiramiento del doble de su tamaño en estadios tardíos de gestación y resistir los movimientos fetales<sup>18</sup>.

## CONCLUSIÓN

Las cabras, en condiciones nutricionales adversas expresan adecuación en el desarrollo de la red vascular placentaria, incrementando el número de arteriolas a lo largo del mesénquima fetal mediante mecanismos de adaptación metabólicos y fisiológicos. Bajo condiciones de restricción nutricional, dicha especie es capaz de revelar cambios en el grosor y disposición de las fibras colágenas, particularmente de las fibras colágenas tipo I, fundamentales para mantener la resistencia e integridad placentaria a lo largo de la gestación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Burton, G.; Charnock, D.; Jauniaux E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction*. 2009;138: 895-902.
- Clark, G. Methods for general tissue. In: Staining procedures. Fourth edition. Pp 105- 112, Williams and Wilkins USA.1981.
- Cristofolini, A.; Merkis, C.; Koncurat, M. Remodelación celular durante la placentación porcina. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG. 2012; (pp. 14-32).
- Cristofolini, A.; Turiello, M.; Sanchis, E.; Cufre, G.; Merkis, C. Effect of feed restriction and realimentation with monensin supplementation on placental structure and ultrastructure in anglo-nubian goats ISRN Veterinary Science. 2012; 490530, 1-10.
- Cufre, G.; Chaves, M.; Godio, L.; Vazquez, M.; Forchetti, O.; Martinez, R. Efecto de la restricción en el consumo sobre la eficiencia productiva, perfil metabólico y desenlace de la pubertad, en cabrillonas Anglo Nubian y sus cruizas con Saanen. *Revista Argentina de Producción Animal*. 2007; 27(3):169-177.
- Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini M.; González, L.; Tablada M.; Robledo, C. (2009) *InfoStat Version 2021*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cordoba. Argentina.
- Fiorimanti, M.; Cristofolini, A.; Benzoni, A.; *et al*. Eficiencia placentaria en cabras restringidas nutricionalmente durante la gestación. *Revista Ab Intus*. 2021;7 (4): 35-42 ISSN 2618-2734.
- Fiorimanti, M.; Cristofolini, A.; Merkis, C. Angiogénesis placentaria en porcinos. Factores angiogénicos. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH y Co. KG. 2017; (pp. 8-9). Saarbrucken, Alemania: Editorial Académica Española.
- Ginane, C.; Bonnet, M.; Baumont, R.; Revell, D K. Feeding behaviour in ruminants: A consequence of interactions between a reward system and the regulation of metabolic homeostasis. *Animal Production Science*. 2015; 55(3): 247-260.
- Gioffredo, J.; Petryna, A. Caprinos: Generalidades, nutrición, reproducción e instalaciones. Cátedra de Producción Ovina y Caprina. Universidad Nacional de Rio Cuarto. 2010.
- Goetsch, A. Recent research of feeding practices and the nutrition of lactating dairy goats. *Journal Applied Animal Research*. 2019; 47(1): 103-114.
- Grajales, H.; Moreno, D.; Cárdenas, E. IV. Aspectos de manejo y control nutricional y alimenticio. Guía técnica de producción ovina y caprina. Bogotá, Colombia: Comisión bicentenario.2011. 6-17.
- Koluman, N.; Silanikove, N. The advantages of goats for future adaptation to Climate Change: A conceptual overview. *Small Ruminant Research*. 2018; 163: 34-38.
- Kurt, P.; Fuente, J. Manejo reproductivo de la cabra Entorno Ganadero N° 37. BM Editores. 2014.
- López de Padilla, C. M.; Coenen, M.J.; Tovar, A.; De la Vega, R.E.; Evans, C.H.; Muller, S.A. Picrosirius red staining: revisiting its application to the qualitative and quantitative assessment of collagen type I and type III in tendon. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2021; 69 (10): 633-643.
- Merkis, C.; Cristofolini, A.; Franchino, M.; Sanchis, E.; Moschetti, E.; Koncurat, M. Angiogénesis placentaria durante la gestación porcina (Placentaria Angiogénesis during the pig gestation) *REDVET*. 2006. 7(4): (pp: 1-4).
- Neto da Silva, A.; Costa, A.; Teixeira, A. *et al*. Collagen and Microvascularization in placentas from young and older mares. *Front Vet Sci*. 2022; 4;8:772658.
- Reyna, E.; Torres, M.; Reyna, N.; Mejias, J. Estructura y función de la matriz extracelular de las membranas fetales humanas. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2003; 63 (1): 78-89.
- Rittié, L. Method for picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. *Methods Mol Biol*. 2017; 1627:395-407.
- Sanchis, E.; Cristofolini, A.; Taglialegna, A.; Merkis, C. Moléculas de la matriz extracelular placentaria y uterina durante la preñez porcina. *Int J Morphol*. 2011; 29(4): 1438-1443.
- Silanikove, N. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Ruminant Research*. 2000; 35(3): 181-193.
- Silanikove, N.; Koluman, N. Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones: Predications on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming. *Small Ruminant Research*. 2015; 123(1): 27-34.
- Turiello, P.; Cristofolini, A.; Fiorimanti, M.; Diaz, T.; Cavaglieri, L.; Merkis, C. Effect of prepuberal nutrition on cellular apoptosis and proliferation in at term placenta of Anglo Nubian goat. *Reproduction in Domestic Animal*. 2019; 54: 560-570.
- Wang, P.; Luo, N.; Zhao, L.; Zhao, Y. Vascular distribution and expression patterns of angiogenic factors in caruncle during the early stage of pregnancy in goats (*Capra hircus*). *Animals*. 2023;13-99.

25. Welsch, U. Histología. 2da edición. Editorial médica panamericana S.A. 2008. Madrid, España.
26. Wooding, F.; Burton, G. Comparative placentation: structure, functions and evolution. Ed. Springer. Verlag. Berlin Heidelberg. 2008.