

Determinación de apoptosis por TUNEL e inmunoreactividad de las proteínas BCL-2 y BAX durante la placentación porcina. Comunicación

Determination apoptosis by TUNEL and BCL-2 and BAX immunoreactivity of the proteins during porcine placentation. Communication

Cristofolini^{1,2}, A., Merkis¹, C., Barroso¹, F., Vaquer Balmaceda¹, V., Allende, F., Chanique¹, A. y Koncurat¹, M.

Área de Microscopía Electrónica. Dpto. Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto. Córdoba.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar en muestras placentarias porcinas de diferentes estadios gestacionales, la fragmentación del ADN a través de la técnica de TUNEL y la inmunoreactividad de las proteínas reguladoras BAX y BCL-2, a fin de detectar los mecanismos pro y antiapoptóticos de la vía mitocondrial involucrados en la remodelación celular placentaria. Se utilizaron cortes histológicos de $\pm 4 \mu\text{m}$ provenientes de placentas porcinas de $\pm 30, 55, 70$ y 114 días de preñez. Para la detección de las proteínas BAX y BCL-2 se realizó la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos comerciales específicos y para la detección de la fragmentación de ADN se utilizó la técnica de TUNEL. Los resultados se expresaron en forma semicuantitativa y para cada período gestacional se determinó la distribución de la intensidad de inmunomarcación a través del valor de High Score (HS). En placentas de 30 días de preñez se observaron núcleos apoptóticos característicos distribuidos en forma de parches en el epitelio materno, mientras que la marcación se presentó en forma lineal en los demás períodos placentarios. En los diferentes períodos gestacionales la proteína proapoptótica BAX se encuentra regulada por la expresión del marcador antiapoptótico BCL-2. Al inicio de la gestación se detectaron valores de HS positivos con el marcador apoptótico BAX, los mismos aumentaron hacia los días 55 y 114 de preñez y disminuyeron hacia el día 70 de gestación. En conclusión, al inicio de la gestación porcina la remodelación placentaria observada acontece por inducción de la vía intrínseca a través de BAX, siendo mayor hacia los 55 y 114 días de preñez.

Palabras clave: apoptosis, porcinos, placenta.

Summary

The aim of the present work was to determine fragmentation of the DNA with TUNEL and the presence of the mitochondrial regulating protein BAX and BCL-2 in porcine placenta during gestation, to detect the mechanisms pro and antiapoptotic involved of the mitochondrial way during the placental remodeling. Histological slides of $\pm 4 \mu\text{m}$ of porcine placenta of $\pm 30, 55, 70$ and 114 days of gestation were used. For the detection of the BAX and BCL-2

Recibido:

Aceptado:

1. Área de Microscopía Electrónica, Dpto. Patología Animal. Facultad de Agron. y Vet. UNRC. Ruta N° 8, Km 601. (5800) Río Cuarto, Córdoba. Argentina. acristofolini@ayv.unrc.edu.ar

2. Becaria de CONICET/Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba.

immunoperoxidase technique and commercial antibodies and for the TUNEL technique the ApopTag® equipment were used. The results were expressed semiquantitative form and for every gestational period the distribution of the immunolabeling intensity was determined by means of the High Score value (HS). At the 30 days nuclei with chromatinic margination was identified by TUNEL. At the 30 days of pregnancy the labeling is in patches forms while in linear form at the 55, 70 and 114 days of pregnancy. BAX expression is regulated by the expression of the BCL-2. To the beginning of the gestation BAX HS values positive was detected, these values increased about the 55 and 114 days of pregnancy and decreased the day 70 of gestation. In conclusion, in pigs to beginning of the gestation the placental remodeling for apoptosis across the intrinsic way BAX, but the biggest placental remodeling to the 55 and to 114 days of pregnancy was observed.

Key words: apoptosis, porcine, placenta.

Introducción

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo que ocurre de manera fisiológica, a través del cual un organismo elimina las células indeseables sin provocar una respuesta inflamatoria. La homeostasis de los tejidos requiere un balance entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular, de esta manera, mitosis y apoptosis mantienen el equilibrio celular de los tejidos. La secuencia de procesos característicos de la apoptosis está regulada por la interrelación de mecanismos pro y anti apoptóticos, de manera tal que la muerte celular puede estar inhibida, en equilibrio o estimulada. (King y Cidlowski, 1998; Fink y Cookson, 2005). La muerte celular programada constituye un factor clave en el desarrollo de diferentes procesos fisiológicos tales como la placentación, fenómeno reproductivo esencial en la mayoría de los mamíferos. Puede ser inducida a través de vías extrínsecas por unión de ligandos a un receptor de membrana, las proteínas de muerte celular mejor caracterizadas son el FAS/APO-1 o CD95, el TRAIL-R o DR4 y el TNF-R1; o por vías intrínsecas o mitocondriales, en donde intervienen proteínas de regulación pro y antiapoptóticas tales como BAX y BCL-2, respectivamente (Yang y Korsmeyer, 1996; Hsu y Hsueh, 1998; Willis et al., 2003).

La preñez temprana en el cerdo, se caracteriza por un rápido desarrollo y crecimiento, tanto del útero como de los embriones, dando

por resultado la formación de una placenta difusa, plegada, adecidua, no invasiva y epitelio-corial (Amoroso, 1952; Dantzer, 1985; Leiser y Kaufmann, 1994). La placenta desempeña un papel fundamental en el transcurso de la gestación, de ella no sólo depende la implantación y mantenimiento de la preñez, sino que además, marca las posibilidades de sobrevivencia postnatal de los lechones (Van der Lende y Van Rens, 2003). Uno de los mecanismos estudiados de regulación de la homeostasis placentaria en cerdos, es la remodelación celular por apoptosis (Okano et al., 2007); en cerdas mestizas se han identificado algunos receptores de muerte celular involucrados en la cascada apoptótica, en placentas porcinas de diferentes estadios gestacionales (Merkis et al., 2007; Cristofolini et al., 2007). Poder reconocer algunos de los mecanismos básicos que regulan la homeostasis placentaria porcina, a través de la identificación de moléculas que intervienen en la remodelación celular, permitirá profundizar el conocimiento de los mecanismos fisiológicos que posibilitan una preñez exitosa en ésta especie de alto valor productivo en la industria pecuaria de nuestra región.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar en muestras placentarias porcinas del inicio (\pm 30 días), la mitad (\pm 55, \pm 70 días) y el final de la gestación (\pm 114 días), la fragmentación del ADN a través de la técnica de TUNEL y la inmunoexpresión de las proteínas BAX y BCL-2, a fin de detectar mecanismos pro y antiapoptóticos de la vía mitocondrial involucrados en la remodelación celular placentaria.

Materiales y Métodos

1. Tractos Reproductivos

Se utilizaron cerdas mestizas destinadas a faena de establecimientos de cría porcina de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba (33,11° S; 64,3° O), consideradas libres de enfermedad de acuerdo a la examinación *antemortem* y *postmortem* realizada. Se procesaron 20 placentas placentas correspondientes a ± 30 días (n= 5), ± 55 días (n= 5), ± 70 días (n= 5) y ± 114 días de gestación (n=5) y 5 úteros vacíos.

En todos los casos el tracto reproductivo fue removido inmediatamente después de la muerte del animal destinado a faena comercial 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 estreptomicina y 2,5 mg/ml de fungizona (Gibco, Grand Island, NY USA), manteniéndolo a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. El tiempo transcurrido entre la remoción del tracto y la obtención de las muestras fue menor a 20 minutos. Se realizó una palpación para detectar la ubicación de los embriones o fetos. Los cuernos uterinos fueron cuidadosamente abiertos en forma longitudinal, con una incisión por el borde anti-mesometrial, para observar el sitio de implantación y recoger muestras del tejido placentario materno y fetal. Se determinó la edad gestacional de las placentas de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los embriones y/o fetos obtenidos de cada cerda gestante (Marrable, 1971).

2. Técnica de microscopía óptica

Se tomaron porciones de $\pm 6 \text{ mm}^3$, de las placentas de cada período gestacional y de los úteros vacíos y se fijaron en formol al 10% diluido en solución tamponada salina (PBS) pH 7,4. Las muestras se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos de $\pm 4 \mu\text{m}$ de espesor. Parte de los cortes de tejido placentario se destinó para la detección de la fragmentación del ADN por ensayo TUNEL y el resto se utilizó para la determinación de la inmunoeexpresión de las proteínas mitocondriales reguladoras BAX y BCL-2, a través de técnicas inmunohistoquímicas.

3. Ensayos de apoptosis

3.1. Detección de apoptosis *in situ*: TUNEL

La detección de la fragmentación de ADN se realizó mediante la técnica de TUNEL (TdT-mediated -dUtp Nick End Labeling) a través del equipo comercial ApopTag® (Chemicon), para la contrastación se utilizó Hematoxilina de Mayer y como medio de montaje Entellan (Merck). A través de la técnica de TUNEL se determinó la presencia de células apoptóticas (núcleos amarronados) y de células viables (núcleos contrastados de azul), presentes en las muestras placentarias de los períodos gestacionales seleccionados. La adquisición de las imágenes se realizó con una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada a un microscopio Axiophot (Carl Zeiss).

3.2. Determinación de inmunoeexpresión de BAX y BCL-2

Para detectar la inmunoeexpresión de las proteínas reguladoras de apoptosis BAX y BCL-2, se realizaron técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos primarios Santa Cruz, Inc. y los equipos comerciales LSAB®+Systems-HRP y Liquid DAB+Substrate Chromogen System (Dako Cytomation); los cortes se contrastaron con Hematoxilina de Mayer y se utilizó el medio de montaje Entellan (Merck). El tejido placentario fue observado con un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss) y los resultados se expresaron en forma semicuantitativa, determinando las intensidades de marcación (i) de la siguiente manera: (-): marcación negativa (i= 0); (+): baja intensidad de marcación (i= 1); (++) media intensidad de marcación (i= 2) y (+++): alta intensidad de marcación (i= 3). Luego, para cada período gestacional se determinó la distribución de la intensidad de inmunomarcación a través del valor de High Score (HS) (Selam et al., 2001). En donde para cada muestra el valor HS derivó de la sumatoria de los porcentajes de tejido placentario marcado para cada intensidad, multiplicado por el ponderado para esa intensidad de marcación.

$$\text{HScore} = \sum \text{Pi} (i + 1)$$

i= intensidad de marcación.

Pi= % de tejido marcado para cada intensidad.

La adquisición de imágenes se realizó a través de una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio Axiophot (Carl Zeiss).

Resultados y Discusión

En el Cuadro 1, observamos la inmunomarcación expresada en forma semicuantitativa y en porcentaje de intensidad de marcación a través de HS, de las proteínas BAX y BCL-2 en los epitelios materno y fetal de las vellosidades placentarias y en tejido conectivo endometrial y coriónico de placentas porcinas de \pm 30, 55, 70 y 114 días de preñez. Hacia el día 30 de gestación la inmunomarcación de la proteína proapoptótica BAX fue baja en los epitelios de las vellosidades placentarias y en endometrio y corion. Con respecto al regulador antiapoptótico BCL-2, no se detectó inmunomarcación en los epitelios de las vellosidades placentarias, mientras que a nivel del tejido conectivo endometrial y coriónico, la misma fue baja. Hacia la mitad de la gestación (\pm 55 y \pm 70) la inmunoexpresión observada para las proteínas BAX y BCL-2 fue negativa en los epitelios materno y fetal de las

vellosidades placentarias; mientras que en conectivo endometrial y coriónico, BAX presentó inmunomarcación media y BCL-2 baja. Hacia el final de la gestación (\pm 114 días) se observó inmunoreactividad baja para la proteína BAX y negativa para BCL-2 en los epitelios de las vellosidades; mientras que a nivel del tejido conectivo endometrial y coriónico la inmunoexpresión observada fue media para BAX y baja para BCL-2.

La técnica de TUNEL permite identificar núcleos en apoptosis, incluso aquellos que se encuentran en estadios muy iniciales de marginación cromatínica; a través de esta técnica observamos en placentas de \pm 30 días de preñez (Figura 1) núcleos apoptóticos característicos distribuidos en forma de parches en el epitelio materno de las vellosidades placentarias, mientras que la marcación se presentó en forma lineal en los demás periodos gestacionales estudiados. Por otro lado, hacia el día 30 de preñez se determinó el mayor número de células en apoptosis presentes en las vellosidades placentarias porcinas (Cuadro 2).

La Figura 2 muestra la distribución de la intensidad de inmunomarcación de las proteínas mitocondriales estudiadas. Observándose que al inicio de la gestación se detectaron valores de HS positivos con el marcador apoptótico BAX, los que aumentaron en dos periodos estudiados, 55 y 114 días coincidiendo

Cuadro 1: Inmunoreactividad de las proteínas BAX y BCL-2 a los 30, 55, 70 y 114 días de preñez, respectivamente.

Table 1: Immunoreactivity of the proteins BAX and BCL-2 to 30, 55, 70 and 114 days of pregnancy, respectively.

Período gestacional	Vellosidad Placentaria		Tejido Conectivo Endometrial y Coriónico	
	BAX	BCL-2	BAX	BCL-2
30 días	(+)	(-)	(+)	(+)
55 días	(-)	(-)	(++)	(+)
70 días	(-)	(-)	(++)	(+)
114 días	(+)	(-)	(++)	(+)

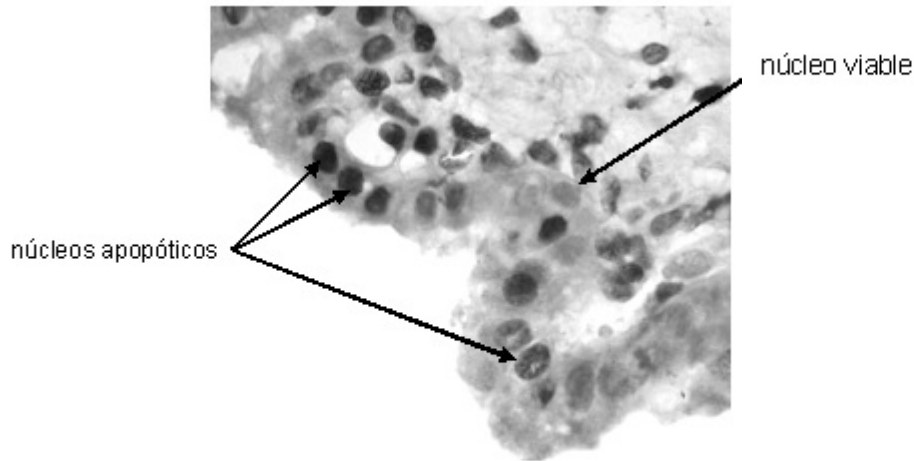


Figura 1: Distribución de intensidad de inmunomarcación (HS) de las proteínas BAX y BCL-2 a los 30, 55, 70 y 114 días de preñez, respectivamente.

Figure 1: Distribution of intensity of immunolabeling (HS) of the proteins BAX and BCL-2 to 30, 55, 70 and 114 days of pregnancy, respectively.

Cuadro 2: Número de células totales y células apoptóticas detectadas a los 30, 55, 70 y 114 días de preñez, respectivamente.

Table 2: Numbers of total cell and apoptotic cell detected to 30, 55, 70 and 114 days of pregnancy, respectively.

Período Gestacional (días)	Nº Células Totales	Nº Células Apoptóticas
30	208	96
55	232	11
70	209	60
114	247	29

do con la mitad de la gestación y el momento del parto, respectivamente. Mientras que hacia el día 70 de gestación se observa una disminución en la distribución de intensidad de inmunomarcación de la proteína proapoptótica BAX.

Durante la placentación porcina, debe existir un eficiente intercambio de factores nutricionales a través de la interfase materno-fetal a medida que avanza la gestación. El equilibrio entre proliferación y muerte celular,

desempeña un papel fundamental en la remodelación celular para el mantenimiento de la homeostasis placentaria (Dantzer y Leiser, 1993; Finch et al., 2004). En los diferentes estadios gestacionales el marcador proapoptótico BAX se encuentra regulado por la expresión del marcador antiapoptótico BCL-2. De acuerdo con trabajos previos, a los 30 días de gestación la expresión de los receptores de muerte celular de la vía extrínseca FAS, fue negativa, como así también la

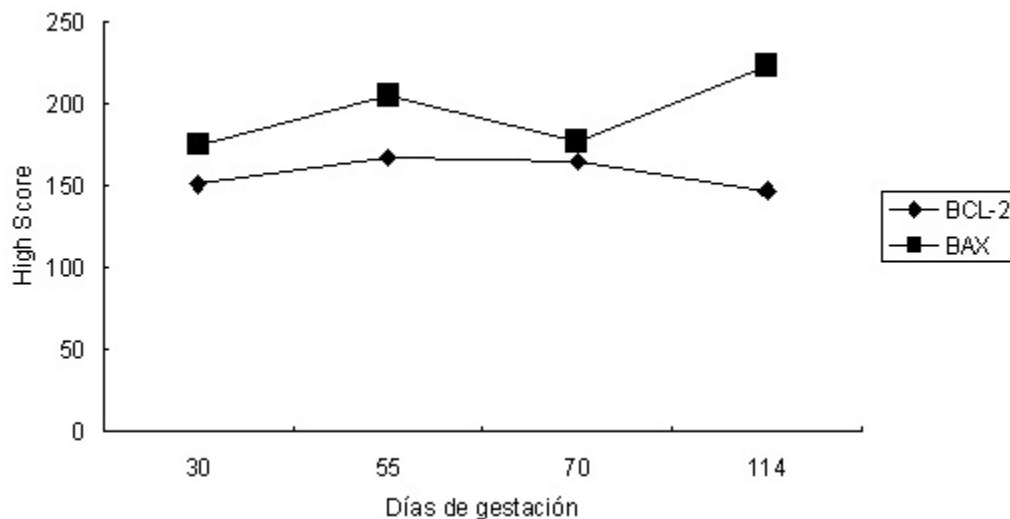


Figura 2: Fotografía de placenta porcina de \pm 30 días de preñez; en donde se observan células placentarias en apoptosis mediante la visualización de la fragmentación del ADN in situ detectada por la técnica TUNEL (1000 x).

Figure 2: Photography of porcine placenta of \pm 30 days of pregnancy; where placental cells apoptotic were observed, by visualization of the DNA's fragmentation detected by the technique TUNEL (1000 x).

inmunoexpresión de la proteína reguladora antiapoptótica BCL-2, lo que nos permite estimar que la apoptosis detectada por TUNEL, al inicio de la preñez porcina, se debería entonces a la activación de la vía intrínseca de señalización apoptótica, a través de la proteína mitocondrial BAX (Cristofolini et al., 2008).

Conclusión

Al inicio de la gestación porcina la remodelación placentaria observada acontece a través de la vía de inducción intrínseca por la proteína mitocondrial BAX; sin embargo la mayor remodelación celular placentaria, realizada por esta vía, se observa hacia la mitad y al final de la gestación porcina. Describir satisfactoriamente la incidencia del proceso apoptótico durante una placentación normal, permitirá futuras investigaciones acerca del rol de este proceso en mecanismos patológicos placentarios involucrados en fallas durante la gestación o en procesos de muerte embrionaria fetal sin causa específica.

Bibliografía

- Amoroso, E. 1952. Placentation. *In*: Marshall's Physiology of Reproduction. Ed. Parkes AS, Vol 2, pp 127-311. London: Longmans Green.
- Cristofolini, A., Merkis, C., Zubeldía, D., Barroso, F., Lloret, M., Sanchis, G., Vaquer, V. and Koncurat, M. 2007. FAS B-10, FAS C-20 and TRAIL expression during porcine placentation. *Biocell* 31(1): 187.
- Cristofolini, A., Merkis, C., Barroso, F., Vaquer, V., Lloret, M., Moschetti, E. y Koncurat, M. 2008. Detección de fibrinógeno, FAS B-10, FAS ZB4 y FAS C-20 durante la placentación porcina.- *REDVET* 9(7) <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>, <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070708.html>
- Dantzer, V. 1985. Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat Embryol*, 172: 281-293.
- Dantzer, V. and Leiser, R. 1993. Initial vascularization in the pig placenta: I. Demonstration of non-glandular areas by histology and corrosion casts. *Anat Rec* 238: 177-190.
- Finch, A., Yang, L., Nwagwu, M., Page, K., McArdle, H. and Ashworth, C. 2004. Placental transport of leucine in a porcine model of low birth weight. *Reproduction* 128: 229-235.

- Fink, S. and Cookson, B. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73(4): 1907-1916.
- Hsu, D. and Hsueh, A. 1998. A splicing variant of the Bcl-2 member Bok with a truncated BH3 domain induces apoptosis but does not dimerize with antiapoptotic Bcl-2 proteins *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 273 (46): 30139-46.
- King, K. and Cidlowski, J. 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 601-617.
- Leiser, R. and Kaufmann, P. 1994. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol*, 102: 122-134.
- Marrable, A. 1971. The embryonic pig: A chronological account. Exeter (ed), Pitman medical, London, 1971.
- Merkis, C., Cristofolini, A. and Koncurat, M. 2007. Apoptotic phenomena during porcine placentation. *Revista Electrónica de Veterinaria: RED-VET* enero 2007, ISSN 1695-7504. www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html.
- Okano, A., Ogawa, H., Takahashi, H. and Geshi, M. 2007. Apoptosis in the porcine uterine endometrium during the estrous cycle, early pregnancy and post partum. *Journal of Reproduction and Development* 53(4): 953-930.
- Selam, B., Kayisli, U., Mulayim, N. and Arici, A. 2001. Regulation of Fas Ligand Expression by Estradiol and Progesterone in Human Endometrium. *Biol Reprod* 65: 979-985.
- Van der Lende, T. and Van Rens, B. 2003. Critical periods for foetal mortality in gilts identified by analysing the length distribution of mummified foetuses and frequency of non-fresh stillborn piglets. *Animal Reproduction Science* 75(1-2): 141-150.
- Willis, S., Day, C., Hinds, M. and Huang, D. 2003. The Bcl-2 regulated apoptotic pathway. *Journal of Cells Science* 116: 4053-4056.
- Yang, E. and Korsmeyer, S. 1996. Molecular thanatopsis: a discourse on the *bcl-2* family and cell death. *Blood* 88:386-401.