

Relación entre Área Total y Área Epitelial de vellosidades placentarias porcinas en diferentes estadíos gestacionales

MERKIS, C. I.¹; CRISTOFOLINI, A. L.¹; FRANCHINO, M. A.¹;
MOSCHETTI, E.²; KONCURAT, M. A.¹

RESUMEN

La placenta porcina es epiteliochorial y no invasiva. Las interdigitaciones entre el epitelio trofoblástico fetal y el epitelio uterino conforman vellosidades de las cuales depende el crecimiento y desarrollo fetal. El objetivo fue determinar el Área Total y el Área Epitelial de vellosidades placentarias porcinas en diferentes períodos gestacionales mediante un analizador digital de imágenes. Se realizaron preparados histológicos de 5 placentas porcinas de cada período gestacional estudiado: 28, 55, 70 días de gestación y a término (aproximadamente 114 días). Para la medición de los parámetros morfométricos se utilizó un equipo de análisis digital de imágenes. Resultados: a los 55 días de gestación los valores medios del Área Total de las vellosidades fueron similares a los encontrados en placentas a término. Hay una disminución significativa del Área Total a los 70 días de gestación. El Área Epitelial se encuentra desarrollada desde los 28 días de preñez observándose una disminución hacia el día 70 y un aumento al final de la gestación. Conclusión: se observó desarrollo de vellosidades placentarias porcinas hasta los 55 días de preñez, disminución del Área Total y Epitelial hacia el día 70 y aumento del Área Epitelial de vellosidades en placentas a término.

Palabras clave: (análisis de imágenes), (placenta), (porcino), (vellosidad).

El presente trabajo forma parte de un programa de investigación 18/A099 subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

¹Área de Microscopía Electrónica. Departamento de Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria.

²Departamento de Matemáticas. Facultad Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba. Estafeta Postal N°9. Argentina. merkis@ayv.unrc.edu.ar

Recibido: junio 2004 - Aceptado: marzo 2005 - Versión on line: marzo 2005

Relationship between Total area and Epithelial area of porcine placental villi at different gestational periods

SUMMARY

The porcine placenta is epitheliochorial and non-invasive. The maintenance of the pregnancy is supported by villi which make interdigitations between the epithelial trophoblastic cells and the epithelial uterine cells during pregnancy. The objective of this work was to study the placental tissue using a digital analysis of images that allows measuring the total area and the epithelial area. Histologic sections of the five porcine placenta of 28, 55, 70 days and a term were used. The measure of the morphometric parameter was realized by digital analysis of images. Results: at 55 days of pregnancy the mean values of villi total area were comparable to that of placenta at term. The total area decreased significantly at about 70 days of pregnancy. The epithelial area developed since 28 days of gestation, decreased about 70 days and increased in placenta at term. Conclusion: villi showed the largest development in porcine placenta of 55 days of pregnancy, decrease of total area and epithelial at 70 days and increase of epithelial area in placenta at term.

Key words: (digital analysis of images), (placenta), (porcine), (villi).

INTRODUCCIÓN

La placenta porcina se caracteriza por ser epiteliocorial, difusa, plegada y no invasiva^{1,11,15,17}. El componente materno de la placenta se origina del endometrio de la cerda gestante y se desarrolla mediante una superficie con surcos o fosas que se extienden en una serie de ondulaciones conocidas como pliegues primarios; cuando la gestación avanza, se desarrollan en la interfase feto-materna una serie de ondas, los pliegues secundarios y terciarios, incrementando así el área de superficie de contacto mutuo^{7,10}. Es sobre estas fosas que se entrelazan los numerosos y complejos pliegues del corion fetal conformando las vellosidades primarias, secundarias y terciarias. Las vellosidades están constituidas por una capa de células epiteliales, denominada trofoblasto, y en íntimo contacto con las células epiteliales del endometrio materno conformando la interfase feto-materna, y hacia el feto por tejido

conectivo, el corion propiamente dicho. Además, la placenta porcina presenta en su superficie unas estructuras denominadas areolas, discernibles histológicamente a partir de alrededor del día 18 de gestación^{6,14,16,24,25}.

Las vellosidades placentarias conforman grandes superficies a través de las cuales se intercambian los nutrientes entre la madre y el feto. Dichas estructuras se acompañan de neoformación de vasos sanguíneos, a fin de brindar el soporte necesario a la sobrevivencia de los embriones/fetos^{7,14,16,29}.

De la placenta no sólo dependen la aceptación del *conceptus*, la sobrevivencia de los embriones y el éxito de la preñez, sino que también marca las posibilidades de sobrevivencia postnatal de los lechones^{6, 7, 10, 16, 17}.

Por otra parte, un analizador de imágenes permite estudiar parámetros morfométricos y estereológicos, a través de un alto grado de automatización ya que se procesa un número elevado de muestras con un mínimo de error y

rápida obtención de resultados ^{12,13,19,21,26,27}.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre el área total y el área epitelial de las vellosidades placentarias porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales a través de un analizador digital de imágenes, para comprender el desarrollo de ambas variables durante la placentación porcina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron cerdas mestizas de un establecimiento de cría porcina de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, para procesar 20 placentas de 28, 55, 70 días de gestación, y a término (aproximadamente 114 días de preñez), consideradas libres de enfermedad de acuerdo a la examinación antemortem y postmortem realizada.

En todos los casos el tracto reproductivo fue removido inmediatamente después de la muerte del animal destinado a faena, y lavado con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco, Grand Island, NY USA) conteniendo 10.000 U/ml de penicilina G sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomina y 2,5 µg/ml de fungizona (Gibco, Grand Island, NY USA), manteniéndolo a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Placentas

Se realizó una palpación para detectar la ubicación de los embriones o fetos. Los cuernos uterinos fueron cuidadosamente seccionados en forma longitudinal, practicándose una incisión en el borde antimesometrial, para observar el sitio de implantación y recoger muestras del tejido mesometrial, endometrial y placentario fetal. Las muestras fueron seleccionadas de la región placentaria

propriadamente dicha, que ocupa la parte central del saco corio-alantoideo y contiene al embrión rodeado por la membrana del mismo nombre. Se tomaron porciones de 5 placentas de cada período gestacional, de 6 mm aproximadamente y se fijaron con formol salino tamponado, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos de $\pm 4 \mu\text{m}$ que se tiñeron con hematoxilina-eosina para el reconocimiento de la estructura placentaria. Se determinó la edad gestacional de las cerdas de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los embriones/fetos obtenidos de cada una de ellas ¹⁸

Análisis digital de imágenes

Para la medición de los parámetros morfométricos se utilizó un analizador digital de imágenes (Kontron imaging system, VIDAS® Carl Zeiss), el cual consta de una CPU con el programa VIDAS 25, con placa de adquisición de imágenes, dos monitores (uno para la manipulación del programa y otro para la visualización de la imagen); un «mouse» indicador de la posición exacta dentro de la imagen y un sistema de conexión realizado a través de una cámara video Philips CCD a un microscopio Axiophot (Carl Zeiss) ^{2,3,8,9}.

Se utilizó una «macro», secuencia de órdenes o rutinas de órdenes de computadora que producen información descriptiva acerca de la imagen digitalizada, dadas por el operador a la PC, diseñada en nuestro laboratorio. El primer paso de la macro es la captura de la imagen óptica en una forma almacenable en la memoria de la PC. Esta conversión es efectuada por un digitalizador óptico, sistema fotosensible que produce números codificados que son una medida de la intensidad luminosa. Dicho sistema muestrea la imagen óptica (50 aproximadamente) a intervalos regulares, y la salida electrónica es convertida en una secuencia de valores numéricos discretos (ceros

y unos). La segunda fase, el preprocesamiento, consiste en la selección de la zona a medir la variable estipulada en forma interactiva. La tercera etapa es el procesamiento, donde digital y automáticamente queda seleccionada la imagen a procesar. Seguidamente, dicha imagen es segmentada y reconocida por la PC. La cuarta etapa es la medición de los parámetros seleccionados, donde a través de la macro se le indica a la PC la identificación del objeto a medir, la apertura de bases de datos para guardar los valores obtenidos y la medición propiamente dicha. Por último, se da la conversión de los valores obtenidos en pixel, que es la más pequeña unidad indivisible que integra una imagen digitalizada, en una unidad métrica, por ejemplo, micrómetros^{5, 19, 21, 23, 26}.

Análisis estadístico

Para estudiar la relación entre el Área Total (AT) y el Área Epitelial (AE) de las vellosidades placentarias porcinas, se realizó un análisis de regresión simple sin intercepto a través del modelo:

$$AE = \beta AT + \varepsilon$$

Donde:

AE = Área Epitelial de la vellosidad

AT = Área Total de la vellosidad

β = coeficiente de regresión

ε = componente aleatoria (residuo)

Para este análisis se utilizó el Software STATISTICAL (versión 6.0)^{20, 22}.

RESULTADOS

La macro realizada nos permitió medir por cada portaobjeto analizado, entre 5 y 7 vellosidades placentarias tomadas en forma aleatoria y al azar.

Se determinó como Área Total (AT) la porción de la vellosidad conformada por células

epiteliales (trofoblasto) y tejido conectivo (corion); mientras que se estableció como Área Epitelial (AE) solamente la capa de trofoblasto en íntimo contacto con el endometrio materno.

La figura 1 muestra la estructura de una vellosidad proveniente de una placenta porcina de 28 días de gestación, en la que se observa la interfase feto-materna propiamente dicha.

La figura 2 muestra una vellosidad a término proveniente de una placenta de 114 días de gestación, se observa gran cantidad de vasos sanguíneos intraepiteliales.

Los valores medios de Área Total y Área Epitelial de vellosidades placentarias provenientes de 28, 55, 70 y 114 días de gestación, obtenidos a través del analizador digital de imágenes, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores medios \pm desvío estándar (μm^2) de Área Total y Área Epitelial de vellosidades placentarias porcinas, provenientes de 28, 55, 70 y 114 días de gestación (n = 5)

período gestacional (días)	Área Total (media \pm DS)	Área Epitelial (media \pm DS)
28	115,36 \pm 29,24	46,98 \pm 18,83
55	137,65 \pm 24,68	47,77 \pm 22,25
70	86,58 \pm 49,53	43,22 \pm 34,62
114	139,15 \pm 59,03	55,20 \pm 18,18

El análisis de las variables estudiadas, Área Total y Área Epitelial de las vellosidades en los diferentes estadios gestacionales, se muestra en los gráficos 1a y 1b, respectivamente.

En el gráfico 1a se observa que a los 55 días de gestación los valores medios de AT son similares a los valores medios de dicha variable en una placenta a término. Además, se observa una disminución significativa de los valores medios

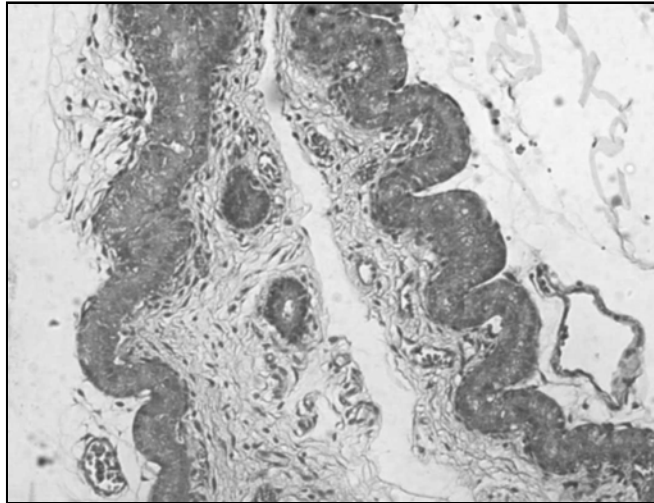


Figura 1. Fotografía de tejido placentario porcino de 28 días de gestación. Se observa una vellosidad placentaria (200x)

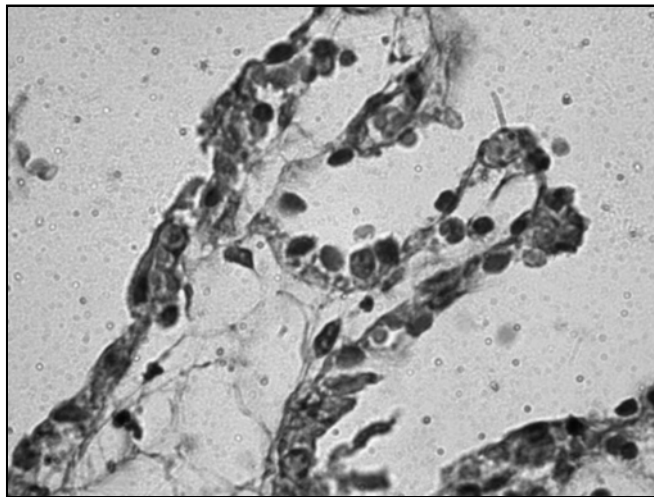


Figura 2. Fotografía de tejido placentario porcino de 114 días de gestación (a término). Se observa en una vellosidad gran cantidad de vasos sanguíneos intraepiteliales (1000 x).

de AT hacia los 70 días de preñez, con respecto a los otros períodos gestacionales estudiados.

En el gráfico 1b se muestra que los valores medios de AE se mantienen constantes entre los 28 y 55 días de gestación; a los 70 días se observa una disminución de los mismos,

mientras que hacia el final de la gestación se encuentran los mayores valores medios de AE. Obsérvese que la variabilidad de AE a los 70 días de preñez es mayor que en los demás períodos gestacionales estudiados.

Los resultados hallados se confirman a

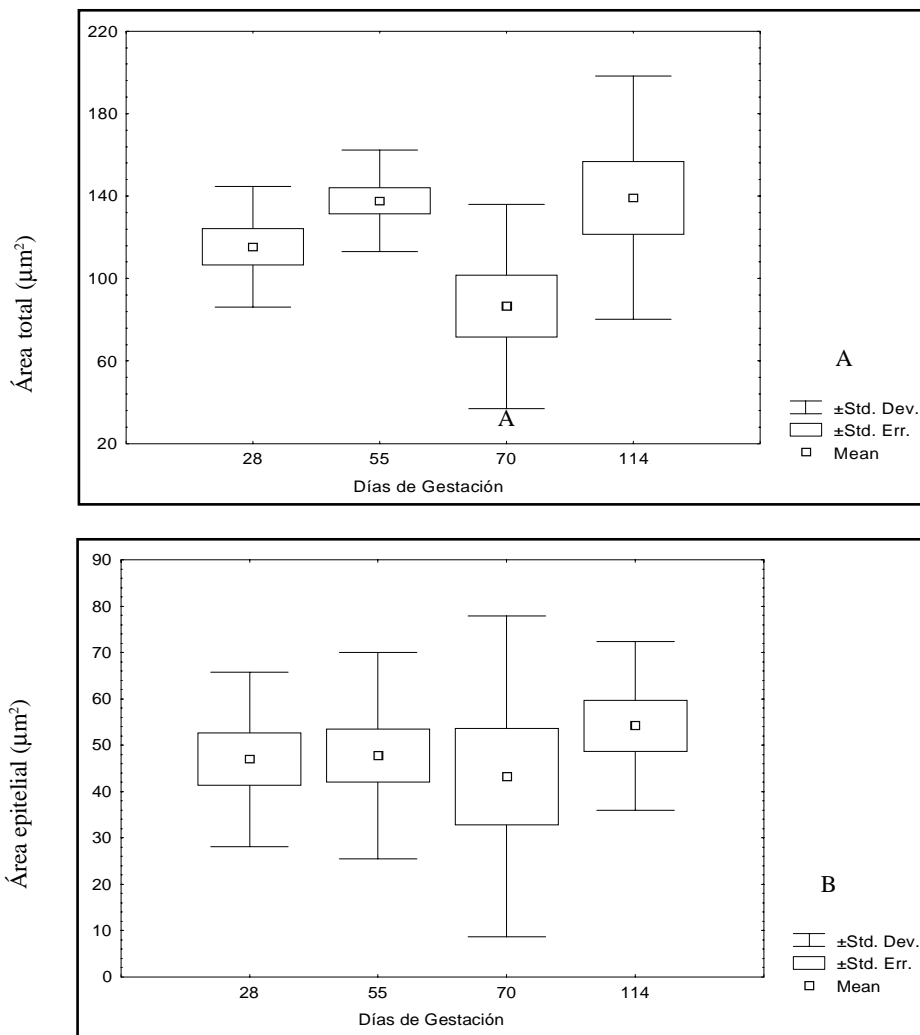


Gráfico 1 a y b: Cajas y bigotes (box-plot) realizado con los valores de áreas totales y áreas epiteliales de vellosidades placentarias porcinas provenientes de cuatro períodos gestacionales (28, 55, 70 y 114 días de gestación).

través de la significancia estadística ($p < 0.01$) del parámetro β , lo que indica que la variable AT explica linealmente a la variable AE. Se construyó un intervalo de confianza para el parámetro β en cada uno de los estadios gestacionales de nivel 95%, cuya forma general

es: $(\hat{\beta} \pm a\sigma_{\hat{\beta}})$, donde $a = t_{n-2, \alpha/2}$. Se observó que en todos los casos el error estándar del estimador del parámetro β fue menor que el valor del estimador de β , lo que indica que éste es estable.

DISCUSIÓN

El estudio de las vellosidades placentarias porcinas, mediante un analizador digital de imágenes, permitió estudiar la relación entre las variables Área Total y Área Epitelial en los diferentes períodos gestacionales.

El trofoblasto porcino conforma vellosidades que sirven para hacer contacto y adherirse al epitelio uterino materno, permitiendo la implantación. Dicho contacto celular es esencial no sólo para el intercambio de nutrientes, sino también para la fijación de la placenta, dado que cada embrión porcino debe lograr su lugar de implantación en los cuernos uterinos, especialmente en especies con placenta epiteliorial, y en ese caso también politoca.

El análisis de imágenes por video permitió incrementar la precisión y acortar tiempos, ya que una PC está asociada para recolectar y analizar los datos. Por lo tanto, fue posible procesar y analizar la imagen como en una fotografía, pero con mayor precisión y velocidad⁹.

Los valores medios de Área Total encontrados a los 55 días de preñez son similares a los valores medios encontrados en placentas a término. Por el contrario, se hallaron diferencias significativas con los valores medios de los otros períodos gestacionales estudiados. En coincidencia con Tarraf y Knight²⁸, hallamos una disminución significativa de los valores medios de AT a los 70 días de preñez que se correspondería con una disminución del crecimiento placentario acompañando el aumento del peso fetal. Nosotros pensamos que a partir de los 70 días de gestación, el aumento de AT de las vellosidades, hasta equipararse al área observada a los 55 días de preñez, sería para lograr el soporte del gran desarrollo fetal que acontece a partir de este período hasta el final de la preñez.

En la otra variable en estudio, el Área Epitelial es mayor en las placentas a término debido al

desarrollo de vellosidades terciarias necesarias para la nutrición fetal, ya que, y en coincidencia con Biensen y col.⁴, consideramos que no hay aumento de tamaño de la placenta porcina a partir de los 90 días de gestación, sino solamente de la porción epitelial de las vellosidades¹⁵. En conclusión, observamos desarrollo de vellosidades placentarias porcinas hasta los 55 días de preñez, disminución del Área Total y Epitelial hacia el día 70 y aumento del Área Epitelial de vellosidades en placentas a término. Estas características señaladas de la estructura de la placenta porcina garantizarían sus principales funciones, como son el intercambio de sustancias y nutrientes entre la madre y los embriones, permitiendo así el desarrollo individual de cada embrión en los cuernos uterinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. AMOROSO, E. C. Placentation. *En* PARKERS A.S. (ed). *Marshalls Physiology of Reproduction*. Longmans Green, London, 1952, pag. 127-311.
2. BARTELS, P.H.; LAYTON, J.; SHOEMAKER, R.L. -Digital Microscopy. *En* GREENBERG (ed). *Computer-assisted images analysis cytology*. Karger, Basel, 1984, pag. 28-61.
3. BAXES, G.A. -Digital images processing. *En* PRENTICE-HALL, ENGLEWOOD CLIFFS (ed). -A practical primer. N.J. 1984.
4. BIENSEN, N.J.; WILSON, M.E.; FORD, S.P. 1999. The impacts of uterine environment and fetal genotype on conceptus size and placental vascularity during late gestation in pigs. *J. Anim. Sci.* 77: 954-959.
5. CASTLEMAN, K.R. *Digital Image Processing*. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey, New Jersey, 07632, 1996.
6. DANTZER, V.; BJÖRKMAN, N.; HASSELAGER, E. 1981. An electron microscopic study of histiotrophe in the interareolar part of the porcine placenta. *Placenta.* 2: 19-28.

7. DANTZER, V.; LEISER, R. 1994. Initial vascularization in the pig placenta: I. Demonstration of non-glandular areas by histology and corrosion casts. *Anat. Rec.* 238: 177-190.
8. FANGERAS, O. Three-Dimensional Computer Vision: A geometric Viewpoint, The MIT Press. Cambridge MA, London, 1993.
9. FAY, F.S.; FOGARTY, K.L.; COGGINS, M. Optical methods in cell physiology. P De Weer and B M. Salzberg, Wiley (ed). N.Y. 1985.
10. GEISER, R.D.; YELICH, J.V. 1990. Regulation of conceptus development and attachment in pigs. *J. Reprod. Fert.* 55: 133-140.
11. HAFEZ, E.S.; HAFEZ, B. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima Edición. Mc Graw Hill Interamericana, 2002.
12. INOUÉ, S. Video microscopía. Plenum Publishing Corporation (ed). NY. 1993.
13. JAHNE, B. Digital Image Processing. Springer, Fourth Edition The MIT Press, Cambridge M.A, London, 1997.
14. JOHANSSON, S.; DENCKER, L.; DANTZER, V. 2001. Immunohistochemical localization of retinoid binding proteins at the materno fetal interface of the porcine epitheliochorial placenta. *Biol. Reprod.* 64: 60-68.
15. KAUFMANN, P.; BURTON, G. The Physiology of Reproduction. -Chapter 8, Second Edition (ed) Knobil and Neill, Raven Press, Ltd, N.Y. 1994.
16. LEISER, R.; DANTZER, V. 1994. Initial vascularization in the pig placenta: II. Demonstration of gland and areola-gland subunits by histology and corrosion casts. *Anat. Rec.* 238: 326-334.
17. LEISER, R.; KAUFMANN, P. 2001. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102: 122-134.
18. MARRABLE, A.W. The embryonic pig: A chronological account. Exeter (ed), Pitman medical, London, 1971.
19. MERKIS, C.I.; ZUBELDÍA, D.; KONCURAT, M.A. 2001. Aplicación del analizador digital de imágenes a la medición de parámetros morfológicos en túbulos seminíferos de testículos de *Liolaemus wiegmanni*. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 14: 49-53.
20. MONTGOMERY, D.; PECK, E. Introduction of linear regression analysis. Second Edition. John Wiley and Sons (ed). Inc. London, 1992.
21. MORISHIMA, S. 2001. Face analysis and synthesis. *IEEE Signal Processing Magazine.* 18: 26-34.
22. MOSTELLER, F.; TUKEY, J. Understanding robust and exploratory data analysis. John Wiley and Sons (ed). Inc. London, 1982.
23. PEDERSINI, F.; SARTI, A.; TUBARN, S. 1999. Multicamera systems. *IEEE Signal Processing Magazine.* 16: 55-65.
24. PERRY, J.S. 1981. The mammalian fetal membranes. *J. Reprod. Fertil.* 62: 321-335.
25. POPE, W.F.; MAURER, R.R.; STORMASHAK, F. 1982. Intrauterine migration of the porcine embryo: interaction of embryo, uterine flashings and indomethacin on myometrial function *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 55: 1169-1178.
26. PRATT, W.K. Digital image processing. John Wiley and sons (ed). London, 1991.
27. REDERT, A.; HENDRIKS, E.; BIEMOND, J. 1999. Correspondence estimation in image pairs. *IEEE Signal Processing Magazine.* 16: 29-46.
28. TARRAF, C.G.; KNIGHT, J.W. 1995. Effects of intrauterine position on conceptus development, placental and endometrial release of progesterone and estrone *in vitro* and concentration of steroid hormones in fetal fluids throughout gestation in swine. *Domestic Anim. Endocrinol.* 12: 179-187.
29. VONAHME, A.; WILSON, M.E.; FORD, S.P. 2001. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biol. Reprod.* 64: 1821-1825.