

Inmunolocalización de CD31 como marcador de vasos sanguíneos placentarios, su aplicación en estudios histomorfométricos

Mariana Fiorimanti^{1,4}; Andrea Cristofolini^{1,4*}; Tomás Diaz²; María Lourdes Sibilla²; Lilia Cavaglieri^{3,4}; Cecilia Merkis¹.

1- Área de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.

2- Cátedra de Biología Celular y Embriología, Departamento de Anatomía Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

3- Cátedra de Micología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

4- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.

Palabras clave:

Inmunohistoquímica,
CD31,
vascularización,
placenta,
porcinos

Resumen. Para el estudio de los procesos de angiogénesis placentaria en especies de interés productivo, es necesario contar con un marcador específico de vasos sanguíneos de diferente calibre, el cual nos permita la aplicación de estudios de histomorfometría vascular. El objetivo fue poner a punto la técnica inmunohistoquímica para CD31 como marcador de vasos sanguíneos en placentas de cerdas del inicio, la mitad y el final de la preñez, para posteriores estudios histomorfométricos. Una parte de los cortes histológicos de 4 µm fueron coloreados con tinciones diferenciales y el resto procesados mediante la técnica de inmunohistoquímica indirecta para la determinación de la proteína marcadora de células endoteliales, CD31. El análisis histomorfométrico reveló un aumento significativo en el número de vasos sanguíneos en la placenta desde el día 30 a 60 de gestación y una disminución del área vascular en gestaciones intermedias ($p=0.05$). La inmunolocalización de CD31 nos permitió delimitar áreas vasculares más pequeñas de manera precisa en la placenta porcina. Consideramos que la marcación de la microvasculatura placentaria a través de la inmunolocalización de CD31, es una eficaz herramienta para la aplicación de estudios de histomorfometría.

Cita sugerida: Fiorimanti, M., *et al.* 2018. Inmunolocalización de CD31 como marcador de vasos sanguíneos placentarios, su aplicación en estudios histomorfométricos. Revista Científica FAV-UNRC *Ab Intus* 1 (1): 66-83

Recibido: 5 de abril 2018; aceptado: 27 de junio 2018

*Autor para correspondencia: Andrea L. Cristofolini. E-mail: alcrstofolini@gmail.com; acristofolini@ayv.unrc.edu.ar. Ruta Nac. 36, Km. 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Financiamiento: este proyecto fue financiado por la SecCyT de la Universidad Nacional de Río Cuarto y por PICT Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina.



CD31 immunolocalization as specific marker of placental blood vessels, its application for histomorphometric studies

Key words:

Immunohistochemistry,
CD31,
vascularization,
placenta,
porcine

Abstract. For study of placental angiogenesis in productive interest species, it is necessary to have a specific marker of different caliber blood vessels, which allows to apply vascular histomorphometry. The objective was to develop the immunohistochemical technique for CD31 as marker of blood vessels in placentas of swines at the early gestations, intermediates gestations and term gestations, for histomorphometric studies. The histological sections of 4 μm were stained with differential stains and the other processed by indirect immunohistochemistry for the determination of the endothelial cell marker protein, CD31. The histomorphometric analysis revealed a significant increase in the number of blood vessels in the placenta from day 30 to 60 of gestation and a decrease in the vascular area in intermediates gestations ($p=0.05$). The immunolocalization of CD31 allowed us to delimit with precision smaller vascular areas. We consider that the marking placental microvasculature through the immunolocalization of CD31 is an effective tool for the application of histomorphometric studies.

INTRODUCCIÓN

En la cerda gestante, a medida que avanza la preñez y son mayores las demandas nutricionales de los *concepti*, la vasculogénesis y la angiogénesis permiten un aumento del flujo sanguíneo placentario (Cristofolini *et al.*, 2017; Sanchis *et al.*, 2017). Numerosos estudios realizados por nuestro grupo de investigación acerca del proceso angiogénico en placentas de especies de interés productivo, demuestran la complejidad del mismo durante el desarrollo placentario, contribuyendo a la formación de una red vascular apropiada al estado fisiológico de la hembra gestante, indispensable para el mantenimiento de la preñez (Wooding y Burton, 2008).

En placentas de cerdas, hemos determinado la presencia de diferentes factores proangiogénicos y sus receptores (Sanchis *et al.*, 2015), así como también el equilibrio homeostático a través de la remodelación celular por apoptosis (Merkis *et al.*, 2010; Cristofolini *et al.*, 2013). Para el estudio de este tipo de procesos fisiológicos es necesario implementar, además, técnicas de histomorfometría que permitan la determinación de diferentes variables en la estructura vascular placentaria (Cristofolini *et al.*, 2017).

Resulta importante contar con una técnica que posibilite demarcar de manera precisa los vasos sanguíneos de diferente calibre presentes en el tejido placentario en estudio. Si bien la utilización de coloraciones histológicas permite visualizar de manera diferencial la vasculatura tisular, resulta dificultosa la diferenciación e identificación de capilares, especialmente en algunos tipos de placentación. Tal es el caso de la cerda, en la cual al presentar una placenta del tipo epiteliocorial, la distancia de difusión hemotrófica entre los tejidos maternos y fetales se acorta notoriamente a medida que avanza la gestación (Cristofolini *et al.*, 2012). En estudios previos hemos determinado que hacia el final de la preñez, las circulaciones materna y fetal se encuentran a distancias tan estrechas como de 0,18 μm (Cristofolini *et al.*, 2017). La disposición de esos capilares en la zona de interfase feto/materna es tal, que resulta dificultoso diferenciarlos de manera precisa ya que se encuentran casi tapizando los epitelios uterino y trofoblástico, en algunos casos separados de los mismos exclusivamente por la membrana basal, dando apariencia de una ubicación "interepitelial".

La glicoproteína integral de membrana CD31 se

encuentra en la superficie de plaquetas humanas, leucocitos y en las uniones intercelulares de células endoteliales (Newman, 1994; Woodfin *et al.*, 2007). Esta molécula de adhesión celular, también es conocida como PECAM-1 (molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas) y está implicada en el proceso de angiogénesis in vivo (Abraham *et al.*, 2016). Se expresa en todos los endotelios continuos, incluidos los de las arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares no sinusoidales. El anticuerpo anti CD31 es reconocido ampliamente como un marcador de células endoteliales en procesos de proliferación celular y se ha establecido como el más efectivo para la detección de la microvascularización por inmunohistoquímica en tumores mamarios de caninos (Clemente, 2010), así como también en técnicas de inmunofluorescencia en placenta de ovinos sobrealimentados (Carr *et al.*, 2016). No hay datos publicados respecto a la técnica de inmunohistoquímica para la determinación de la estructura vascular placentaria.

El objetivo del presente estudio fue ajustar un protocolo de trabajo para la aplicación de la técnica inmunohistoquímica en la detección de CD31, para la marcación diferencial de vasos sanguíneos de diferente calibre en placentas de cerdas y su posterior uso en estudios histomorfométricos.

METODOLOGÍA

Se procesaron 10 tractos reproductivos de diferentes períodos gestacionales (30 ± 2 y 60 ± 2 días de preñez) y 5 placentas recolectadas inmediatamente luego de la parición natural de las cerdas (114 ± 2 días). Nuestro protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad Nacional de Río Cuarto (CoEdI), Res. 186/2016. Los tractos reproductivos se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco, USA) contenido 10.000 U/mL de penicilina G sódica, 10 mg/mL de sulfato de estreptomina y 2,5 µg/mL de fungizona, manteniéndolos a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Las muestras de tejido placentario fueron procesadas a través de la técnica de microscopía óptica convencional. Parte de los cortes se colorearon con las tinciones diferenciales tricrómica de Masson y tricrómica de Gallego, el resto fue montado sobre portaobjetos gelatinizados y preservado para la realización de la técnica inmunohistoquímica.

Para la determinación de la proteína CD31 las seccio-

nes fueron sometidas a recuperación antigénica en microondas con solución tampón de citrato 10 mM, pH 6, luego fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 3 % en PBS durante 20 minutos. El bloqueo de anticuerpos inespecíficos se realizó con suero de caballo al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó overnight en cámara húmeda a 4 °C con el anticuerpo primario anti-CD31, diluido 1/100 (ab28364, Abcam, Cambridge, Reino Unido); como anticuerpo secundario fue empleado el equipo comercial Polivalent Biotinylated Link YELLOW- pool de segundos anticuerpos biotinilados anti-rabbit, anti-mouse, (HiDef Detection™ HRP Polymer System Cell Marque, USA). El cromógeno diaminobencidina (DAB Cell Marque, USA) fue utilizado para revelar las proteínas inmunorreactivas. Finalmente, se contrastó con hematoxilina de Mayer (Dako, USA).

Las secciones coloreadas con las tinciones diferenciales y las inmunohistoquímicas para CD31, fueron observadas a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss), adquiriendo las imágenes mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio. A través de la utilización del Software Axiovision Release 4.6.3 (Zeiss, Alemania) se evaluaron 5 imágenes al azar de cada placenta por periodo gestacional estudiado, determinándose el número de vasos sanguíneos y el área vascular como variables morfométricas. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016) para evaluar la dependencia de CD31 respecto a los estadios gestacionales estudiados. Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar para cada periodo gestacional. Se realizó un ANOVA y una comparación a posteriori con el test LSD Fisher. Los resultados fueron considerados significativos cuando el valor de $p=0,05$. Cuando los supuestos de normalidad y homogeneidad de los datos no se cumplían, fue utilizado un análisis de la varianza no paramétrico, Kruskal Wallis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluamos la presencia de vasos sanguíneos en los períodos gestacionales estudiados, a través de las tinciones diferenciales hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson y tricrómica de Gallego. Determinamos que las tinciones hematoxilina-eosina y tricrómica de Gallego no mostraron grandes diferencias entre sí, respecto a la visualización de la microvasculatura placentaria (Figura 1).

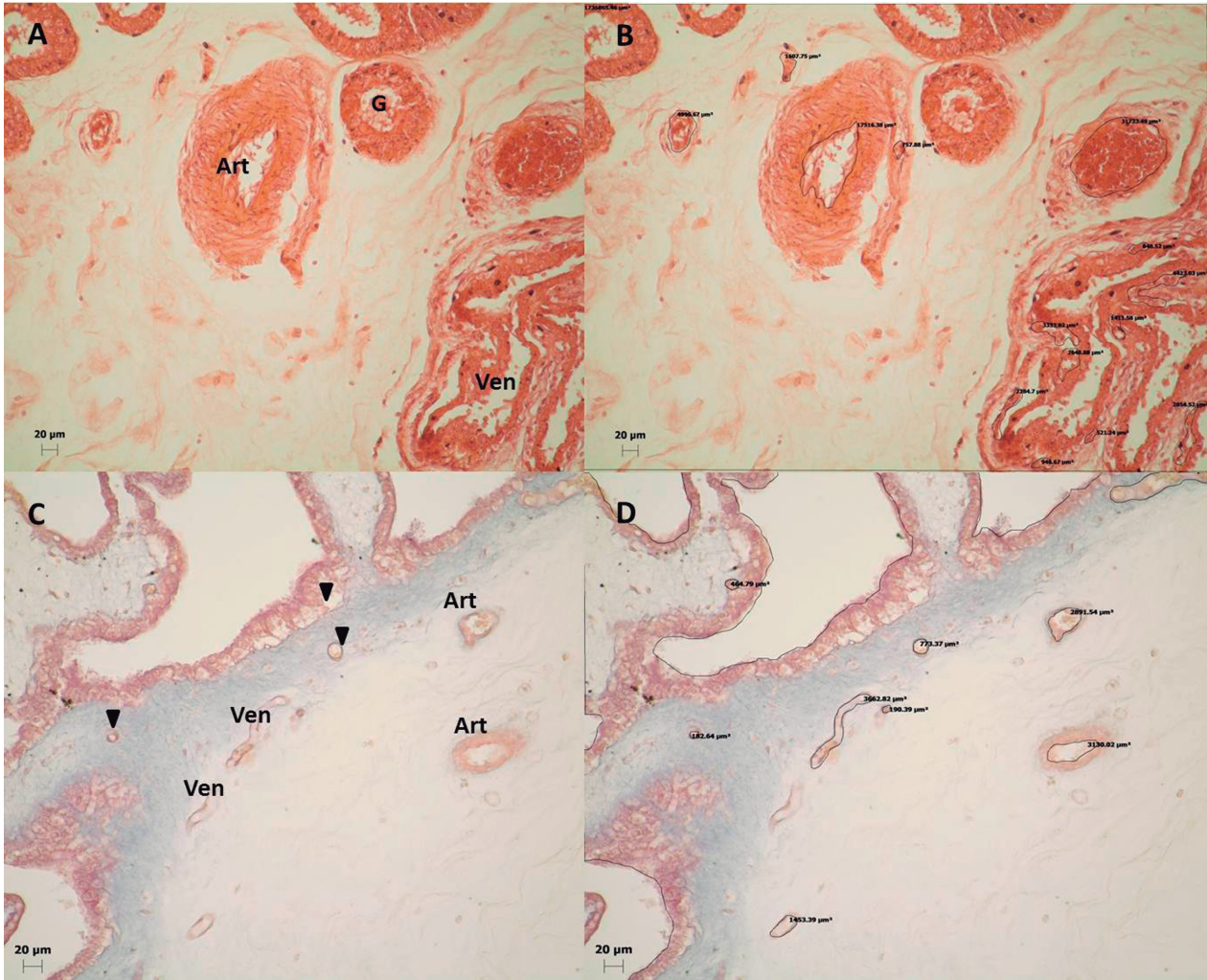


Figura 1. Tejido placentario del inicio (A y B) teñido con hematoxilina-eosina y del final de la preñez (C y D) coloreado con tricrómica de Gallego. En ambas coloraciones diferenciales, la observación y la definición de la microvasculatura placentaria resultó dificultosa (A y C), especialmente de aquellos capilares ubicados cercanos a los epitelios (punta de flecha). Las diferentes mediciones de la variable morfométrica área vascular se observan en B y D. Art: arteriola, G: glándula materna, Ven: vénula. En todo el panel: 200x, escala: 20 µm.

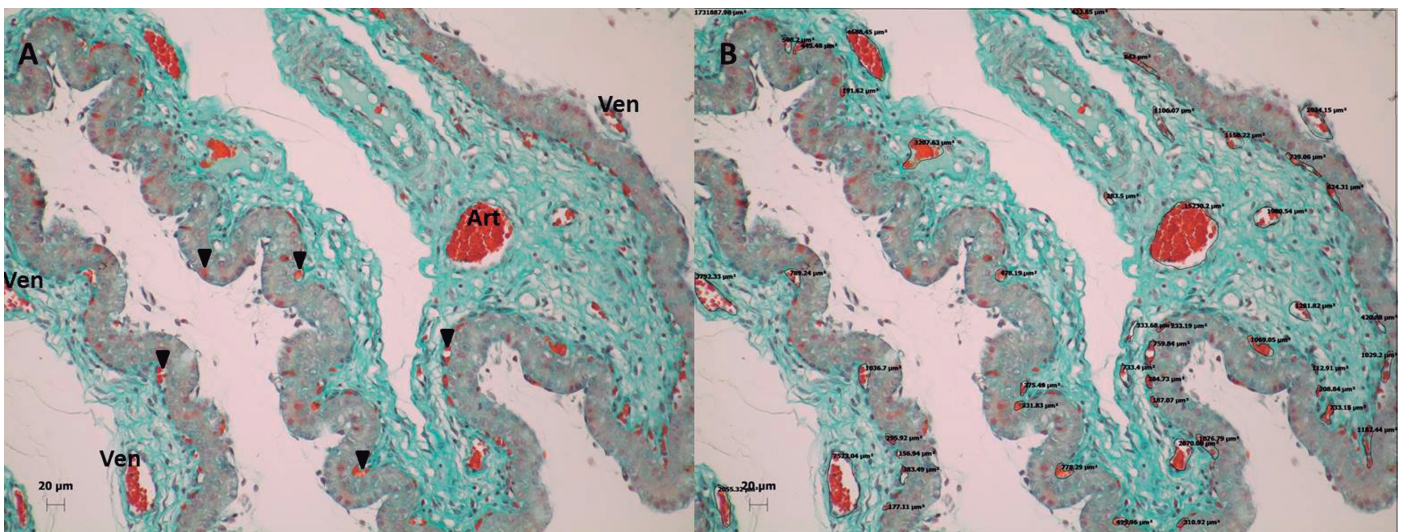


Figura 2. Tejido placentario de 60 días de preñez, coloreado con la tinción tricrómica de Masson, en donde se observa la distribución de la vasculatura placentaria, incluso la disposición de los capilares cercanos a la interfase materno/fetal (punta de flecha) (A) y las diferentes mediciones de la variable morfométrica área vascular (B). Art: arteriola, Ven: vénula. Ambas microfotografías: 200x, escala: 20 µm.

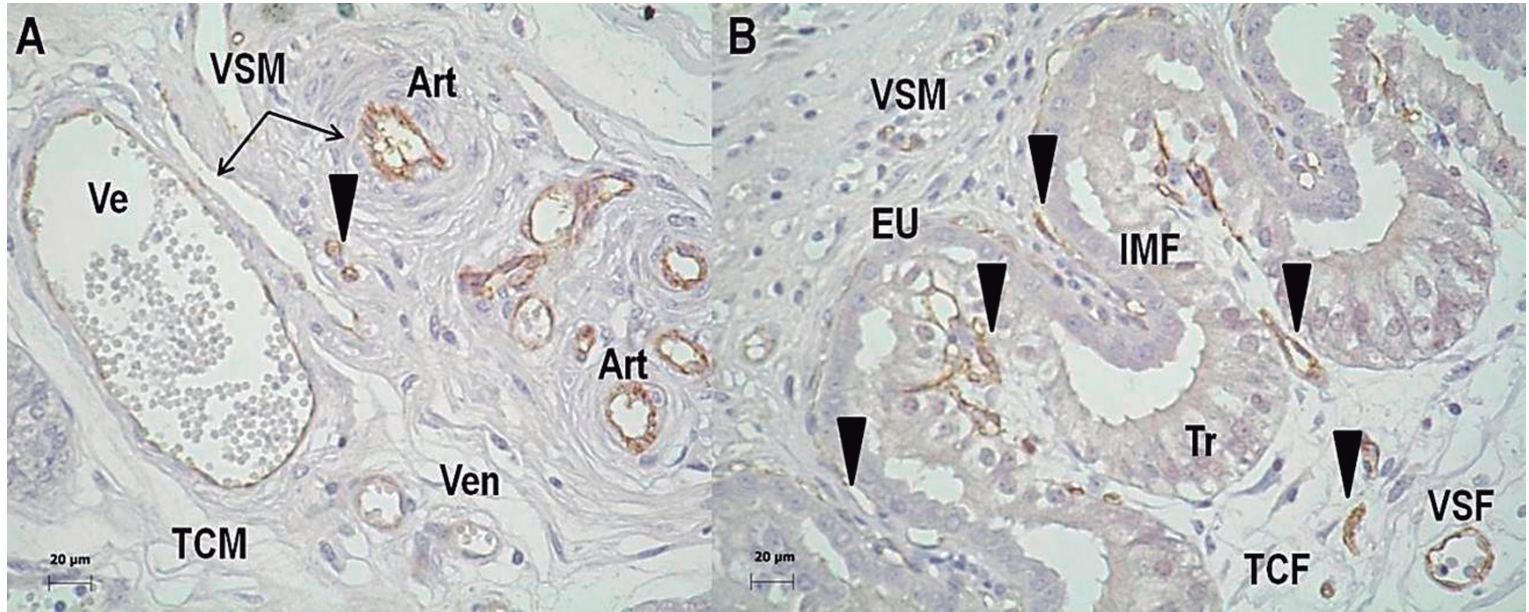


Figura 3. Inmunolocalización de CD31 en tejido placentario de 30 días de gestación. Se observa la ubicación y distribución de vasos sanguíneos de diferente calibre en el componente materno de la placenta (A); se destaca la presencia de numerosos capilares (punta de flecha) en la zona de interfase materno-fetal (B). VSM: vasos sanguíneos maternos. Ve: vena. Ven: vénula. Art: arteriola. TCM: tejido conectivo materno. IMF: interfase materno-fetal. EU: epitelio uterino. Tr: trofoblasto. VSF: vaso sanguíneo fetal. TCF: tejido conectivo fetal. En ambas imágenes: 400x, escala: 20 µm.

Por su parte, la tinción tricrómica de Masson permitió una mejor identificación de los vasos sanguíneos, los eritrocitos teñidos de rojo resaltaban sobre las fibras colágenas coloreadas de verde. La figura 2 corresponde a una interfase materno/fetal de 60 días de preñez coloreada con la tinción diferencial de Masson. En ella apreciamos la distribución de la microvasculatura en un tejido placentario de gestación intermedia, tanto en el componente materno como fetal (Figura 2).

A través de la detección por inmunohistoquímica de CD31 se pudieron localizar desde vasos sanguíneos de gran calibre, como venas y arterias, hasta vasos de menor diámetro como arteriolas, vénulas y pequeños capilares. En placentas del inicio de la gestación destacamos cómo los pequeños vasos sanguíneos se disponen por un lado, en cercanías del epitelio trofoblástico y por otro, inmediatamente en las proximidades del epitelio uterino (Figura 3).

En gestaciones intermedias y al final de la preñez, la marcación de las células endoteliales con CD31 permitió delimitar de manera práctica y específica el área de los vasos sanguíneos placentarios, especialmente aquellos dispuestos de manera muy cercana a los epitelios. En las micrografías la intensa coloración marrón, correspondiente a una marcación positiva para CD31, denota claramente la vasculatura placentaria. Destacamos hacia el día 114 de

gestación un gran acercamiento de los capilares al epitelio trofoblástico; esta disposición dificulta poder delimitarlos de manera precisa, sin embargo la marcación a través de CD31 nos permitió realizar el análisis histomorfométrico con mayor definición (Figura 4).

A partir de la inmunolocalización de la proteína CD31 se realizó el análisis histomorfométrico de los vasos sanguíneos de la misma manera que con las tinciones diferenciales tricrómica de Masson y tricrómica de Gallego. Los resultados del análisis morfométrico obtenido por inmunomarcación de CD31 mostraron una gran variabilidad respecto de los analizados a través de las tinciones diferenciales. Las mayores diferencias se detectaron en los periodos temprano y final de gestación, mientras que en el periodo medio las variaciones fueron menores.

Es importante destacar el número de vasos sanguíneos detectados por CD31 en el periodo temprano de 30 días de gestación, el cual presentó una mayor media de 50,60 estadísticamente significativa ($p=0,05$), más de dos veces mayor comparado con la media de 19,47, cuantificados a través de las tinciones convencionales, Hacia el final de la preñez obtuvimos otro dato relevante, una media de 17,80 estadísticamente significativa ($p=0,05$), más de tres veces superior a la media de 4,87 descrita con las tinciones diferenciales (Tabla 1).

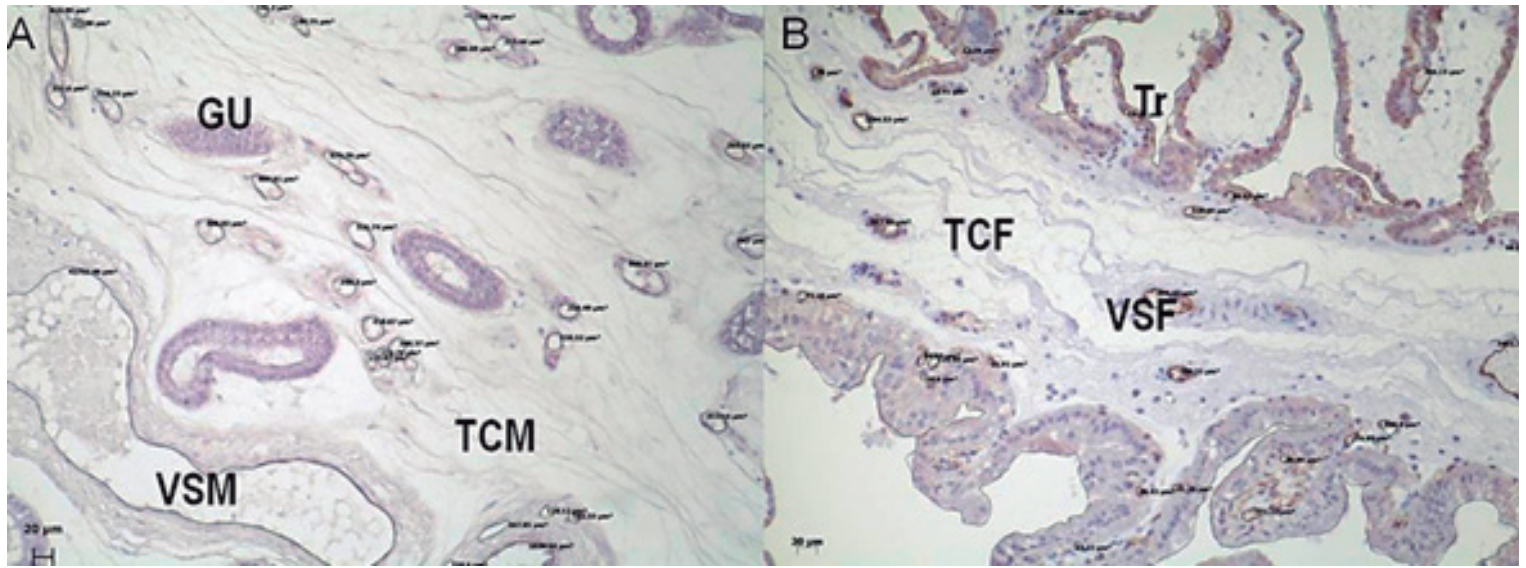


Figura 4. Localización de vasos sanguíneos en tejido placentario de 60 (A) y de 114 días de gestación (B), a través de la inmunomarcación con CD31. Observamos el análisis histomorfométrico realizado a través del software AxioVision Release 4.6.3. VSM: vasos sanguíneos maternos. GU: glándula uterina, TCM: tejido conectivo materno, Tr: trofoblasto, VSF: vaso sanguíneo fetal, TCF: tejido conectivo fetal. En ambas imágenes: 400x, escala: 20 µm.

Al analizar el área vascular determinada por CD31, la mayor media se obtuvo en el periodo final de gestación, con un valor de 1397,17 µm², sin embargo no hubo variación entre periodos ($p > 0,05$). El valor mínimo de área vascular también se detectó a los 114 días, con 73,08 µm², mientras que el máximo de 42752,46 µm², fue observado a los 60 días de preñez, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,05$) (Tabla 2).

Si comparamos estos valores de área vascular respecto a los obtenidos en estudios previos a través

de las tinciones diferenciales, podemos destacar que a través de CD31 fue posible delimitar áreas vasculares más pequeñas de manera precisa. Los desvíos estándares obtenidos por el análisis histomorfométrico de CD31 en la mayoría de los casos fueron menores, lo cual significa que la técnica inmunohistoquímica para CD31 permite delimitar e identificar con mayor exactitud el endotelio de los vasos sanguíneos que las tinciones diferenciales hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson y tricrómica de Gallego.

Número de vasos/periodo de gestación	Media	DE	Mín	Máx
Temprano (30 días)	50,60	3,36	47,00	54,00
Medio (60 días)	17,00	9,11	8,00	29,00
Tardío (114 días)	17,80	5,81	11,00	27,00

Tabla 1. Número de vasos sanguíneos por periodo de gestación inmunomarcados con CD31.

Área Vascular/ Período de gestación	Media	DE	Mín.	Máx.
Temprano (30 días)	1230,75 μm^2	3554,77 μm^2	88,80 μm^2	23297,71 μm^2
Medio (60 días)	980,04 μm^2	4784,35 μm^2	77,98 μm^2	42752,46 μm^2
Tardío (114 días)	1397,17 μm^2	4677,37 μm^2	73,08 μm^2	37461,14 μm^2

Tabla 2. Área vascular por periodo de gestación inmunomarcado con CD31.

El análisis morfométrico vascular reveló un aumento significativo en el número de vasos sanguíneos en la placenta desde el día 30 a 60 de gestación ($p=0,05$). Estos resultados coincidentes con estudios previos de Merkis *et al.* (2006), quienes detectaron un incremento significativo de vasos de pequeño calibre hacia el día 55 de preñez, podrían considerarse uno de los mecanismos para incrementar el flujo sanguíneo uterino en la mitad de la gestación. Otros autores, como Vonnahme *et al.* (2001) han analizado el número de vasos sanguíneos por unidad de área en tejidos placentarios porcinos y determinaron que éstos disminuían desde el día 25 al día 44, antes de aumentar progresivamente hacia el día 112 de gestación. Si tenemos en cuenta el número de vasos sanguíneos conjuntamente con la variable área vascular, aquí también se observa que el área vascular total disminuye al día 60 respecto del día 30, lo cual podría deberse al predominio de vasos sanguíneos cuyas áreas son de menor diámetro en el periodo medio de la gestación. A pesar de que estos resultados no son estadísticamente significativos ($p>0,05$), Cristofolini *et al.* (2017) han determinado que el área vascular placentaria depende del período gestacional en cerdas mestizas.

Por otro parte, consideramos la inmunolocalización de CD31 como una eficaz herramienta para el análisis histomorfométrico de vasos sanguíneos en el proceso de vascularización placentaria. La identificación del endotelio de los vasos sanguíneos a través de esta técnica, permitió delimitar con mayor exactitud el perímetro de los mismos y en consecuencia, determinar el área vascular.

Nuestros resultados concuerdan con lo determinado por otros autores en estudios de vascularización en neoplasias (Montrucchio, *et al.*, 1998; Sapino, *et al.*, 2001; Pisacane, *et al.*, 2007; Clemente, 2010); sin embargo CD31 no había sido utilizado aun para

la determinación de la microvasculatura placentaria porcina.

Recientemente, Guimarães *et al.* (2017), han utilizado el factor de von Willebrand como marcador de endotelios en placenta porcina. El factor de von Willebrand ha sido el primer marcador endotelial utilizado para cuantificar vasos en estudios de diagnóstico inmunohistoquímico, sin embargo en la actualidad se ha determinado que posee una menor sensibilidad que CD31 (Clemente, 2010), de esta manera los resultados presentados por Guimarães *et al.* (2017) no evidencian una marcación endotelial tan definida y precisa como lo manifiestan nuestros hallazgos.

CONCLUSIONES

CD31 es un excelente marcador de células endoteliales para la determinación de la microvasculatura placentaria porcina, permitiéndonos complementar los estudios de vascularización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, V.; Parambath, A.; Joe, D.; DeLisser, H. 2016. Influence of PECAM-1 ligand interactions on PECAM-1-dependent cell motility and filopodia extension. *Physiology Reproductive*: 4 (22):e13030.

Carr, D.; David, A.; Aitken, R.; Milne, J.; Borowicz, P.; Wallace, J.; Redmer, D. 2016. Placental vascularity and markers of angiogenesis in relation to prenatal growth status in overnourished adolescent ewes. *Placenta*, 46: 79-86.

Clemente, M. 2010. Estudio histológico e inmuno-

histoquímico diferencial de inmunofenotipo, angiogénesis y patrón de metástasis en el cáncer inflamatorio mamario canino con respecto a otros tumores mamarios malignos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.

Cristofolini, A.; Fiorimanti, M.; Campos, M.; Sanchis, E.; Díaz, T.; Moschetti E.; Merkis, C. 2017. Morphometric study of the porcine placental vascularization. *Reproduction in Domestic Animal*, 1-9. DOI: 10.1111/rda.13095.

Cristofolini, A.; Sanchis, E.; Alonso, L.; Moliva, M.; Chanique, A.; Merkis, C. 2012. Distancia de difusión hemotrófica placentaria porcina. *Acta Microscopica*, 21(A): 31-32.

Cristofolini, A.; Sanchis, G.; Moliva, M.; Alonso, L.; Chanique, A.; Koncurat, M.; Merkis, C. 2013. Cellular remodelling by apoptosis during porcine placentation. *Reproduction in Domestic Animal*, 1-7. DOI: 10.1111/rda.12130.

Di Rienzo, J.; Casanoves, A.; Balzarini, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. 2016. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.

Guimarães, G.; Alves, L.; Betarelli, R.; Guimarães, C.; Helmo, F.; Pereira, C.; Corrêa, R.; Zangeronimo, M. 2017. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and factor VIII in the gilt placenta and its relation to fetal development. *Theriogenology*, 92: 63-68.

Merkis, C.; Cristofolini, A.; Franchino, M.; Sanchis, E.; Moschetti, E.; Koncurat, M. 2006. Angiogenesis placentaria durante la gestación porcina. *Redvet*, 7(4): 1-4.

Merkis, C.; Cristofolini, A.; Sanchis, E.; Koncurat, M. 2010. Expression of death cellular receptors FAS/CD95 and DR4 during porcine placentation. *International Journal of Morphology*, 28(3): 829-834.

Newman, P. 1994. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Annuary New Yoek Academic Science*, 714:165-74

Picasane, A.; Picciotto, F.; Risio, M. 2007. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. *Cell Oncology*, 29(1): 59-66.

Sanchis, E.; Critofolini, A.; Fiorimanti, M.; Barbeito, C.; Merkis C. 2017. Apoptosis and cell proliferation in porcine placental vascularization. *Animal Reproduction Science*, 184: 20-28.

Sanchis, E.; Cristofolini, A.; Merkis, C. 2015. Porcine placental immunoexpression of vascular endothelial growth factor, placenta growth factor, Flt-1 and Flk-1. *Biotechnic & Histochemistry*, 90(7): 486-494.

Sapino, A.; Bongiovanni, M.; Cassoni, P.; Righi, L.; Arisio, R.; Deaglio, S.; Malavasi, F. 2001. Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. *Journal of Pathology*, 194 (2): 254-61.

Woodfin, A.; Voisin, M.; Nourshargh, S. 2007. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vascular Biology*, 27(12): 2514-23.

Wooding, P. y G. Burton. 2008. In: *Comparative placentation. Structures, functions and evolution*. Berlín Heidelberg, Alemania: Editorial Springer-Verlag. Berlín Heidelberg.