

**INFORME**  
**BECA de ENTRENAMIENTO 2014**

**Director**

***Claudio G. Barbeito***

**Becaria**

***Rocío Hernández***

**Tema**

***Implantación y placentación en carnívoros: técnicas para estudios morfológicos, histoquímicas, inmunohistoquímicas y moleculares***

## BECA de ENTRENAMIENTO 2014

*Durante el desarrollo de la beca y, según lo previsto en el plan, se llevó adelante un entrenamiento en distintas técnicas, habilidades y destrezas necesarias para la investigación de la implantación y la placentación en los carnívoros*

### ***Descripción de las tareas realizadas***

Durante el periodo de trabajo llevé adelante la obtención de muestras de sacos fetales y placentas de caninos y de felinos, así como de la estimación de la edad gestacional, la protocolización de las muestras y su documentación fotográfica.

Acondicioné las muestras de distintas maneras según se fueran a procesar mediante técnicas histológicas básicas, lectin e inmunohistoquímica (inmersión en formol-inmersión en formol y pasaje a alcohol) o técnicas moleculares como PCR o Western blot (toma de muestras y rotulado sobre hielo seco, congelación a  $-70^{\circ}$ , o inmersión en conservantes comerciales de ácidos nucleicos y posterior eliminación del conservante y pasaje a freezer de  $-18^{\circ}$  o  $-70^{\circ}$ ).

Procesé las muestras hasta la obtención de bloques de parafina (deshidratación, aclaramiento, inclusión en parafina) y obtuve cortes para distintas técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas, colocándolos, según fuera el caso, sobre portabjetos estándares, silanizados o con cargas positivas.

Realicé la coloración de rutina de los cortes con hematoxilina y eosina, las técnicas de coloración de Giemsa, PAS y Azul de toluidina.

En conjunto con mi director participé de jornadas de observación y discusión de los preparados obtenidos para adentrarme en el aprendizaje de las características

microscópicas de un órgano histológicamente complejo como la placenta, con todas las variaciones estructurales que exhibe en dos especies diferentes y en distintos momentos de la gestación. Acompañé esta observación con búsquedas bibliográficas y lectura de artículos de la especialidad.

Habiendo realizado las lecturas necesarias acerca de los fundamentos de las técnicas llevé adelante técnicas de lectinohistoquímica e inmunohistoquímica (IHQ) con un panel seleccionado de lectinas y de anticuerpos, respectivamente. Participé luego en la observación, registro fotográfico y discusión de los resultados obtenidos.

Participé en reuniones científicas, tanto de Ciencias Morfológicas como de Biología Celular y Molecular, lo que resultó interesante para conocer distintas líneas de investigación y relacionarme con otros estudiantes y profesionales de la especialidad.

Realicé un viaje a la Facultad de Ciencias Veterinarias del Litoral, en Esperanza, Santa Fe, en el marco del proyecto "*Morfología e histoquímica aplicadas a la biología y la patología de la placenta y la preñez. Parte II*" (Código: 11/ V 193) del Sistema de Incentivos de la UNLP. Allí llevé adelante técnicas de IHQ para la marcación de los factores de crecimiento IGF1, IGF2 y sus receptores en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), instituto de doble dependencia UNL y CONICET, lo que resultó muy enriquecedor tanto laboralmente como humanamente.

El trabajo llevado a cabo durante la beca contribuyó a la realización de investigaciones que se publicaron en diferentes revistas y jornadas de la especialidad.

-Presentaciones en Jornadas y Congresos publicados como resúmenes

1-HERNANDEZ R, DIESSLER ME, BARBEITO CG. "Implantación y Placentación en carnívoros: técnicas para estudios morfológicos, histoquímicos, inmunohistoquímicos y moleculares". Presentación oral en las Jornadas de Ciencia y Técnica de la FCV, en noviembre de 2014. Publicado en *Analecta Veterinaria* 34, p68, 2014. ISSN 1514-2590.

2- CEBRAL E, DIESSLER ME, VENTUREIRA M, SOBARZO C, HERNANDEZ R, CASAS L, BARBEITO CG. Expression and activity of matrix metalloprotease-2 in canine early

placenta". Placenta 38, Issue 4, p508. (WB SAUNDERS CO. LTD, ISSN 0143-4004)  
Publicación parcial.

3-Cebral E, Diessler M, Ventureira M, Sobarzo C, Hernandez R, Casas L, Barbeito C.  
"Expresión y actividad de la metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en la placenta canina".  
Presentado en la Tercera Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República  
Argentina, San Miguel de Tucumán. 9 al 11 de Septiembre de 2015. Biocell En Prensa

-Artículos Completos en revistas internacionales

4-CONRAD ML, DIESSLER ME, HERNANDEZ R, FREITAG N, BARRIENTOS G,  
MOSCHANSKY P, ROSE M, CASAS L, BARBEITO CG, BLOIS MS. "Differential  
spatiotemporal patterns of galectin expression are a hallmark of endotheliochorial  
placentation". American Journal of Reproductive Immunology. En prensa.

## **Resumen de métodos, técnicas e instrumental empleados**

### **Protocolo para acondicionamiento de muestras con conservantes de ácidos nucleicos**

- 1- Del órgano en fresco se toman muestras de un tamaño igual o menor a 0,5cm.
- 2- Las muestras se colocan en un eppendorf con RNA later® (conservante comercial), se pueden conservar por un mes a 4°C o una semana a 25°C.
- 3- Luego se puede procesar o se elimina el conservante, y se mantiene congelado en freezer a -70°C.

### **Protocolo para procesamiento histológico de rutina**

#### Toma de Muestras:

- 1- Úteros y placentas obtenidos mediante histerectomía y cesárea/histerectomía (FIGURAS 1 y 2)
- 2- Fijación con formol durante 24h.
- 3- Post fijación y mantenimiento en alcohol 96°.



**Figuras 1 y 2.1:** Útero, placenta, membranas fetales y feto de felino. **2:** Útero y placenta de canino.

Procesamiento de muestras:

- 1- Reducción del material.
- 2- Obtención de porciones de interés de 1 x 0,5 cm, introducción en cestillas plásticas.
- 3- Deshidratación en alcoholes de graduación creciente, un pasaje en alcohol 70º, tres en 96º y res en 100º (durante una hora cada uno).
- 4- Aclarado con xilol, tres pasajes de 30 min, hasta que la muestra este color ámbar.
- 5- Impregnación con parafina en estufa a 60ºC, tres pasajes durante una hora.
- 6-Entacado con parafina en estufa a 60ºC, tres pasajes durante 1h.
- 7- Corte en micrótopo (colocación de la muestra entacada en frio, nivelación, obtención de cortes de 3 µm).
- 8- Colocación en agua tibia, montado sobre portaobjetos.
- 9- Secado sobre la platina.
- 10- Mantenimiento en estufa a 36.37ºC hasta la tinción.

Tinción de rutina: Hematoxilina y eosina

- 1- Desparafinado en xilol, dos pasajes de 10-15min.
- 2- Hidrato en alcoholes decrecientes, el tren consta de dos recipientes con alcohol 100º, dos con 96º, y uno con alcohol 70º (1 min en cada uno).
- 3- Lavado con agua destilada.
- 4- Tinción con Hematoxilina, por 3 a 5 min.
- 5- Lavado con agua corriente, para lograr el viraje.
- 6- Tinción con Eosina, por 1 min.
- 7- Deshidratado en alcoholes crecientes, pasajes fugaces por alcohol 96º y 100º.
- 8- Aclarado en xilol, dos pasajes.
- 9- Montaje con bálsamo natural.

Reacción de PAS (Solución de ácido peryódico de Schiff):

- 1- Desparafinado con xilol, dos pasajes.
- 2- Hidratado con alcoholes decrecientes.
- 3- Lavado con agua destilada.
- 4- Incubación con ácido peryódico durante 15 min.
- 5- Lavar con agua destilada.
- 6- Incubación con reactivo de Schiff, filtrado en el momento.
- 7- Virado con agua corriente durante 5 min.
- 8- Lavado con agua destilada.
- 9- Tinción con Hematoxilina durante 3 a 5 min.
- 10- Virar con agua corriente.
- 11- Deshidratar con alcoholes crecientes.
- 12- Aclarar con xilol, dos pasajes.
- 13- Montar con bálsamo natural.

Resultado:

Núcleos: Azul.

Glucógeno y lámina basal: rosa y fucsia.

Azul de Toluidina:

- 1-Desparafinado con xilol, dos pasajes.
- 2- Hidratado con alcoholes decrecientes.
- 3- Lavado con agua destilado.
- 4- Tinción con Toluidina ferricada durante 10 a 15 min.
- 5- Viraje con agua corriente.
- 6- Deshidratación con alcoholes crecientes.
- 7- Aclarado con xilol dos pasajes.
- 8- Montaje con bálsamo natural.

Resultado:

Núcleos. Azul.

Gránulos de mastocitos: Violeta-Rojo, purpura, por la presencia de heparina.

Giensa:

- 1- Desparafinado en xilol, dos pasajes de 10-15min.
- 2- Hidratado en alcoholes decrecientes, el tren consta de dos pasadas por alcohol 100º, dos por 96º, pasando por el 70º, 1 min en cada uno.
- 3- Lavaje con agua destilada.
- 4- Tinción con Giensa por 1h.
- 5- Deshidratado en alcoholes crecientes, pasajes fugaces por alcohol 96º y 100º.
- 6- Aclarado en xilol, dos pasajes.
- 7- Montaje con bálsamo natural.

### **Protocolo utilizado para el procesamiento lectinohistoquímico**

Lectinohistoquímica:

Se procesan cortes montados sobre portaobjetos silanizados.

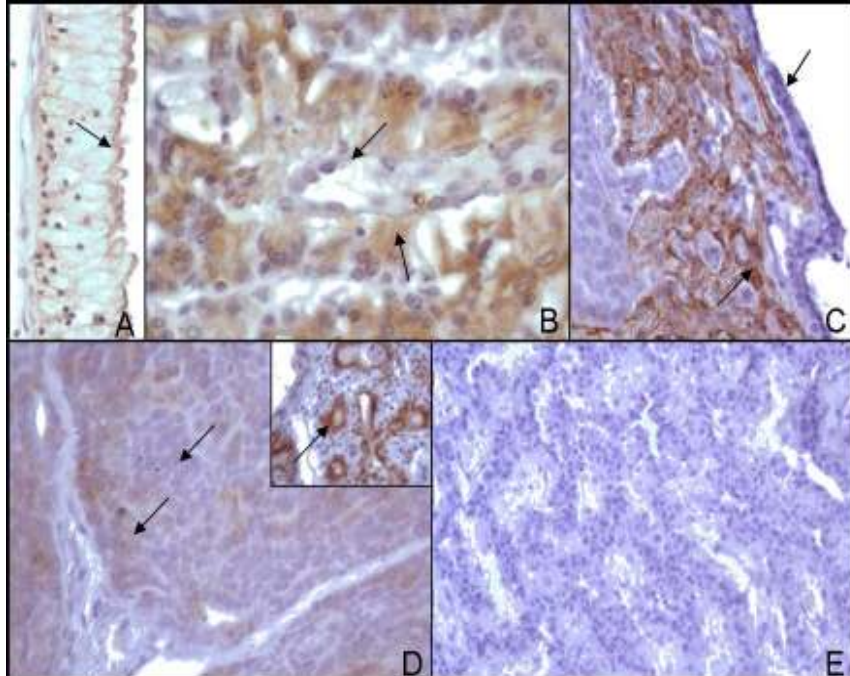
- 1- Desparafinado con xilol, dos pasajes de 10 min.
- 2- Hidratado con alcohol 100º, dos pasajes durante 15 min cada uno, mas adelante con alcoholes decrecientes.
- 3- Bloqueo de la peroxidasa endógena con agua oxigenada por 30 min.
- 4- Dos pasajes por alcoholes 96º y uno por alcohol 70º, 5 min cada uno.
- 5- Bloqueo de uniones inespecíficas con albumina de suero bovino, incubación durante 30 min.
- 6- Incubación con lectinas (WGADBAUEAPHA-E y PHA-L), toda la noche, 4ºC.
- 7- Lavado con buffer PBS, tres pasajes (cada lectina por separado).
- 8- Incubación con Estreptavidina-Peroxidasa, durante 30 min.
- 9- Lavado con buffer PBS.
- 10- Revelado con diaminobencidina (cromógeno), durante unos segundos, controlar con microscopio.
- 11- Corte con agua corriente.
- 12- Lavado con agua estilada.
- 13- Contra tinción con Hematoxilina (segundos).
- 14- Viraje con agua corriente.
- 15- Lavado con agua destilada.
- 16- Deshidratación en alcoholes crecientes durante 5 min cada uno.
- 17- Aclarado con xilol dos pasajes.
- 18- Montaje con bálsamo natural.

## **Protocolo utilizado para el procesamiento inmunohistoquímico**

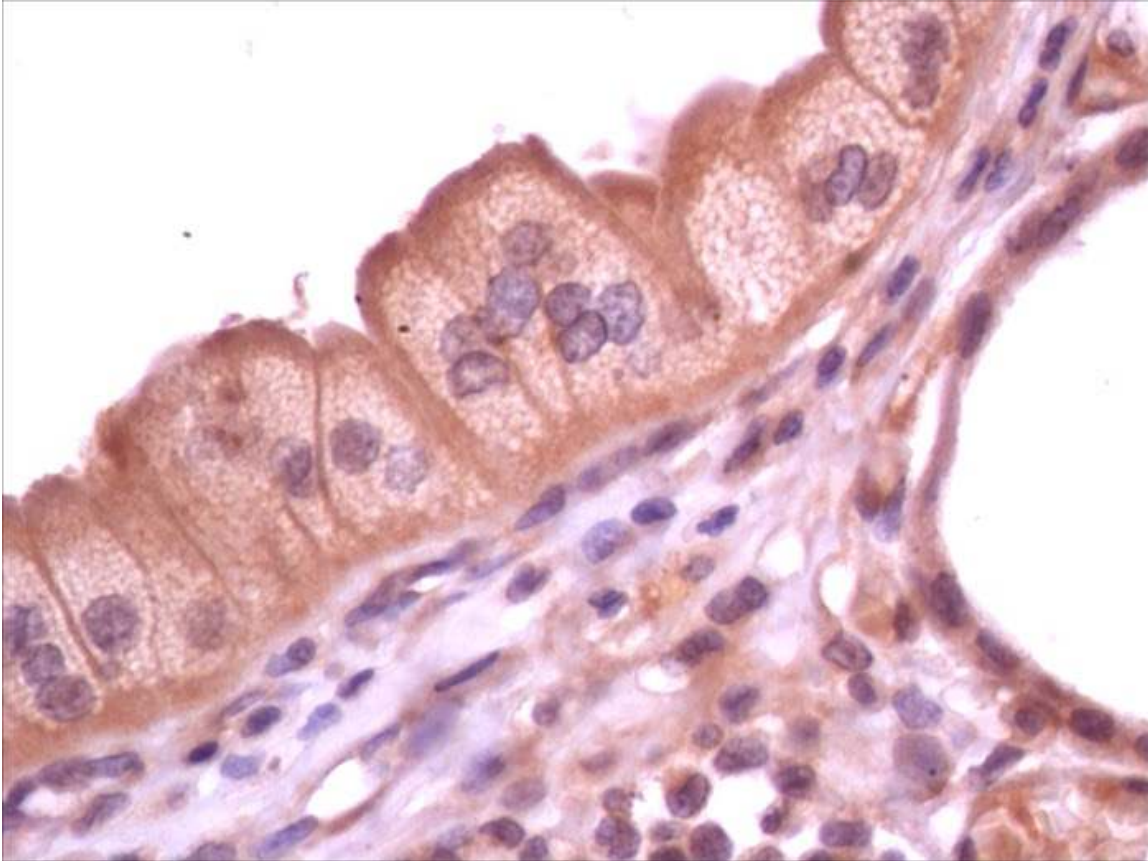
### **Inmunohistoquímicos (FIGURAS 3 Y 4)**

- 1- Colocar los cortes 10-15min en estufa a 60°
- 2- Desparafinar en xilol, 15 min.
- 3- Desparafinar en Xilol, 10 min.
- 4- Hidratar con Alcohol 100, 2 min.
- 5- Hidratar con Alcohol 100, 2 min.
- 6- Hidratar con Alcohol 96, 2 min.
- 7- Hidratar con Alcohol 70, 2 min.
- 8- Lavado con PBS, 2 min.
- 9- Recuperación antigénica en microondas.
  - I- Hidratar con PBS, 5 min.
  - II- Poner los cortes en los jarras Coplin con citrato 0,01u, ph6.
  - III- Colocarlo a baño María, con tapa perforada al microondas.
  - IV- Calentar 3 min al 100%
  - V- Calentar 12 min a 40% (Para contrarrestar la evaporación, conviene hacer dos cortes de 6 min a 40% y así ir suplementando con agua destilada lo que se evapora).
  - VI- Dejar enfriar 20 min dentro del microondas con la puerta abierta.
  - VII- Hacer dos lavados con PBS de 5 min cada uno.
- 10- Inactivación de la peroxidasa endógena con agua oxigenada en metanol por 10 min.
  - I- Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 36ml de metanol y 4 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30vol).
- 11- Agregar 4ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30vol) por 10 min más.
- 12- Hacer dos lavados con PBS de 5min cada uno.
- 13- Secar los cortes y cubrirlos con solución de bloqueo por 15min.
  - I- Solución de Bloqueo: suero de cabra, leche descremada, albumina bovina, etc.
- 14- Escurrir sin lavar los cortes y cubrir con el anticuerpo primario, incubar toda la noche a 4°C (también se puede 1h en estufa).
- 15- Hacer dos lavados con PBS de 5 min cada uno.
- 16- Secar los cortes y cubrirlos con la estreptavidina-peroxidasa por 30 min.
- 17- Hacer tres lavados con PBS de 5 min cada uno.
- 18- Secar los cortes y cubrirlos con la solución de cromógeno (DAB) de 1 a 10 min, dependiendo el tejido y el anticuerpo, cortar la reacción a gusto mirando al microscopio, (la DAB se puede usar en el día y siempre que no haya precipitado).
- 19- Cortar la reacción en agua destilada, hacer dos lavados de 5 min cada uno.
- 20- Contrastar con Hematoxilina, de 30 s a 1 min.
- 21- Hacer dos lavados rápidos con agua destilada.
- 22- Virar en agua corriente.

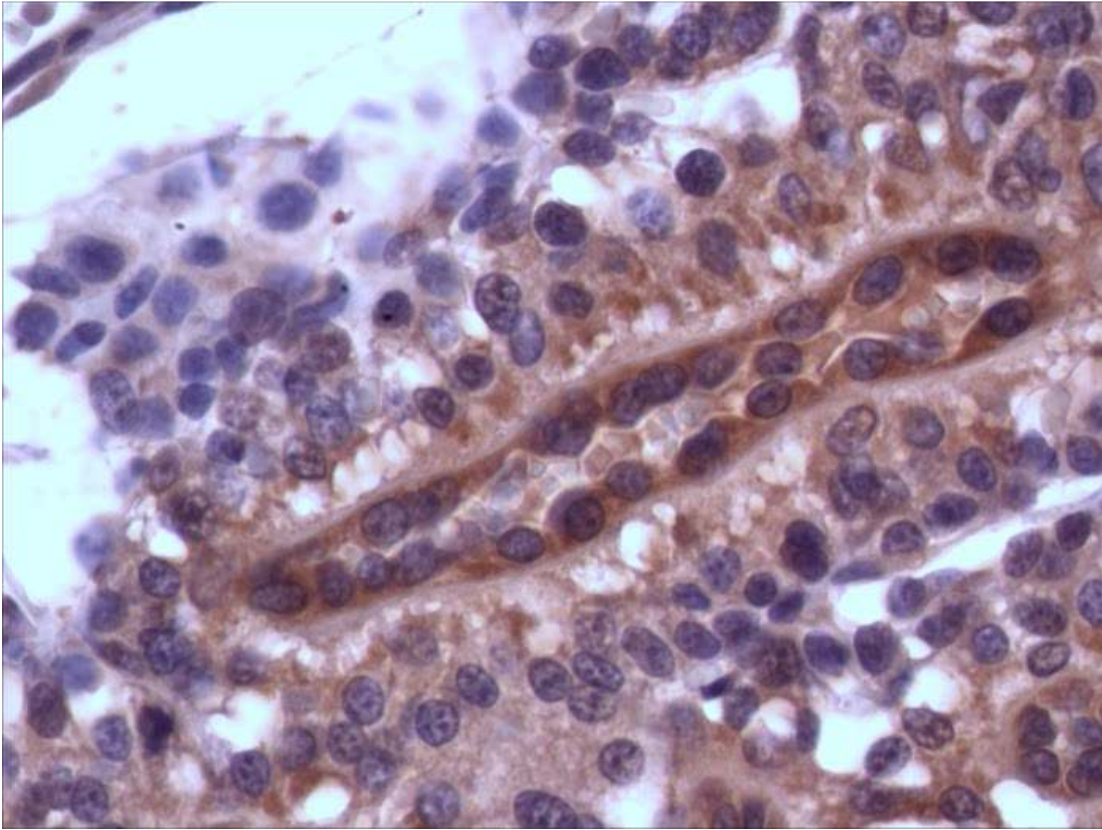
- 23- Hacer un lavado rápido en agua destilada.
- 24- Deshidratación en Alcohol 70, 2 min.
- 25- Deshidratación en Alcohol 96, 2 min.
- 26- Deshidratación en Alcohol 100, 2 min.
- 27- Deshidratación en Alcohol 100, 2 min.
- 28- Aclarado en Xilol, 3 min.
- 29- Aclarado en Xilol, 5 min.
- 30- Montaje con bálsamo natural.



**Figura 3.A:** Corion liso del saco fetal de un canino. Se señala la marca positiva (parda) para citoqueratinas en la región apical de las células trofoblásticas. 20X. **B:** Placenta madura de canino, laberinto. La flecha superior señala el endotelio materno, negativo para citoqueratinas, y la inferior el trofoblasto, positivo. 40X. **C:** Embrión en implantación. Aun en la etapa de máxima invasividad, el trofoblasto (flecha superior) permanece negativo al marcador mesenquimáticovimentina, observándose azul. La flecha inferior señala el tejido conectivo del endometrio, positivo para vimentina. 40X. **D:** Control positivo de tejido. Carcinoma mamario simple sólido canino. Las flechas señalan la heterogénea marcación para citoqueratinas. 40X. En el recuadro, a efectos de comparación, se observa la intensa y homogénea marcación para citoqueratinas en un área normal de la misma mama. 10X. **E:** Laberinto placentario de canino. Control negativo de técnica. No se observan elementos parduzcos. 20X. Técnica IHQ.



**Figura 4.** Técnica de Inmunohistoquímicos. Marcación del factor de crecimiento IGF1 en placenta tardía de perra. Cámaras superficiales maternas. Epitelio glandular materno vacuolado. Estroma muy infiltrado, con células del tejido conectivo positivas, al igual que el endotelio de los vasos sanguíneos maternos.



**Figura 5.**IHQ. Marcación con anticuerpo anti-IGF1 en placenta madura de perra. Zona de contacto materno fetal, laberinto. El endotelio de los vasos maternos presenta gran positividad (marrón oscuro). El citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto presentan positividad (parduzco). Los glóbulos rojos contenidos en el vaso son negativos a la marcación por la inactivación de la peroxidasa endógena.