

## **Inmunolocalización de proteínas mitocondriales reguladoras durante la placentación en porcinos** (Immunolocalization of regulated mitochondrial proteins during porcine placentation)

**Merkis, Cecilia Inés:** Área de Microscopía Electrónica, Departamento Patología Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto, Enlace Rutas 8 y 36 km 601, CP 5800. Río Cuarto, Córdoba, Argentina, [cmerkis@ayv.unrc.edu.ar](mailto:cmerkis@ayv.unrc.edu.ar) | **Cristofolini, Andrea Lorena:** Becaria de CONICET/Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba, Área de Microscopía Electrónica, Departamento Patología Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto, [acristofolini@ayv.unrc.edu.ar](mailto:acristofolini@ayv.unrc.edu.ar) | **Barroso, Fabio:** Área de Microscopía Electrónica, Departamento Patología Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto, [fabarroso@hotmail.com](mailto:fabarroso@hotmail.com) | **Vaquer Balmaceda, Virginia:** Área de Microscopía Electrónica, Departamento Patología Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto, [virgivaquer@hotmail.com](mailto:virgivaquer@hotmail.com) | **Allende, Federico:** Área de Microscopía Electrónica, Departamento Patología Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto, [fedeallende@hotmail.com](mailto:fedeallende@hotmail.com) | **Chanique, Analía:** Área de Microscopía Electrónica, Departamento Patología Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto, [achanique@ayv.unrc.edu.ar](mailto:achanique@ayv.unrc.edu.ar) | **Koncurat, Mirta:** Área de Microscopía Electrónica, Departamento Patología Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto, [mkoncurat@ayv.unrc.edu.ar](mailto:mkoncurat@ayv.unrc.edu.ar)

---

### **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 inmunolocalización de las proteínas reguladoras BCL-2 y BAX, 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  $\pm 30, 55, 70, 80$  y  $114$  días de gestación. La detección de la fragmentación de ADN se realizó mediante la técnica de TUNEL. A las muestras TUNEL positivas se les realizó la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos comerciales específicos para la inmunomarcación de las proteínas BAX y BCL-2. 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 placentas de 70 y 80 días. 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 los 70 y 80 días de gestación. En conclusión, la apoptosis observada al inicio de la gestación porcina se debería a la inducción de la vía intrínseca a través de BAX, siendo mayor esta remodelación celular hacia los 55 y 114 días de preñez. Mientras que hacia los 70 y 80 días de preñez la remodelación celular acontecería a través de los receptores FAS de la vía extrínseca de señalización de apoptosis.

**Palabras claves:** Apoptosis I Placenta I Porcinos I Vía intrínseca

---

## **Abstract**

The aim of the present work was to determine fragmentation of the DNA with TUNEL and the immunolocalization of the regulating protein BCL-2 and BAX in porcine placenta during gestation, to detect the mechanisms pro and antiapoptotic involved of the mitochondrial way during the placental remodelling. Histological slides of  $\pm 4 \mu\text{m}$  of  $\pm 30$ , 55, 70, 80 and 114 days of gestation were used. For the detection fragmentation of the DNA for the TUNEL technique the ApopTag® equipment was used. To positive TUNEL samples the technique immunoperoxidase was realised to them and commercial antibodies was used by immunomarcation of BAX and BCL-2 proteins. The results were expressed semiquantitative form and for every gestational period the distribution of the immunolabelling intensity was determined by means of the High Score value (HS). At the 30 days nuclei with cromatinic margination in patches forms was identified by TUNEL, whereas at the 70 and 80 days of pregnancy it was lineal. BAX expression is regulated by the expression of the BCL-2 in different gestational periods. To the beginning of the gestation HS BAX values positive was detected, these values increased about the 55 and 114 days of pregnancy and decreased the 70 and 80 days of pregnancy. In conclusion, in pigs to beginning of the gestation the apoptosis observed occur across the intrinsic way BAX. Whereas towards the 70 and 80 days of gestation the cellular remodelling would occur through receptors FAS of the extrinsic route of apoptosis signalling.

**Key words:** Apoptosis I Placenta I Porcine I Intrinsec way

---

## Introducción

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico, permanente y dinámico, 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 manteniendo, de ésta manera, el equilibrio celular de los tejidos. La secuencia de procesos característicos de la apoptosis está regulada por la interrelación de mecanismos pro y antiapoptóticos, de manera tal que la muerte celular puede estar inhibida, en equilibrio o estimulada. (King and Cidlowski, 1998; Fink and Cookson, 2005). La apoptosis constituye un proceso fundamental en el desarrollo de la placentación en mamíferos. Puede ser inducida a través de vías de señalización extrínsecas por unión de ligandos a un receptor de membrana, siendo los receptores de muerte celular FAS/APO-1 o CD95, TRAIL-R o DR4 y el TNF-R1, los mejor caracterizados; o por vías de señalización intrínsecas, en donde intervienen proteínas de regulación pro y antiapoptóticas tales como BAX y BCL-2, respectivamente (Yang and Korsmeyer, 1996; Hsu and Hsueh, 1998; Willis *et al.*, 2003).

En el cerdo, la preñez temprana, se caracteriza por un rápido desarrollo y crecimiento, tanto de los tejidos maternos como embrionarios, dando por resultado la formación de una placenta difusa, plegada, adecidua, no invasiva y epiteliocorial (Amoroso, 1952; Dantzer, 1985; Leiser and 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 and 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 y col., 2007; Cristofolini y col., 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. Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Determinar la fragmentación del ADN a través de la técnica de TUNEL, en muestras placentarias porcinas de  $\pm$  30, 55, 70, 80 y 114 días de preñez.
- Determinar la inmunolocalización de las proteínas BAX y BCL-2, en cortes placentarios de los períodos gestacionales estudiados.

Los objetivos se plantearon a fin de detectar mecanismos pro y anti-apoptóticos de la vía mitocondrial de inducción de la apoptosis celular, involucrados en la remodelación celular placentaria a lo largo de la gestación porcina.

## **Materiales y Métodos**

### **1- Animales. Tractos reproductivos y placentas**

Se obtuvieron tractos reproductivos de cerdas mestizas destinadas a faena de frigoríficos de la zona de Río Cuarto, Córdoba, 33°: 04' latitud Sud y 64° 38' longitud Oeste, 467.61 m.s.n.m., Argentina. Se procesaron placentas provenientes de gestaciones de  $\pm$  30 días (n = 5),  $\pm$  55 días (n = 5),  $\pm$  70 (n = 5),  $\pm$  80 (n = 5) y a término  $\pm$  114 días (n = 5); consideradas libres de enfermedad de acuerdo a la examinación clínica y postmortem realizada.

Los tractos reproductivos se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco) conteniendo antibiótico-antimicótico. Se realizó una palpación para detectar la ubicación de los embriones o fetos y los cuernos uterinos fueron cuidadosamente abiertos con una incisión por el borde anti-mesometrial, para observar el sitio de implantación y recoger muestras del tejido endometrial y placentario fetal. Se estimó 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 para microscopía óptica**

Las muestras de tejido placentario fueron procesadas a través de la técnica histológica convencional e incluidas en parafina. Parte de los cortes se destinaron para el estudio de la fragmentación del ADN a través de la técnica TUNEL, y el resto para la detección de la inmunolocalización de las proteínas BAX y BCL-2 a través de técnicas de inmunohistoquímica.

### **3- Determinación las proteínas mitocondriales BAX y BCL-2**

Los cortes histológicos obtenidos en el párrafo 2, fueron incubaron con los anticuerpos primarios específicos disponibles en el mercado

(Santa Cruz, Inc; anti-BAX y anti-BCL-2), se utilizó el equipo comercial de inmunohistoquímica LSAB®+Systems HRP (Dako Cytomation) y el equipo de revelado Liquid DAB+Substrate Chromogen System (Dako Cytomation). Los cortes fueron contrastados con Hematoxilina de Mayer y se utilizó Entellán como medio de montaje; posteriormente fueron observados con un microscopio Axiophot (Carl Zeiss) y la adquisición de imágenes se realizó a través de una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico. Los resultados se expresaron en forma semicuantitativa, determinando que:

(-)	Marcación negativa
(+/-)	Pobre marcación
(+)	Marcación positiva
(++)	Abundante marcación
(+++)	Cuantiosa marcación

Además, 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.

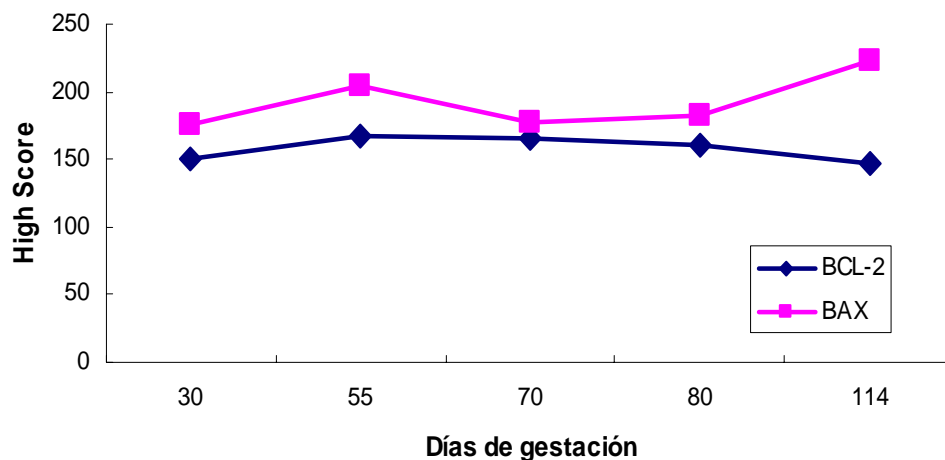
$$\text{HScore} = \sum P_i (i + 1) \quad i = \text{intensidad de marcación.}$$

$P_i =$  % de tejido marcado para cada intensidad.

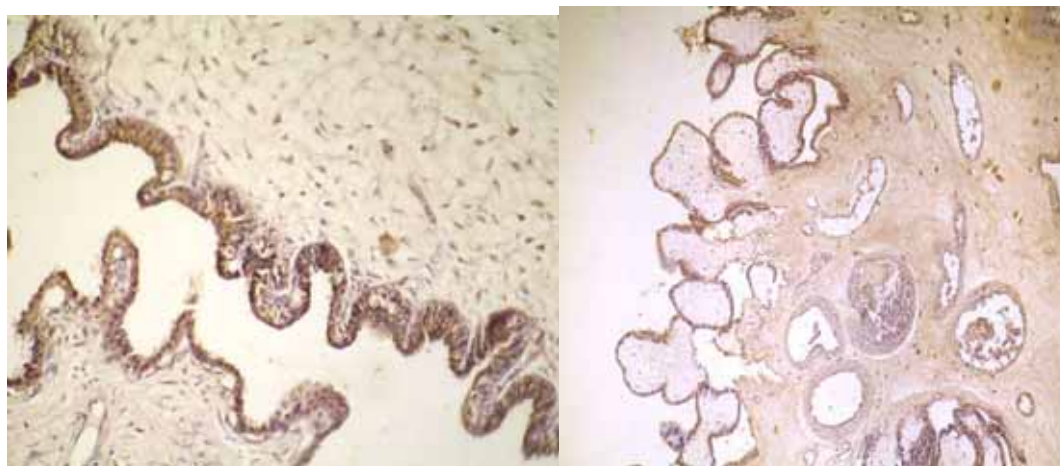
## Resultados y Discusión

El Gráfico Nº 1 observamos la distribución de la intensidad de inmunolocalización de las proteínas mitocondriales BAX y BCL-2 en placentas porcinas de  $\pm$  30, 55, 70, 80 y 114 días de preñez. Hacia el día 30 de gestación se detectaron valores de HS positivos con el marcador proapoptótico BAX, los que aumentaron notablemente hacia el día 55, coincidiendo con la mitad de la preñez. Hacia el día 70 se observa una marcada disminución de la distribución de intensidad de inmunolocalización de BAX en el tejido placentario, valores que se elevan hacia el día 80 de gestación, aumentando marcadamente hacia los 114 días de preñez, coincidiendo con el momento del parto.

**Gráfico Nº 1-** Distribución de intensidad de inmunolocalización de las proteínas BAX y BCL-2 a los 30, 55, 70, 80 y 114 días de gestación.

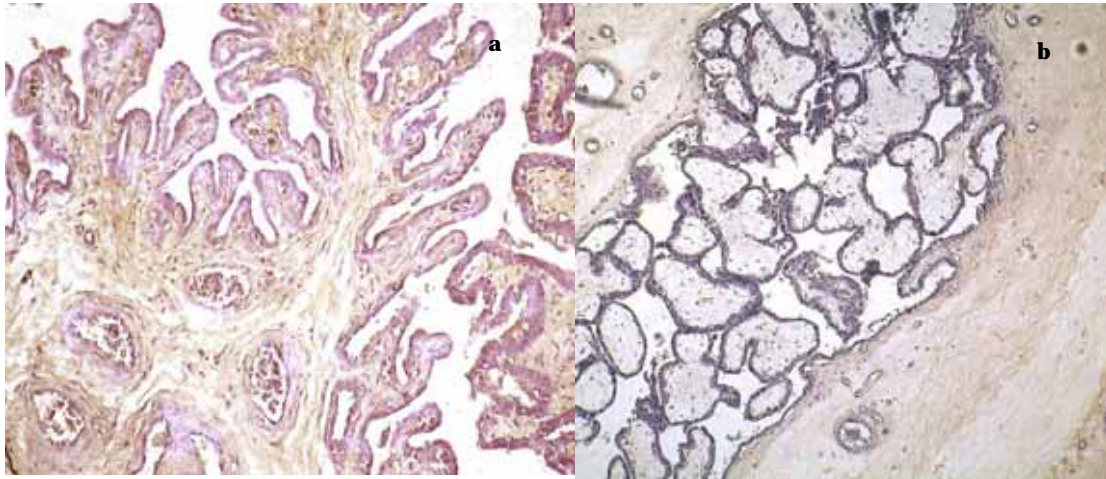


En las Figuras Nº 1 a y b se observa la inmunolocalización de la proteína mitocondrial BAX en tejido placentario de  $\pm 30$  y  $\pm 114$  días de preñez, respectivamente. Donde se observa al inicio de la gestación, una inmunomarcación positiva en vellosidades placentarias y en tejido conectivo (Figura Nº 1 a); mientras que hacia el final de la preñez la inmunoreactividad fue positiva en vellosidades y abundante en tejido conectivo (Figura Nº 1 b).



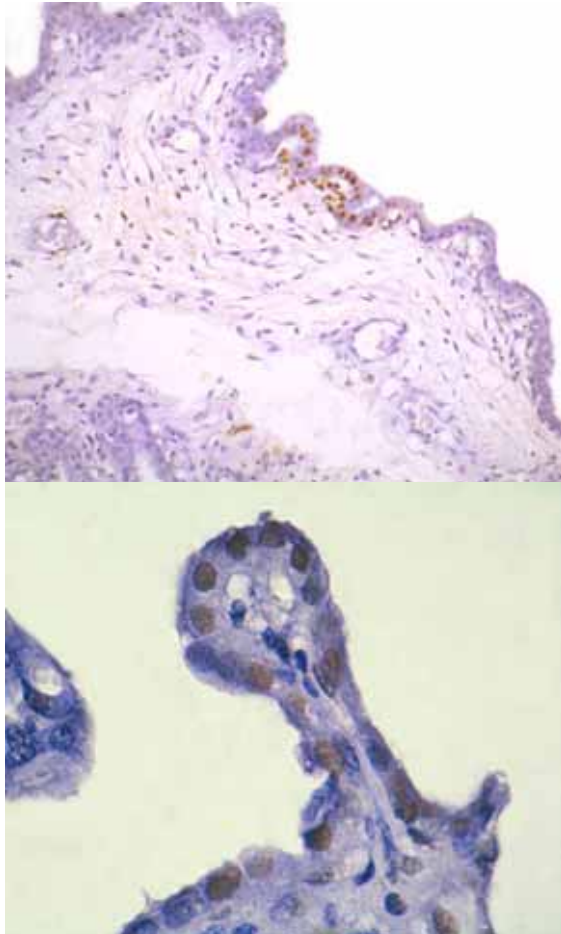
**Figuras Nº 1** – Fotografías de placentas porcinas de  $\pm 30$  (a) y  $\pm 114$  (b) días de gestación en donde se observa la inmunoexpresión de la proteína mitocondrial proapoptótica BAX (a y b:200x).

Las Figuras Nº 2 a y b presentan la inmunolocalización del regulador antiapoptótico BCL-2 en placentas porcinas de 80 días de preñez y a término, respectivamente. Se observa en ambos períodos gestacionales una inmunoexpresión negativa en vellosidades placentarias y positiva en tejido conectivo (Figuras Nº 1 a y b).



**Figuras Nº 2** – Inmunomarcación de la proteína antiapoptótica BCL-2, en cortes placentarios porcinos de  $\pm$  80 días de preñez (a) y a término (b) (a y b: 200 x).

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 Nº 3 a) 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 hacia los días 70 y 80 de preñez (Figuras Nº 3 b y c, respectivamente).



**Figura Nº 3-** Fotografías de corte placentario de  $\pm$  30, 70 y 80 días de gestación, respectivamente, donde se observan células placentarias en apoptosis, mediante la visualización de la fragmentación del ADN *in situ*, detectada por la técnica TUNEL (a:100 x; b: 1000 x; c: 400 x).

Durante la gestación porcina el correcto intercambio metabólico entre los sistemas materno y fetal es fundamental para satisfacer las demandas nutricionales de los *conceptus*. Por lo tanto una adecuada remodelación celular placentaria, a través de procesos apoptóticos, es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de este órgano transitorio, a medida que avanza la gestación porcina (Dantzer and Leiser, 1993; Finch *et al.*, 2004). En los diferentes estadios gestacionales el marcador proapoptótico BAX se encuentra regulado por la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2. De acuerdo con trabajos previos, a los 30 días de gestación la inmunexpresión de los receptores de muerte celular de la vía extrínseca FAS, fue negativa, como así también la inmunexpresión 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; notándose una mayor remodelación placentaria hacia los 55 y 114 días de preñez (Cristofolini y col., 2008). Por otro lado, hacia los 70 y 80 días de gestación la distribución de intensidad de inmunomarcación de los receptores vía extrínseca FAS aumenta, al igual que la expresión de la proteína reguladora BCL-2, de manera tal que la apoptosis detectada por TUNEL, en dichos periodos, se debería entonces a la activación de la vía de señalización extrínseca.

## Conclusiones

La mayor remodelación celular placentaria que acontece a través de la vía inducción mitocondrial de apoptosis, se observa hacia la mitad y al final de la gestación porcina. Mientras que hacia los días 70 y 80 de preñez, estaría activada la vía de señalización extrínseca a través de los receptores transmembrana FAS.

## 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, 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 M. Koncurat. 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 R. Leiser. 1993. Initial vascularization in the pig placenta: I. Demostration of non-glandular areas by histology and corrosion casts. *Anat Rec* 238: 177-190.
- Finch, A.; Yang, L.; Nwagwu, M.; Page, K.; McArdle, H.; 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 A. Hsueh. 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 J. Cidlowski. 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 601-617.
- Leiser, R. and P. Kaufmann. 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. y M. Koncurat. 2007. Apoptotic phenomena during porcine placentation. *Revista Electrónica de Veterinaria: REDVET* enero 2007, ISSN 1695-7504.  
[www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html)
- Okano, A.; Ogawa, H.; Takahashi, H.; 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, 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 B. Van Rens. 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 D. Huang. 2003. The Bcl-2 regulated apoptotic pathway. *Journal of Cells Science* 116: 4053-4056.
- Yang, E. and S. Korsmeyer. 1996. Molecular thanatopsis: a discourse on the *bcl-2* family and cell death. *Blood* 88:386-401.

**REDVET: 2009 Vol. 10, Nº 9**

Recibido 24.11.08 - Ref. prov. U004 – Revisado 18.02.09 – Aceptado 23.03.09  
Ref. def. 090903\_REDVET - Publicado: 15.09.09

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090909.html>  
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090909/090903.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización® Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://revista.veterinaria.org>