

USO DE LA TÉCNICA DE MOAR PARA EL ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE VASOS SANGUÍNEOS PLACENTARIOS

Autores:

Sanchis Gabriela^{1*}, Cristofolini Andrea², Moliva Melina³, Merkis Cecilia⁴

1 Doctorando, Becaria CONICET/MinCyTCba, Area de Microscopía Electrónica, UNRC, Río Cuarto, Argentina.

2 Doctora, TP5, Area de Microscopía Electrónica, UNRC, Río Cuarto, Argentina.

3 Ayudante de Investigación, Area de Microscopía Electrónica, UNRC, Río Cuarto, Argentina.

4 Doctora, JTP Exclusiva, Area de Microscopía Electrónica, UNRC, Río Cuarto, Argentina.

[*gsanchis@ayv.unrc.edu.ar](mailto:gsanchis@ayv.unrc.edu.ar)

RESUMEN

La placenta porcina se caracteriza por presentar los tejidos maternos y fetales en simple aposición. En consecuencia, una adecuada nutrición de los embriones/fetos en desarrollo requiere de un estricto intercambio materno-fetal de gases y sustancias, siendo los vasos sanguíneos las principales estructuras involucradas. La Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) posee un valor considerable en estudios histológicos al trabajar al límite del poder de resolución de la microscopía óptica. El objetivo fue evaluar el uso de la técnica de MOAR para el análisis morfométrico del área vascular placentaria porcina. Se emplearon cortes semifinos de $\pm 0,25 \mu\text{m}$ de placentas porcinas de 30, 60, 70 y 114 días de gestación, procesados según la técnica de MOAR. Para evaluar la independencia del área vascular con respecto al estadio gestacional los datos fueron analizados estadísticamente a través del software InfoStat. No se detectó efecto del día de gestación sobre el área vascular ($p=0,02$). Se observó que al día 30 el área vascular media es notablemente mayor que en períodos posteriores (30: 224,50; 60: 168,00; 70: 166,03; 114: 168,69). Las características óptimas de fijación, inclusión y espesor de cortes de la técnica de MOAR, posibilita una mejor resolución de las imágenes, permitiendo la obtención de datos más precisos.

PALABRAS CLAVE: MOAR; análisis morfométrico; vasos sanguíneos; placenta; cerda

INTRODUCCIÓN

En la producción porcina, el manejo reproductivo es fundamental para alcanzar índices óptimos de eficiencia productiva (Parsi y col., 2007). Una de las variables más importantes en la industria del cerdo que afecta el tamaño de la camada por cerda/año y por ende la producción, es la alta tasa de muerte embrionaria. En el ganado porcino la mayor parte de las pérdidas acontecen durante períodos críticos en el desarrollo del producto de la gestación, tales como el momento de la implantación y durante los 40 a 50 días de preñez, siendo debidas principalmente a la superpoblación de los cuernos uterinos (Pallás Alonso, 2008). La placenta, como órgano transitorio de la gestación, desempeña dos funciones fundamentales: por un lado maximizar la adquisición de oxígeno y nutrientes desde la madre, y por otro, minimizar el rechazo inmunológico por el sistema inmune materno (Wooding and Burton, 2008). En la placenta epiteliochorial de la cerda, los componentes placentarios maternos y fetales permanecen morfológicamente separados por seis capas de tejidos (Wooding and Burton, 2008). En consecuencia, una adecuada nutrición de los embriones/fetos en desarrollo requiere de un estricto intercambio materno-fetal de gases y sustancias, siendo los vasos sanguíneos las principales estructuras tisulares involucradas. La vasculatura placentaria se desarrolla con el avance de la gestación a medida que los nutrientes fetales y los requerimientos sanguíneos de gas aumentan (Moliva, 2012; Sanchis y col., 2012). Por otra parte, la microscopía óptica de alta resolución o MOAR consiste en el empleo de los cortes semifinos obtenidos durante el procesamiento de muestras por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y su posterior observación al microscopio óptico. La histotecnología plástica empleada en TEM permite la plena utilización del poder de resolución de la microscopía óptica (Hoffman, 1995). Analizar a través de parámetros morfométricos la vasculatura placentaria en cortes tisulares obtenidos por MOAR ofrecerá información precisa acerca de los vasos sanguíneos placentarios.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se trabajó con muestras placentarias obtenidas de cerdas mestizas gestantes, provenientes de frigoríficos y criaderos de la zona de Río Cuarto, Argentina (33,11° S, 64,3° O),

destinadas a faena y consideradas libres de enfermedad, de acuerdo al examen clínico y *postmortem* realizado. Se procesaron 17 tractos reproductivos de diferentes períodos gestacionales. Inmediatamente después de obtenidos, se lavaron con solución salina de Hank´s (SSH) (Gibco, USA) conteniendo 10.000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina y 2.5 µg/ml de fungizona y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Se realizó una palpación de los tractos reproductivos obtenidos para detectar la ubicación de los embriones o fetos. Los cuernos uterinos se abrieron en forma longitudinal con una incisión por el borde anti-mesometrial, para observar el sitio de implantación y recoger muestras del tejido mesometrial y placentario fetal. Se extrajeron los embriones/fetos de ambos cuernos y se procedió al conteo, pesaje, medición y sexado de los mismos. Se determinó la edad gestacional de los embriones o fetos extraídos de cada cerda gestante en función de la longitud céfalo-caudal de los mismos (Marrable, 1971). De acuerdo a ello, se obtuvieron placentas de 30, 60, 70 y 114 días de preñez.

2. Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

Para el estudio de la morfología vascular placentaria por microscopía óptica de alta resolución, las muestras de tejido placentario se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en solución tampón fosfato de Sørensen (PBS) (0,1 M, pH 7,4) durante 3 h a 4°C. Se lavaron dos veces con PBS. Se refijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron dos veces en PBS y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona. Se procedió luego a la preinclusión en resina epoxi EMBED 812 1:1 en acetona 100% durante toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente a una inclusión en EMBED 812 a 60°C, durante 24 horas. A través de un ultramicrotomo manual (Sorvall MT-1A, DuPont, USA), utilizando cuchillas de vidrio, se obtuvieron cortes semifinos ($\pm 0,25 \mu\text{m}$) los que fueron colocados sobre portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina sobre una platina termostatazada, para permitir la entrada del colorante al tejido incluido en la resina.

3. Determinación del área vascular placentaria

Para la determinación del área de los vasos sanguíneos en las muestras placentarias obtenidas, se utilizaron cortes histológicos de 30, 60, 70 y 114 días de preñez. Se tomaron imágenes con la cámara Canon Powershot G6 7.1 megapixels (Canon, Japón) adosada al microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron luego procesadas con el

software AxioVision Release 4.6.3, a fin de obtener el área individual de cada uno de los vasos. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 100x. Se midió el área de alrededor de veinte vasos sanguíneos por cada uno de los períodos seleccionados y los datos fueron analizados estadísticamente con el programa estadístico InfoStat, con el objetivo de analizar la independencia del área de los vasos en los diferentes períodos de gestación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron los vasos sanguíneos placentarios de los cuatro períodos gestacionales seleccionados para el estudio. El test de Kruskal Wallis no detectó efecto del día de gestación sobre el área vascular media ($p=0,2$), lo cual podría ser el resultado de la gran variabilidad de datos, principalmente al día 30 en que coexisten vasos de pequeño y gran calibre. Sin embargo, coincidiendo con estudios anteriores (Moliva, 2012), se observó que en el período de gestación temprana el área vascular media es notablemente mayor que en estadios posteriores (30: 224,50; 60: 168,00; 70: 166,03; 114: 168,69), lo cual puede ser observado claramente en las imágenes (Fig.1). En estudios previos realizados por microscopía óptica (MO) detectamos dependencia del área vascular con respecto al estadio gestacional (Sanchis y col., 2012). Además, notamos un aumento del área vascular media hasta el día 80 (datos no publicados). Cabe destacar que el área del corte histológico en MO es superior al de MOAR, lo cual permite abarcar una mayor zona placentaria, posibilitando el análisis de un mayor número de vasos sanguíneos, obteniendo resultados más representativos de la población vascular. A través de MO también es posible analizar vasos de gran calibre, los cuales quedan excluidos en los cortes de MOAR. Sin embargo, las características de fijación, inclusión y espesor de los cortes tratados por la técnica de MOAR posibilitan la obtención de imágenes de mayor resolución a partir de las cuales pueden obtenerse datos morfométricos de mayor precisión que los adquiridos a través de MO.

CONCLUSIONES

En conclusión, las características de fijación de la técnica de MOAR proveen una excelente preservación del tejido. Las imágenes digitales adquiridas a partir de los tejidos así tratados permiten un análisis cuantitativo reproducible a través del análisis morfométrico computarizado. El uso conjunto de la técnica de MOAR y el análisis morfométrico dieron lugar a un estudio de elevada precisión de los vasos sanguíneos placentarios que participan en el transporte hemotrófico. Los mismos constituyen una pieza fundamental en el intercambio

nutricional entre madre y embriones/fetos, indispensable para el desarrollo adecuado de los *conceptus*. A futuro, sería necesario aumentar el número de cortes semifinos y tratados por MOAR e incrementar el número de vasos sanguíneos placentarios analizados para obtener resultados más representativos de lo que acontece a lo largo de la preñez en porcinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marrable A. (1971) The embryonic pig: A chronological account. Ed. Exeter, Pitman Medical, London.
2. Hoffman, E. (1995) High resolution light microscopy for interpretation of renal biopses. *Pediatric Nephrology*, Dec 9(6): 763-769.
3. Moliva M. (2012) Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y sus receptores Flt-1 y KDR en placentas porcinas de razas mestizas. Tesis de Grado de Microbiología. Biblioteca Central "Juan Filloy" de la Universidad Nacional de Río Cuarto.
4. Pallás Alonso, R. (2008) Factores que afectan la fertilidad y prolificidad en el ganado porcino. *Taurus*, Bs. As., 10(39): 26-38.
5. Parsi J, Echevarría A, Trolliet J, Grivel C, Rossi D. y Yanke M. (2007) Efectos del tamaño de grupo y de diferentes disponibilidades de comederos sobre la conversión del alimento y el aumento diario de peso en cerdos pos-destete en sistemas de producción al aire libre. *Revista electrónica de veterinaria (REDVET)*, 8: 1695-7504.
6. Sanchis G, Cristofolini A, Merkis C. (2012) Moléculas de matriz extracelular y vascularización en la placenta porcina. EAE Editorial Académica Española GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Alemania. ISBN: 978-3-659-00805-4 (en prensa).
7. Wooding P. and Burton G. (2008) In: *Comparative placentation. Structures, functions and evolution*. Ed. Springer-Verlag. Berlín Heidelberg.

ANEXOS

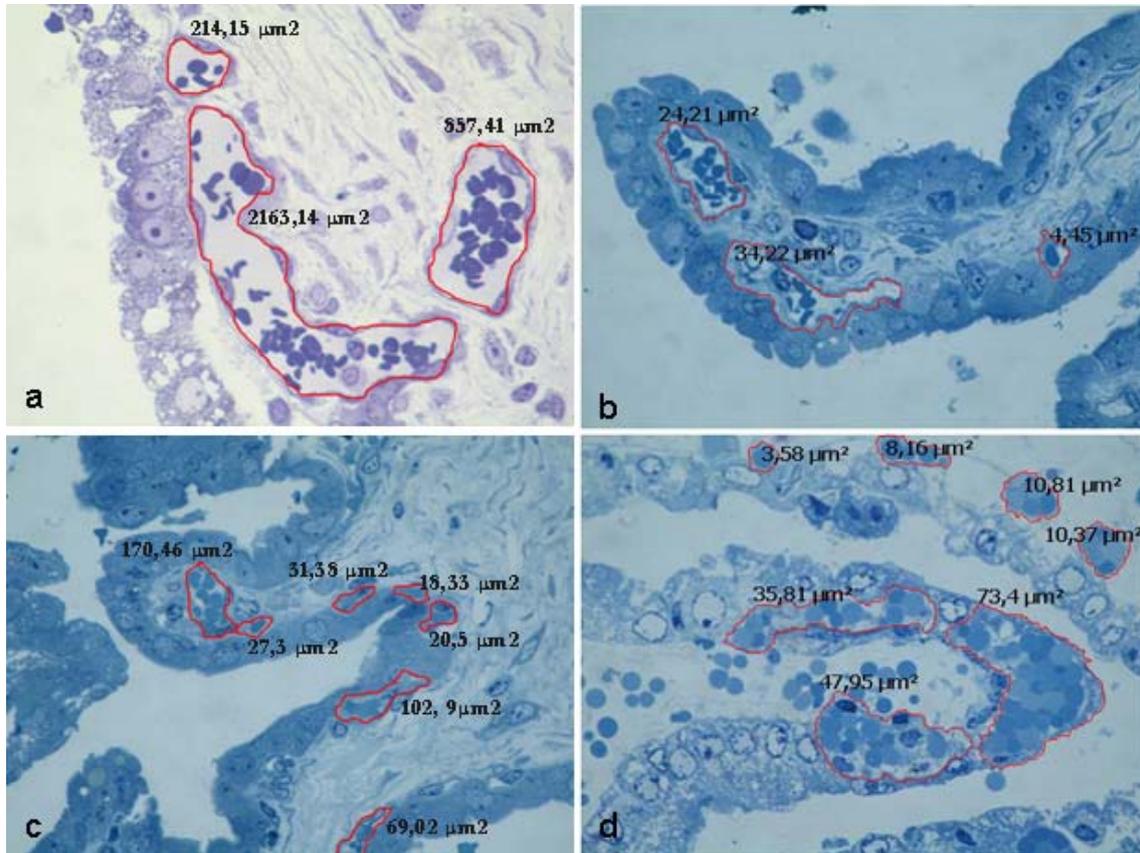


Figura 1: Medición de área vascular en tejidos placentarios porcinos tratados con la técnica de MOAR. a) 30 días, b) 60 días, c) 70 días, d) 114 días. 1000x.