

Efectos de la restricción alimentaria sobre el desarrollo de los vasos sanguíneos placentarios en cabras

Effects of nutritional restriction on placental blood vessels development in goats

CONIGLIO, MV¹; MERKIS, CI²; DIAZ, T³; ROMANINI, MC³; TURIELLO, MP¹; BOZZO, AA³; COTS, DS³. Y
ROLANDO, AN³.

¹Departamento de Producción Animal, FAV- UNRC, ²Área de Microscopía Electrónica, FAV-UNRC, ³Departamento de Anatomía Animal FAV-UNRC. Ruta 36 Km 601. 5800 Río Cuarto.

RESUMEN

El objetivo fue estudiar los efectos de la restricción alimentaria sobre la angiogénesis placentaria en cabras Anglo nubian. Se utilizaron 19 placentas a término de tres grupos de estudios: control, restringido y restringido con monensina. Los cortes placentarios se procesaron con técnicas histológicas de rutina e inmunomarcaron con anticuerpo anti-VEGF y se cuantificó el área y perímetro de los vasos sanguíneos. El perímetro de los vasos de los grupos restringidos fue mayor estadísticamente con respecto al control. Mientras que el área de los mismos no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tres grupos. El VEGF se localizó en las células epiteliales trofoblásticas de los grupos control y restringido, además en éstos últimos también se localizó en el endotelio vascular. El número de células inmunomarcadas con el VEGF fue significativamente mayor en los grupos restringidos coincidiendo con el mayor perímetro de los vasos, lo que sugiere que el VEGF estimula el crecimiento endotelial. Las diferencias encontradas entre los grupos estudiados, indicarían que hubo una adaptación compensatoria en las cabras que fueron sometidas a una dieta restringida, ya que el área vascular se mantuvo sin modificaciones a expensas del aumento del perímetro de los vasos.

Palabras Claves: (placenta), (angiogénesis), (VEGF), (cabra).

Correspondencia *e-mail*: vconiglio@ayv.unrc.edu.ar

Recibido: 1/08/2015

Aceptado: 18/05/2016

SUMMARY

The aim was to study the effects of nutritional restriction on placental angiogenesis in Anglo nubian goats. 19 term placenta of three groups were used: control, restricted and restricted with monensin. Tissue sections were processed by routine histological techniques and immunostained with the anti-VEGF antibody and the area and perimeter of the blood vessels were quantified. The perimeter of vessels of the restricted groups was statistically higher compared to the control. While the area of the vessels do not show significant differences in any of the 3 groups. VEGF was localized in trophoblastic epithelial cells control and restricted, also in the latter was also localized to the vascular endothelium. The number of immunolabeled VEGF cells was higher in the restricted groups, coinciding in these groups with the larger perimeter of the vessels, so VEGF would stimulate the growth of the vascular endothelium. The differences between the restricted and the control groups, suggest that there was a compensatory adaptation of goats subjected to a restricted diet, because the vascular area remained unchanged due to the increase of the perimeter of the blood vessels.

Key words: (placenta), (angiogenesis), (VEGF), (goat).

INTRODUCCIÓN

En Argentina la producción caprina, en su mayoría, se desarrolla utilizando el pastizal natural, el cual presenta variaciones anuales y un marcado descenso de la oferta forrajera en el periodo invernal. Ante esta situación, los animales no alcanzan a cubrir sus requerimientos nutritivos en esta época del año afectando la tasa de crecimiento de las hembras en el período prepuberal, puberal y postpuberal³.

Investigaciones realizadas con cabras jóvenes prepúberes, *Anglo nubian*, establecieron que una restricción alimentaria de un 30 % del consumo de materia seca afecta el crecimiento de las mismas, pero se permite mantener un nivel de metabolitos y hormonas compatibles con el desenlace de la pubertad^{2,14,15}. En los sistemas caprinos el uso de monensina tendría, como en otros rumiantes, un efecto compensador ante las restricciones energéticas en el manejo nutricional⁵. Rivera *et al.* (2003), demostraron que el uso de monensina provocó una tendencia favorable en el diámetro del folículo ovulatorio, en la ovulación y en la tasa de preñez de cabras.

La nutrición materna condiciona el desarrollo placentario, el tamaño de la placenta

y el correcto intercambio nutricional materno-fetal¹⁶. Asimismo, el mantenimiento de la preñez depende en gran parte del intenso crecimiento y formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis, asociados con el desarrollo de una eficiente interfase materno-fetal¹². Un compromiso significativo de la vascularización de la placenta, ocasionado por una mala nutrición materna, puede menoscabar el intercambio de nutrientes, de gases y residuos entre el sistema materno y fetal⁸, teniendo un gran impacto en la supervivencia neonatal y el desarrollo fetal¹⁰.

La densidad del área capilar (DAC) y la densidad del número de capilares (DNC) son parámetros usados como medidas del desarrollo vascular. En este sentido, estudios realizados en ovejas por Vonnahme (2006) demostraron que la DAC y la DNC aumentan exponencialmente tanto en la parte caruncular como en la cotiledonaria desde el día 40 de preñez hasta el final de la gestación. No obstante, si bien el crecimiento es exponencial en ambos tejidos, proporcionalmente es mayor el desarrollo en la parte cotiledonaria. El crecimiento en el tejido caruncular se acompaña por un pequeño

aumento del número de capilares y un gran incremento del diámetro capilar, mientras que en el tejido cotiledonario hay aumento del número de capilares con una disminución en el diámetro capilar⁷. Para una misma área de sección transversal, muchos vasos de pequeño calibre permiten una mayor eficiencia de intercambio capilar en comparación con pocos vasos de gran diámetro, porque el área superficial (perímetro o área de superficie de los capilares por unidad de tejido) disponible para el intercambio es mayor¹¹.

Numerosos factores están implicados en la angiogénesis, siendo uno de los más importantes el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)⁹, que es un estimulador del proceso de angiogénesis⁶. En las placentas de cerdos se demostró que la expresión del VEGF aumenta progresivamente durante la gestación en asociación con el marcado incremento en el número de vasos sanguíneos en la interfase materno-fetal¹⁷.

Teniendo en cuenta las condiciones de alimentación a las que son sometidas las cabras por las variaciones estacionales de las pasturas naturales y que los estudios en placenta de las mismas son escasos o nulos en Argentina, se propuso estudiar el desarrollo de los vasos sanguíneos y la localización del VEGF en placentas de cabras sometidas a restricción alimentaria en el período prepuberal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 19 cabras prepúberes de la raza *Anglo nubian* con un peso promedio de 12 kg, y aproximadamente 4 meses de edad. Los animales fueron asignados en tres grupos: control (C), (n=5) animales con consumo de materia seca a voluntad; restringido (R), (n=7) animales sometidos a una restricción del 30% del consumo potencial logrado en las hembras C y restringido con monensina sódica al 20% (laboratorio Elanco[®]) (M), (n=7) animales sometidos a restricción con la adición de 12,5 mg. de monensina/animal/día. La dieta estuvo compuesta por una mezcla de 70:30 de heno de alfalfa picado y grano de maíz molido, logrando

una concentración energética de 2.4 Mcal/KgMS. A los grupos M y R se los suplementó con urea para lograr una restricción solo energética. El alimento se ofreció en jaulas individuales durante 8 horas diarias (8 a.m a 4 p.m) a fin de controlar el consumo diario. El resto del tiempo los animales permanecieron libres con la finalidad que pudieran establecer interacción social y comportamiento reproductivo. Durante este tiempo tuvieron libre acceso a la provisión de agua. El aporte de minerales fue igual para todos los grupos a través de una suplementación con un núcleo vitamínico-mineral comercial.

El experimento se desarrolló durante 592 días. El período de restricción alimentaria se prolongó por 250 días, a partir de este periodo y coincidiendo con el comienzo de la etapa reproductiva (aproximadamente 12 meses de edad) los grupos R y M fueron alimentados igual que el grupo C hasta el final de la experiencia. Se realizó la detección de celo una vez por día, por la mañana, antes de la entrega de alimento, por observación directa durante 45 minutos, utilizando un macho adulto provisto de delantal. Luego de comprobar la ciclicidad de todas las hembras, se realizó el servicio por monta natural. A los 25–30 días posteriores al servicio se realizó el diagnóstico de la gestación utilizando un ecógrafo Berger[®]. Después del parto se recolectaron 19 placentas provenientes de los diferentes grupos de estudio establecidos y se registró el peso de las mismas. El protocolo experimental fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la UNRC. Las muestras de tejido placentario se fijaron en formol al 10% tamponado y se procesaron con la técnica histológica de rutina. Algunos cortes se colorearon con hematoxilina-eosina y otros se usaron para inmunohistoquímica usando un anticuerpo primario anti-VEGF (1/100) (Santa Cruz, Biotechnology[®]), un anticuerpo secundario biotilado, el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) y se revelaron con diaminobenzidina (DAB) (Kit SK-41 Vector Lab. USA). En todos los casos se realizó un control negativo omitiendo el anticuerpo primario.

Análisis de los vasos sanguíneos

En tres cortes de cada placenta se midieron, en 5 campos tomados al azar, el área y el perímetro de los vasos y se los clasificaron de acuerdo a su calibre utilizando el software Axiovision Release 4.6.3 (Carl Zeiss®). Para el estudio del área de los vasos sanguíneos se dividieron los datos en tres intervalos de acuerdo al tamaño de los mismos: 1- vasos de pequeño calibre (10 a 100 μm^2); 2- vasos de mediano calibre (100 a 400 μm^2) y 3- vasos de gran calibre (400 a 1000 μm^2).

Análisis inmunohistoquímico

Se contaron las células inmunomarcadas con el VEGF de 5 campos ópticos tomados al azar con un aumento de 400X en tres cortes de cada una de las 19 placentas y se obtuvo un índice de VEGF calculado como el cociente entre las células inmunomarcadas con el VEGF y células totales por 100.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de Varianza y las comparaciones de

medias se realizaron con la diferencia media mínima (LSD) de Fisher (alfa=0.05) bajo el modelo extendido: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$, siendo Y_{ij} la observación de la cabra j bajo el tratamiento i , μ = la media total, T_i = el efecto del tratamiento i . Los análisis fueron realizados mediante la versión 2009 del Software InfoStat⁴ que permite el ajuste de modelos mixtos.

El peso promedio de las placentas fue de $457 \pm 140,6$ g (C: $539,4 \pm 143,13$; R: $417,9 \pm 100,50$; SD: 138,855) y no se encontraron diferencias significativas entre grupos.

La observación macroscópica de las placentas obtenidas luego del parto no demostró anomalías en ninguno de los grupos en estudio.

Análisis morfométrico de los vasos sanguíneos

La mayor parte de los vasos de mediano y gran calibre se ubicaron en el tejido conectivo de las vellosidades corioalantoideas, siendo su distribución muy variable. Los vasos de pequeño calibre, en especial los capilares, se observaron cercanos al epitelio trofoblástico (Figura 1).

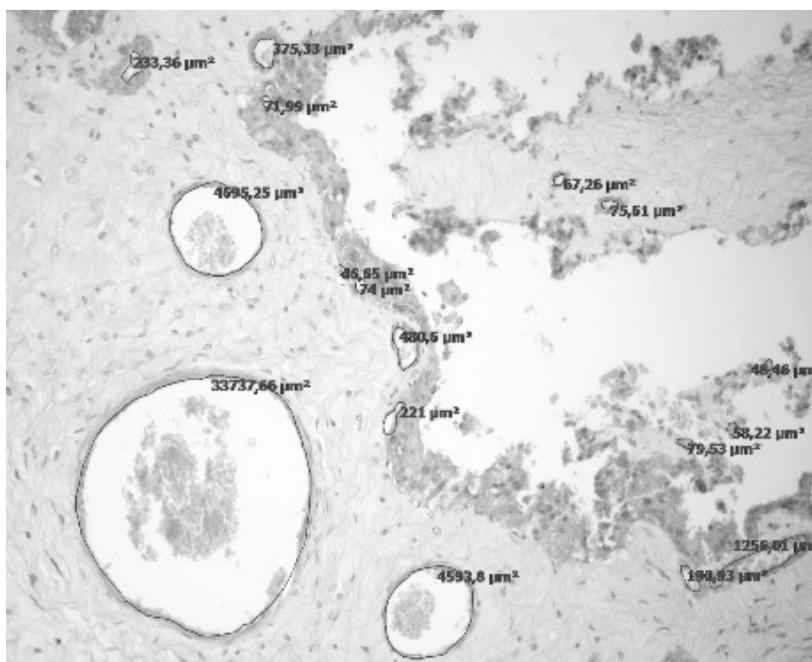


Figura 1. Corte histológico de placenta de cabra del grupo control con coloración de Hematoxilina/Eosina (200x). Medición del área y perímetro de los vasos sanguíneos.

El perímetro de los vasos sanguíneos fue mayor significativamente ($p \leq 0,01$) en las placentas de cabras del grupo R y M, con respecto a las controles (Gráfico 1).

El área de los vasos, dividida en tres intervalos de acuerdo al calibre, no mostró diferencias significativas en ninguno de ellos, entre los grupos R, M y C (Gráfico 2).

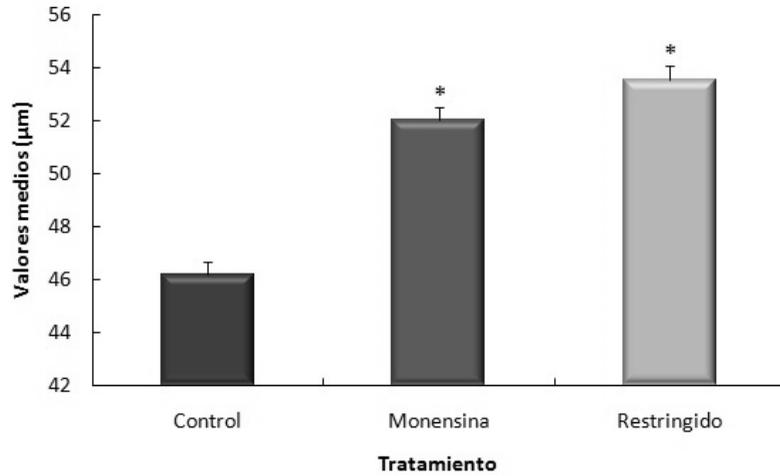


Gráfico 1. Perímetros de vasos sanguíneos en el tejido placentario.

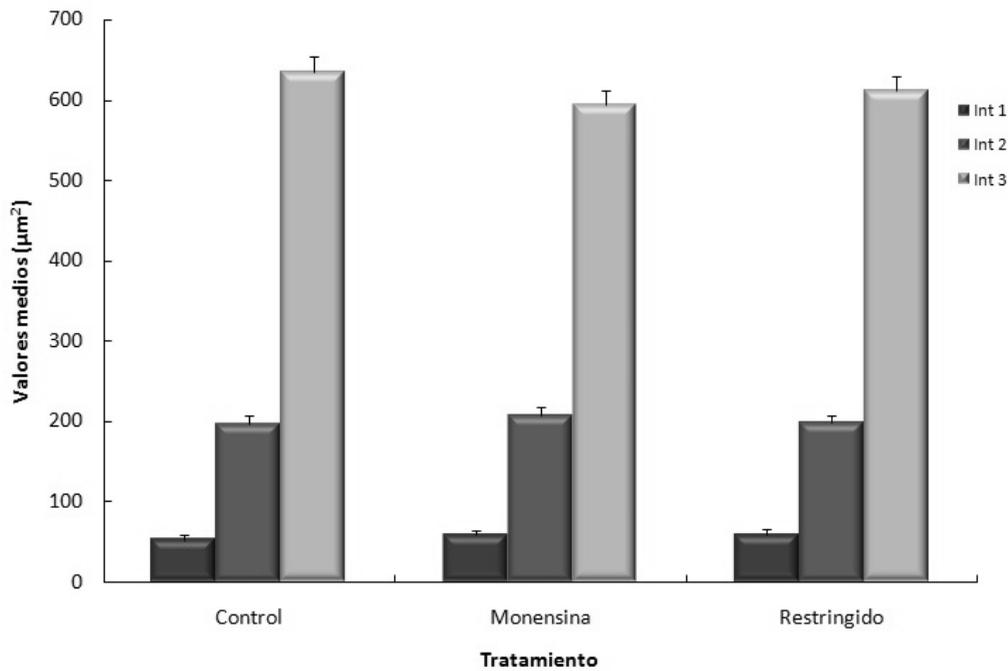


Gráfico 2. Área de los vasos sanguíneos en el tejido placentario.

Análisis inmunohistoquímico de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en placentas

Se determinó la presencia del VEGF en el epitelio trofoblástico de placentas C, R y M. El mismo se localizó en el citoplasma tanto de las células mononucleadas como de las binucleadas, observándose en estas últimas una intensa inmunomarcación. En las

placentas de cabras R y M, el VEGF también fue identificado en el endotelio de los vasos sanguíneos (Figura 2).

Los resultados obtenidos demostraron que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos en estudio, siendo mayor el índice del VEGF en las placentas R (73.58 ± 3.65), con respecto a C (42.51 ± 3.04) y M (32.40 ± 3.98) ($p < 0.001$) (Gráfico 3).

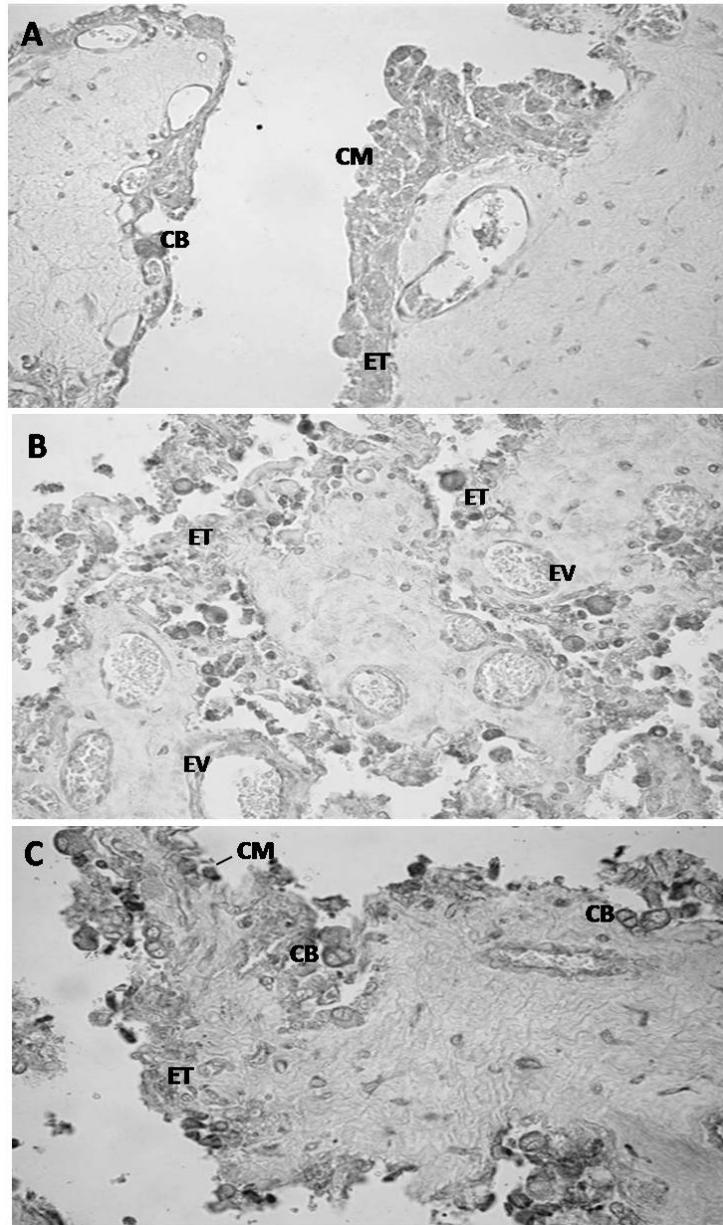


Figura 2. Fotografía de corte histológico de placenta de cabra de grupo control inmunomarcadas con VEGF (400x).
ET: epitelio trofoblástico; CM: células mononucleadas; CB: células binucleadas.

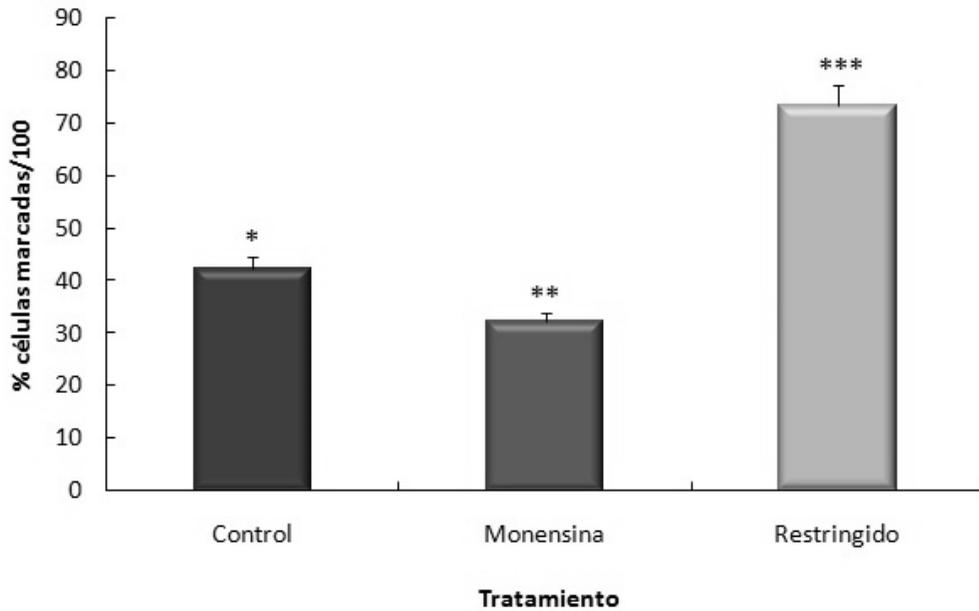


Gráfico 3. Índice de células inmunomarcadas con VEGF.

DISCUSIÓN

Actualmente no hay evidencias del efecto que ejerce la restricción alimentaria realizada en hembras prepúberes, sobre el desarrollo placentario en cabras. Este estudio demostró que no hubo diferencias significativas entre los pesos de las placentas de las cabras sometidas a restricción alimentaria con respecto a sus controles. Las placentas de cabras restringidas y suplementadas con monensina, tampoco presentaron diferencias significativas con los controles, lo que indicaría que el uso del ionóforo no incide en el peso placentario. Se conoce que para lograr el mantenimiento de la preñez es fundamental el intenso crecimiento y formación de nuevos vasos sanguíneos, asociados con el desarrollo de una eficiente interfase materno-fetal¹². El estudio de medidas morfométricas de los vasos sanguíneos en las placentas de cabras de cada uno de los grupos establecidos y la expresión del VEGF, permitió evidenciar el grado de desarrollo de la vasculatura en placentas a término de cabras, presentando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados, en concordancia con lo observado en placentas de ovinos por Vonnahme (2006).

El perímetro de los vasos sanguíneos placentarios fue significativamente mayor en las placentas de cabras de los grupos con dieta restringida con respecto a sus controles. Mientras que, el área de los vasos no presentó diferencias significativas entre los grupos y para ninguno de los tres intervalos de tamaños establecidos. En este estudio el área de los vasos sanguíneos no presentó cambios en las placentas de los grupos restringidos, por lo que se podría inferir que no se afectaría la angiogénesis. El perímetro de los vasos sanguíneos presentó un aumento significativo en las placentas de los grupos restringidos, lo que podría indicar la presencia de un mecanismo compensatorio que mantendría el área vascular a expensas de un incremento del tamaño de los vasos y no, mediante la formación de nuevos vasos sanguíneos. Reynolds *et al.* (2004) demostraron que es más eficiente el intercambio placentario materno-fetal, cuando hay mayor cantidad de vasos sanguíneos de pequeño calibre que escasos vasos de mayor tamaño.

En placentas de ovejas normales la arquitectura microvascular de la placenta fetal es altamente ramificada y compuesta de

abundantes capilares pequeños que aseguran un transporte sanguíneo rápido para mejorar el intercambio feto-materno¹⁰⁻¹¹. En este estudio, el incremento del perímetro de los vasos en las placentas de los grupos restringidos, indicaría que la velocidad de transporte sería más baja, pudiendo afectar el adecuado intercambio materno-fetal.

En las placentas del grupo con dieta restringida, el índice del VEGF fue mayor con respecto a las controles, coincidiendo con el mayor perímetro de sus vasos. De este modo, el VEGF estaría estimulando el crecimiento del endotelio vascular, propiedad demostrada por Choi *et al.*, (2005) en las placentas de ratas. Sin duda, otros factores de crecimiento contribuyen en la formación y desarrollo de los vasos sanguíneos, tal lo demostrado por Regnault *et al.* (2003) y por Vonnahme *et al.* (2001), siendo la angiogénesis el resultado de la influencia de numerosos factores.

Se puede concluir que las diferencias encontradas entre los grupos estudiados, indican que hubo una adaptación compensatoria en las cabras que fueron sometidas a una dieta restringida, ya que el área vascular se mantuvo sin modificaciones a expensas del aumento del perímetro de los vasos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barinaga, M. Designing therapies that target tumor blood vessels. *Cancer Res.* 1997; 275: 482 - 484.
2. Cufre, G.; Chaves, M.; Godio, L.; Vasquez, M.; Forchetti, O.; Martinez, R. Efecto de la restricción en el consumo de energía sobre parámetros sanguíneos y pubertad en cabrillonas. *Rev Arg Prod Anim.* 2007; 27(3): 169 - 177.
3. De la Rosa Carbajal, S. Manual de producción caprina. 1ª ed. Formosa. 2011; 1 - 4. ISBN 978-987-33-0421-7.
4. Di Rienzo J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. Grupo InfoStat, 2009; FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
5. Erasmus, L.; Robinson, P.; Ahmadi, A.; Hinders, R.;
6. Garrett, J. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 2005; 12: 129 - 239.
7. Fraser, S.; Ogawa, M.; Yu, R.; Nishikawa, S.; Yoder, M.; Nishikawa, S. Definitive hematopoietic commitment within the embryonic vascular endothelial-cadherin population. *Exp Hematol.* 2002; 30: 1070 - 1078.
8. Hafez, S.; Borowicz, P.; Reynolds, P.; Redmer, D. Maternal and fetal microvasculature in sheep placenta at several stages of gestation. *J Anat.* 2010; 216: 292 - 300.
9. Kelly, R. Nutrition and placental development. *Proc Nutr Soc Aust.* 1992; 17: 203 -211.
10. Regnault, T.; Vrijer, B.; Galan, H.; Davidsen, M.; Trembler, K.; Battaglia, F.; Wilkening, R.; Russell, V. The relationship between transplacental O₂ diffusion and placental expression of PlGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. *J Physiol.* 2003; 550: 641 - 656.
11. Reynolds, L.; Redmer, D. Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. *Biol Reprod.* 1992; 47: 698 - 708.
12. Reynolds, L.; Borowicz, P.; Vonnahme, K.; Johnson, M.; Grazul-Bilska, A.; Wallace, J.; Caton, J.; Redmer, D. Animal Models of Placental Angiogenesis. *Placenta.* 2004; 26: 689 - 708.
13. Rivas, P.; Rodríguez-Márquez, J.; Hernández, A. Número de vasos sanguíneos y expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y de la óxido nítrico sintetasa endotelial e inducida en la alantoides ovina. *Rev Cien FCV-LUZ.* 2006; 16(4): 347 - 352.
14. Rivera, G.; Alanis, G.; Chaves, M.; Ferrero, S.; Morillo, H. Seasonality of estrus and ovulation in Creole goats of Argentina. *Small Ruminant Res.* 2003; 48: 109 - 117.
15. Spencer, T.; Bazer, F. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci.* 2004; 82: 4 - 13.
16. Turiello, P. Incidencia del nivel nutricional sobre el estado metabólico y hormonal de cabrillonas y su repercusión sobre la eficiencia reproductiva. Tesis de doctorado.

- Biblioteca Universidad Nacional de Río Cuarto. 2012; 118 p.
17. Van Rens, B.; Koning, G.; Bergsma, R.; Lende, T. Preweaning piglet mortality in relation to placental efficiency. *J Anim Sci.* 2005; 83: 144 - 151.
18. Vonnahme, K.; Ford, S. Placental vascular endothelial growth factor receptor system mRNA expression in pigs selected for placental efficiency. *J Physiol.* 2004; 554: 194 - 201.
19. Vonnahme, K.; Hess, B.; Nijland, M.; Nathanielsz, P.; Ford, S. Placentomal differentiation may compensate for maternal nutrient restriction in ewes adapted to harsh range conditions. *J Anim Sci.* 2006; 84: 3451 - 3459.

