

DESARROLLO VASCULAR EN PLACENTAS DE CABRAS DE 50 Y 100 DÍAS DE GESTACIÓN

Tomás Díaz Torres, Cecilia Merkis Jaime, Débora Cots Negri, Gabriela Sanchis, Andrea Cristofolini, María Cristina Romanini Caffaratti, Andrea Bozzo Chiavassa, Alicia Rolando Giordano.

Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba Argentina

tdiazvet@gmail.com

RESUMEN

El aumento en el intercambio transplacentario, debido al crecimiento exponencial del feto durante la última mitad de la gestación, depende primariamente del gran desarrollo del lecho vascular placentario. El objetivo de este trabajo fue evaluar el patrón de desarrollo vascular placentario en cabras, durante los dos últimos tercios de la gestación. Se utilizaron 10 cabras adultas de raza criolla de las que se obtuvieron los úteros grávidos de 50 (n=5) y 100 (n=5) días de gestación. Sobre cortes histológicos placentarios coloreados con hematoxilina/eosina se midieron las variables morfométricas densidad de área capilar, densidad de perímetro capilar, densidad de número capilar y perímetro capilar medio para el tejido caruncular (CAR) y cotiledonario (COT) de 3 placentomas de cada placenta. En los tejidos COT y CAR se observó un aumento significativo de la densidad de perímetro capilar y de la densidad de área capilar a los 100 días de la gestación. Dicho aumento en el tejido cotiledonario se debe al aumento de la densidad del número de capilares; en cambio en el tejido caruncular al aumento en el tamaño de los capilares, evidenciando diferentes estrategias en ambos tejidos, para aumentar el área capilar y con ello el intercambio de nutrientes.

INTRODUCCION

Los placentomas son las unidades estructurales de las placentas de los rumiantes, constituidos por la interdigitación de vellosidades fetales cotiledonarias con el tejido caruncular materno. A través de ellos se realiza el intercambio de nutrientes y de gases

entre la madre y el feto (Wooding, 2008). La formación de una extensa red vascular es necesaria para desarrollar estas importantes funciones (Espinosa, 2011).

El establecimiento de la circulación funcional materna y fetal, es uno de los primeros eventos que ocurren durante el desarrollo de la placenta; la adecuada formación de una nueva red de vasos sanguíneos (angiogénesis), es acompañada por un marcado aumento en el flujo sanguíneo uterino y umbilical (Regnault *et al*, 2003). La angiogénesis se define como el proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente (Ramazan Demir *et al*, 2007). El crecimiento vascular en los tejidos placentarios comienza al principio de la preñez y continúa durante toda la gestación (Reynolds and Redmer, 1995). Se han desarrollado numerosos métodos morfométricos para investigar el patrón de desarrollo vascular en placentas de ovejas (Borowicz *et al*, 2007) determinándose que la vascularización del tejido caruncular (CAR) se incrementa continuamente desde el día 50 de la gestación hasta el día 140 y la del tejido cotiledonario (COT) se incrementa el doble que ésta, durante el mismo período. El crecimiento en el tejido caruncular se acompaña por un pequeño aumento del número de capilares y gran incremento del diámetro capilar. Mientras que en el tejido cotiledonario hay un gran aumento del número de capilares con una disminución en el diámetro capilar (Borowicz *et al*, 2007).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el patrón de desarrollo vascular placentario (caruncular y cotiledonario) mediante el estudio de variables morfométricas de los vasos sanguíneos, durante los dos últimos tercios de la gestación en cabras.

MATERIALES Y METODOS

Toma de muestras

El estudio fue llevado a cabo en la facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto. El protocolo experimental fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la UNRC. Se utilizaron diez cabras adultas de raza criolla, clínicamente sanas y en buen estado nutricional, alimentadas a base de pasturas naturales y agua *ad libitum*. Se determinó el estro por observación directa y posteriormente fueron apareadas por monta natural. El diagnóstico de la gestación se realizó por ecografía entre los 25 y 30 días de la cópula. Se obtuvieron 5 úteros grávidos de 50 días de gestación y 5 de 100 días. De cada útero se obtuvieron muestras de 3 placentomas diferentes, los que se fijaron en formol bufferado al 10% durante 24 hs, se deshidrataron, incluyeron en parafina y se realizaron

cortes histológicos de $\pm 4\text{-}5\ \mu\text{m}$ y se siguieron los pasos de la técnica histológica convencional

Estudio morfométrico de los vasos sanguíneos

Se tomaron 3 cortes histológicos de cada placenta estudiada y se colorearon con hematoxilina-eosina. Para este estudio se tomaron fotografías de 10 campos al azar de cada una de las 10 placentas estudiadas (un total de 100 campos) con un aumento de 200x. La adquisición de las imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada a un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania).

Se midieron las variables morfométricas área, perímetro y número de los capilares, utilizando el software Axiovision Release 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania). Se calculó la densidad de área capilar (DAC: área capilar total como proporción del área de tejido), la densidad de perímetro capilar (DPC: perímetro capilar total como proporción del área de tejido), la densidad de número capilar (DNC: número de capilares totales como proporción del área del tejido) para el tejido caruncular y el cotiledonario por separado. Además de los anteriores parámetros, se calculó como medida del tamaño capilar, al perímetro capilar medio (PCM).

Se realizó un test t-student para evaluar si existían diferencias significativas entre las medias de los grupos, utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al*, 2009).

RESULTADOS

Estudio morfométrico de los vasos sanguíneos

La metodología de fijación y coloración empleada nos permitió visualizar y medir de manera satisfactoria los vasos sanguíneos del tejido placentario. Los capilares conservaron su histología y su diámetro promedio. Se observó una distribución desigual de los vasos entre ambos tejidos (CAR y COT) y pequeños capilares en estrecho contacto a la zona de unión materno-fetal.

En el tejido COT se observó a los 100 días de la gestación un aumento significativo de la DAC ($p<0.0001$) y de la DPC ($p<0.0001$). El mismo comportamiento presentaron estas dos variables para el tejido CAR ($p=0.0108$ y $p=0.0084$ respectivamente).

Al comparar ambas regiones se observó a los 50 y 100 días de la gestación, una mayor DAC en la región CAR ($p=0.0270$ y $p=0.0013$ respectivamente). A su vez, se evidenció un

aumento significativo de la DPC en la región CAR a los 100 días de la gestación ($p=0.0071$) (Figura 1A y B).

En la región COT se observó un aumento significativo de la DNC a los 100 días de gestación ($p<0.0001$). Por el contrario, en la región CAR no se observaron diferencias significativas entre ambos tiempos gestacionales. Asimismo, no se evidenciaron diferencias significativas entre CAR y COT para los estadios gestacionales analizados (Figura 1C).

En la región CAR el PCM fue significativamente mayor a los 100 días de la gestación ($p=0,001$), mientras que en la región COT no se observaron diferencias significativas. Al comparar el PCM entre ambas regiones, se evidenció un aumento significativo en la región CAR con respecto a COT a los 50 ($p<0,0001$) y a los 100 días ($p<0,0001$) de la gestación (Tabla1).

Tabla 1. Perímetro capilar medio (PCM) en el tejido CAR y COT (μm).

Tejido	Días de gestación		valor p
	Día 50	Día 100	
CAR	38,21	41,26	0,001
COT	31,72	33,68	0,056
valor p	<0,0001	<0,0001	

$p \leq 0.05$ significa diferencias estadísticamente significativa

DISCUSIÓN

El crecimiento de la placenta y el incremento del flujo sanguíneo para el mantenimiento de la preñez dependen de una apropiada red vascular, la cual surge de la vasculogénesis y angiogénesis. Ambos procesos son regulados por diversos factores y sus receptores (Reynolds *et al*, 2005). Numerosos trabajos realizados en placentas de ovejas indican que el desarrollo vascular de los tejidos placentarios, tanto en la porción caruncular como en la cotiledonaria, comienzan en la preñez temprana y continúan durante toda la gestación (Reynolds and Redmer, 2001; Reynolds *et al*, 2004 y Vonnahme *et al*, 2006).

En el presente estudio se evaluó la angiogénesis en el comienzo del segundo y tercer tercio de la preñez (50 y 100 días) debido a que estudios realizados en ovejas demuestran que en este período se llevan a cabo el mayor crecimiento y diferenciación de la red de capilares (Borowicz *et al*, 2007). La densidad del área vascular en el tejido materno en ovejas, se incrementa a partir de la mitad de la gestación aunque muy poco, mientras que en el tejido cotiledonario se incrementa muy fuertemente en el último tercio (Borowicz *et al*, 2007). Coincidente con estos resultados, en este trabajo se observó un aumento significativo de la

DAC en el día 100 de la gestación comparado con el día 50, tanto en el tejido caruncular como en el cotiledonario, siendo la DAC caruncular, mayor que la de COT a lo largo del período estudiado.

En nuestro estudio histomorfométrico observamos que en el tejido caruncular hay un aumento significativo del tamaño capilar a medida que avanza la gestación. Sin embargo no hay una diferencia significativa de la densidad del número capilar, por lo que el aumento del área vascular podría deberse a un aumento en el tamaño capilar más que al número de capilares. En el tejido cotiledonario, en cambio, observamos que a los 100 días de preñez aumenta la DNC pero no el perímetro capilar medio, por lo que el aumento del área vascular podría deberse a un aumento en el número de capilares más que al tamaño. Estos resultados acuerdan con los observados en placentas de otras especies como en ovejas (Borowicz *et al*, 2007) y en humanos (Ramsey, 1982).

El flujo sanguíneo umbilical y uterino aumentan exponencialmente durante la gestación y esto depende del desarrollo del lecho vascular placentario (Reynolds, 2005). En nuestro estudio la arquitectura microvascular del tejido cotiledonario observada, compuesta de abundantes capilares pequeños asegurarían un transporte sanguíneo rápido, lo que mejoraría el intercambio feto-materno (Reynolds and Redmer 2001, Reynolds *et al*, 2004, Reynolds, 2005).

En conclusión, en este estudio observamos que a medida que avanza la gestación la DAC aumenta en la region caruncular debido al aumento en el tamaño de los capilares y en la región cotiledonaria por el aumento en la densidad del número capilar. Esto permite el aumento del flujo sanguíneo, lo que posibilita satisfacer la mayor demanda de nutrientes por parte del feto en crecimiento.

BIBLIOGRAFIA

Borowicz P; Arnold D; Johnson M; Grazul-Bilska A; Redmer D; Reynolds L (2007). Placental Growth Throughout the Last Two Thirds of Pregnancy in Sheep: Vascular Development and Angiogenic Factor Expression. *Biology of Reproduction* 76, 259-267.

Espinosa C (2011). Angiogénesis en la placenta de los animales domésticos. *Revista veterinaria* 22: 2, 131-138.

Merkis C; Cristofolini A; Franchino M; Sanchis E; Moschetti E; Koncurat M (2006). Angiogénesis placentaria durante la gestación porcina. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ®*, Vol. VII, nº 04.

Ramazan D; Sevala Y; Huppertz B (2007). Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta histochemica* 109 257-265.

Ramsey (1982). *The Placenta, Human and Animal*. Praeger. New York.

Reynolds L; Redmer D (2001). Angiogenesis in the Placenta. *Biology of Reproduction* 64, 1033-1040.

Reynolds L; Borowicz P; Vonnahme K; Johnson M; Grazul-Bilska A; Wallace J; Caton J; Redmer D (2005). Animal Models of Placental Angiogenesis. *Placenta* 26, 689-708.

Valdés G; Corthorn J (2011). Review: The angiogenic and vasodilatory utero-placental network. *Placenta* 32, Vol. 25: 170-175.

Vonnahme K; Arndt W; Johnson M; Borowicz P; Reynolds L (2008). Effect of Morphology on Placentome Size, Vascularity, and Vasoreactivity in Late Pregnant Sheep. *Biology of Reproduction* 79, 976-982.

Wooding P; Burton G (2008). Comparative placentation: structure, functions and evolution. Springer. Verlag Berlin Heidelberg. 1-291.

ANEXOS

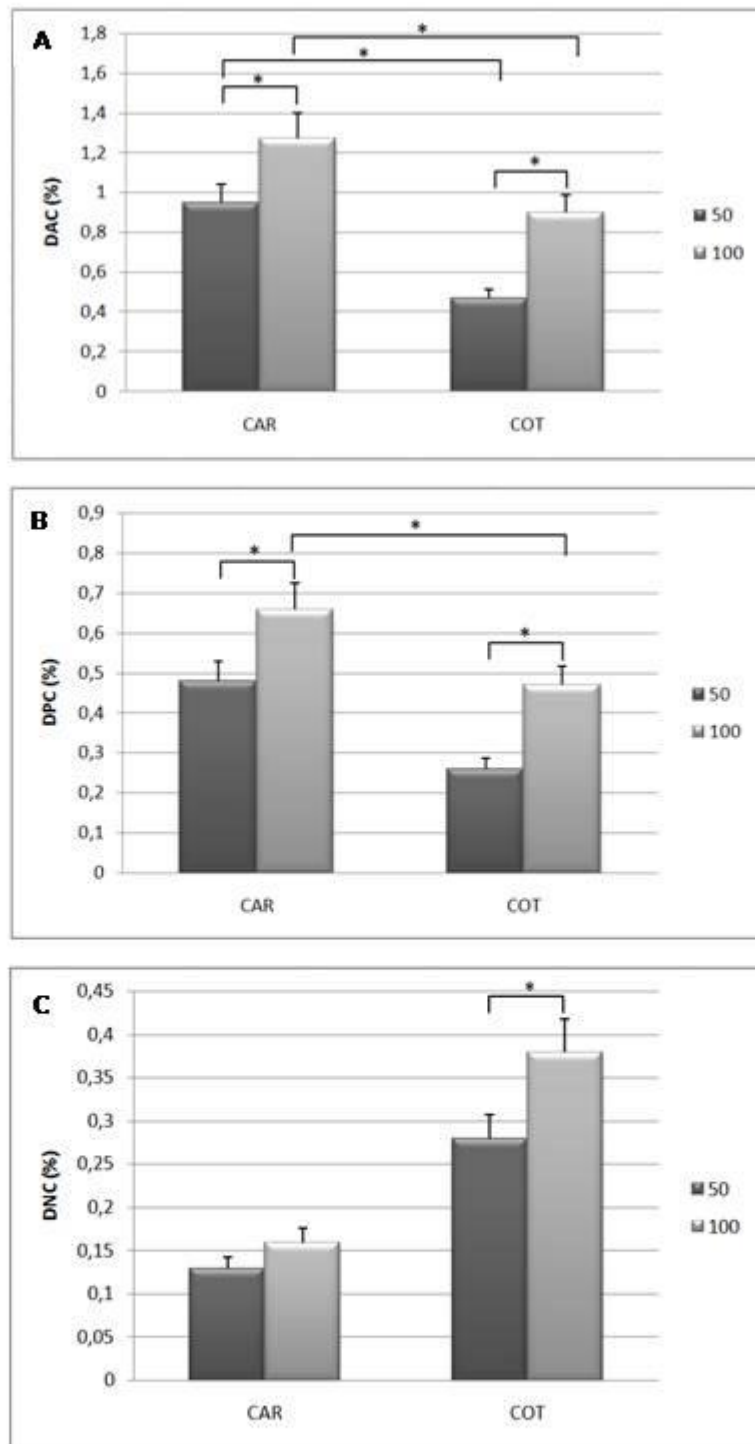


FIG 1: A: densidad de área capilar (%). B: densidad de perímetro capilar (%). C: densidad de número capilar (%). * $p \leq 0.05$