
Concentración de Interleuquina 1-β durante la placentación porcina.

Artículo de Vélez, C.; Clauzure, M.; Williamson, DM.; Barbeito, C., Santa Coloma, TA. y Koncurat, MA.
CIENCIA VETERINARIA, Vol. 20, N° 1, enero-junio de 2018, ISSN 1515-1883 (impreso) E-ISSN 1853-8495 (en línea), pp. 13-24
DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet-20182011>

Concentración de Interleuquina 1-β durante la placentación porcina

Vélez, C.^{1,2}; Clauzure, M.^{2,3}; Williamson, DM.¹; Barbeito, C.^{2,4}; Santa Coloma, TA.^{2,3} y Koncurat, MA.¹

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam). Calle 5 esquina 116. 6360 General Pico, La Pampa, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Laboratorio de Biología Celular y Molecular, y Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), Buenos Aires, Argentina.

⁴ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Calle 60, Casco Urbano, B1900 La Plata, Buenos Aires

Email: karovel@yahoo.com.ar

RESUMEN

La IL-1β, citoquina proinflamatoria, está involucrada en la implantación del *conceptus*, la invasión y la inmunotolerancia feto-materna. Participa en el desarrollo del trofoblasto, comunicación con el endometrio y es necesaria para una correcta implantación. Sin embargo, se desconoce la presencia de esta citoquina, tanto a nivel placentario como sistémico, durante el periodo posterior a la implantación porcina, especie que posee una placenta de tipo epiteliochorial, no invasiva, adecidua, plegada y difusa. En este trabajo se determinó la concentración de IL-1β en sueros, homogenatos de útero de cerdas no gestantes y homogenatos de placenta materna y fetal de distintos períodos gestacionales (30, 60, 70 y 114 días). Se observó un pico de concentración tisular de IL-1β durante la gestación, a los 60-70 días, tanto en placenta materna como fetal. A nivel sistémico, la determinación demostró un patrón contrario, se observó un pico en los niveles séricos de IL-1β al final de la gestación. Estos resultados sugieren que la IL-1β sería necesaria entre los 60 y 70 días del periodo gestacional a nivel tisular, para participar en los



mecanismos moleculares que permiten la remodelación en la interfase placentaria característica de este periodo. Por otro lado, el aumento de la citoquina a nivel sérico, al final de la gestación, probablemente tenga como objetivo activar el sistema inmune pro-inflamatorio para el desencadenamiento del parto y expulsión de las placentas.

PALABRAS CLAVE: interleuquina 1- β , gestación, porcina

Interleukin 1- β concentration during porcine gestation

ABSTRACT

IL-1 β , a proinflammatory cytokine, is involved in the conceptus implantation, invasion and fetal-maternal immunotolerance. It participates in the development of the trophoblast, communication with the endometrium and it's necessary for a correct implantation. However, the presence of this cytokine, both at the placental and systemic levels, is unknown during the period after the implantation in swine, a species that has an epitheliocorial, noninvasive, adecidua, folded and diffuse placenta. In this study, the concentration of IL-1 β in sera, uterus homogenates of non-pregnant sows and homogenates of maternal and fetal placenta of different gestational periods (30, 60, 70 and 114 days) were determined. A peak IL-1 β tissue concentration was observed during gestation at 60-70 days in both maternal and fetal placenta. At the systemic level, the determination demonstrated an opposite pattern, a peak in serum IL-1 β levels was observed at the end of gestation. These results suggest that IL-1 β is useful between the 60 and 70 days of the gestational period in a tissue level, for participation in the molecular mechanisms that allows remodeling in the placental characteristic of this period. Furthermore, the increase of the serum cytokine at the end of gestation probably aims to activate the pro-inflammatory immune system for the onset of labor and expulsion of the placentas.

KEYWORDS: interelukin 1- β , gestation, porcine.

Fecha de Recepción: 13-11-2017

Fecha de aprobación para publicación: 03-05-2018

Introducción

La Interleuquina 1- β (IL-1 β) es una citoquina pro-inflamatoria que actúa como mediador central de la inflamación y la inmunidad innata en los mamíferos^[1, 2]. La IL-1 β está involucrada en la implantación del *conceptus*, la invasión y la inmunotolerancia feto-materna^[3]. Esta citoquina se sintetiza en forma de precursor^[4] y es escindida a su forma madura mediante la actividad de caspasa-1^[5,6], localizada en complejos que se denominan “inflamomas”^[7]. La IL-1 β media sus efectos biológicos a través de un receptor de membrana denominado receptor de la IL-1 de tipo I (IL-1RI), el cual contiene un dominio de transducción de señales en la región citoplásmica^[8]. Tras la unión de la IL-1 β al receptor, la transducción de señales supone varios fenómenos de fosforilación y formación de nuevos complejos con otras quinasas y proteínas adaptadoras, que finalmente dan lugar a la activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) y de la proteína activadora-1 (AP-1), entre otros factores de transcripción involucrados en su señalización^[9, 10].

En las primeras etapas de la gestación, el blastocisto, inicia un diálogo con el endometrio de manera de obtener su receptividad. Esta comunicación cruzada involucra, además de otros factores, la generación de una respuesta inmune de tipo inflamatoria, resultando en la implantación del *conceptus* y la generación de la placenta⁽¹¹⁾. El rol de la IL-1 β ha sido ampliamente estudiado en el período de implantación de distintas especies⁽³⁾. Esta citoquina participa en el desarrollo del trofoblasto y comunicación con el endometrio y es necesaria para una correcta implantación⁽¹²⁾, así los niveles de expresión de IL-1 β en el *conceptus* porcino aumentan entre los días 11 y 15 de la gestación y luego disminuyen^(13,15), al igual que la caspasa-1 y el factor de transcripción NF- κ B⁽¹⁶⁾. También, durante el período de implantación, se ha descrito un aumento de expresión del receptor de IL-1 en tejidos de placenta materna, confirmando la efectiva señalización de IL-1 β ⁽¹⁵⁾.

La cerda posee una placenta de tipo epiteliochorial, no invasiva, adecuada, plegada y difusa⁽¹⁷⁾ y se sabe que en distintas etapas de la gestación predomina un ambiente proapoptótico, producto del desarrollo de las vellosidades trofoblásticas y constante remodelación placentaria.⁽¹⁸⁾ Hay numerosos trabajos que demuestran el rol de la IL-1 β en el diálogo que se establece entre el trofoblasto y el endometrio porcino para una correcta implantación^(12,14,16) pero aún no se ha estudiado qué ocurre con esta citoquina, tanto a nivel placentario como sistémico, durante el periodo posterior a la implantación. El período de gestación tardía cumple con etapas cruciales para su desarrollo exitoso y en

los cuales la IL-1 β puede estar involucrada. El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración de IL-1 β en suero, endometrio de cerdas no gestantes y en placenta materna y fetal de distintos periodos gestacionales.

Materiales y métodos

ANIMALES

Se utilizaron 23 tractos reproductivos de cerdas destinadas a faena, entre segundo y tercer parto, mestizas (Landrace x Large White) con periodos gestacionales comprendidos entre los 30 y 114 días de gestación (dg) y 8 úteros de cerdas no gestantes. Los tractos se obtuvieron de frigoríficos de la zona de General Pico, provincia de La Pampa, Argentina (35° 45' y 63° 50' de latitud y longitud, respectivamente), a excepción de 5 muestras placentarias de cerdas a término que se recolectaron en criaderos de la zona durante el parto. La sanidad de los animales fue acreditada mediante evaluación de su historia clínica a través de una entrevista con el productor y por examen post-mortem, incluyendo análisis clínicos, parasitológicos y bacteriológicos.

TRACTOS REPRODUCTIVOS

Los tractos reproductivos gestantes (23) se obtuvieron de cerdas que se encontraban en diferentes periodos gestacionales: 30-35 días de gestación (en adelante 30 dg; n=7), 60 días (n=4), 70 días (n=4) y 114 días (n=8). Se tomaron esos periodos para los estudios ya que en ellos la gestación cumple con etapas cruciales para su desarrollo exitoso: a los 30 días comienza la osificación, el desarrollo del sistema inmunológico⁽¹⁹⁾ y la placenta se encuentra en plena etapa de crecimiento exponencial y desarrollo de las vellosidades trofoblásticas.⁽²⁰⁾ En el periodo de 60-70 días de preñez se alcanza el mayor crecimiento placentario y continúa su desarrollo en estado de meseta, de modo que el feto comienza a crecer de manera exponencial. Aquí también se observa la mayor remodelación placentaria celular determinada por estudios de apoptosis.⁽¹⁸⁾ El periodo a término se escogió ya que indica el fin de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la gestación. Se determinó la edad gestacional de acuerdo al promedio de la longitud céfalo-caudal de los embriones/fetos obtenidos de cada cerda según la tabla desarrollada por Marrable,⁽²¹⁾ utilizando un calibre y regla manual. Inmediatamente después de recolectados, los tractos reproductivos se lavaron con solución salina de Hank's (SSH)

(136,9 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 3,7 mM NaH₂PO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 4,2 mM NaHCO₃, 0,7 mM MgSO₄, 5,5 mM D-glucosa y 10 mM HEPES), con 10.000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina y 2,5 µg/ml de fungizona, y se guardaron a 4°C para su traslado y procesamiento en el laboratorio.

En las cerdas gestantes de 30, 60 y 70 dg se realizó la palpación de los cuernos uterinos para detectar la ubicación de los embriones o fetos. Luego los cuernos uterinos se incidieron por la curvatura mayor para observar el sitio de implantación y recoger las muestras de tejido placentario. Dado el tipo de placenta no invasiva, se separó fácilmente la placenta fetal de la materna para obtener muestras de cada estructura por separado. Cada placenta fetal fue extraída y colocada en la mesada. Se analizó su estructura anatómica, se la pesó, midió su longitud y se procedió a la extracción de muestras placentarias de la porción embrionaria, zona en la placenta fetal que contiene al embrión propiamente dicho rodeado por el saco amniótico, el alantoides y la membrana corio-alantoidea. El útero gestante se analizó macroscópicamente confirmando su estructura normal y se tomaron muestras de la porción embrionaria de cada unidad feto-materna. Con respecto a las placentas de 114 dg, éstas fueron obtenidas al momento del parto y llevadas refrigeradas al laboratorio. Se procedió a la toma de muestras de la placenta fetal de 114 dg con la misma técnica anteriormente mencionada. Por otro lado, se trabajó con úteros de cerdas no gestantes para utilizarlos como control. Las muestras de endometrio se extrajeron de la curvatura mayor tanto del cuerno izquierdo como del cuerno derecho.

OBTENCIÓN DE SUERO

En el caso de muestras provenientes de frigorífico, a cada animal se le extrajo sangre por corte de la vena yugular. En el caso de las cerdas con gestación a término se le realizó la extracción sanguínea por el método de flebopunción. La vena de elección fue la vena medial de la oreja. Una vez extraída la sangre, se la mantuvo a temperatura ambiente hasta lograr la adecuada retracción del coágulo y el exudado del suero. A fin de clarificar el suero, se lo centrifugó a 500 *g* durante 10 minutos. Se fraccionó el suero en alícuotas, se rotuló y conservó a -20 °C hasta su uso.

OBTENCIÓN DE HOMOGENATOS DE PLACENTA MATERNA, HOMOGENATOS DE PLACENTA FETAL Y DE ÚTERO NO GESTANTE PORCINO

Los homogenatos de placenta porcina materna (HoPM) y homogenatos de placenta porcina fetal (HoPF) se obtuvieron según el protocolo descrito por Koncurat et al. (1999)⁽²²⁾ Se extrajeron del tracto reproductivo muestras de aproximadamente 5 g de tejido placentario porcino materno o fetal y se las trituro y maceró con tres partes de solución fisiológica a fin de obtener una masa homogénea. Luego se centrifugó el tejido homogeneizado a 500 g por 20 minutos y el sobrenadante se alícuotó y conservó a -20°C . Con respecto a los extractos de útero no gestante (HoU), se extrajo de cada cuerno uterino en la zona de la curvatura mayor una muestra de 5 g de tejido. Luego, dichas muestras extraídas fueron procesadas con la misma técnica previamente descrita.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-1 β EN HOMOGENATOS DE PLACENTA MATERNA, HOMOGENATOS DE PLACENTA FETAL Y DE ÚTERO NO GESTANTE PORCINO Y SUEROS DE CERDAS GESTANTES Y NO GESTANTES

La determinación de IL-1 β se realizó por enzima inmunoanálisis (ELISA)⁽²³⁾ en homogenatos de útero porcino no gestante, homogenatos de placenta porcina materna y fetal y sueros de cerdas no gestantes y gestantes provenientes de los diferentes períodos de gestación estudiados. En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura anti-IL-1 β porcino (ab100754, Abcam, USA) se adicionaron 100 μl por pocillo de cada estándar y muestra en los pocillos determinados. Se cubrió la placa y se la incubó toda la noche en heladera (4°C). Luego de la incubación se descartó la solución y se lavó la placa 4 veces con solución de lavado. Se adicionaron 100 μl de anticuerpo anti-IL-1 β porcino biotilado a cada pocillo. Se incubó la placa por 1 hora a temperatura ambiente en un agitador horizontal de microplaca a 200 rpm (DPC, USA). Se descartó la solución y se lavó 4 veces con solución de lavado. Se adicionaron 100 μl de solución estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Streptavidina-HRP) a cada pocillo. Se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente con una suave agitación. Se descartó la solución y se lavó la placa 4 veces. Se colocaron 100 μl de sustrato tetrametilbencidina (TMB) en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 μl /pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK® Instruments, Inc. USA). La concentración de IL-1 β presente en cada una de las muestras se determinó utilizando una curva estándar⁽²³⁾

Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos de la determinación de IL-1 β en sueros, extractos placentarios y extractos de útero no gestante, éstos fueron ordenados en los 4 periodos de gestación elegidos: 30 dg, 60 dg, 70 dg y 114 dg; y cerdas no gestantes (NG). Las diferencias entre las concentraciones de la citoquina de los diferentes periodos de gestación fueron analizadas mediante un análisis de varianza y el test de Tukey ($p < 0,05$), una prueba de comparaciones múltiples.

Resultados

DETERMINACIÓN DE IL-1 β EN SUERO

Para iniciar el estudio del rol de IL-1 β en el transcurso de la gestación media-tardía, mediante la técnica de ELISA se determinaron las concentraciones séricas de la citoquina. Las concentraciones séricas de IL-1 β fueron basales y similares tanto en las cerdas no gestantes como en las gestantes de 30, 60 y 70 dg. A los 114 dg, el valor de esta citoquina se incrementó significativamente ($306,25 \pm 53,55$ pg/ml; $p = 0,0227$) (Figura 1), aumentando su concentración 300 veces respecto a las determinadas en el resto de las muestras.

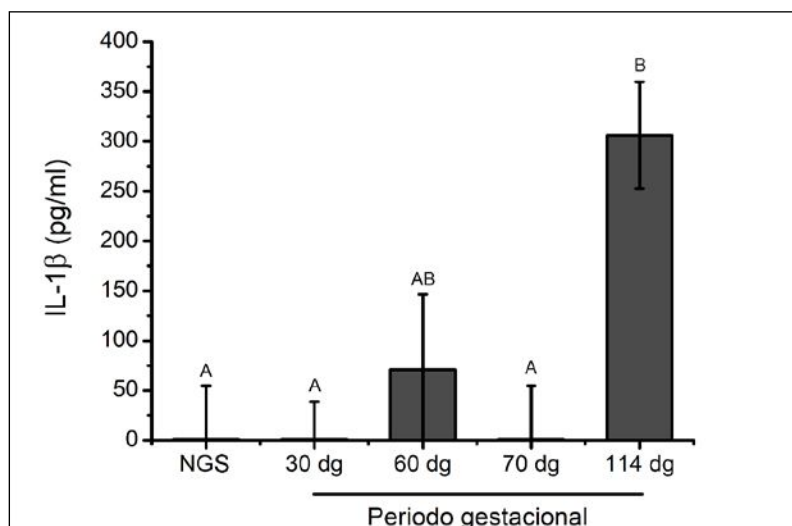


Figura 1: Concentración sérica de IL-1 β (pg/ml) entre cerdas no gestantes (NGS) y diferentes periodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

DETERMINACIÓN DE IL-1 β EN HOMOGENATOS DE PLACENTA MATERNA (HoPM)

Luego de obtener los homogenatos de placenta materna como se indicó en materiales y métodos, mediante ELISA se determinó la expresión de IL-1 β en los diferentes periodos gestacionales estudiados (30, 60, 70 y 114 dg). Se hallaron diferencias significativas en la concentración de IL-1 β en homogenatos de placenta materna entre los diferentes periodos gestacionales, llegando a un valor máximo a los 70 dg (254,16 pg/ml) (Figura 2). Luego de este pico, la concentración de esta citoquina disminuyó significativamente en placenta materna llegando incluso a una concentración menor que la determinada en homogenatos uterinos de cerdas no gestantes.

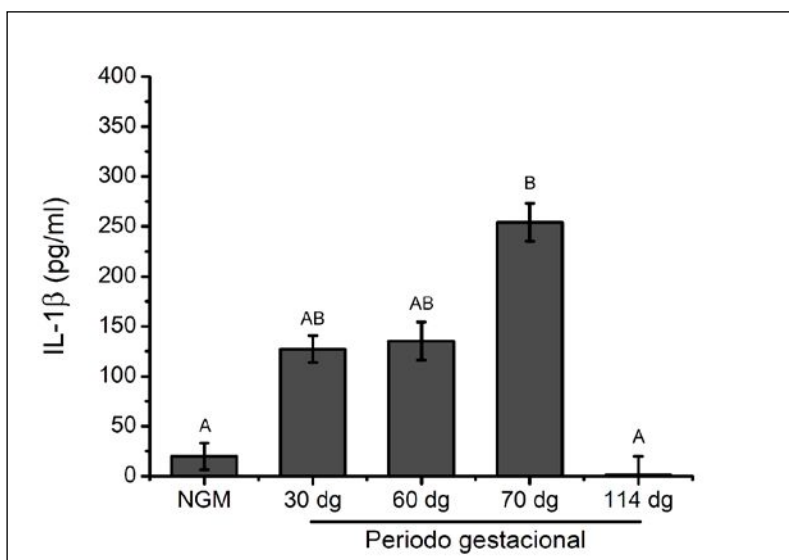


Figura 2: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM de los periodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

DETERMINACIÓN DE IL-1 β EN HOMOGENATOS DE PLACENTA FETAL (HoPF)

Finalmente, se determinó la expresión de IL-1 β por ELISA en homogenatos de placenta fetal de los diferentes periodos gestacionales estudiados. Los resultados mostraron un patrón similar al encontrado en las muestras de homogenatos de placenta materna, con diferencias significativas entre los distintos periodos gestacionales estudiados,

pero con un desplazamiento de la curva hacia los 60 dg. La concentración de IL-1 β en placenta fetal aumentó a los 30 dg (136,43 pg/ml), con un pico en su concentración a los 60 dg (261,06 pg/ml), luego su concentración bajó a los 70 dg (138,48 pg/ml) y descendió significativamente a los 114 dg (1 pg/ml; $p=0,0012$) (Figura 3).

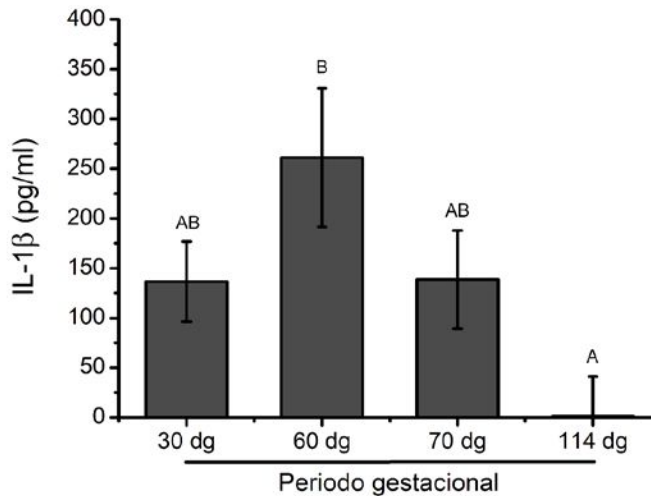


Figura 3: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en muestras de HoPF en los diferentes periodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Discusión

Se sabe que la placenta es un órgano transitorio integrado por estructuras de origen fetal y materno, y existen moléculas involucradas en el mantenimiento de la arquitectura y placentación exitosa. Particularmente el trofoblasto porcino se halla en íntimo contacto con el epitelio uterino, donde se encuentran los antígenos fetales en contacto con los tejidos maternos, lo que genera que durante la gestación, el sistema inmune materno sea regulado hacia un tipo de respuesta Th1-Th2-Th3-Tr1, generando así la tolerancia materna^(24,25) En concordancia con los trabajos de Geisert y *col.* (2015)⁽¹²⁾ y Mathew (2015)⁽¹⁶⁾ en gestación porcina temprana, la IL-1 β en la interfase feto-materna, cumpliría el rol de crear un ambiente de tipo proinflamatorio propicio para una correcta placentación; ya que hemos hallado, además, la presencia de esta citoquina tanto en tejido placentario como en suero luego del periodo de implantación.

Con respecto a los niveles locales placentarios de la IL-1 β durante la gestación porcina, Tuo y col. (1996)⁽¹³⁾ hallaron expresión de ARNm en *conceptus* y placenta fetal, desde los 11 dg hasta los 45 dg, luego sus niveles bajaron significativamente. Sin embargo, en este trabajo, se encontró que la IL-1 β presentó un pico en su concentración en placenta fetal a los 60 dg y en placenta materna a los 70 dg. En ambos casos la concentración de IL-1 β disminuyó a los 114 dg. El periodo comprendido entre los 60 y los 70 días es un momento de cambios importantes en la gestación porcina, se produce la etapa de mayor remodelación placentaria. A los 60 dg la placenta finaliza su crecimiento exponencial, con generación de vellosidades secundarias y terciarias, para poder sostener el peso de los fetos, que pronto comenzarán su etapa de crecimiento exponencial⁽¹⁸⁾ La alta concentración de IL-1 β , tanto en placenta fetal a los 60 dg como en placenta materna a los 70 dg, sugiere la necesidad de un ambiente de tipo proinflamatorio en la interfase feto-materna para regular la apoptosis y la proliferación celular; mecanismos fundamentales para la placentación porcina.

En humanos y bovinos, se ha demostrado que durante el parto normal o prematuro existe un aumento de citoquinas como IL-1 β , IL-2, TNF α , IFN γ , IL-8 e IL-12 en tejido cervical; hecho que favorecería la activación de macrófagos, neutrófilos y células NK. Por otro lado, estas citoquinas producirían un aumento de prostaglandinas que facilitarían las contracciones uterinas y de metaloproteasas que facilitarían el desgarro y dilatación cervical^(26,27,28,29,30) En el presente trabajo hemos observado que los niveles séricos de IL-1 β permanecen basales durante la gestación pero que aumentan significativamente al final de la misma, probablemente con el único objetivo de activar el sistema inmune proinflamatorio a fin de preparar la expulsión de las placentas en el parto. Estos resultados demuestran que, independientemente del tipo de placenta y del poder de invasión del trofoblasto durante la gestación, para que se genere el parto se requiere de un ambiente útero-placentario proinflamatorio al final de la gestación.

Conclusión

Los resultados demostraron que la IL-1 β se halló presente en la interfase feto-materna durante la gestación porcina en los períodos de mayor remodelaje tisular placentario (60-70 dg); y en suero a término, probablemente para facilitar la expulsión de las placentas durante el parto.

Bibliografía

1. Dinarello, CA., Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 2011. 117(14): 3720-32.
2. Garlanda, C.; Dinarello CA. and Mantovani, A., The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 2013. 39(6): 1003-18.
3. Geisert, R.; Fazleabas, A.; Lucy, M. and Mathew, D., Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1beta. *Cell Tissue Res*, 2012. 349(3): 825-38.
4. Pizarro, TT. and Cominelli, F., Cloning IL-1 and the birth of a new era in cytokine biology. *J Immunol*, 2007. 178(9): 5411-2.
5. Dinarello, CA., Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: 519-50.
6. Lamkanfi, M., Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(3): 213-20.
7. Martinon, F.; Burns, K. and Tschopp, J., The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 2002. 10(2): 417-26.
8. Casadio, R.; Frigimelica, E; Bossù, P; et al., Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. *FEBS Lett*, 2001. 499(1-2): 65-8.
9. Walsh, MC.; Kim, GK.; Maurizio, PL; Molnar, EE. and Choi, Y., TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. *PLoS One*, 2008. 3(12): e4064.
10. Takaesu, G.; Ninomiya-Tsuji, J.; Kishida, S.; Li, X.; Stark, GR. and Matsumoto, K., Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(7): 2475-84.
11. Kridli, RT; Khalaj, K.; Bidarimath, M. and Tayade, C., Placentation, maternal-fetal interface, and conceptus loss in swine. *Theriogenology*, 2016. 85(1): 135-44.
12. Geisert, RD.; Johnson, GA. and Burghardt, RC., Implantation and Establishment of Pregnancy in the Pig. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2015. 216: 137-63.
13. Tuo, W.; Harney, JP. and Bazer, FW., Developmentally regulated expression of interleukin-1 beta by peri-implantation conceptuses in swine. *J Reprod Immunol*, 1996. 31(3): 185-98.
14. Ross, JW.; Ashworth, MD.; Hurst, AG.; Malayer, JR. and Geisert, RD., Analysis and characterization of differential gene expression during rapid trophoblastic elongation in the pig using suppression subtractive hybridization. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. 1: 23.
15. Ross, JW.; Malayer, JR.; Ritchey, JW. and Geisert, RD., Characterization of the interleukin-1beta system during porcine trophoblastic elongation and early placental attachment. *Biol Reprod*, 2003. 69(4): 1251-9.

-
16. Mathew, DJ.; Newsom, EM.; Guyton, JM.; Tuggle, CK.; Geisert, RD. and Lucy, MC., Activation of the transcription factor nuclear factor-kappa B in uterine luminal epithelial cells by interleukin 1 Beta 2: a novel interleukin 1 expressed by the elongating pig conceptus. *Biol Reprod*, 2015. 92(4): 107.
 17. Amoroso, EC., Placentation. Parkes, A.S., Ed., *Marshall's Physiology of Reproduction*, Longmans Green, London. , 1952: 127-311.
 18. Marrable, AW., *The Embryonic Pig: A Chronological Account*. Ed. Pitman Medical Exeter. London., 1971.
 19. Butler, JE.; Lager, KM.; Splichal, I., et al., The piglet as a model for B cell and immune system development. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009. 128(1-3): 147-70.
 20. Wooding, P. and Burton, G., *Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution*. Cambridge, United Kingdom, Ed. Springer, 2008: 105-114.
 21. Cristofolini, A.; Sanchis, G.; Moliva, M., et al., Cellular remodelling by apoptosis during porcine placentation. *Reprod Domest Anim*, 2013. 48(4): 584-90.
 22. Koncurat, M.; Greco, C. and Vivas, A. , Hallazgo del factor precoz de preñez (EPF) en extractos placentarios porcinos. *Rev Bras Reprod Anim.*, 1999. 3(193-195).
 23. Margni, R., *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos*. 5th ed. Panamericana EM, editor. Buenos Aires., 1996: 799-851.
 24. Baraño, RI., et al., Determination of IL-1 and IL-6 levels in human embryo culture-conditioned media. *Am J Reprod Immunol*, 1997. 37(2): 191-4.
 25. Raghupathy, R., Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol*, 2001. 13(4): 219-27.
 26. Winkler, M.; Fischer, DC.; Ruck, P., et al., Parturition at term: parallel increases in interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. *Hum Reprod*, 1999. 14(4): 1096-100.
 27. Winkler, M.; Oberpichler, A.; Tschesche, H.; Ruck, P.; Fischer, DC.; Rath, W., Collagenolysis in the lower uterine segment during parturition at term: correlations with stage of cervical dilatation and duration of labor. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. 181(1): 153-8.
 28. van Engelen, E.; de Groot, MW.; Breeveld-Dwarkasing, VN., et al., Cervical ripening and parturition in cows are driven by a cascade of pro-inflammatory cytokines. *Reprod Domest Anim*, 2009. 44(5): 834-41.
 29. Young, A.; Thomson, AJ.; Ledingham, M.; Jordan, F.; Greer, IA. and Norman, JE., Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod*, 2002. 66(2): 445-9.
 30. Sennstrom, MB.; Ekman, G.; Westergren-Thorsson, G., et al., Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod*, 2000. 6(4): 375-81.