

Detección de fibronectina durante la placentación porcina

C. L. Vélez¹, D. Williamson y M. Koncurat

Cátedra Biología General, Departamento Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Veterinarias,
UNLPam. Calle 5 esq 116 (6360) General Pico, La Pampa, República Argentina.

Recibido Agosto 01, 2013. Aceptado Abril 27, 2014.

Detection of fibronectin during porcine placentation

ABSTRACT. The porcine placenta is epitheliochorial, diffuse, folded, adecidual, and non invasive. Fibronectin (FN) is a dimeric glycoprotein present in the extracellular matrix of most animal tissues; it plays a major role in cell adhesion, migration, implantation and embryogenesis. The aim of this study was to investigate the expression of FN in the maternal-fetal interface during porcine placentation. Placental tissue samples from sows (n = 12) at 17, 32, 60, and 107 d of gestation (dg) and non-pregnant uterus samples (n = 4) were collected. The detection of FN was performed by indirect immunoperoxidase and the FN area immunolabeled was determined with the software Image Pro-Plus® 3.0. The most intensive staining for FN was found in the conceptus' trophoctoderm, particularly in the apical membrane on 17, 32, and 60 dg; staining was weaker in the surface of the uterine epithelium on the same days. FN did not express itself in the glandular epithelium until 107 dg. No significant difference was found in the trophoblast as to the percentage of the immunostaining area until day 60 of gestation, when it decreased. In the endometrial luminal epithelium significant differences were found in the area positive to FN during placentation. These results suggest that FN might be involved in the molecular mechanisms that take part in the adhesion and attachment of the epithelia that makes up the maternal-fetal interface during porcine placentation.

Key words: Epithelium, Fibronectin, Placenta, Swine,

RESUMEN. La placenta porcina es de tipo epiteliocorial, no invasiva, adecidua, plegada y difusa. La fibronectina (FN) es una glicoproteína dimérica presente en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos animales, que interviene en los procesos de adhesión celular, migración, implantación y embriogénesis. En este estudio se investigó la expresión de la FN en la interfase feto-materna durante la placentación porcina. Se recolectaron muestras de tejido placentario porcino (n = 12) a los 17, 32, 60 y 107 d de gestación (dg) y muestras de útero no gestante (n = 4). La detección de FN se realizó por inmunoperoxidasa indirecta y se determinó el área de inmunomarcaje de FN con el programa Image Pro-plus® 3.0. Se encontró la tinción más intensa de FN en el trofoblasto del conceptus, particularmente en la membrana apical a los 17, 32 y 60 dg; en los mismos períodos la tinción fue más débil en la superficie del epitelio uterino. La FN no se expresó en el epitelio glandular hasta los 107 dg. En el trofoblasto no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de área inmunomarcada hasta los 60 dg, momento en el cual se incrementó. En el epitelio luminal endometrial hubo diferencias significativas en el área positiva a FN durante la placentación. Estos resultados sugieren que la FN podría estar involucrada en los mecanismos moleculares que participan en la adhesión y fijación de los epitelios que conforman la interfase feto-materna durante la placentación porcina.

Palabras clave: Epitelio, Fibronectina, Placenta, Porcinos,

¹Autor para la correspondencia, e-mail: karovel@yahoo.com.ar

Introducción

La gestación es un fenómeno fisiológico que obedece a precisas interacciones entre el conceptus y su madre, interacciones que se llevan a cabo a través de la placenta. Dado que la placenta porcina es de tipo epiteliocorial, no invasiva, adecuada, plegada y difusa, desempeña sus funciones si se produce la correcta adhesión y fijación de las células trofoblásticas fetales con las células epiteliales endometriales.

Las moléculas de adhesión en la interfase feto-materna placentaria comprenden una variedad de proteínas de membrana y han sido clasificadas en cuatro subfamilias: las integrinas, las selectinas, las caderinas y las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Botella Llusia, 2001; Reddy y Mangale, 2003). Los principales ligandos de las integrinas incluyen un gran número de proteínas de la matriz extracelular (MEC), tales como las proteínas de la matriz del hueso, colágenos, fibrinógeno, lamininas, trombospondina, vitronectina, el factor de von Willebrand y la fibronectina (Plow *et al.*, 2000).

La Fibronectina (FN) es una glicoproteína dimérica, cada subunidad está formada por una serie de dominios funcionalmente distintos con diferentes especificidades de unión a moléculas, siendo uno de ellos el que contiene la secuencia del tripéptido arginina-glicina-aspartato (RGD); sitio que reconocerá la integrina para su adhesión. La FN se considera esencial para la migración y diferenciación de muchos tipos celulares durante la embriogénesis (Lodish, 2011).

El rol de las moléculas de adhesión y sus ligandos en el endometrio no está claramente definido. Estudios en gestaciones de diferentes especies, demostraron que estas moléculas representan excelentes marcadores de estadíos normales y anormales de receptividad uterina y pueden ser claves en los mecanismos de implantación y regulación de la gestación (Lessey y Arnold, 1998). En ovinos, las integrinas juegan un rol predominante en interacciones con la MEC, para traducir señales celulares entre el trofoectodermo y las células epiteliales uterinas (Burghardt *et al.*, 2002). En bovinos, se sugiere que la fusión de las células binucleadas con el epitelio materno es el fenómeno que inicia cambios en la expresión de las integrinas y las moléculas de la MEC en el estroma subepitelial uterino (MacIntyre *et al.*, 2002). En porcinos, se ha estudiado el papel de las integrinas y de sus ligandos de la MEC comparando su expresión en útero no gestante con una preñez temprana de 10-15 d de gestación (Bowen *et al.*, 1996; Bowen y Hunt, 2000; Jaeger *et al.*, 2001) y hasta los 35 d de gestación (Rashev *et al.*, 2005). Sin embargo, poco se conoce acerca de la expresión de estas moléculas de adhesión y sus ligandos durante el desarrollo de la placentación porcina en la interfase feto-materna. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue detectar la expresión de FN sobre muestras de placentas porcinas provenientes de diferentes períodos de preñez y determinar el área de inmunomarcaje hallado en la interfase feto-materna.

Materiales y Métodos

Animales y tractos reproductivos

Se utilizaron 12 tractos reproductivos de cerdas, entre segundo y tercer parto, mestizas (Landrace x Large White) en diferentes períodos gestacionales de 17, 20, 32, 35, 60 y 107 d de gestación (dg) y 4 úteros de cerdas no gestantes, provenientes de frigoríficos de la zona de General Pico, provincia de La Pampa, Argentina (35° 45' y 63° 50' de latitud y longitud, respectivamente). Los tractos reproductivos se lavaron con solución salina de Hank (SSH) conteniendo 10000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomomicina y 2,5 µg/mL de fungizona, y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Se determinó la edad gestacional de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los embriones/fetos según la tabla desarrollada por Marrable (1971), utilizando un calibrador y/o regla manual.

Se agruparon los diferentes períodos de gestación en función de etapas relacionadas a la gestación porcina: 17-20 dg marca el fin de la implantación, 32-35 dg es el comienzo de la osificación y del desarrollo del sistema inmunológico; a los 60 dg la placenta alcanza la meseta que marca el fin de su crecimiento exponencial, y 107 dg indicaría el fin de los mecanismos involucrados en la placentación porcina.

Procesamiento del tejido placentario

El tejido placentario porcino, tanto materno como fetal, se fijó en formol tamponado con fosfato al 10%. Se realizó la técnica histológica convencional (Geneser, 2006) para incluir el tejido en parafina, obteniéndose cortes histológicos de ± 5 mm.

Determinación de la fibronectina

Sobre los cortes histológicos se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta LSAB (Labeled

Streptavidin Biotin Method): se desparafinaron los cortes de tejido placentario y se lavaron con solución tampón fosfato salino (Phosphate buffered saline, PBS); se agregó peróxido de hidrógeno al 3% (para bloquear a peroxidasa endógena) durante 20 min y se lavó con PBS. Se realizó tratamiento de recuperación antigénica mediante microondas de uso doméstico, con buffer citrato 0.01 M, pH 6.0 sometiendo los cortes por 3 min a 100% de potencia y 9 min al 50%; se dejaron enfriar 20 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS. Se colocó BSA (albúmina sérica bovina) al 3% por 15 min a fin de bloquear las uniones inespecíficas y se agregó el anticuerpo de conejo anti-fibronectina de rata y porcino policlonal (ab23751, Abcam, Cambridge, Reino Unido), dilución 1:200, incubando 20 h a 4°C. Posteriormente, se dejaron a temperatura ambiente por 10 min y se lavaron con PBS. Se agregó el segundo anticuerpo biotilado (inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra, Dako Cytomation, Dinamarca) incubando durante 20 min a temperatura ambiente, lavándose luego con PBS. Se colocó estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (streptavidina/HRP, Dako Cytomation, Dinamarca) y se incubó durante 20 min. Se lavó con PBS, se cubrió con solución cromógena diaminobencidina (DAB) durante 20 min, se lavó con agua destilada y se contrastó con hematoxilina activada por 4 seg (Biopur, Argentina), sumergiendo luego el tejido en agua corriente tibia por 10 min para fijar el colorante. La muestra se deshidrató, se montó el portaobjeto con un

cubreobjeto y se observó en un microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). Se tomaron imágenes de los tejidos a 100X y 400X con una cámara de microscopio (Canon PowerShot G20, Tokio, Japón).

Determinación del porcentaje de área de inmunomarcaje a FN

Se tomaron microfotografías (n = 15) de cada estructura estudiada: epitelio luminal endometrial, epitelio glandular y trofoblasto, como mínimo sobre 2 portaobjetos por cada período de gestación elegido. Sobre ellas se aplicó el software Image Proplus® 3.0 (Media Cybernetics, EE. UU.). Brevemente, el área inmunohistoquímicamente marcada a FN se valoró como el porcentaje del área total evaluada a través de la segmentación de colores, extrayendo los objetos de determinado color (marrón). La coloración marrón fue seleccionada con una sensibilidad de 4 (máximo 5) y luego se aplicó una máscara para la separación permanente de los colores. Se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada (Salveti *et al.*, 2004).

Análisis de los resultados

Los resultados de inmunohistoquímica indirecta, LSAB, fueron expresados en forma semicualitativa (Rashev *et al.*, 2005), con una escala elegida en función de la coloración detectada, determinando que: (-)= negativo, (+)= positividad leve, (++)= positividad moderada y (+++)= positividad fuerte.

La evaluación del área de inmunomarcaje de FN se realizó con el programa estadístico R versión 3.0.1 (Fox, 2005).

Resultados

El útero no gestante no presentó inmunomarcación para FN en ninguna de las estructuras estudiadas. A los 17 dg se observó moderada (++) expresión continua de FN en la porción apical de las células trofoblásticas del conceptus. En el mismo período de gestación se observó expresión leve (+) continua de FN en la zona apical de las células del epitelio luminal endometrial, mientras que las células glandulares fueron negativas. A los 32 dg se observó fuerte (+++) expresión de FN en la porción citoplasmática apical de las células del trofoblasto (Figura 1). Sobre el epitelio luminal endometrial se encontró leve (+) marcaje citoplasmático de esta molécula, siendo las glándulas negativas. A los 60 dg se observó fuerte (+++) expresión de FN en la porción citoplasmática media-luminal de las células del trofoblasto (Figura 2). En el endometrio se encontró positividad moderada (++) en las células del epitelio

luminal pero fueron negativas las células epiteliales glandulares. A los 107 dg no se encontró expresión de FN ni en el trofoblasto ni en el epitelio luminal endometrial, pero sí se observó inmuno-marcación moderada (++) en células glandulares endometriales (Tabla 1).

Con respecto al porcentaje de área inmunomarcada (%AIM), en el epitelio endometrial se hallaron diferencias significativas entre los períodos de gestación, aumentando el área de FN a medida que avanzó la gestación. Las células epiteliales glandulares sólo mostraron inmunomarcación a los 107 dg, cubriendo el 52,23% del citoplasma. En las células trofoblásticas no se encontró diferencias significativas entre los períodos de 17 y 32 dg, pero sí diferencias significativas en el %AIM a los 60 dg con respecto al principio de la preñez (Tabla 1).

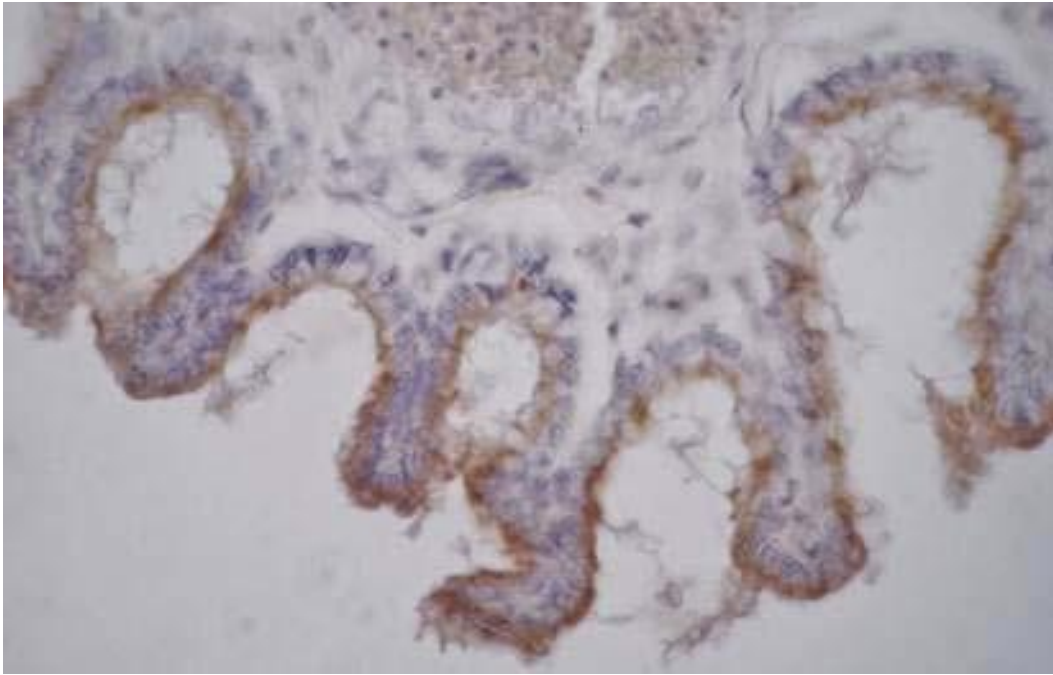


Figura 1. Expresión fuerte (+++) de fibronectina en la región de las vellosidades trofoblásticas a los 32 d de gestación (400x).

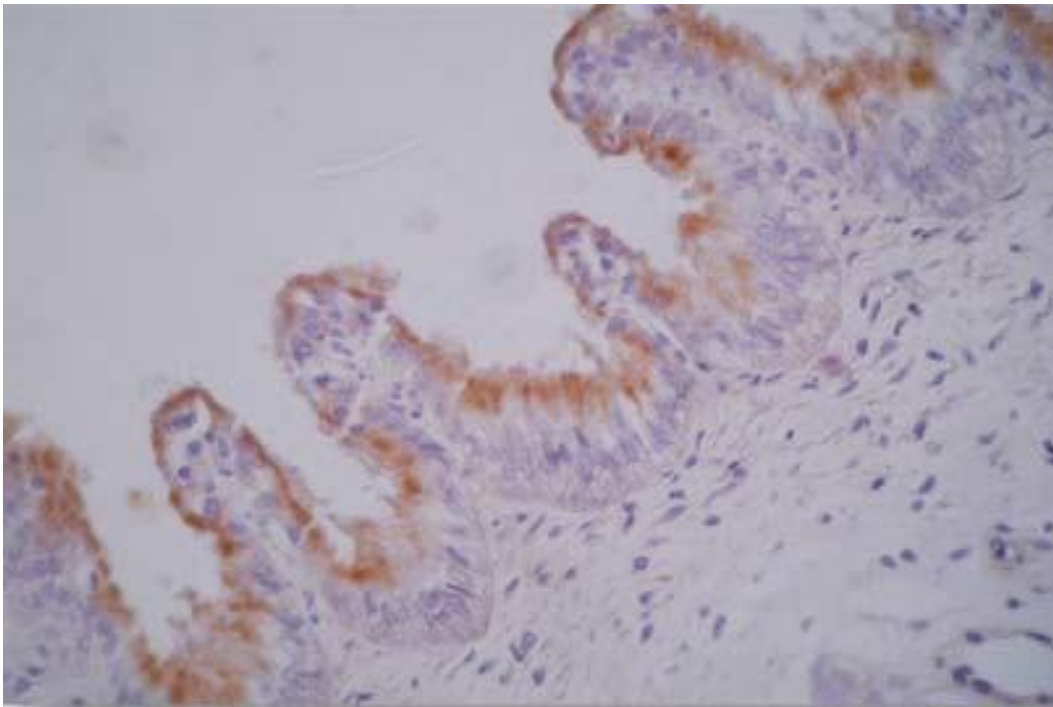


Figura 2. Expresión fuerte (+++) de fibronectina en la región de las vellosidades trofoblásticas a los 60 d de gestación (400x).

Tabla 1. Detección de fibronectina en tejidos placentarios porcinos (epitelio endometrial, glándulas y trofoblasto) durante la preñez y en útero vacío por inmunohistoquímica indirecta (LSAB) y determinación del porcentaje del área inmunomarcada (%AIM)

Fibronectina	Epitelio endometrial		Glándulas		Trofoblasto	
	LSAB	% AIM	LSAB	% AIM	LSAB	% AIM
Útero vacío						
(0 dg)	Negativo	-----	Negativo	-----		
17 dg	(+) apical	13.57a	Negativo	-----	(++) apical	25.05ab
32 dg	(+) apical	31.37bc	Negativo	-----	(+++)	21.19ab
60 dg	(++) apical	48.81d	Negativo	-----	(+++)	34.85c
107 dg	Negativo	-----	(++) citop.	52.23	Negativo	-----

Apical: región apical de las células placentarias.

Citop: citoplasma. LSAB: técnica estreptavidina-biotina peroxidasa.

%AIM: porcentaje de área inmunomarcada a FN.

a, b, c, d - Diferentes letras dentro de la misma columna denotan diferencias significativas (Tukey; p<0,05).

Discusión

Para que la gestación progrese, es necesario que se establezca una interacción entre el conceptus y el endometrio, que involucra, entre otras, a las moléculas de adhesión y sus ligandos, que serían las responsables del reconocimiento y anclaje de los epitelios materno y fetal en la interfase placentaria porcina (Williamson y Koncurat 2009).

Según Rashev *et al.* (2005), los epitelios que forman parte de la interfase feto-materna durante la preñez temprana porcina, hasta los 35 dg, expresan fibronectina con la misma intensidad, tanto sobre las células trofoblásticas como sobre los tejidos endometriales uterinos, aumentando la intensidad de la marcación a medida que la formación de la placenta avanza. Los resultados del presente trabajo muestran coincidencia parcial con ese estudio, con respecto a los epitelios de la interfase feto-materna, ya que la inmunomarcación citoplasmática a FN fue más intensa en el trofoblasto que en el epitelio luminal endometrial. Además, se demostró su presencia en dichas estructuras a medida que avanza la gestación, haciéndose negativa a término, la expresión de FN. Discrepamos con Rashev *et al.* (2005) a nivel de glándulas endometriales, ya que no se encontró positividad a FN en el epitelio glandular endometrial en la gestación temprana, tampoco hubo tal expresión a medida que la gestación

avanzó, sólo se encontró positividad citoplasmática a FN al final de la preñez.

No hay trabajos que determinen los porcentajes de AIM de FN en la placenta porcina. En nuestro laboratorio comparamos los porcentajes del AIM entre ambos epitelios de la interfase feto-materna, y se observó que hay diferencia significativa entre el área inmunomarcada endometrial y trofoblástica, siendo mayor el área marcada de las células endometriales a los 32 y 60 dg, aumentando este porcentaje a medida que avanza la gestación. En cuanto al trofoblasto, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de área marcada hasta los 60 dg de preñez. Según estudios de apoptosis realizados en nuestro laboratorio, hacia los 60 d de preñez se observa la mayor remodelación de las vellosidades placentarias, dado que cesa el crecimiento exponencial de la placenta para dar lugar al crecimiento de los fetos (Merkis *et al.*, 2010). Es importante señalar que se encontró una mayor positividad y porcentaje de área inmunomarcada a FN también durante este período. En conclusión, con base en los resultados obtenidos, se sugiere que la fibronectina estaría involucrada en los mecanismos moleculares que participan en la adhesión y fijación de los epitelios que conforman la interfase feto-materna durante la placentación porcina.

Literatura Citada

Botella Llusia, J. 2001. Integrins and reproduction. *Ann R Acad Nac Med*; 118:73-85.

Bowen, J. A., F. W. Bazer, and R. C. Burghardt. 1996. Spatial and temporal analyses of integrin and muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoectoderm *in vivo*. *Biol. Reprod.*; 55:1098-106.

Bowen, J. A., and J. S. Hunt. 2000. The role of integrins in reproduction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; 223:331-43.

- Burghardt, R. C., G. A. Johnson, L. A. Jaeger, H. Ka, J. E. Garlow, T. E. Spencer, and F. W. Bazer. 2002. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells, Tissues, Organs*; 172:202-17.
- Fox, J. (2005). The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *J. Stat. Software*; 14:1-42.
- Geneser, F. (2006). *Histología* (3.ª Ed.). Panamericana S. A. España.
- Jaeger, L. A., G. A. Johnson, H. Ka, J. G. Garlow, R. C. Burghardt, T. E. Spencer, and F. W. Bazer. 2001. Functional analysis of autocrine and paracrine signaling at the uterine-conceptus interface in pigs. *Reprod.*; 58(Suppl.):191-207.
- Lessey, B. A. and J. T. Arnold. 1998. Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the establishment of uterine receptivity. *J. Reprod. Immunol.*; 39:105-16.
- Lodish, H. 2011. *Biología celular y molecular* (5.ª Ed.) Panamericana. Buenos Aires.
- MacIntyre, M. D, H. C. Lim, K. Ryan, S. Kimmins, J. A. Small, and L. A. Maclaren. 2002. Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. *Biol. Reprod.*; 66:1430-36.
- Marrable, A. W. 1971. *The embryonic pig: a chronological account*. Ed. Exeter, Pitman Medical, London; 30-51.
- Merkis, C., A. Cristofolini, E. Sanchis, and M. Koncurat. 2010. Expression of death cellular receptors FAS/CD95 and DR4 during porcine placentation. *Int. J. Morphol.*; 28:829-34.
- Plow, E. F., T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J. W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.*; 275:21785-8.
- Rashev, P., R. Georgieva, and D. Rees. 2005. Expression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin and fibronectin during early pregnancy in pigs. *Folia Biol. Praha*; 51:121-5.
- Reddy, K. V. and S. S. Mangale. 2003. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. *Tissue Cell*; 35:260-73.
- Salvetti, N. R., E. J. Gimeno, J. A. Lorente, and H. H. Ortega. 2004. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells, Tissues, Organs*; 178:117-25.
- Williamson, D. M. y M. A. Koncurat. 2009. Expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ y de las subunidades de integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$ durante la placentación porcina. *InVet*; 11:31-7.