



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE INTEGRINAS, Y SU RELACIÓN CON LOS
NIVELES DE ESTEROIDES E INTERLEUQUINAS, DURANTE LA
PLACENTACIÓN PORCINA.**

AUTORA: M.V. WILLIAMSON, Delia María

DIRECTORA: Dra. KONCURAT, Mirta Adriana

CODIRECTOR: Dr. BARBEITO, Claudio Gustavo

LUGAR DE TRABAJO: Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. AGUILAR, José Javier (UNRC)

Dr. GIMENO, Eduardo Juan (UNLP)

Dr. de la SOTA, Rodolfo Luzbel (UNLP)

Año 2011

A mis amores, Ángel y Jazmín

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Dra. Mirta Koncurat por su trabajo, su constancia, aportes y su apoyo total.

A mi co-director Dr. Claudio Barbeito por las sugerencias y correcciones al presente trabajo.

A los miembros jurados de esta tesis, Dr. José Javier Aguilar, Dr. Eduardo Juan Gimeno y Dr. Rodolfo Luzbel de la Sota por las sugerencias que contribuyeron al mejoramiento de la presente tesis.

A mis padres, Delia y Carlos por el acompañamiento que me hicieron.

A mi marido Ángel por el apoyo brindado y el sacrificio realizado, a mi hijita Jazmín que llegó a mi vida en las últimas instancias de éste trabajo.

A mis compañeros de investigación por el trabajo en conjunto realizado y la amistad compartida.

A todos los que hicieron posible que se realizara éste trabajo.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLPam por haberme permitido realizar este estudio y brindarme ayuda económica.

Al CONICET, por brindarme su confianza al otorgarme dos becas de postgrado que posibilitaron la realización de ésta tesis.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE PUBLICACIONES	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
LISTA DE TABLAS	XVI
LISTA DE FIGURAS.....	XVIII
RESUMEN.....	XXVII
SUMMARY	XXIX
1. PRÓLOGO.....	XXXI
2. INTRODUCCIÓN.....	1
Placenta.....	2
Placenta Porcina.....	3
Las integrinas.....	8
Las integrinas en la reproducción.....	10
Hormonas gestacionales.....	12
Progesterona.....	13
Estrógenos.....	14
Sistema inmunológico.....	15
Sistema inmunológico en la reproducción.....	16
Interferones.....	19
IFN- γ	20

Interleuquina-6.....	21
Interleuquina-12.....	22
Interleuquina-15.....	23
Interleuquina-18.....	24
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
Hipótesis.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Animales y tractos reproductivos.....	27
Extracción de sangre.....	28
Obtención de suero.....	28
Determinación de la edad gestacional.....	29
Procesamiento del tejido placentario.....	29
Obtención de homogenatos de placenta porcina materna (HoPM) y fetal HoPF) y de útero no peñado porcino (HoU).....	29
Determinación de hormonas en homogenatos de placenta porcina (HoPP) y sueros porcinos.....	29
Determinación de citoquinas en homogenatos de placenta porcina (HoPP) y sueros porcinos.....	30
Determinación de IFN- γ	30
Determinación de Interleuquina-6.....	31
Determinación de Interleuquina-12.....	31
Determinación de Interleuquina-15.....	32

Determinación de Interleuquina-18.....	32
Análisis de la estructura de la placenta y útero. Técnica para Microscopía Óptica.....	33
Determinación de Integrinas.....	33
Análisis estadístico.....	35
4. RESULTADOS	36
Análisis microscópico de la estructura de la placenta y de útero.....	36
Determinación de integrinas.....	38
Expresión de la Integrina $\beta 1$	38
Expresión de la Integrina $\alpha 3$	41
Expresión de la Integrina $\beta 3$	44
Expresión de la Integrina $\alpha \nu \beta 3$	49
Determinación de hormonas.....	55
Determinación de progesterona.....	56
Concentración de progesterona (ng/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0) y homogenatos de placenta materna.....	56
Concentraciones de progesterona (ng/ml) en homogenatos de placenta fetal.....	57
Concentración de progesterona (ng/ml) en suero.....	58
Determinación de estrógenos.....	60
Concentración de estrógenos (pg/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0) y homogenatos de placenta materna.....	60

Concentración de estrógeno (pg/ml) en homogenatos de placenta fetal.....	61
Concentración de estrógeno (pg/ml) en suero.....	62
Determinación de interleuquinas.....	64
Determinación de IFN- γ	64
Determinación de IL-6.....	67
Determinación de IL-12.....	68
Determinación de IL-15.....	70
Determinación de IL-18.....	72
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	75
Discusión.....	75
Conclusiones.....	88
6. BIBLIOGRAFÍA.....	90
7. ANEXOS.....	104

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

1. Williamson D y Koncurat M. Estudio preliminar de la expresión de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas durante la placentación porcina. XXII Jornadas Científicas, Asociación de Biología de Tucumán. 27, 28 y 29 de octubre. Tafí del Valle. Tucumán. Argentina. 2005.
2. Williamson D y Koncurat M. Estudio de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ y de la subunidad $\beta 1$ durante la placentación porcina. Memorias del V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 2006. Pag. 265.
3. Williamson D y Koncurat M. Detección de la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas durante la placentación porcina. XXIII Jornadas Científicas. Asociación de Biología de Tucumán. 28-30 de septiembre de 2006. Tafí del Valle. Tucumán. Pag. 257.
4. Williamson D and Koncurat M. Expression of $\beta 1$ and $\alpha 3$ integrin subunits during porcine gestation. XXIV Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. 1- 2 de diciembre. Potrero de los Funes, San Luis. 2006. Pag. 130.
5. Williamson D, Alonso G, Hernandez M y Koncurat M. Expresión de la subunidad $\beta 3$ de las integrinas durante la placentación porcina. Primera Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina, 17-19 de agosto. Hotel Casa Serrana, Huerta Grande, Córdoba. 2007.
6. Williamson D, Riesco O, Alonso G, Hernandez M, Moschetti E and Koncurat M. Estrogen, progesterone and integrins during porcine placentation. III Latin-

American Symposium on Maternal-Fetal Interaction Placenta-Research & Clinical. 4-7 de noviembre. Los Cocos, Córdoba, Argentina. 2007.

7. Riesco O; Yaful G; Williamson D y Koncurat M. Estudio comparativo de radioinmunoanálisis y quimioluminiscencia en la determinación de progesterona en sueros y homogenatos placentarios maternos y fetales porcinos. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas, I Congreso Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas, I Encuentro de Histotecnólogos. 14-16 de Mayo. Córdoba, Argentina. 2008.
8. Williamson D y Koncurat M. Expresión de la integrina $\alpha\beta3$ y de las subunidades $\alpha3$ y $\beta1$ en la placentación porcina. En: Memorias del IX Congreso Nacional de Producción Porcina. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 2008
9. Koncurat M, Viglierchio M , Hernández M y Williamson D. Detección de la integrina $\alpha\beta3$ durante la placentación porcina. En: I Jornadas Patagónicas de Biología y III Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas. 11-14 de marzo de 2009. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Chubut. 2009.
10. Williamson D, Clauzure M y Koncurat M. Expresión de la subunidad $\beta1$ de las integrinas durante la gestación temprana porcina. En: VI Jornada de Ciencia y Técnica. 7 de agosto de 2009. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. General Pico, La Pampa. 2009. (Se recibió Premio a la mejor presentación científica en la sección poster).

11. Torres P, Toribio M, Lacolla D, Yaful G, Soler I, Adagio L, Sanfilippo S, Viglierchio M, Williamson D y Cesán R. Factores de riesgos en el desgranamiento estudiantil en la facultad de veterinaria de La Pampa. estudio preliminar de la cohorte 2000. En: VI Jornada de Ciencia y Técnica. 7 de agosto de 2009. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. General Pico, La Pampa. 2009.
12. Sanchis G, Williamson D, Cristofolini A, Merkis C y Koncurat M. Inmunoexpresión de osteopontina e integrina $\alpha v \beta 3$ en tejidos placentarios porcinos. estudio preliminar. En: XVII Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. 12-14 de agosto de 2009. Sociedad de Biología de Córdoba. Huerta Grande, Córdoba. 2009.
13. Williamson D y Koncurat M. Expresión de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 3$ y $\beta 1$ de las integrinas y de $\alpha v \beta 3$ durante la gestación temprana porcina. En: XVII Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. 12-14 de agosto de 2009. Sociedad de Biología de Córdoba. Huerta Grande, Córdoba. 2009.
14. Torres P, Toribio M, Lacolla D, Yaful G, Soler I, Adagio L, Sanfilippo S, Viglierchio M, Williamson D, Cesán R. Permanencia estudiantil de la cohorte 2000 en la Facultad de Ciencias Veterinaria de La Pampa. En: 4º Encuentro de investigadores en didáctica de la biología. ADBIA. 3-5 de junio de 2010. General Roca, Río Negro. 2010.
15. Williamson D, Riesco O, Velez C y Koncurat M. Determinación de la concentración de IL-18, IL-15 e IL-12 en suero, homogenatos placentarios maternos

y fetales durante la gestación porcina. En: X° Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; X° Congreso Nacional de Producción Porcina. 8 al 11 de agosto de 2010. Mendoza Capital. (ISBN: 978-950-665-616-4), Pp: 277. Con referato.

16. Koncurat M, Yaful G, Riesco O y Williamson D. Determinación de IL-6, progesterona y estrógenos en la preñez porcina temprana. En: Asociación de Biología de Tucumán, XXVII Jornadas Científicas. 13-15 de octubre de 2010. Tafí del Valle, Tucumán, Argentina. 2010.
17. Koncurat M, Williamson D, Velez C y Riesco O. Concentration of IL-6, IL-12 and IFN γ in serum and placental extracts during porcine gestation. En: First French-Argentine Immunology Congress. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 2-5 noviembre, 2010. Buenos Aires, Argentina. 2010.

PUBLICACIONES

1. Williamson D and Koncurat M. Preliminary study of expression of subunit β 1 of integrins during porcine placentation. *Biocell* 2006; 30(1): 219. ISSN: 0327-9545.
2. Williamson D and Koncurat M. Expression of β 1 and α 3 integrin subunits during porcine gestation. *Biocell* 2007. 31(1):178. ISSN 0327-9545.
3. Riesco O; Yaful G; Williamson D; Koncurat M. Comparative study of radioimmunoassay and chemiluminescence in progesterone determination in serum

and fetal and placental maternal porcine homogenates. *International Journal of Morphology*. 2008; 26(3):734. *versión On-line* ISSN 0717-9502.

4. Williamson D; Yaful G; Riesco O y Koncurat M. Progesterona, Estrógenos y Expresión de Integrinas en la Gestación Temprana Porcina. *Ciencia Veterinaria*, 10(1):13-22. 2008. Con referato. ISSN: 1515-1883.
5. Williamson DM y Koncurat MA. Expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ y de las subunidades de integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$ durante la placentación porcina. *InVet* 2009; 11(1): 31-37. ISSN 1514-6634.
6. Sanchis G, Williamson D, Cristofolini A, Merkis C y Koncurat M. Osteopontin and $\alpha v\beta 3$ integrin immunoexpresion in porcine placental tissues. Preliminar study. *Biocell*, 33(3):A256.2009. Con referato. ISSN 0327-9545.
7. Williamson D, Sanfilippo S and Koncurat M. Expression of $\alpha 3$, $\beta 3$ and $\beta 1$ integrin subunits and $\alpha v\beta 3$ during early porcine gestation. *Biocell* 33(3):A267. 2009. Con referato. ISSN: 0327-9545.

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpos.

Ag: Antígenos.

ARNm: Acido ribonucleico mensajero.

CL: Cuerpos lúteos.

CSF: Factor de estimulación de colonias.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

DAB: Diaminobencidina.

DPC: Diagnostic Product Corporation.

ELISA: Enzima inmunoanálisis.

E₂: Estrógenos.

FAK: Quinasa de adhesión focal.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FasL: Receptor de muerte celular transmembrana con su ligando específico.

Fet: Fetal.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

G: Glucógeno.

GF: Factor de crecimiento.

HE: Hematoxilina eosina.

HLA: Antígeno leucocitario humano.

HoPF: Homogenato de placenta porcina fetal.

HoPM: Homogenato de placenta porcina materna.

HoPP: Homogenato de placenta porcina.

HoU: Homogenato útero no preñado porcino.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

IFM: Interfase feto-materna.

IFN: Interferón.

IgG: Inmunoglobulina G.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IL: Interleuquina.

IL-R: Receptor de interleuquina.

IL-18 BP: Proteína de unión a la IL-18

LGL: Linfocitos granulares grandes.

LIF: Factor inhibidor de leucemia.

LSAB: Labeled strptavidin biotin method.

M: Mitocondria.

Mat: Materno.

MEC: Matriz extracelular.

MCPP: Medio condicionado de placenta porcina.

N: Núcleo.

NK: Célula natural killer.

NKu: Célula natural killer uterina.

P₄: Progesterona.

PBS: Solución salina tamponada.

PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}.

PKC: Proteína quinasa C.

proIL-18: Precursor de la IL-18.

RIA: Técnica de radioinmunoanálisis.

SLA: Antígenos leucocitarios suínos.

SSH: Solución salina de Hank's.

Streptavidina-HRP: Solución Streptavidina –Peroxidasa de rábano picante.

Th: helper: Linfocitos T auxiliares.

TM: Toneladas métricas.

TMB: Tetrametilbencidina.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TRAIL: Ligando inducido por apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral α .

TrIFN- γ : IFN- γ trofoblástico porcino.

LISTA DE TABLAS

Tabla

1.	Expresión de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales.....	39
2.	Expresión de la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales.....	42
3.	Expresión de la subunidad $\beta 3$ de las integrinas en útero vacío y placentas diferentes períodos gestacionales.....	45
4.	Expresión de la integrina $\alpha \nu \beta 3$ en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales.....	50
5.	Determinación de P_4 por Quimioluminiscencia y RIA en HoPM, HoPF y suero en diferentes períodos gestacionales.....	55
6.	Concentración P_4 (ng/ml) en HoPM, HoPF y suero de cerdas vacías y de diferentes períodos de gestación..	56
7.	Concentración E_2 (pg/ml) en HoPM, HoPF y suero de cerdas vacías y de diferentes períodos de gestación..	60
8.	Concentración IFN- γ (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.....	64
9.	Concentración IL-6 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.....	67

10. Concentración IL-12 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.....68
11. Concentración IL-15 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.....70
12. Concentración IL-18 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.....72

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Eventos que ocurren durante el inicio de la gestación en el cerdo, desde la fecundación hasta el proceso de elongación del *conceptus*. Adaptado de Bazer *et al.*, 2009.....5
2. Eventos que ocurren durante la implantación del *conceptus* en el cerdo. Implantación en especies no invasivas y adecuadas. 1- Desprendimiento de la zona pelúcida; 2- Precontacto y orientación del blastocisto; 3- Aposición; 4- Adhesión. Modificado de Bazer *et al.*, 2009.5
3. Esquema de la circulación de sustancias en la placenta porcina. A: porción areolar; B: porción interareolar; C: porción “lacunar”. Las flechas indican la probable dirección de los nutrientes al feto. 1- circulación fetal; 2- células mesenquimatosas del corion fetal; 3- trofoblasto o trofoectodermo; 4- epitelio uterino; 5- glándulas uterinas endometriales; 6- células mesenquimatosas del endometrio; 7: circulación materna. Koncurat, 2003.....6.
4. Fotografía electrónica de una interfase feto-materna procedente de una placenta porcina porcina de 28 días de preñez. Nótese interdigitaciones de las microvellosidades del epitelio materno (**Mat**) y fetal (**Fet**) en la interfase feto materna (**IFM**), Se observan gran cantidad de cuerpos electrodensos (\blacktriangle), comunicación entre dichos cuerpos electrodensos (\uparrow), así como glucógeno (**G**) y mitocondrias (**m**). **N**: núcleo y \diamond unión tipo estrecha (tight) entre células epiteliales trofoblásticas. 5000x. Koncurat, 20037
5. Fotografía de placenta fetal de cerda de \pm 40 días de gestación.....8

6. Estructura de una integrina. Modificado de Alberts *et al.*, (2004).9
7. Fotografía de un tracto reproductivo de 90 días de gestación..27
8. Fotografía de una placenta fetal con su feto de 44 días de gestación.28
9. Microfotografía de un útero vacío donde se observa el epitelio uterino, lumen, glándulas endometriales y vasos sanguíneos, HE 100x.36
10. Microfotografía de una placenta porcina de 35 días de gestación. Se observa la presencia de la interfase feto-materna conformada por vellosidades fetales y maternas, glándulas uterinas y vasos sanguíneos. HE 100x.....37
11. Microfotografía de una placenta porcina materna de 114 días de gestación. Se aprecian las vellosidades maternas, vasos sanguíneos estromales e intraepiteliales y glándulas endometriales. HE 200x.....38
12. Microfotografía de interfase placentaria de 37 días de gestación donde se observa alta positividad de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas en las vellosidades fetales y maternas que conforman la interfase feto-materna y positividad intermedia en el tejido conectivo. IHQ 100x.40
13. Microfotografía de interfase placentaria de 80 días de gestación. La subunidad $\beta 1$ de las integrinas se manifiesta con alta intensidad en vellosidades fetales y vasos sanguíneos y con positividad intermedia en vellosidades maternas, glándulas uterinas y tejido conectivo tanto fetal como materno. IHQ 100x.41
14. Microfotografía de interfase feto-materno de 37 días de gestación. Se aprecia la expresión de $\alpha 3$ en las vellosidades fetales, maternas y vasos sanguíneos, así como

- en tejido conectivo fetal (+) y materno (++)). Las glándulas uterinas fueron negativas al marcaje de la subunidad $\alpha 3$. IHQ 100x.....43
15. Microfotografía de placenta materna de 60 días de gestación. Y se observa positividad intermedia de la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas en vasos sanguíneos y tejido conectivo materno. Se destaca la ausencia de la expresión de ésta integrina en las glándulas uterinas. IHQ 200x.44
16. Microfotografía de interfase placentaria de 37 días de gestación donde se aprecia alta expresión de $\beta 3$ a nivel de vellosidades maternas y fetales y en glándulas uterinas, así como en corion y tejido conectivo materno. IHQ 100x..46
17. Microfotografía de placenta de 60 días de gestación donde se observa el poco marcaje de $\beta 3$ en las vellosidades y la negatividad en las glándulas endometriales. IHQ 100x.47
18. Microfotografía de una interfase placentaria de 70 días de preñez donde se aprecia la expresión intermedia de $\beta 3$ en los tejidos maternos y la disminución en la intensidad del marcaje en el corion. IHQ 100x.48
19. Microfotografía donde se observa alta expresión de $\beta 3$ en las vellosidades de la interfase placentaria de 80 días de gestación. Se destaca la ausencia de expresión en las glándulas uterinas. IHQ 100x..49
20. Microfotografía de de un corte de tejido placentario materno de 37 días de gestación. Se aprecia el marcaje de $\alpha \nu \beta 3$ en las glándulas endometriales y en el estroma. IHQ 400x.....51

21. Microfotografía de una interfase feto-materno de 60 días de gestación con expresión baja de $\alpha\beta 3$ en las vellosidades placentarias. Y ausencia de expresión en glándulas uterinas. IHQ 100x.52
22. Microfotografía de una interfase de 70 días de gestación con alta expresión en las vellosidades fetales y baja expresión en vellosidades maternas y ausencia de marcaje en las glándulas endometriales. IHQ 100x.53
23. Microfotografía de corte placentario de 80 días de gestación con baja expresión de $\alpha\beta 3$ en las vellosidades fetales y sin expresión a nivel de vellosidades maternas y glándulas uterinas. IHQ 100x.54
24. Análisis de correlación de las concentraciones de P_4 determinadas mediante quimioluminiscencia y radioinmunoensayo en muestras de suero, y homogenatos de placentarios maternos y fetales, $n=30$, (polinomio lineal, $y=2.12+1.05^x$; $r^2=0.92$, $P<0.001$). Se presentan los valores promedios observados y los estimados por la función polinomial.55
25. Valores medios y desvío estándar de P_4 (ng/ml) en HoU y HoPM. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p<0,05$).56
26. Análisis de regresión de los valores de progesterona (ng/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0) y homogenato de placenta materna a distintos tiempos. Polinomio cúbico; $y = -1,8E-0,5x^3 + 0,0026x^2 - 0,063x + 0,6327$; R^2 ajustado = 0,2993; $p=0,0007$56
27. Valores medios y desvío estándar de P_4 (ng/ml) en HoPF. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p<0,05$).57

28. Análisis de regresión de los valores de progesterona (ng/ml) en homogenato de placenta fetal a distintos tiempos. Polinomio cúbico; $y = -0,0004x^3 + 0,0634x^2 - 1,3994x + 0,7045$; R^2 ajustado = 0,6613; $p < 0,0001$58
29. Valores medios de P_4 (ng/ml) en suero de cerdas en diferentes períodos gestacionales, día 0 corresponde a hembras vacías. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$)...58
30. Análisis de regresión de los valores de progesterona (ng/ml) en suero de hembras vacías (día 0) y en distintos períodos de gestación. Polinomio de cuarto orden; $y = -1,5E-05x^4 + 0,0037x^3 - 0,3005x^2 + 7,9384x + 18,6286$; R^2 ajustado = 0,7808; $p = 0,002$59
31. Valores medios de progesterona (ng/ml; desvío estándar) en HoPM y HoPF durante la gestación. Letras distintas indican diferencias significativas (ANAVA; $p < 0,0001$).).60
32. Valores medios y desvío estándar de E_2 (pg/ml) en HoU (día 0) y HoPM. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$)..... 60
33. Análisis de regresión de los valores de estrógeno (pg/ml) en homogenato de útero vacío y homogenato de placenta materna de distintos períodos de gestación. Polinomio cúbico; $y = 0,0211x^3 - 2,3182x^2 + 63,8439x + 688,4983$; R^2 ajustado = 0,9124; $p < 0,0001$61
34. Valores medios y desvío estándar de E_2 (pg/ml) en HoPF. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$).....61

35. Análisis de regresión de los valores de estrógeno (pg/ml) en homogenato de placenta fetal de distintos períodos de gestación. Polinomio cúbico; $y = 0,1087x^3 - 12,2038x^2 + 336,0042x + 540,0882$; R^2 ajustado = 0,8529; $p < 0,0001$62
36. Valores medios de estrógeno (pg/ml) y desvío estándar en suero de hembras vacías (día 0) y en cerdas de diferentes períodos de gestación. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$).....62
37. Análisis de regresión de los valores de estrógeno (pg/ml) en suero de cerdas vacías y de cerdas en diferentes períodos de gestación. Polinomio cuadrado; $y = 0,0895x^2 - 5,1611x + 32,2446$; R^2 ajustado 0,8594; $p < 0,0001$63
38. Valores medios de E_2 (pg/ml) y desvío estándar en suero, HoPM y HoPF. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$).....64
39. Concentración de IFN- γ (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.....65
40. Regresión de la concentración de IFN- γ (pg/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0) y homogenatos de placenta materna en distintos días de la gestación porcina. Los valores menores a 15 pg/ml fueron considerados iguales a 15 pg/ml. Polinomio cuadrado; $y = 0,0069x^2 - 1,2548x + 68,9588$; R^2 ajustado 0,7119; $p = 0,0101$.).....65
41. Regresión de la concentración de IFN- γ (pg/ml) en homogenatos de placenta fetal provenientes de distintos días de la gestación porcina. Los valores menores a 15 pg/ml fueron considerados iguales a 15 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y =$

- 0,0005x⁴ - 0,1508x³ + 17,6883x² - 895,6747x + 16510,964; R² ajustado = 0,995; p = 0,0033.....66
42. Regresión de la concentración de IFN- γ (pg/ml) en suero de cerdas vacías (día 0) y de cerdas en distintos períodos gestacionales. Los valores menores a 15 pg/ml fueron considerados iguales a 15 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = 0,0000064x^4 - 0,0019x^3 + 0,1944x^2 - 8,3933x + 140,3742$; R² ajustado = 0,9978; p = 0,0001.....66
43. Concentración de IL-6 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez..67
44. Regresión de los valores de IL-6 (pg/ml) en homogenato de placenta fetal en distintos períodos gestacionales. Los valores menores a 34 pg/ml fueron considerados iguales a 34 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = 0,0004x^4 - 0,1151x^3 + 13,0727x^2 - 6369792x + 11247,0769$; R² ajustado = 0,9626; p=0,001.68
45. Regresión de los valores IL- 6 (pg/ml) en suero de cerdas vacías y cerdas en distintos períodos de gestación. Los valores menores a 34 pg/ml fueron considerados iguales a 34 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = -0,0001x^4 + 0,0114x^3 - 0,57x^2 + 2,7512x + 281,6792$; R² ajustado = 0,6227; p = 0,0934.....68
46. Concentración de IL-12 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez..69
47. Regresión de los valores de interleuquina 12 (pg/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0) y homogenatos de placenta materna en distintos períodos gestacionales.

- Polinomio cuadrado; $y = 0,01x^2 - 1,13x + 127,21$; R^2 ajustado = 0,5707; $p = 0,0215$.).....69
48. Regresión de los valores de interleuquina 12 (pg/ml) en homogenato de placenta fetal en distintos períodos gestacionales. Polinomio cuadrado; $y = 0,0537x^2 - 9,3072x + 452,552$; R^2 ajustado = 0,4732; $p = 0,0617$70
49. Regresión de los valores de interleuquina 12 (pg/ml) en suero en cerdas vacías (día 0) y cerdas en distintos períodos gestacionales. Polinomio de cuarto orden; $y = -0,000016x^4 + 0,0035x^3 - 0,22x^2 + 4,4x + 14,49$; R^2 ajustado = 0,3943; $p = 0,1746$.).....70
50. Concentración IL-15 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.....71
51. Regresión de la concentración de interleuquina 15 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (días 0) y homogenatos de placenta materna en distintos períodos de gestación. Polinomio cúbico; $y = -1,4E-03x^3 + 0,24x^2 - 7,69x + 155,02$; R^2 ajustado = 0,03; $p = 0,4369$71
52. Regresión de la concentración de interleuquina 15 (pg/ml) en homogenato de placenta fetal en distintos períodos de gestación. Polinomio cúbico; $y = 0,02 x^3 - 3,54x^2 + 248,66 - 4622,31$; R^2 ajustado = 0,54; $p = 0,1733$.).....72
53. Regresión lineal de la concentración de interleuquina 15 (pg/ml) en suero de cerdas de distintos períodos gestacionales. $Y = -3,44x + 753,95$; $R^2 = 0,28$; $p = 0,1145$72
54. Concentración IL-18 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.)...73

55. Regresión de la concentración de interleuquina 18 (pg/ml) en homogenatos de útero vacío y homogenatos de placenta materna en distintos períodos gestacionales. Los valores menores a 39 pg/ml fueron considerados iguales a 39 pg/ml. Polinomio cúbico; $y = -0,0153x^3 + 3,3739x^2 - 231,1314x + 5086,898$; R^2 ajustado = 0,9206; $p = 0,0011$73
56. Regresión de la concentración de interleuquina 18 (pg/ml) en homogenato de placenta fetal en distintos períodos de gestación. Los valores menores a 39 pg/ml fueron considerados iguales a 39 pg/ml. Polinomio cuadrado; $y = -1,6814x^2 + 230,9114x - 5174,2698$; R^2 ajustado = 0,000037; $p = 0,4312$74
57. Regresión de la concentración de interleuquina 18 (pg/ml) en suero cerdas vacías y cerdas en distintos períodos gestacionales. Los valores menores a 39 pg/ml fueron considerados iguales a 39 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = -0,0002x^4 + 0,0551x^3 - 4,2293x^2 + 100,9257x + 213,2146$; R^2 ajustado = 0,1494; $p = 0,3888$74

TITULO Estudio de la presencia de integrinas, y su relación con los niveles de esteroides e interleuquinas, durante la placentación porcina.

PALABRAS CLAVES Porcinos – Placenta Materna y Fetal – Integrinas – Interleuquinas
– Hormonas Esteroides.

RESUMEN

Se estudió la expresión de integrinas en placentas porcinas de diferentes períodos gestacionales y su regulación por hormonas esteroideas y citoquinas. Se determinó integrinas por inmunoperoxidasa, concentración de progesterona por RIA, estrógenos por quimioluminiscencia e interferón- γ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 por ELISA. Las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\beta 3$ se encontraron en vellosidades y endometrio hacia los ± 37 días, mientras que $\beta 1$ expresó alta positividad desde los 37 días hasta el final de la preñez. Las glándulas uterinas fueron negativas a $\alpha 3$, mientras que las vellosidades expresaron marcaje durante la gestación. Se halló alta concentración de P_4 a partir de los 60 días ($45,6 \pm 20,77$ ng/ml) en homogenatos placentarios fetales hasta los 80 días, momento en que declina hasta el final de la preñez. También en estos extractos los E_2 fueron significativamente más altos ($41840 \pm 18724,07$ pg/ml) que los hallados en homogenatos placentarios maternos ($p < 0,0001$) al fin de la gestación. El IFN- γ , la IL-6 y la IL-12 mostraron un pico a los 32 días de gestación solo en los extractos fetales. Solo la IL-15 se mantuvo elevada durante la preñez, disminuyendo a término, lo que señalaría su probable regulación por la P_4 . La IL-18 se encontró en los extractos fetales a los $\pm 60-70$ días de preñez. En conclusión, las integrinas

acompañaron los aumentos de P_4 registrados en los extractos placentarios fetales. La alta expresión de α_3 en el trofoblasto acompañada de la baja expresión de $\alpha\beta_3$ y β_1 al final de la gestación, formaría parte de las señales moleculares que permiten el desprendimiento de la placenta. Se sugiere que la IL-15 estimularía la síntesis de IgG, mientras que las IL-12, IL-15 e IL-18 en momentos puntuales de la gestación, como del IFN- γ , señalarían el rol del sistema inmune innato en la preñez porcina.

TITLE Estudy of integrin presence and its relationship with steroid and interleukin levels during porcine gestation.

KEY WORDS Swines- Fetal and Maternal Placenta- Integrins- Steroid Hormones-

SUMMARY

The expression of integrin in porcine placenta of different gestational periods and its regulation by steroid hormones and cytokines was studied. Integrins by immunoperoxidase and IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-15 and IL-18 by ELISA were determined. Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\beta 3$ were found in villi and endometrium to ± 37 days, while $\beta 1$ expressed high positivity from day 37 until the end of pregnancy. Uterine glands were negative to $\alpha 3$ while villi expressed staining during gestation. P_4 high concentration was observed from 60d (45.6 ± 20.77 ng/ml) in homogenates of fetal placenta up to 80d, then declining till the end of pregnancy. Moreover in these extracts E_2 were significantly higher ($41,840 \pm 18,724.07$ pg/ml) than those found in homogenates of maternal placenta ($p < 0.0001$) by the end of gestation. IFN- γ , IL-6 and IL-12 showed a peak on day 32 of gestation only in the fetal extracts. IL-15 only remained high during pregnancy, decreasing at term, thus indicating its possible regulation by P_4 . IL-18 was found in fetal extracts at $\pm 60-70$ days of pregnancy. In conclusion, integrins accompanied P_4 increases recorded in the fetal placental extracts; P_4 decreased from 80 days, a period when E_2 increased. $\alpha 3$ high expression in the trophoblast accompanied by $\alpha v \beta 3$ and $\beta 1$ low expression at the end of pregnancy would be

part of the molecular signals that allow placental detachment. It is suggested that IL-15 would stimulate IgG synthesis while IL-12, IL-15 and IL-18 at specific times of gestation like that of IFN- γ would indicate the role of the innate immune system in porcine gestation.

PRÓLOGO

La producción animal porcina tiene en el campo de la reproducción uno de sus pilares, ya que en ella se fundamentan algunas de las estrategias para lograr la mayor cantidad de animales viables.

Los estudios de los factores que afectan los sucesos de fertilización y de éxito de la preñez son algunos de los de mayor importancia en la fisiología de la reproducción. Una de las causales de pérdida reproductiva en condiciones de normalidad, es la mortalidad embrionaria durante el período peri-implantacional.

En la región del sur de la provincia de Córdoba y norte de La Pampa el porcentaje de muerte embrionaria en porcinos es muy alta (52%, Bosch *y col.*, 2001). En la patogenia de éste proceso intervienen alteraciones en la migración de los embriones, su elongación, el reconocimiento inmunológico de la preñez por la madre y la competencia embrionaria por el lugar de implantación. A pesar de los numerosos trabajos científicos que existen sobre los períodos tempranos de la gestación porcina, aún permanecen gran cantidad de mecanismos sin dilucidar.

Según otros estudios, entre un 15 a 20 % de las pérdidas tienen su lugar entre los días 30 y 50 de preñez y luego ocurre un 5 a 10 % de muerte adicional entre los días 90 y 114 de gestación (Vonnahme *et al.*, 2002). Murphy *et al.*, (2009), al estudiar criaderos comerciales de Norteamérica encontraron dos ondas de pérdidas embrionarias y fetales durante la gestación porcina, la primera ocurre durante la adhesión del *conceptus* al endometrio uterino y provoca aproximadamente 30% de pérdidas y la segunda onda ocurre entre los días 50 y 70 de la preñez adicionando alrededor del 10 al 15% de pérdidas.

El tamaño de la camada, o sea el número de lechones nacidos por parto, es la variable biológica más importante para conseguir una producción porcina redituable. Wilson *et al.*, (2000), proponen que, aunque el mayor número de pérdidas embrionarias (30-40%) ocurre entre los 12 y 18 días de gestación, el número de embriones presentes al día 25 es mucho mayor que los animales que llegan a término. Además, postulan que si el número de *conceptus* vivos aumentan más allá de los 18 días de gestación, la capacidad del útero ejerce un impacto negativo sobre el tamaño de la camada, este efecto se manifiesta aproximadamente a los 30 días de gestación. Spencer and Bazer, (2004b), tras estudiar la capacidad uterina como factor limitante en el tamaño de la camada, proponen incrementar el número de glándulas endometriales y la longitud de los cuernos uterinos administrando hormonas específicas y factores de crecimiento durante el período crítico organizacional que ocurre antes de la pubertad y en la preñez.

Dentro de la producción cárnica mundial, el sector porcino es el más importante, tanto en los países en vías de desarrollo como en los desarrollados. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, en el 2008, un 39% de la producción mundial de carne fue de cerdo, siendo ésta de 937.415.926 cabezas de ganado (FAOSTAT. Abril 2010). Se estima que la producción mundial tendrá una tasa de crecimiento promedio anual de 2,26% entre los años 2006 a 2016, llegando a un volumen promedio de 129,3 millones de TM, a diferencia del promedio de producción alcanzado durante los años 2004 a 2006 que fue de 103,4 millones TM (Whole Hog, 2006).

El consumo *per cápita* de carne de cerdo en el año 2009 en diferentes países expresado como kg/habitante/año fue el siguiente: Hong Kong (65,1), Taiwán (41,7), Belarus (41,4), Unión Europea (41,1), China (36,1), Suiza (35,8), Corea del Sur (29,2) y

USA (29,1) (USDA y Comisión de la Unión Europea, 2010). En la Argentina, el consumo por habitante por año en 2009 fue de 7,98 Kg. Los valores son semejantes desde el año 2006 y se observa un crecimiento paulatino desde el año 1992 cuando el consumo fue de 5,65 Kg (SAGPyA- Dirección de Animales Menores y de Granja, en base a datos de SENASA y ONCCA, 2010).

La cerda, desde un punto de vista productivo, sirve en vida a un propósito comercial: producir lechones; y por lo tanto, cuanto mayor sea la eficiencia con que lo haga, tanto más elevado será el margen de utilidad en cualquier empresa dedicada a la producción porcina. Sin duda, la fertilidad en el cerdo es un carácter con un alto grado de variabilidad; aun hoy existen diferencias notables entre el potencial reproductivo teórico y los logros obtenidos, a pesar de los progresos que se han realizado en el campo de la biología reproductiva del cerdo.

INTRODUCCION

La cerda es una especie poliéstrica anual, cuyo ciclo estral tiene una duración de 21 días aproximadamente, con un rango de 18 a 23 días. El ciclo reproductivo se relaciona con diversos procesos fisiológicos como: pubertad y madurez sexual, estación reproductiva, ciclo estral, actividad sexual, postparto y envejecimiento. Estos componentes son regulados por factores ambientales, genéticos, fisiológicos, hormonales, conductuales y psicosociales.

La preñez en las cerdas dura 114 ± 3 días y posee una placenta epiteliocorial, difusa, plegada, no invasiva y adecidua (Amoroso, 1952; Dantzer, 1985). El proceso de implantación ocurre entre los días 13 y 20 de gestación. La implantación involucra las fases de aposición del epitelio uterino con el trofoectodermo, la adhesión y el anclaje microvelloso y es precedida por un extenso período de preanclaje que se caracteriza por la migración de los blastocistos a través de los cuernos uterinos y su rápida y espectacular elongación (Amoroso, 1952; Dantzer, 1985; Wilson, 2000; Konkurat, 2003).

El trofoblasto o trofoectodermo consiste en una capa de células polarizadas capaz de cumplir una variedad de funciones, tales como la liberación de enzimas y el transporte de nutrientes a través de la membrana. Expresa diversos receptores, sintetiza y secreta hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona) y proteínas (interferones y otras citoquinas) que participan en funciones metabólicas, endocrinológicas y posiblemente, inmunológicas, requeridas para el establecimiento y mantenimiento de la preñez (Amoroso, 1952; Perry, 1981; Robertson, 2000; Cencic and La Bonnardière, 2002; Dimova *et al.*, 2007; Yaful, 2009).

La implantación requiere una apropiada interacción entre el blastocito y el endometrio uterino, que ha sufrido una adecuada estimulación hormonal esteroidea durante la fase luteal del ciclo. Ésta estimulación involucra la acción secuencial de estradiol y progesterona (P_4) en el endometrio, lo que induce la secreción del epitelio glandular. Además, los procesos de implantación y placentación son eventos celulares que dependen de una adecuada relación entre los embriones y el medio ambiente uterino y de una compleja comunicación célula-célula, particularmente entre el trofoblasto fetal y las células epiteliales del endometrio uterino de la cerda preñada.

En general, el crecimiento placentario es medido en masa, y el incremento es exponencial entre los días 20 y 60 de gestación. Entre los días 60 y 110 de la gestación, el crecimiento de la placenta se mantiene en forma de meseta. Por último ocurre un incremento secundario inmediatamente antes del término de la preñez (Wilson and Ford, 2001).

Placenta

Los mamíferos euterios presentan diversos tipos de placenta, que varían en la cantidad y el tipo de capas celulares que se interponen entre la sangre de la madre y el embrión. Una característica peculiar del desarrollo temprano de los mamíferos euterios es el aporte de nutrientes del organismo materno a través de la placenta. La placenta cumple sus funciones a través de la aposición o fusión entre las membranas fetales y el endometrio que permiten el intercambio fisiológico entre el feto y la madre. La placenta difiere de otros órganos en muchos aspectos. Se origina como resultado de diversas gradaciones de interacciones materno-fetales y se comunica con el embrión por medio de un cordón de vasos sanguíneos. Sus funciones y tamaños cambian continuamente durante la preñez y finalmente es expulsada.

Para el feto, la placenta es un órgano con muchas actividades funcionales que son independientes en el adulto. Desempeña un importante rol cumpliendo una función protectora frente a traumatismos o a agentes infecciosos y secretando factores inmunomoduladores que aseguran la supervivencia de la unidad feto-placentaria. Además, cumple una función metabólica permitiendo el intercambio gaseoso y de nutrientes y deshechos entre el feto y la madre, regulando la homeostasis y sintetiza hormonas esteroides, peptídicas y diferentes factores de crecimientos (Hafez and Hafez, 2003).

Placenta Porcina

La placenta porcina es no invasiva y epiteliocorial debido a que permanecen todas las capas de la barrera placentaria durante la preñez y por lo tanto, el epitelio uterino está en contacto con el trofoblasto. Es difusa porque las vellosidades se distribuyen regularmente en todo el corion proporcionando una amplia área feto-materna de intercambio. En la zona donde están las vellosidades, el saco coriónico emite pliegues macroscópicos (pliegues primarios) que se interdigitan con estructuras complementarias del lado del endometrio. De los pliegues primarios surgen pliegues secundarios que son las vellosidades. La presencia de los pliegues primarios le confiere la característica de ser de tipo plegada. Se la considera adecidua, porque no hay pérdida de tejidos uterinos y las vellosidades se introducen en la mucosa uterina a manera de los dedos de un guante, sin que existan hemorragias en el momento del parto (Climent *et al.*, 2005).

Una de las funciones principales de la placenta corioalantoidea porcina es el intercambio de nutrientes entre la madre y los fetos. La sustancia que nutre a la descendencia se denomina embriotrofo, procede de la sangre materna (hemotrofo) y de

las secreciones de glándulas uterinas y fragmentos celulares (histiotrofo). Los dos sistemas circulatorios permanecen morfológicamente separados por las capas celulares y presentan un flujo cruzado o en contracorriente entre los vasos alantoideos y uterinos.

La placenta varía continuamente de tamaño, forma y estructura interna durante la gestación. Después de la implantación, se desarrolla a un ritmo rápido, luego se mantiene en forma de meseta hasta antes del final de la gestación donde vuelve a crecer. Las reestructuraciones a nivel celular se reflejan en un juego entre la apoptosis y la actividad mitótica.

Aproximadamente 48 horas después de la fecundación, los cigotos ingresan a los cuernos uterinos y alrededor del cuarto o quinto día maduran a blastocistos, vesículas formadas por una capa que se llama trofoblasto y una masa celular interna, de la que se forma el embrión propiamente dicho.

Entre los 9 y 16 días de preñez ocurre el período de peri-implantación durante el cual se produce un marcado remodelaje uterino y la diferenciación del *conceptus*. El *conceptus* porcino sufre el proceso de elongación, cambiando de una forma esférica de aproximadamente 1 cm de diámetro a una forma filamentosa, larga, tubular de hasta 1 m de longitud; esto ocurre en un período de 12 a 24 horas y se debe a una reorganización y remodelación del trofoblasto, para que los embriones tempranos cubran la superficie uterina de la cerda. Durante el período de elongación el *conceptus* libera estrógenos (E_2) que actúan como señal en el reconocimiento de la preñez y como marcador de elongación del trofoblasto, lo que permite el anclaje de los embriones al epitelio endometrial, (Fig. 1; Fig. 2, Bazer *et al.*, 2009).

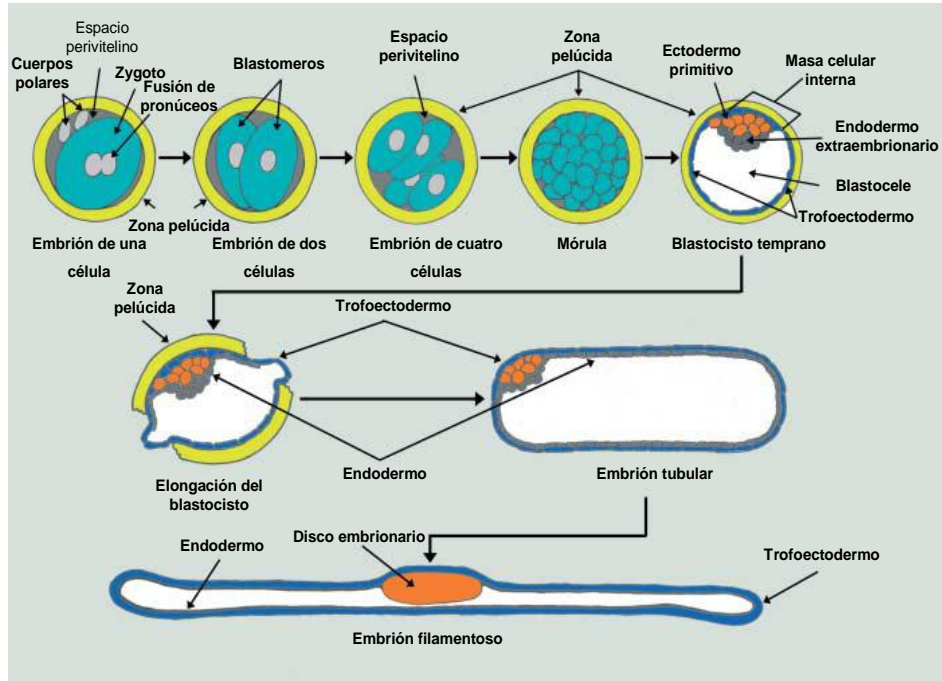


Fig. 1: Eventos que ocurren durante el inicio de la gestación en el cerdo, desde la fecundación hasta el proceso de elongación del *conceptus*. Adaptado de Bazer *et al.*, 2009.

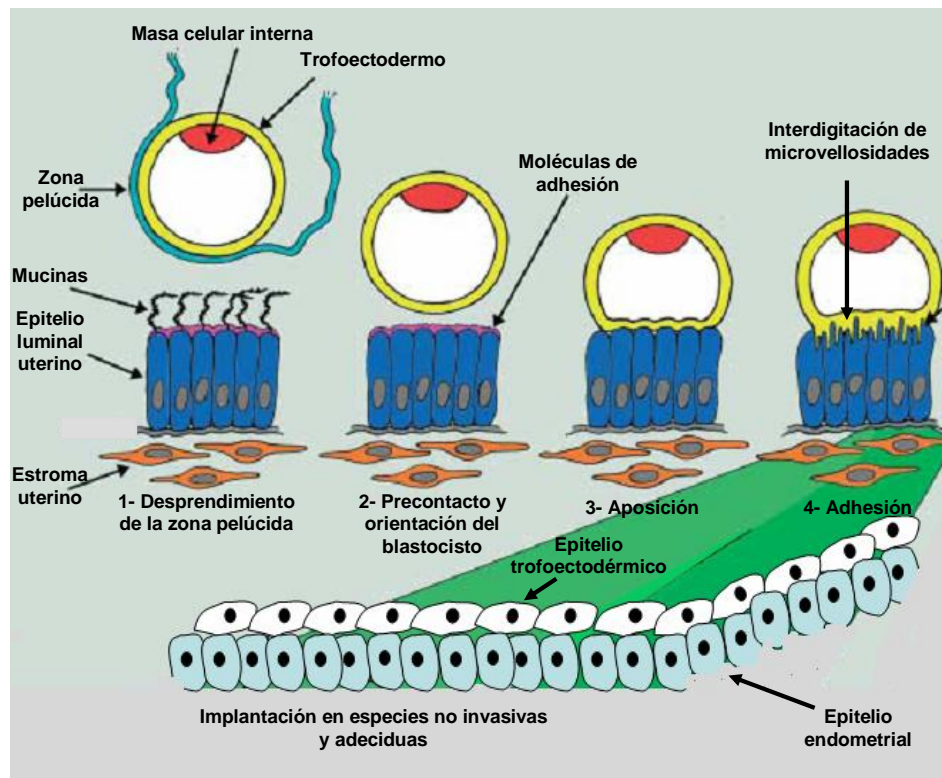


Fig. 2: Eventos que ocurren durante la implantación del *conceptus* en el cerdo. Implantación en especies no invasivas y adecuadas. 1- Desprendimiento de la zona pelúcida; 2- Precontacto y orientación del blastocisto; 3- Aposición; 4- Adhesión. Modificado de Bazer *et al.*, 2009.

Además, existen estructuras especializadas conocidas como aréolas, que tachonan la superficie de la placenta. Las aréolas son prominencias proliferativas del trofoblasto que carecen de vellosidades y están enfrentadas a cavidades de las glándulas uterinas. Son discernibles histológicamente a partir del día 15 de preñez. Así, los epitelios trofoblásticos coriónico y uterino se encuentran estrechamente unidos en algunas áreas (interareolar) y separados por material extracelular en otras (aréolas), lo que posibilitaría, respectivamente, tanto la nutrición hemotrófica como la histiotrófica a través del trofoblasto fetal (Fig. 3, Fig. 4, Koncurat, 2003).

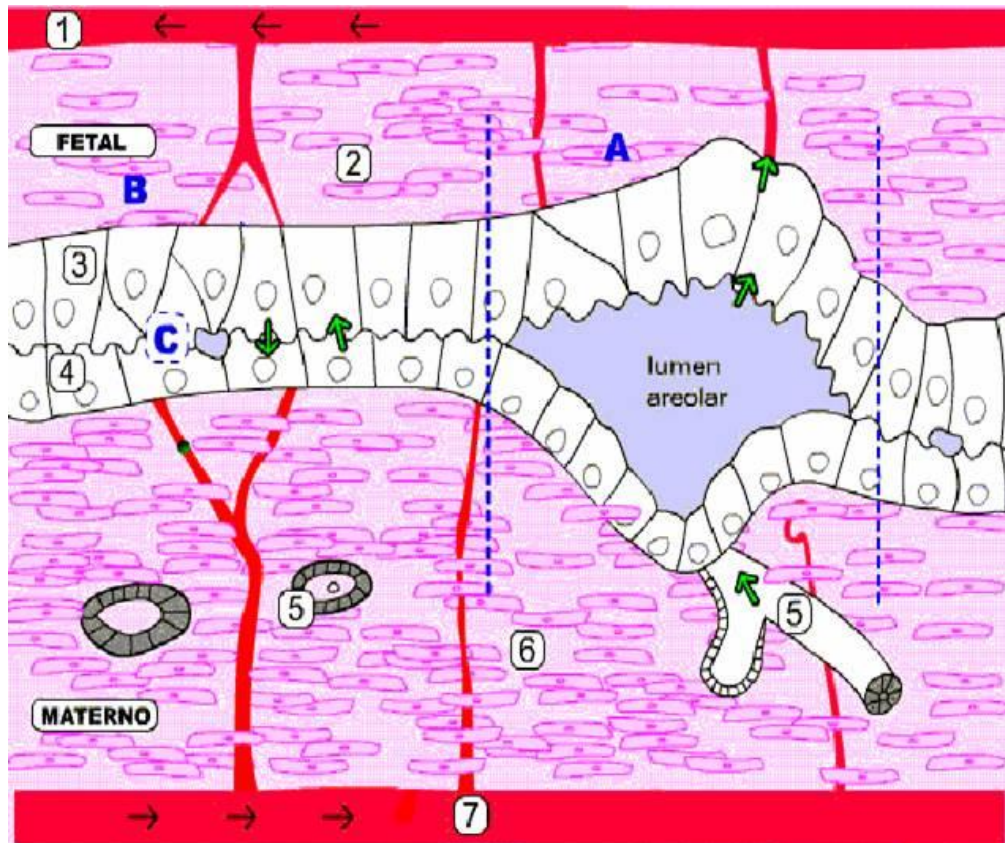


Fig. 3: Esquema de la circulación de sustancias en la placenta porcina. A: porción areolar; B: porción interareolar; C: porción “lacunar”. Las flechas indican la probable dirección de los nutrientes al feto. 1- circulación fetal; 2- células mesenquimatosas del corion fetal; 3- trofoblasto o trofooctodermo; 4- epitelio uterino; 5- glándulas uterinas endometriales; 6- células mesenquimatosas del endometrio; 7: circulación materna. Koncurat, 2003.

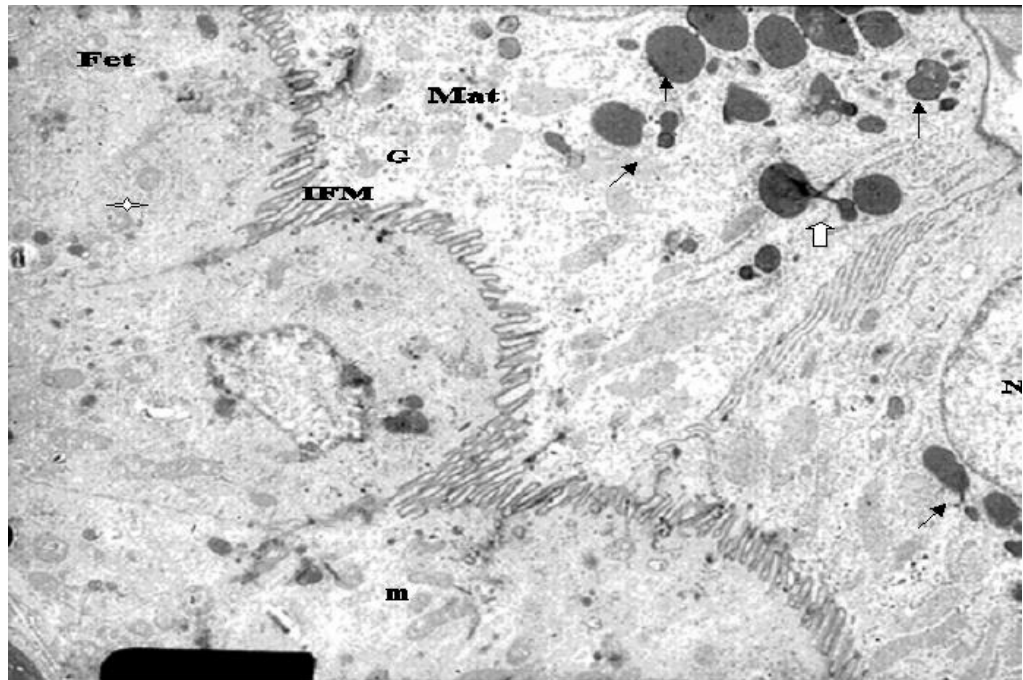


Fig. 4: Fotografía electrónica de una interfase feto-materna procedente de una placenta porcina de 28 días de preñez. Nótese interdigitaciones de las microvellosidades del epitelio materno (**Mat**) y fetal (**Fet**) en la interfase feto materna (**IFM**). Se observan gran cantidad de cuerpos electrodensos (▲), comunicación entre dichos cuerpos electrodensos (⏏), así como glucógeno (**G**) y mitocondrias (**m**). **N**: núcleo y ⋄ unión tipo estrecha (tight) entre células epiteliales trofoblásticas. 5000x. Koncurat, 2003.

La placenta porcina consta de tres regiones que pueden apreciarse desde el día 40 de gestación. Estas regiones incluyen: una zona denominada embrionaria, que coincide con el centro del corion y que contiene al embrión propiamente dicho rodeado por la membrana corio-alantoidea, una zona paraplaentaria, que incluye membranas extraembrionarias y se encuentra a ambos lados de la región embrionaria y por último, los extremos avasculares o apéndices necróticos, Fig. 5.

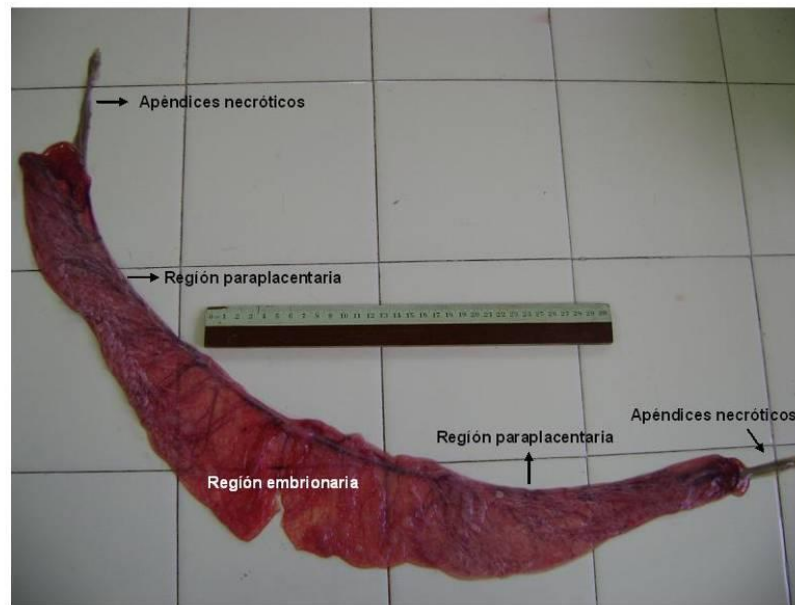


Fig. 5: Fotografía de placenta fetal de cerda de \pm 40 días de gestación.

Las Integrinas

Las moléculas de adhesión comprenden una variedad de proteínas de membrana que han sido clasificadas en cinco familias, las integrinas, las lectinas, las caderinas, las mucinas y las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Botella Lluisa, 2001; Reddy and Mangale, 2003). Las integrinas son receptores de vital importancia debido a que son las principales proteínas que dispone la célula para unirse a la matriz extracelular (MEC) e interactuar con ella, además de participar de uniones célula-célula. Comprenden una gran familia de proteínas transmembranas constituidas por dos subunidades glicoproteicas, denominadas α y β , unidas entre sí no covalentemente. Cada subunidad tiene un dominio extracelular N-terminal grande, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal pequeño. La única excepción a ésta estructura, es la subunidad $\beta 4$ que posee un dominio citoplasmático de aproximadamente 45 aminoácidos más que otras subunidades β . En el ser humano se

han identificado nueve subunidades β ($\beta 1$ - $\beta 9$) y veinticuatro subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, αv , αIIb , αLR , αIEL , αx , αm , αL y αd) y se han definido alrededor de 25 heterodímeros diferentes de integrinas, (Fig. 6, Modificado de Alberts *et al.*, 2004).

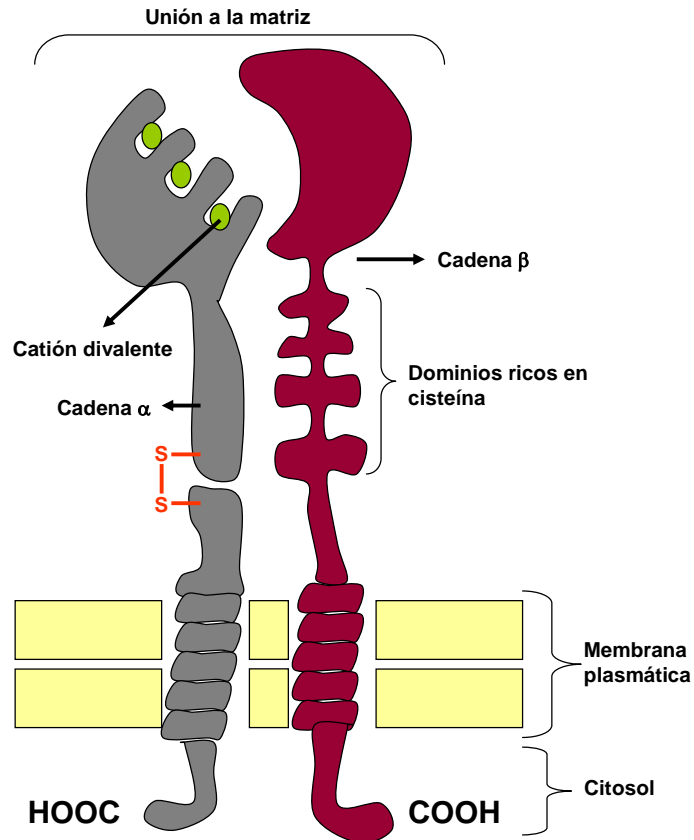


Fig. 6: Estructura de una integrina. Modificado de Alberts *et al.*, (2004).

Una misma molécula de integrina localizada en diferentes tipos celulares puede presentar afinidades por diferentes ligandos, por lo que es de suponer que otros factores específicos relacionados con el tipo celular puedan interactuar con la integrina modulando su actividad. La unión de las integrinas a sus ligandos depende de cationes divalentes extracelulares (Ca^{+2} o Mg^{+2}), lo que refleja la presencia de dominios de unión a estos cationes en la región extracelular de la subunidad α . El tipo de catión influye

tanto en la afinidad como en la especificidad de la unión de una integrina a sus ligandos (Alberts *et al.*, 2004).

Las integrinas tienen un dominio citoplasmático pequeño que no genera señales intracelulares directamente, pero que puede interactuar con proteínas adaptadoras y por lo tanto originar señales intracelulares al unirse a sus ligandos. Generalmente, las integrinas se agrupan en los complejos de adhesión focal de la membrana donde se asocian a proteínas citoplasmáticas como la talina y la actina α , que a su vez interactúan con proteínas unidas al citoesqueleto como la vinculina, la tensina y la actina. En estos complejos se asocian también proteínas intracelulares involucradas en la generación de señales de activación como la quinasa de adhesión focal (FAK: Focal Adhesion Kinase) y serina/treonina quinasas como la proteína quinasa C (PKC: Protein Kinase C). Estas enzimas generan cascadas de señalización celular que dirigen procesos como la reorganización del citoesqueleto o la inducción de la expresión de algunos genes. Estas señales pueden tener efecto sinérgico o antagónico con rutas activadas por otros receptores celulares, produciéndose así complejos procesos de integración de señales que convergen en puntos comunes y finalmente resultan en respuestas de activación, proliferación, diferenciación o muerte celular. También existe una señalización centrífuga, que es la capacidad de una célula para controlar las interacciones integrinas-ligando desde el interior, especialmente importante en plaquetas y en leucocitos, donde las integrinas han de ser activadas antes de la adhesión.

Las integrinas en la reproducción

La función de las diversas integrinas está determinada por las combinaciones de las subunidades α y β expresadas en cada célula y está relacionada con los procesos llevados a cabo por las células como los de diferenciación, inflamación, reparación de

tejidos o transformación maligna. El rol de las integrinas en el endometrio no está claramente definido, los estudios de Lessey and Arnold, (1998), muestran que éstas moléculas representan excelentes marcadores de estadios normales y anormales de receptividad uterina y pueden ser claves en los mecanismos de implantación y regulación de la gestación.

En vacas, se sugiere que la fusión de las células binucleadas con el epitelio materno, es el proceso que inicia los cambios en la expresión de las integrinas y las moléculas de la MEC en el estroma subepitelial uterino (MacIntyre *et al.*, 2002). En ovejas, las integrinas juegan un papel predominante en las interacciones entre la MEC y sus receptores para traducir señales entre el trofoectodermo y las células epiteliales uterinas (Burghardt *et al.*, 2002). En el endometrio y blastocito caprino están expresadas la integrina $\alpha v \beta 3$ y las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 5$ que desempeñarían un importante papel en los procesos de implantación (Carson *et al.*, 2000). En la coneja, la integrina $\alpha v \beta 3$ está presente en el trofoblasto y en el embrión y podría estar involucrada en las interacciones materno-embriónicas tempranas (Illera *et al.*, 2003). Los resultados de estudios realizados en monas Rhesus sugieren que existe una correlación entre la expresión de las integrinas y sus ligandos de la MEC en la interfase feto-materna y que estas moléculas actuarían en el control de la proliferación y diferenciación celular, regulando la invasión de las células trofoblásticas al comienzo de la gestación (Li *et al.*, 2003). En la mujer, se considera a las integrinas como probables marcadores de la receptividad uterina para la implantación del embrión, cuando el útero se encuentra bajo la influencia de la P_4 (Carson *et al.*, 2000). Hanashi *et al.*, 2003, demostraron que la integrina $\beta 1$ participa en la fase final de la implantación en la decidua humana.

En especies con placenta epiteliocorial, se encontró que la integrina $\alpha 5\beta 1$ participa en los eventos moleculares de los procesos de implantación (Rashev *et al.*, 2005). Numerosos trabajos plantean el papel de las integrinas y de sus ligandos de la MEC comparando su expresión entre el útero durante el ciclo estral y en la preñez temprana de entre 10 y 15 días (Bowen *et al.*, 1996; Bowen and Hunt, 2000; Garcia y *col.*, 2004; Jaeger *et al.*, 2001). Algunos de estos estudios analizan a las integrinas involucradas en la implantación porcina (Bowen *et al.*, 1996; Bowen and Hunt, 2000; Burghardt *et al.*, 2002; Foxcroft *et al.*, 2000; Rashev *et al.*, 2005), pero no se halló ningún trabajo que analice la expresión de integrinas durante el transcurso de la gestación porcina.

Hormonas gestacionales

Una hormona es un mensajero químico que coordina las actividades de diferentes células en un organismo pluricelular. En el año 1995 D. M. Fawcett (Scaglia, 2005) define el término hormona como cualquier sustancia (gas, lípido, proteína, neurotransmisor, etc) que liberada por una célula actúa sobre otra célula tanto lejana como cercana, independiente de su origen o vía de transporte. Las hormonas están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Se clasifican en función de su estructura como esteroideas, proteicas, polipeptídicas, glicoproteicas, derivados de aminoácidos (especialmente de la tirosina) y ácidos grasos o sus derivados tales como las prostaglandinas.

Una hormona actúa en una célula blanco y genera una respuesta biológica. Las acciones que producen inciden sobre la reproducción, el desarrollo y el crecimiento.

Asimismo, regulan la actividad psiconeural, el metabolismo, la funcionalidad tisular, la actividad inmunológica, el medio interno y el metabolismo óseo.

Progesterona

La P₄, considerada la hormona de la preñez, es esencial para crear un ambiente donde se lleven a cabo el crecimiento y desarrollo del *conceptus* hasta su término.

En porcinos, la P₄ producida y secretada por los cuerpos lúteos (CL) a lo largo de la gestación (Hafez and Hafez, 2003; Spencer and Bazer, 2004a), inhibe la contractibilidad del miometrio, media los cambios de la actividad secretoria del útero, regula los efectos de la nutrición sobre la gestación porcina y, en consecuencia, el estado metabólico que determina la sobrevivencia embrionaria (Mueller *et al.*, 2006; Qsuire, 2006).

El crecimiento del *conceptus* y su implantación no solo está regulado por la secreción de P₄ por el CL sino también por la expresión de receptores de P₄ en el epitelio y el estroma uterino (Geisert *et al.*, 2006).

Vivas *et al.*, (1998), en medios condicionados de placenta porcina (MCP) encontraron poca P₄ a los 30 días de preñez, la concentración aumentó ligeramente hacia el día 90 de preñez y abruptamente en los MCP de hembras a término. Estos hallazgos en MCP demostrarían no solo la existencia de una secreción de origen ovárica sino también otra de origen placentario, como lo muestran los valores de P₄ hallados en los medios condicionados de placenta porcina durante los diferentes períodos gestacionales.

Para Knight y Kukoly, (1990), la concentración de P₄ en cultivos de placenta aumenta linealmente entre los 25 y los 40 días, pero estos autores no especifican el

componente placentario (fetal o materno) que la sintetiza. Yaful *et al.*, (2005), observaron un pico de P₄ en suero porcino en el período comprendido entre 15 y 20 días de gestación. Yaful, (2009), descubrió en los extractos placentarios fetales altas concentraciones de P₄, hipotetizando que la placenta fetal es una fuente alternativa de producción de P₄ durante la preñez porcina. Por el contrario la misma autora no observó en los extractos placentarios maternos ni en líquido amniótico concentraciones elevadas de la hormona. A partir de éstos resultados postuló que la P₄ hallada en la placenta fetal es utilizada en la interfase entre madre y *conceptus* o metabolizada dentro del útero. Además, plantea un rol sistémico de la P₄, ya que registró en suero un pico de esta hormona durante el período de la “ventana de implantación”, mientras que en los extractos placentarios fetales fue en el período de post-implantación donde determinó el mayor aumento de la concentración de P₄. Considera que el aumento de P₄ a nivel sistémico se debería a la síntesis de P₄ por los CL, ya que además durante ese período se produce un aumento significativo de peso de los mismos.

Estrógenos

Los E₂ participan en la proliferación y expansión de la placenta, en el movimiento de agua y electrolitos, en la permeabilidad celular y en la regulación del flujo de sangre uterina.

En cerdos, según Pope *et al.*, (1982), los E₂ desempeñan un importante rol en el transporte de los *conceptus* hacia el lugar donde se implantarán en los cuernos uterinos, ya que podrían estimular la descarga de histamina por el endometrio, lo que llevaría a un aumento del flujo sanguíneo del miometrio y de la contractibilidad de las células musculares. La secreción de E₂ es medible en blastocistos de 5 a 7 mm y se incrementa rápidamente durante la expansión y elongación temprana (Fischer *et al.*,

1985). Las dos fases estrogénicas consideradas por Spencer y Bazer (2004a) fueron coincidentes con los valores de E_2 séricos encontrados en el trabajo de Yaful (2009), que demuestra la existencia de valores altos de E_2 séricos desde los 5 días de preñez, en comparación a los hallados en cerdas vacías, tanto en fase folicular como en fase luteal. Éstas concentraciones descendieron a los 15-20 días para aumentar nuevamente en el período de 23-49 días de preñez, éste aumento sería necesario para prolongar la secreción de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), molécula luteolítica, hacia el lumen uterino.

La concentración de E_2 en sangre aumenta considerablemente al acercarse el parto. La estrona y el 17β estradiol sufren un incremento en las 3 últimas semanas de gestación y caen a niveles basales al día siguiente del parto (Hafez and Hafez, 2003).

Sistema inmunológico

El sistema inmune está formado por un conjunto de células, estructuras y órganos e implica la integración de múltiples señales positivas y negativas que afectan a las células participantes. Las células que forman el sistema inmune son muy variadas tanto en su estructura como en su función. Todas proceden de una célula pluripotencial de la médula ósea, de la que se diferencian dos líneas distintas: la línea mieloide y la línea linfoide.

De la línea mieloide derivan los granulocitos como eosinófilos, neutrófilos y basófilos; y las células presentadoras de antígenos (CPA), grupo que está formado por células dendríticas y macrófagos. Siendo las funciones principales de estas células la fagocitosis, la presentación de antígenos y la producción de citoquinas.

La línea linfoide da origen a diferentes tipos de linfocitos. Es responsable de llevar a cabo las principales funciones que caracterizan al sistema inmune y que le

permiten reaccionar frente a moléculas extrañas de forma específica, así como recordarlas para una futura posible invasión (memoria). De ésta línea derivan los linfocitos B responsables de la producción de anticuerpos y los distintos tipos de linfocitos T. Los linfocitos T auxiliares (Th: helper) son subpoblaciones especiales de linfocitos T CD4+ que proporcionan ayuda a otras células inmunocompetentes para elaborar respuestas inmunitarias mediante la activación celular o la secreción de citoquinas. El linfocito Th0 es un prolinfocito virgen que todavía no tiene una función específica. Los linfocitos Th0 se pueden diferenciar a linfocitos Th1 o Th2, capaces de desencadenar y estimular la defensa contra un antígeno específico o a linfocitos Th3, inhibidores de la inflamación, éstos últimos también denominados linfocitos reguladores o linfocitos Treg. Los Th-3 inhiben la función de los linfocitos Th1 (Sanchez-Vizcaino, 2004; Male *et al.*, 2008).

Sistema inmunológico en la reproducción

La reproducción en los animales vivíparos es un hecho biológico crucial; los biólogos e inmunólogos no comprenden aún la totalidad de los mecanismos celulares y moleculares asociados con éste fenómeno. Desde el punto de vista genético la madre y el feto no son idénticos, debido a que el feto hereda un grupo de genes polimórficos diferentes del padre y de la madre. Por lo tanto, en la mayoría de las combinaciones de parejas hay múltiples antígenos tisulares que difieren entre el feto y la madre y son potencialmente aloantígenos de tejido reconocibles por el sistema inmune materno. Por ese motivo, surge el interrogante de por que no se induce una respuesta por parte de las células inmunes maternas hacia esos aloantígenos y de cómo la madre provee protección contra agentes microbianos, sin desencadenar una respuesta inmune letal contra los tejidos fetales (Rabinovich, 2004).

En la gestación humana y murina, la interfase materno-fetal es un sitio inmunológicamente activo con la producción de diversas citoquinas inmunoregulatorias, que favorecen una respuesta de tipo Th2. Además, el sistema inmune innato se encuentra activado produciendo un estado inflamatorio local y sistémico y el sistema inmune adaptativo reconoce la existencia de los antígenos fetales. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en un transplante de órgano, la naturaleza de la respuesta inflamatoria es tal que no permite que los antígenos paternos induzcan el rechazo del *conceptus*. Esto se debe en primer lugar a la presentación antigénica especial, ya que no hay expresión de antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), en humanos denominados antígenos leucocitarios humanos (HLA) clase I ni de clase II en el trofoblasto; la sensibilización que puede ocurrir fuera de la interfase materno-fetal induce mecanismos adicionales que evitan el rechazo fetal. Además, la inducción de un perfil de respuesta Th2 por citoquinas y hormonas colabora para evitar la activación de una respuesta celular citotóxica. Aún así, si acaso células T citotóxicas son generadas por exposición a antígenos fetales, el microambiente uterino suprime el desarrollo de una respuesta efectora. Además, la placenta expresa moléculas tales como el receptor de muerte celular transmembrana con su ligando específico, FasL y el ligando inducido por apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral alfa (TRAIL) que evitan la activación y el ataque de células T. Estudios recientes indican que se induce un estado de tolerancia específico hacia antígenos fetales por las células T y B maternas, el cual sería transitorio, produciéndose después del parto una recuperación de esa respuesta (Rabinovich, 2004).

Ramsoondar *et al*, (1999), demostraron que los antígenos clase I del CMH, denominados en cerdos antígenos leucocitarios suínos (SLA), no se detectan sobre la

superficie de las membranas extraembrionarias durante la gestación; pero sí se encuentran niveles muy bajos de ARNm para esos antígenos (Ag) sobre el mesodermo vascular de las membranas extraembrionarias en el día 25 de gestación y en el corion y amnios a término. Además, se han dosado gran cantidad de ARNm específico para las moléculas del CMH en las células y tejidos del endometrio uterino y en los leucocitos maternos porcinos provenientes de sangre periférica. Según Leboutteiller *et al.* (1996), existirían mecanismos especiales, propios del embrión y del trofoblasto, para controlar la expresión de moléculas del CMH, de manera de regular la expresión de tales antígenos, temporal y espacialmente, durante el desarrollo embrionario.

La mayoría de las células del sistema inmune pueden comunicarse entre sí y con las células vecinas mediante proteínas regulatorias llamadas citoquinas. Estas son glicoproteínas de bajo peso molecular, solubles, generalmente monoméricas, con vida media corta, que se encuentran en muy bajas concentraciones en condiciones fisiológicas. Son sintetizadas por una gran variedad de células como respuesta a señales determinadas y coordinan las interacciones entre las células. Estos factores paracrinicos o autocrinos controlan el destino, los movimientos y las funciones de sus células blanco, en especial durante el estrés o el desarrollo de la respuesta inmune, la hematopoyesis y la embriogénesis. En general, afectan la producción o la actividad de otras citoquinas de modo aditivo, sinérgico o antagónico, y sus efectos suelen ser redundantes. Hasta la fecha se describieron más de un centenar de estos factores, interleuquinas (IL), interferones (IFN), factores de crecimiento (GF), factores de estimulación de colonias (CSF), factores de necrosis tumoral (TNF), quimiocinas y otros (Rabinovich, 2004; Betancourt-Alonso, 2006; Tizard, 2009).

Una amplia variedad de citoquinas se expresan en el útero de las especies mamíferas. La fuente de producción celular varía e incluye células endometriales y células del trofoblasto, pero también leucocitos, macrófagos y células *natural killer* uterinas (NKu). La apropiada interacción entre el embrión peri-implantado y el endometrio materno estaría bajo el control de citoquinas particularmente paracrinas (Huang, 2006; Dimitriadis *et al.*, 2005).

Las citoquinas son moléculas inmunoregulatoras críticas, responsables de determinar la naturaleza de una inmunorespuesta. Se ha propuesto que las reacciones inmunes Th2/Th3 son necesarias para una gestación normal, mientras que la inmunidad Th1 se considera perjudicial para el feto (Costeas *et al.*, 2004). Sin embargo los estudios más recientes indican una mayor complejidad en la inmunoregulación de la preñez.

Interferones

Los IFNs son proteínas o glicoproteínas con un peso molecular de 20 a 34 kDa, que se agrupan en dos tipos principales: IFN de tipo I e IFN de tipo II.

En el grupo de IFNs de tipo I se incluyen el IFN- α , el IFN- β , el IFN- τ , el IFN- κ , el IFN- ω y el IFN- δ .

Según Tizard, (2009), el IFN- α es sintetizado en grandes cantidades por las células dendríticas plasmacitoides y en mucha menor cantidad por linfocitos, monocitos y macrófagos. Existen de IFN- α 18 isoformas en los seres humanos, 12 en los cerdos y bovinos, 4 en los caballos y 2 en los perros. El IFN- β es sintetizado por fibroblastos infectados con virus (hay 5 isoformas en bovinos y cerdos y 1 en perro y en humanos). El IFN- ω lo sintetizan los linfocitos, monocitos y células del trofoblasto de los seres humanos, caballos, cerdos, conejos y perros. En el trofoblasto de rumiantes se ha detectado una forma distinta de IFN tipo I, el IFN- τ . El IFN- δ se ha aislado a partir del

trofoblasto de cerdos, y está relacionado solo lejanamente con el resto de los IFN tipo I. Se han descrito dos formas de IFN- κ actualmente denominados IL-28 e IL-29.

Existe un solo IFN tipo II, el IFN- γ , que es una citoquina proinflamatoria producida principalmente por los linfocitos estimulados y que también es sintetizada en las células del trofoblasto de cerdos (Tizard, 2009).

El conceptus porcino es la única especie mamífera que secreta IFN de los dos tipos: IFN- γ e IFN- δ , y ésta secreción la realiza durante el período de peri-implantación, proveyendo la oportunidad de que estos dos IFNs trabajen en conjunto para regular la expresión génica del endometrio (Joyce *et al.*, 2008).

IFN- γ

Durante la implantación porcina, entre los días 12-20 de gestación, el trofoectodermo secreta enormes cantidades (hasta 250 μg por cuerno uterino) de IFN- γ hacia el lumen uterino. Éste TrIFN- γ parece constituir un único caso de IFN- γ producido por células no linfoideas (Cencic *et al.*, 2002).

El papel fisiológico de los IFN γ e IFN δ en suinos difiere del rol que desempeñan en los rumiantes. El IFN- γ podría actuar principalmente como un agente anti-infeccioso, proporcionando un medio ambiente sano para la implantación de los embriones. Ambos IFNs se encuentran localizados en la región apical de las células trofoblásticas porcinas. Además, se postula que los IFNs podrían permanecer en el lumen uterino y ser efectores directos de la despolarización de la membrana apical del epitelio endometrial, induciendo remodelación parcial o profunda de este tejido materno, condición necesaria para la implantación de los embriones (Murphy *et al.*, 2009).

Interleuquina-6

La IL-6 es una citoquina multifuncional que regula varios aspectos de la respuesta inmune en el humano, particularmente la reacción de fase aguda y la hematopoyesis. Esta molécula tiene varias funciones redundantes con IL-11 y el factor inhibidor de leucemia (LIF). Es secretada por células linfoides y no linfoides normales o transformadas. Su producción está regulada por numerosas señales tales como la estimulación mitogénica o antigénica, lipopolisacáridos, ionóforos del calcio, citoquinas y virus. La expresión en monocitos es inhibida por IL-4, IL-10 e IL-13. Los niveles séricos se elevan en condiciones patológicas, incluyendo infecciones bacterianas y virales, traumas, enfermedades autoinmunes e inflamación.

La deficiencia de IL-6 en ratones produce reducción de la fertilidad y disminución del número de sitios de implantación viables. En la mujer, la IL-6 se expresa débilmente durante la fase proliferativa del ciclo menstrual, pero la inmunoreactividad es alta durante la mitad de la fase secretoria, predominantemente en el epitelio glandular (Dimitriadis *et al.*, 2005).

En el ser humano y el ratón, que comparten el tipo de placenta invasiva y hemocorial, ha sido ampliamente demostrada la presencia de anticuerpos (Ac) bloqueadores, denominados inmunoglobulinas G (IgG) asimétricas, para el enmascaramiento de los aloantígenos paternos y fetales durante la gestación (Margni, 1996). En 1992, se demostró que sobrenadantes de cultivos de placenta murina incrementaban la proporción de IgG asimétricos en un hibridoma que sintetizaba los dos tipos de IgG (simétrico y asimétrico). En estudios posteriores se halló que una fracción proteica de 23-27 kDa del sobrenadante era la responsable de estos efectos y que esa fracción se correspondería con la IL-6. Por lo tanto, esta IL es sintetizada por células

placentarias como las trofoblásticas y podría actuar induciendo la glicosilación asimétrica de las IgG (Margni and Zenclussen, 2001).

La clasificación de la IL-6 como citoquina inductora de la vía Th1 o Th2 ha sido controvertida durante varios años. Esta controversia se presenta porque la misma molécula puede presentar ambas características dependiendo de la dosis, la fuente celular y la etapa gestacional estudiada. Actualmente se considera que la presencia de IL-6 desplaza la balanza Th1/Th2 hacia una respuesta Th2. Se ha demostrado que su presencia es necesaria en la implantación humana, posiblemente debido a que regula la producción de enzimas del tipo de las metaloproteasas, responsables de la digestión de la MEC. Hacia el final de la gestación, los niveles de expresión de ARNm de IL-6 son cuatro veces mayores que en el primer trimestre, posiblemente porque está involucrada en el proceso pro-inflamatorio del trabajo pre-parto. En el primer trimestre de la gestación la IL-6 estaría implicada en la remodelación de tejidos placentarios, así como en la hematopoyesis y la vascularización de las vellosidades placentarias (Gutierrez y *col.*, 2008).

Interleuquina-12

La IL-12 es una citoquina heterodimérica compuesta por dos cadenas, p40 y p35. Esta citoquina es el principal estímulo para la expresión de ARNm de IFN- γ y su traducción en diferentes subpoblaciones de células NK. La IL-12 juega un rol importante en la inducción de la respuesta inmune mediada por células, aumenta la actividad de los linfocitos T citotóxicos y de las NK y está involucrada en la diferenciación de las células T vírgenes hacia la subpoblación Th1 (Hasan *et al.*, 1999).

La IL-12 fue reconocida inicialmente como inductora de la síntesis de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica humana *in vitro*. Los macrófagos y las células dendríticas son la principal fuente de IL-12 en muchos tejidos.

Las IL-12 e IL-2 no estimulan la secreción de IFN- γ en cultivos de macrófagos deciduales de mujer, pero actúan sinérgicamente para estimular la liberación de IFN- γ en cultivo de LGL CD56⁺⁺ deciduales (linfocitos granulares grandes). Los LGL estimulados con IL-12 e IL-2 y co-incubados con macrófagos deciduales exhibieron gran secreción de IFN- γ . El sinergismo estaría mediado por factores solubles liberados por los macrófagos deciduales. Se sugiere que interacciones entre LGL deciduales y macrófagos pueden jugar un rol importante en la regulación de la presencia de citoquinas en la interfase materno-fetal promoviendo una respuesta inmune basada en linfocitos Th1, la que contribuiría en el control del desarrollo placentario (Marzusch *et al.*, 1997).

Interleuquina-15

La IL-15 es una citoquina requerida para la diferenciación de las células NKu en el ratón. En humanos y murinos la expresión endometrial de IL-15 es regulada por la P₄ (Oh and Croy, 2008).

La IL-15 y su ARNm se detectaron en el endometrio humano no gestante, la decidua y la placenta. La IL-15 ha sido inmunolocalizada en células estromales perivasculares de la fase secretoria, en células epiteliales glandulares durante la fase proliferativa y en decidua el primer trimestre de la gestación (Kitaya *et al.*, 2000).

Verma *et al.*, (2000), han demostrado, en la mujer, que la IL-15 es producida en la mucosa uterina y que puede afectar la citotoxicidad y proliferación de NKu, sugiriendo que dichas NKu son potencialmente capaces de responder a IL-15. A

diferencia de las células NK sanguíneas, las células NKu no se transforman en células citolíticas potentes, lo cual es críticamente importante para una célula que está presente en la interfase materno-fetal ya que la actividad citolítica destruiría el trofoblasto. Los macrófagos son también una importante fuente de IL-15 en el útero. La producción del ARNm de IL-15 y la secreción de la proteína se incrementa durante la decidualización *in vitro* de células estromales endometriales. Aunque la IL-2 y la IL-15 tienen numerosos efectos superpuestos sobre las células del sistema inmune, la expresión diferencial de estas citoquinas en distintos tipos celulares sugiere que sus funciones son parcialmente distintas. La IL-2 administrada en forma exógena estimula la citotoxicidad de las NKu contra el trofoblasto y la proliferación de NK. Mientras que la IL-15 puede producir proliferación de NKu sin la transformación de éstas en células citotóxicas capaces de destruir al trofoblasto, por lo que postulan que en útero la IL-15 tendría un rol en promover la supervivencia y la expansión de las células NKu.

Interleuquina-18

La IL-18 es un miembro de la familia de las interleuquinas descubierto en los últimos años. El sistema de la IL-18 incluye a la IL-18, el receptor de la IL-18 (IL-18 R), la proteína de unión a la IL-18 (IL-18 BP) y el precursor de la IL-18 (proIL-18).

La IL-18 es producida como un precursor inactivo y es secretada activa después de su clivaje por caspasa-1 u otras caspasas. Estructuralmente es similar a los miembros de la familia de las IL-1. Funcionalmente es promotora de una respuesta Th1 con inducción de la producción de IFN- γ .

Una proteína de unión a la IL-18, que se denomina IL-18 BP, ha sido identificada en el útero humano. Actúa como un inhibidor natural del IFN- γ inducido por IL-18 y suprime la respuesta Th1. Se ha demostrado que la IL-18 BP neutraliza la

función de IL-18, sugiriendo que el sistema IL-18 opera mediante las interacciones de la citoquina con sus receptores y proteínas de unión.

La presencia del sistema completo IL-18, incluyendo la expresión de ARNm y la producción de proteínas, ha sido demostrado en las fases proliferativas y secretorias del endometrio humano. Aunque se observó que la expresión de IL-18 y su ARNm en el endometrio humano es mayor durante la fase secretoria que en la fase proliferativa. Así, la expresión y el nivel apropiado de IL-18 e IL-18BP durante el período de implantación del endometrio secretorio puede modular la red de citoquinas Th1/Th2 durante la implantación embrionaria (Huang, 2006).

Algunos trabajos analizan a las citoquinas involucradas en la implantación en humanos y murinos (Margni, 1996; Marzusch *et al.*, 1997; Kitaya *et al.*, 2000; Verma *et al.*, 2000; Margni and Zenclussen, 2001; Dimitriadis *et al.*, 2005; Huang, 2006; Gutierrez y *col.*, 2008; Oh and Croy, 2008) pero no se halló ningún estudio que analice la expresión o el rol de las citoquinas IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 durante el transcurso de la gestación porcina.

Así mismo, poco se conoce acerca de la expresión de las integrinas, moléculas de adhesión que deben contribuir a mantener la interfase materno-fetal en ésta especie epiteliocorial.

Objetivo General

Estudiar el rol de las integrinas en placentas porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales, tratando de individualizar moléculas implicadas en los procesos de adhesión placentaria durante la gestación porcina y su posible interrelación con el sistema endocrino e inmunológico.

Objetivos Específicos

- Realizar dosajes de IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 en Homogenatos de placenta porcinas y sueros provenientes de hembras en diferentes períodos gestacionales, vacías y machos.
- Realizar dosajes de hormonas esteroideas en suero y HoPP de los mismos períodos gestacionales seleccionados.
- Determinar la presencia de integrinas en preparados histológicos de placentas porcinas de diferentes períodos de preñez y en útero vacío.
- Establecer posibles relaciones entre los niveles de hormonas y de citoquinas con la expresión tisular de integrinas halladas en la placenta porcina

Hipótesis

- En el proceso de la placentación porcina la presencia de integrinas estaría regulada por los sistemas endocrino e inmune materno.
- Las hormonas esteroideas y las citoquinas presentes en la interfase feto-materna intervendrían en el crecimiento y desarrollo placentario porcino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y tractos Reproductivos: Se recolectaron 61 tractos reproductivos provenientes de cerdas mestizas de la zona de General Pico, La Pampa, Argentina ($35^{\circ} 62'$ y $63^{\circ} 45'$ de latitud y longitud respectivamente), comprendidos entre 30 y 114 días de gestación, y de cerdas no preñadas.

De los 61 tractos reproductivos:

- Seis correspondieron a úteros de cerdas no gestantes en diferentes fases del ciclo estral, tres en fase folicular y tres en fase luteal. Las mismas se tomaron como testigos.
- El resto de los tractos reproductivos (55) incluyeron placentas provenientes de cerdas gestantes en diferentes períodos gestacionales: 32 días (n=5), 35 días (n=4), 40 días (n=4), 44 días (n=4), 50 días (n=5), 51 días (n=4), 60 días (n=5), 65 días (n=4), 70 días (n=5), 80 días (n=5), 90 días (n=5) y 114 días (n=5) (Fig. 7 y Fig.8).

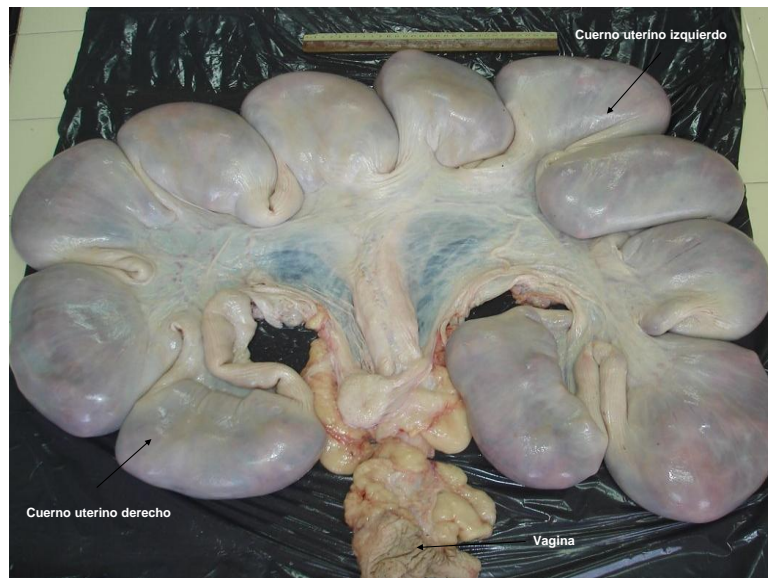


Fig. 7: Fotografía de un tracto reproductivo de 90 días de gestación.

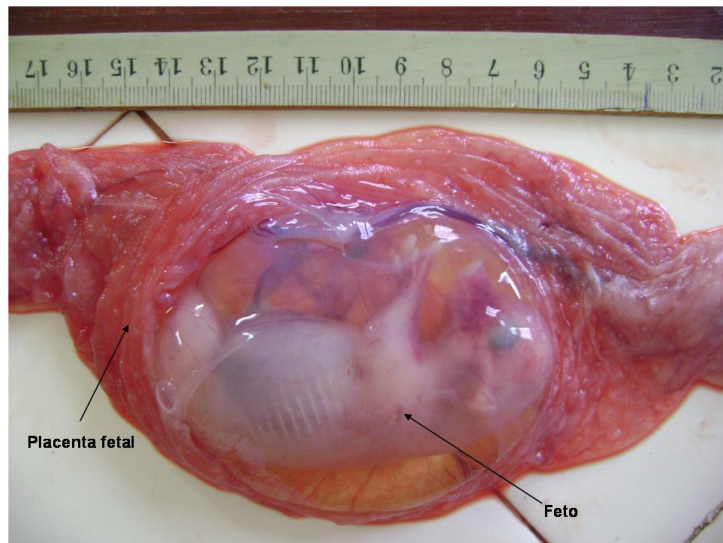


Fig. 8: Fotografía de un saco fetal con su feto de 44 días de gestación.

Inmediatamente después de recolectados, los tractos reproductivos se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) conteniendo 10.000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina y 2,5 ug/ml de fungizona y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Extracción de sangre: A cada hembra porcina se le extrajo sangre por el método de flebopunción. Las venas de elección fueron: vena cava craneal y vena medial de la oreja.

En el caso de las muestras provenientes de frigorífico, se obtuvo la sangre por corte de la vena yugular.

Obtención de Suero: Una vez extraída la sangre, se la dejó a temperatura ambiente hasta lograr la adecuada retracción del coágulo y el exudado del suero. Luego se la centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos, para clarificar el suero, se la fraccionó en alícuotas y se la conservó a -20°C hasta su uso.

Determinación de la edad gestacional: Se estimó la edad de la preñez de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los embriones o los fetos obtenidos de cada cerda (Marrable, 1971).

Procesamiento del tejido placentario: Se fijaron las muestras placentarias maternas y fetales por técnicas histológicas convencionales (Geneser, 2006) en formol tamponado con fosfato al 10% y se realizaron los cortes histológicos de $\pm 5 \mu\text{m}$.

Obtención de homogenatos de placenta porcina materna (HoPM) y fetal (HoPF) y de útero no peñado porcino (HoU). Los homogenatos de placenta porcina se prepararon de la siguiente manera: a la placenta porcina se la homogeneizó de tal manera de obtener una pulpa, con la ayuda de un molinillo eléctrico, para éste proceso 1 (una) parte de la pulpa de placenta se homogeneizó con 3 (tres) partes de solución fisiológica. Luego, para descartar los pequeños restos de tejido, se centrifugó a -20°C hasta su uso, denominándose a los resultados HoPM u HoPF. Los HoU se procesaron de la misma manera.

Determinación de hormonas en homogenatos de placenta porcina (HoPP) y sueros porcinos. Para la cuantificación de P_4 se utilizó la técnica de RIA competitivo en fase sólida que consiste en la inhibición de la unión de la hormona marcada con ^{125}I (trazador) al anticuerpo específico unido al tubo de reacción, por parte de la hormona no marcada (Chard, 1990). Después de un tiempo de incubación se aspiró el líquido contenido en los tubos y se midió la radioactividad unida en un contador de centelleo gamma automático.

El $17\text{-}\beta\text{-Estradiol}$ se determinó mediante Inmunoensayo Enzimático Quimioluminiscente en fase sólida en un equipo DPC (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). En éste método, cada unidad de análisis de la hormona, contiene una

bola recubierta de anticuerpos policlonales de conejo anti-hormona. El anticuerpo anti-hormona se encuentra unido a una perla de poliestireno y está encerrado en una copa de reacción denominada *Immulite Test Unit*[®]. La muestra compete en la *Test Unit*[®] con hormonas marcadas con un “ligando” durante 30 minutos. El material no unido es descartado por lavado centrífugo. En una segunda etapa, se agrega un anticuerpo “anti-ligando” marcado con la enzima fosfatasa alcalina. La *Test Unit*[®] fue incubada por otros 30 minutos y el material no unido nuevamente descartado por lavado centrifugado. Posteriormente, se agregó un sustrato (éster fosfato de adamantyl dioetano) cuya hidrólisis genera un compuesto quimioluminiscente que es leído en un fotomultiplicador incorporado en el equipo. Este equipo consiste en un sistema que automáticamente maneja muestras, reactivos, incubaciones, separación, medición y cálculo de concentraciones y posteriormente los cálculos son realizados automáticamente en una curva maestra que es recalibrada antes de usar.

Determinación de citoquinas en homogenatos de placenta porcina (HoPP) y sueros porcinos. Se realizó por enzima inmunoanálisis (ELISA), (Margni, 1996), la determinación de las siguientes citoquinas: IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, en homogenatos de placenta porcina materna y fetal y sueros porcinos provenientes de diferentes períodos de gestación

Determinación de IFN- γ : A la placa de ELISA que posee el anticuerpo anti-porcino IFN- γ (Thermo Scientific, USA) se le adicionó 50 μ l de diluyente estándar en cada pocillo y 50 μ l de muestra. Luego se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó tres veces. Posteriormente se adicionó el anticuerpo anti-porcino IFN- γ biotilado, se lo incubó a temperatura ambiente durante una hora y se lavó tres veces la placa. Se colocó 100 μ l de Solución Streptavidina–Peroxidasa de rábano picante

(Streptavidina-HRP) incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó tres veces y se incubó con 100 μ l de sustrato tetrametilbencidina (TMB) en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se detuvo la reacción con solución Stop y se midió la absorbancia a 450 nm (BioTeK[®] Instruments, Inc. USA).

Determinación de Interleuquina-6: En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura policlonal anti-Interleuquina 6 porcino (R&D Systems, USA) se adicionó 50 μ l/pocillo de diluyente de ensayo RD1-63 y 100 μ l/pocillo de estándar, control o muestra. Se mezcló durante un minuto y se cubrió, incubándose durante 2 hs a temperatura ambiente. Se lavó la placa con 400 μ l/pocillo de buffer de lavado. Se agregó 200 μ l de conjugado de IL-6 porcino. Se cubrió e incubó 2 hs. Se lavó nuevamente. Se adicionó 120 μ l/pocillo de solución sustrato incubándose a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad. Se frenó la reacción con 120 μ l/pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK[®] Instruments, Inc. USA).

Determinación de Interleuquina-12: En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura anti-Interleuquina 12 humana (Thermo Scientific, USA) se adicionaron 50 μ l/pocillo de estándar o muestra por duplicado y 100 μ l/pocillo de reactivo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavó la placa 3 veces con solución amortiguadora de lavado. Se adicionaron 100 μ l/pocillo de reactivo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) incubándose a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó nuevamente y se adicionaron 100 μ l/pocillo de solución sustrato TMB incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se detuvo la reacción con

100 μ l/well de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK[®] Instruments, Inc. USA).

Determinación de Interleuquina-15: Se incubó la placa ELISA con el anticuerpo de captura anti-humano IL-15 purificado (eBioscience, Inc. USA) durante toda la noche a 4°C. Se lavó la placa 5 veces con 250 μ l/pocillo de buffer de lavado. Se incubó la placa con diluyente de análisis 1X a temperatura ambiente durante 1 hora. Y se lavó la placa 5 veces con solución amortiguadora de lavado. Se adicionaron 100 μ l/pocillo de estándar en los pocillos correspondientes y 100 μ l/pocillo de las muestras estudiadas en los restantes pocillos. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y se lavó 5 veces con solución amortiguadora de fosfato. Posteriormente se incubó la placa con 100 μ l/pocillo del anticuerpo de detección (anticuerpo anti-humano IL-15 policlonal conjugado con biotina) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó 5 veces con solución amortiguadora de lavado, y se adicionaron 100 μ l/pocillo de Avidina-HRP incubándose a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó nuevamente y se colocó 100 μ l/pocillo de Solución Substrato incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detuvo la reacción con 50 μ l/pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK[®] Instruments, Inc. USA).

Determinación de Interleuquina-18: En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura anti-Interleuquina 18 porcino (Neogen Corporation, USA/Canadá) se adicionaron 300 μ l/pocillo de solución amortiguadora de lavado, se vaciaron y se adicionaron 100 μ l de diluyente de muestra en duplicado en todos los pocillos correspondientes a los estándares y se colocaron 100 μ l de estándar en los pocillos designados. Se agregaron 50 μ l de diluyente de muestra y 50 μ l de la muestra en cada uno de los pocillos correspondientes. Se adicionaron 50 μ l/pocillo de reactivo

conjugado con biotina, se cubrió la placa y se la incubó a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de microplaca a 200 rpm. Se lavó la placa 3 veces con solución amortiguadora de lavado y se adicionaron 100 μ l/pocillo de reactivo conjugado con HRP incubándose a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de microplaca a 200 rpm y se lavó nuevamente. Se colocaron 100 μ l/pocillo de solución substrato TMB incubándose a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 μ l/pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK[®] Instruments, Inc. USA).

Análisis de la estructura de la placenta y útero. Técnica para Microscopía

Óptica: Se fijaron las muestras placentarias en formol adicionado de tampón fosfato al 10 %. Las mismas, fueron deshidratadas de la siguiente manera: se las colocaron en alcohol 96° una hora, nuevamente en alcohol 96° una hora, deshidratante histológico (Biopur, Argentina) una hora, deshidratante histológico/xilol por partes iguales una hora y xilol una hora, luego se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de cada muestra de aproximadamente 5 μ m, montando por portaobjetos de a tres o cuatro cortes; previamente al montaje se colocaron los cortes en un baño termostaticado a 40°C con agua y gelatina para que no se plegaran. Algunos de los preparados obtenidos se colorearon con Hematoxilina-Eosina. Las muestras fueron observadas con un microscopio Axiophot (Zeiss, Göttingen, Alemania.) y la adquisición de imágenes se realizó con una cámara Canon, PowerShot G6, de 7.1 megapíxeles (Canon, Tokio Japón).

Determinación de Integritas: Previo a la implementación de ésta técnica se desparafinaron parte de los cortes de tejido placentario procesados para microscopía óptica mediante el siguiente protocolo: 3 pasajes en xilol 100 % de 10 minutos cada

uno, 2 pasajes en alcohol 100° de 5 minutos cada uno, 2 pasajes en alcohol 96° de 5 minutos cada uno, 2 pasajes en agua destilada de 10 minutos cada uno y 2 pasajes en solución salina tamponada (PBS) de 10 minutos cada uno.

Dado que no existe en el mercado gran disponibilidad de anticuerpos anti-integrinas porcinas se trabajó con anticuerpos anti-integrinas que reaccionan con integrinas porcinas y humanas tal como fue realizado por Bowen *et al.*, (1996); García *et al.*, (2004) y Rashev *et al.*, (2005). Se realizó una técnica de inmunohistoquímica (IHQ) indirecta LSAB (Labeled Strptavidin Biotin Method): se lavó el tejido con PBS, se agregó peróxido de hidrógeno al 3% (para bloquear la peroxidasa endógena) durante 5', se lavó con PBS y se agregó anticuerpo de ratón anti-subunidad de integrina $\beta 1$ humana monoclonal 1:100 (Chemicon) o anticuerpo de conejo anti-integrina $\alpha 3$ humana policlonal 1:500 (Chemicon) o anticuerpo de conejo anti-integrina $\beta 3$ humana policlonal 1:200 (Chemicon); se incubó 20', se lavó nuevamente con PBS. Se agregó el segundo anticuerpo biotilnado (inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra) incubando 20' y se lavó con PBS. Se colocó gotas de streptavidina/HRP de Dako Cytomation y se incubó 20', se lavó con PBS nuevamente, se cubrió con solución cromógena diaminobencidina (DAB), 15', se lavó con agua destilada y se contrastó con hematoxilina (2'), se lavó con agua corriente, se montó y observó en un microscopio Axiophot (Zeiss) y la adquisición de imágenes se realizó con una cámara Canon, PowerShot G6, de 7.1 megapíxeles (Canon, Tokio Japón).

Para la determinación de $\alpha V\beta 3$ se utilizó un anticuerpo de ratón anti-integrina $\alpha V\beta 3$ humana monoclonal conjugado con biotina en una dilución 1:100 (Chemicon), que se reveló de igual manera que en la técnica descrita anteriormente.

Como controles negativos se utilizaron cortes de tejidos a los que se les realizó la misma técnica, la única modificación fue que se reemplazó el primer anticuerpo por PBS.

Los resultados de las técnicas de marcación para determinación de integrinas se expresaron en forma semicualitativa, con la siguiente escala elegida en función de la intensidad de la coloración detectada, considerando:

(-): negativo

(+): baja positividad

(++): positividad intermedia

(+++): alta positividad

Análisis estadístico: Las concentraciones de las hormonas esteroideas P_4 y E_2 , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- γ en suero porcino y extractos placentarios maternos y fetales fueron analizadas mediante un análisis de la varianza y prueba de comparaciones múltiples el test de Tukey ($p < 0,05$). Adicionalmente se realizó una regresión lineal múltiple con los datos obtenidos (Infostat v 1.1).

RESULTADOS

ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LA ESTRUCTURA DE LA PLACENTA Y DE ÚTERO.

En todos los casos, el aspecto macro y microscópico general de los úteros y la placenta se correspondió con el descrito como normal en el periodo del ciclo estral o de la gestación en que se tomo la muestra

En la figura 9 se observa un corte histológico de un útero de cerda no gestante, coloreado con hematoxilina eosina.

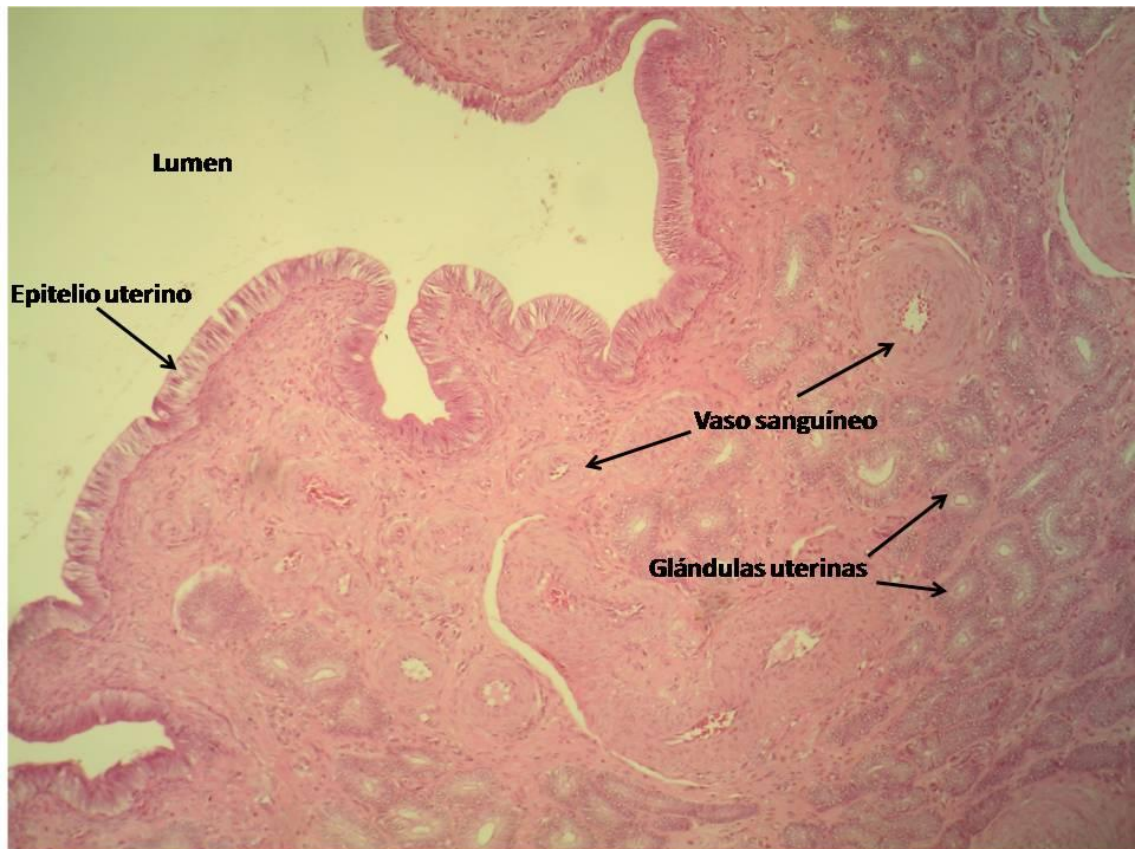


Fig. 9: Microfotografía de un útero vacío donde se observa el epitelio uterino, lumen, glándulas endometriales y vasos sanguíneos, HE 100x.

En la figura 10, se presenta una microfotografía de una placenta de 35 días de preñez en donde se puede observar la interfase feto-materno.

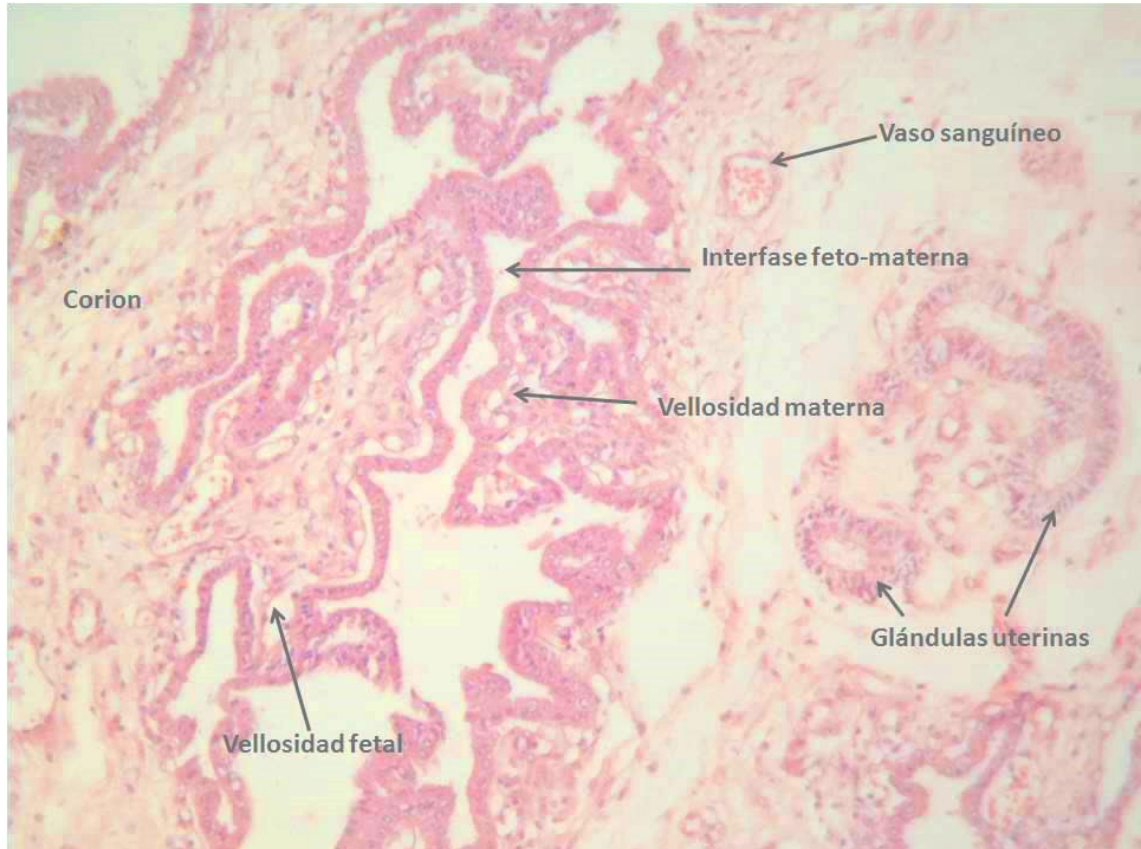


Fig. 10: Microfotografía de una placenta porcina de 35 días de gestación. Se observa la presencia de la interfase feto-materna conformada por vellosidades fetales y maternas, glándulas uterinas y vasos sanguíneos. HE 100x.

En la figura 11 se aprecia la estructura de una placenta porcina materna a término (114 días de gestación), donde se destaca la presencia de los vasos sanguíneos “intraepiteliales” que se conforman en las vellosidades.

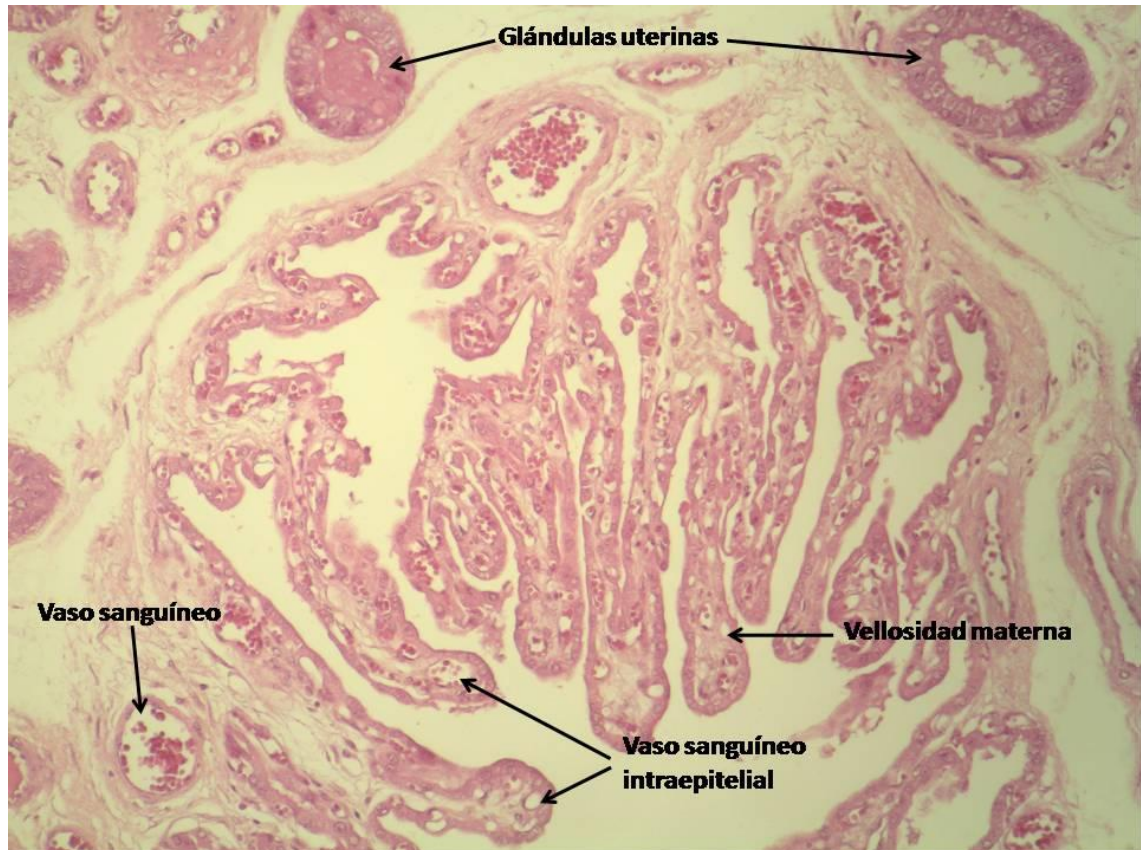


Fig. 11: Microfotografía de una placenta porcina materna de 114 días de gestación. Se aprecian las vellosidades maternas, vasos sanguíneos estromales e intraepiteliales y glándulas endometriales. HE 200x.

DETERMINACIÓN DE INTEGRINAS

En el proyecto de tesis se planificó la determinación de integrinas por una técnica de inmunofluorescencia, según Bowen *et al.*, (1996). Pero en los primeros ensayos comprobamos que con la metodología empleada en nuestros trabajos la placenta porcina autofluoresce por lo que se decidió realizar la determinación de integrinas mediante una técnica inmunohistoquímica basada en la reacción de la peroxidasa.

Expresión de la Integrina $\beta 1$:

Se analizó la expresión de la subunidad de la integrina $\beta 1$ tanto en útero vacío como en muestras placentarias, fetales y maternas, de los diferentes períodos seleccionados. Ver Tabla 1.

Tracto Reproductivo	Epitelio Uterino	Vellosidades		Glándulas Uterinas	Vasos Sanguíneos	Tejido Conectivo	
		Fet.	Mat.			Fet.	Mat.
Útero vacío	+			- / ++ (basal)	++		++
37 días		+++	+++	++	++	+	++
60 días		++	+++	++	++	ND	++
70 días		+++	++	+++	+++	+	++
80 días		+++	++	++	+++	++	++
114 días		+	+	++	++	+	++

Fet: Fetal; Mat: Materno; ND: No Determinado; +, ++, +++: Diferentes Grados de Positividad.

Tabla 1: Expresión de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales.

En la figura 12 se aprecia en la placenta porcina de 37 días de gestación alta positividad a nivel de vellosidades trofoblásticas y maternas para la subunidad $\beta 1$ de las integrinas.

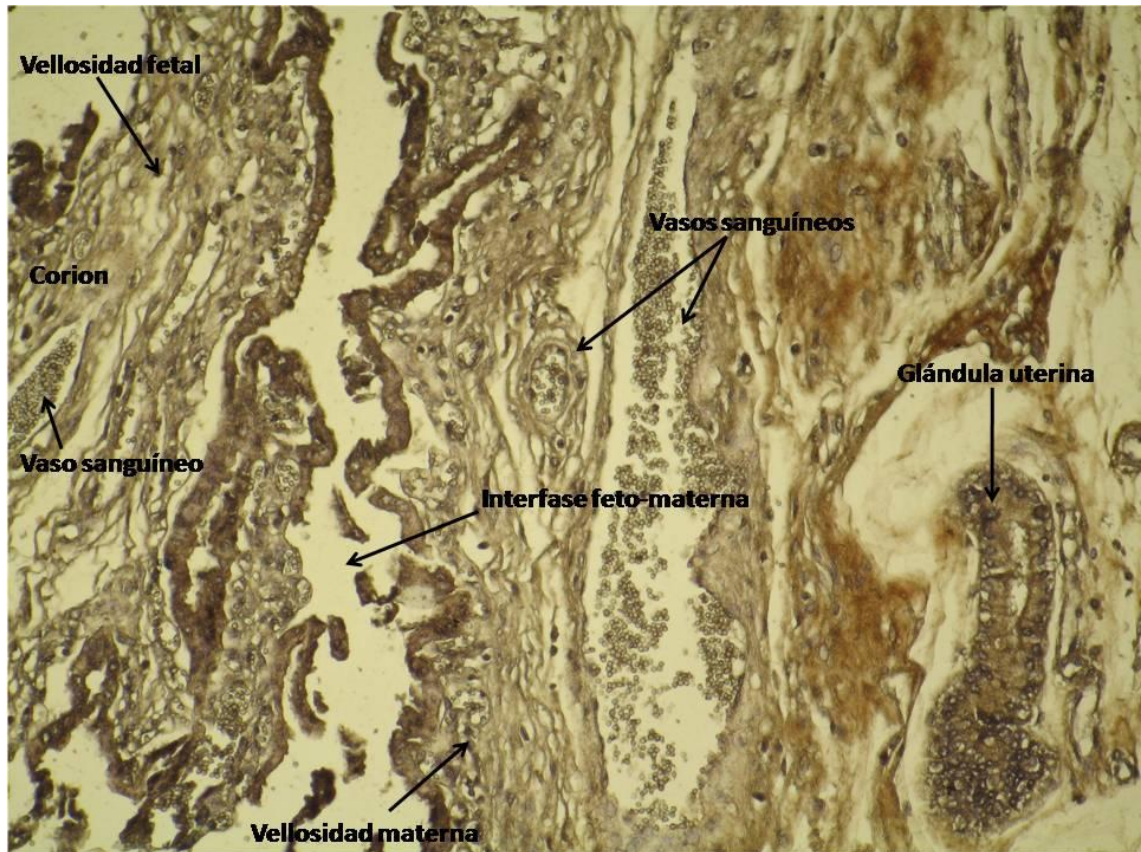


Fig. 12: Microfotografía de interfase placentaria de 37 días de gestación donde se observa alta positividad de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas en las vellosidades fetales y maternas que conforman la interfase feto-materna y positividad intermedia en el tejido conectivo. IHQ 100x.

En la figura 13 se observa positividad a nivel de vellosidades trofoblásticas y maternas para la subunidad $\beta 1$ de las integrinas en la placenta porcina de 80 días de gestación.

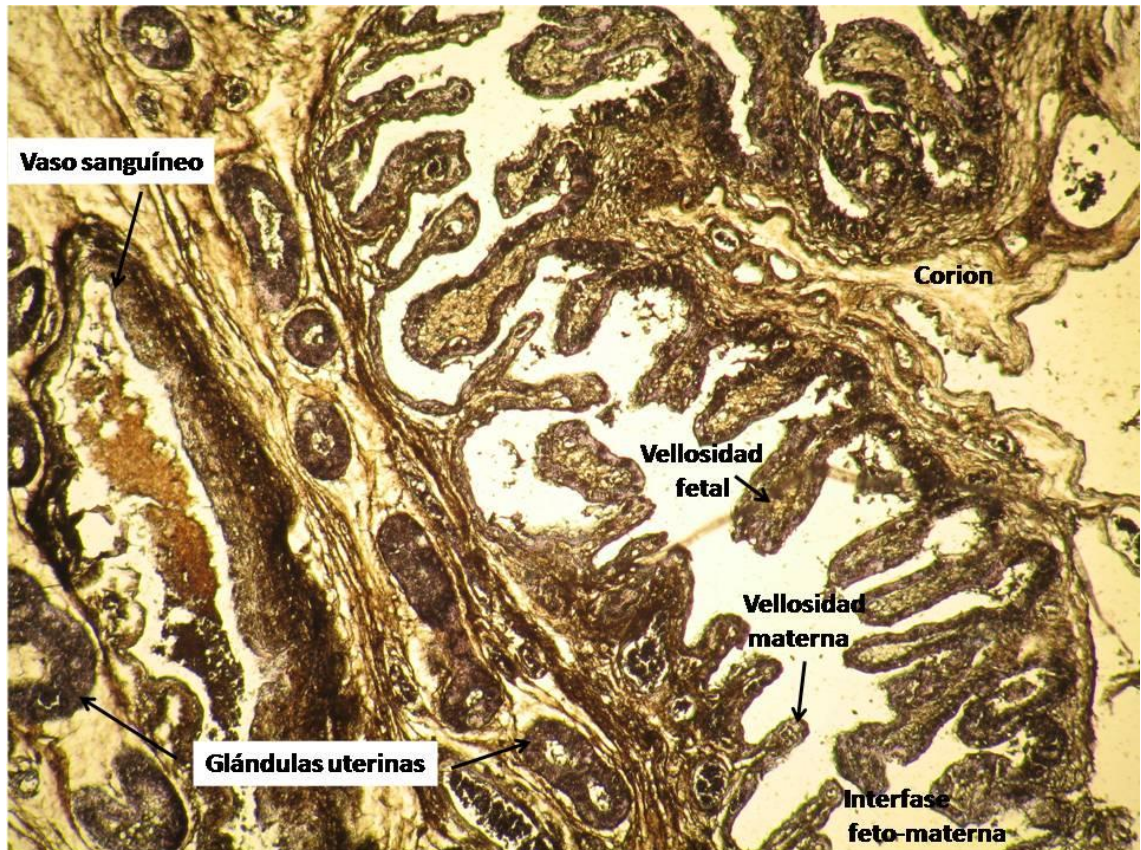


Fig. 13: Microfotografía de interfase placentaria de 80 días de gestación. La subunidad $\beta 1$ de las integrinas se manifiesta con alta intensidad en vellosidades fetales y vasos sanguíneos y con positividad intermedia en vellosidades maternas, glándulas uterinas y tejido conectivo tanto fetal como materno. IHQ 100x.

Expresión de la Integrina $\alpha 3$:

Se halló marcada positividad de $\alpha 3$ en las vellosidades, mientras que las glándulas endometriales mostraron negatividad en todos los períodos gestacionales estudiados. Ver Tabla 2.

Tracto Reproductivo	Epitelio Uterino	Vello­sidades		Glándulas Uterinas	Vasos Sanguíneos	Tejido Conectivo	
		Fet.	Mat.			Fet.	Mat.
Útero vacío	++			–	–		+
37 días		+++	++	–	+++	+	++
60 días		++	+++	–	++	ND	++
70 días		++	+++	–	++	+++	++
80 días		+++	++	–	++	+++	++
114 días		+++			+++	++	

Fet: Fetal; Mat: Materno; ND: No Determinado; +, ++, +++: Diferentes Grados de Positividad.

Tabla 2: Expresión de la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales.

En cortes de 37 días de gestación (figura 14) las vellosidades fetales presentaron positividad alta (+++) a la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas, las vellosidades maternas positividad intermedia (++) y no hubo expresión a nivel glandular.



Fig. 14: Microfotografía de interfase feto-materno de 37 días de gestación. Se aprecia la expresión de $\alpha 3$ en las vellosidades fetales, maternas y vasos sanguíneos, así como en tejido conectivo fetal (+) y materno (++) . Las glándulas uterinas fueron negativas al marcaje de la subunidad $\alpha 3$. IHQ 100x.

A los 60 días de gestación (figura 15) las vellosidades maternas fueron positivas a la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas, en cambio no hubo expresión de esta subunidad en las glándulas.



Fig. 15: Microfotografía de placenta materna de 60 días de gestación. Y se observa positividad intermedia de la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas en vasos sanguíneos y tejido conectivo materno. Se destaca la ausencia de la expresión de ésta integrina en las glándulas uterinas. IHQ 200x.

Expresión de la Integrina $\beta 3$:

Esta integrina se expresó, con marcación elevada en todos los tejidos placentarios estudiados. Ver Tabla 3.

Tracto Reproductivo	Epitelio Uterino	Vellosidades		Glándulas Uterinas	Vasos Sanguíneos	Tejido Conectivo	
		Fet.	Mat.			Fet.	Mat.
Útero vacío	++			-	ND		
37 días		+++	+++	+++	++	ND	++
60 días		+	+	-	++	++	++
70 días		++	++	++	++	+	++
80 días		+++	+++	-	+++	++	++
114 días		+++	+++	+++	+++	++	++

Fet: Fetal; Mat: Materno; ND: No Determinado; +, ++, +++: Diferentes Grados de Positividad.

Tabla 3: Expresión de la subunidad $\beta 3$ de las integrinas en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales.

En gestaciones de 37 días de gestación la subunidad $\beta 3$ se expresó intensamente en las vellosidades maternas y fetales y en las glándulas uterinas (figura 16).

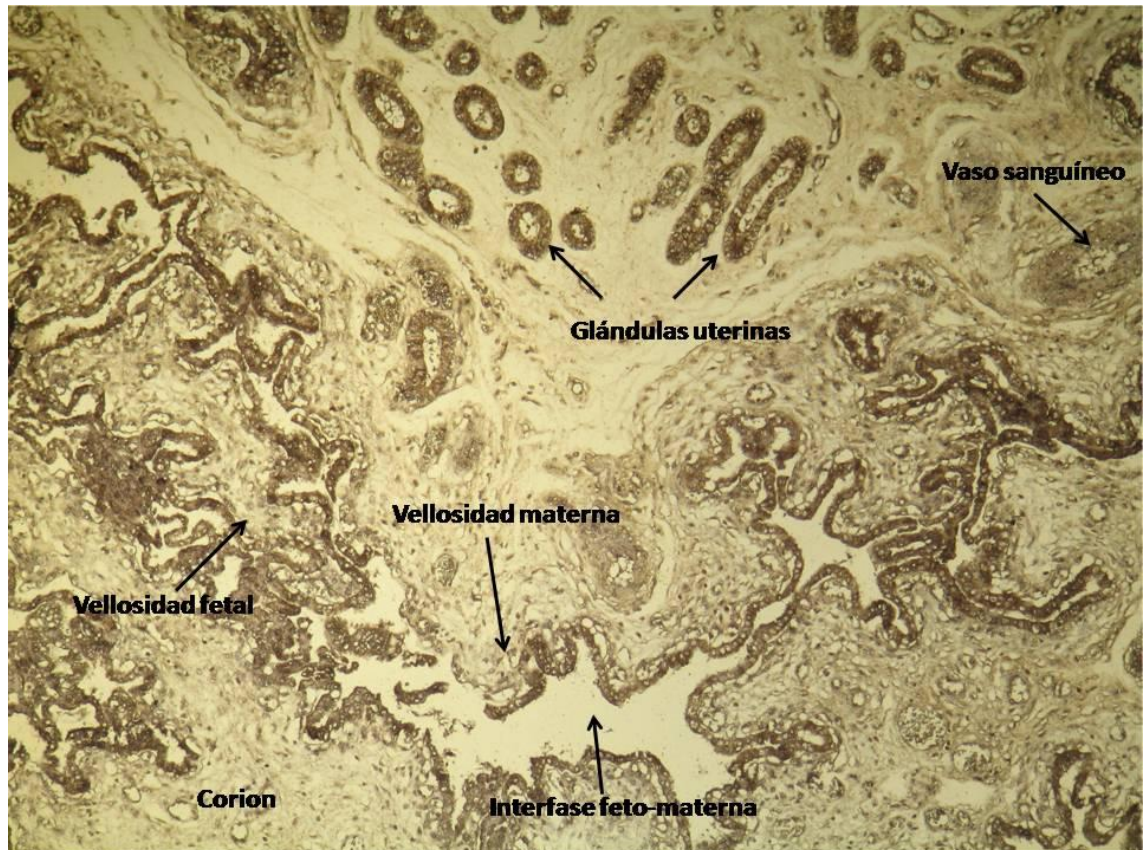


Fig. 16: Microfotografía de interfase placentaria de 37 días de gestación donde se aprecia alta expresión de $\beta 3$ a nivel de vellosidades maternas y fetales y en glándulas uterinas, así como en corion y tejido conectivo materno. IHQ 100x

En cortes de 60 días de gestación la expresión de $\beta 3$ en las vellosidades fetales y maternas fue de intensidad baja y no se encontró en las glándulas uterinas (figura 17).



Fig. 17: Microfotografía de placenta de 60 días de gestación donde se observa el poco marcaje de $\beta 3$ en las vellosidades y la negatividad en las glándulas endometriales. IHQ 100x.

En la figura 18 que muestra una placenta de 70 días de preñez se observa expresión intermedia de $\beta 3$ en las vellosidades fetales y maternas así como en las glándulas uterinas.

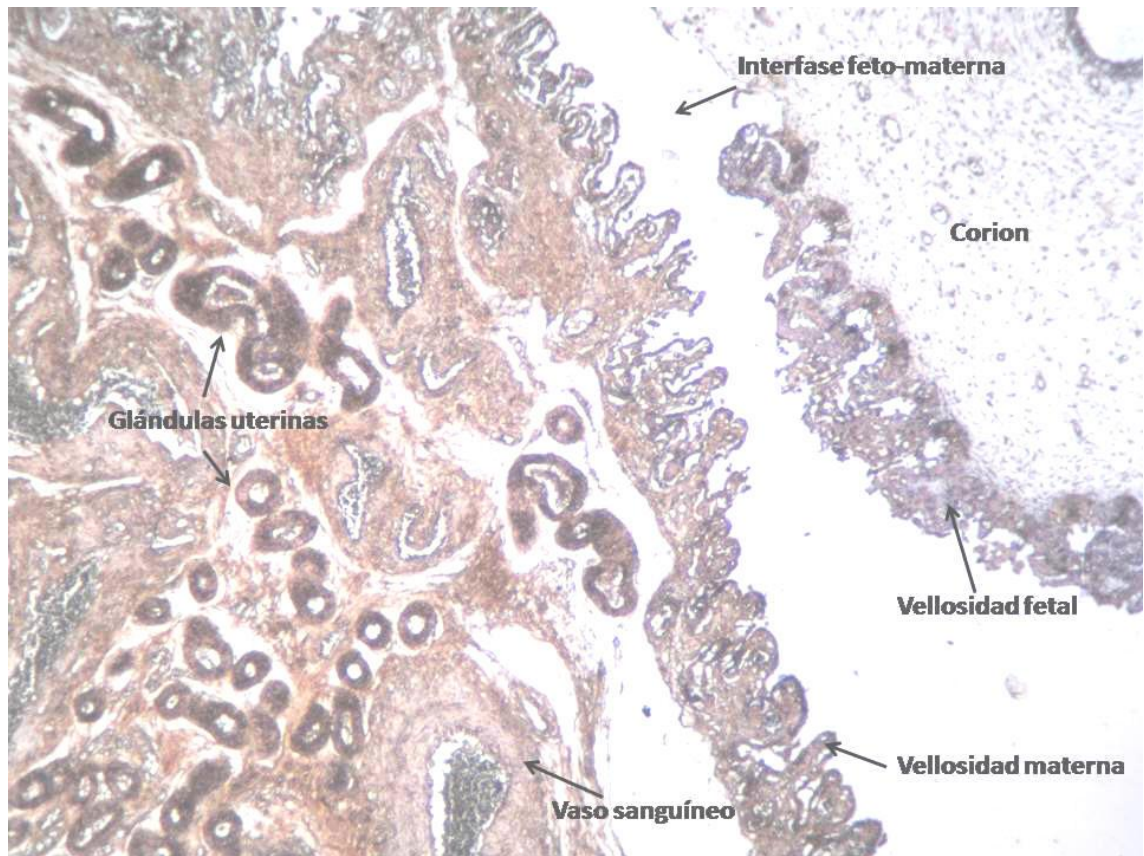


Fig. 18: Microfotografía de una interfase placentaria de 70 días de preñez donde se aprecia la expresión intermedia de $\beta 3$ en los tejidos maternos y la disminución en la intensidad de la marcación en el corion. IHQ 100x.

En la preñez de 80 días la subunidad $\beta 3$ se expresó intensamente en los tejidos estudiados, siguiendo un patrón semejante al hallado a los 37 días de gestación, con excepción de las glándulas endometriales que se presentan negativas (figura19).

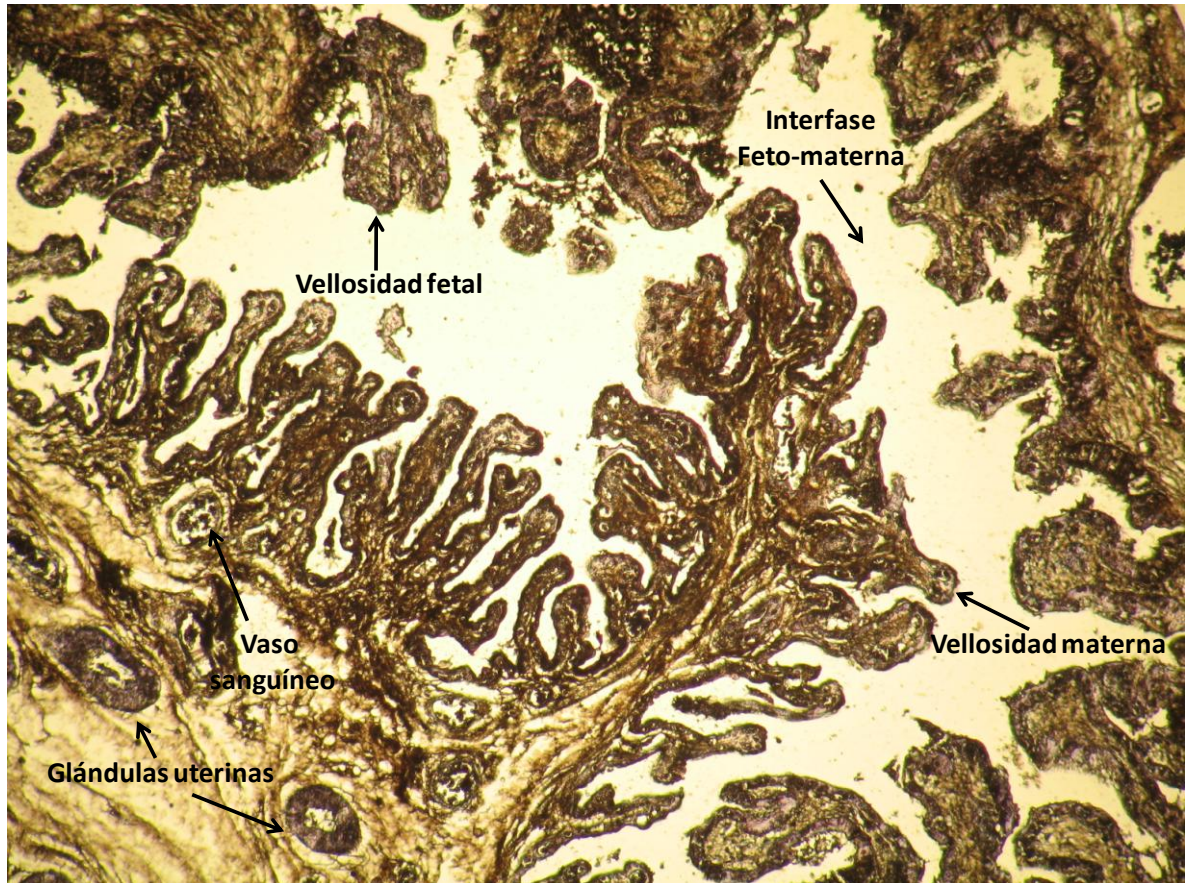


Fig. 19: Microfotografía donde se observa alta expresión de $\beta 3$ en las vellosidades de la interfase placentaria de 80 días de gestación. Se destaca la ausencia de expresión en las glándulas uterinas. IHQ 100x.

En la preñez a término (114 días de gestación) se observó alta expresión de $\beta 3$ en la interfase feto-materna y en las glándulas endometriales. Fue el período en donde se halló la máxima expresión de $\beta 3$.

Expresión de la Integrina $\alpha v \beta 3$:

Durante la placentación la integrina $\alpha v \beta 3$ se expresó en las vellosidades durante la gestación y solamente a los 37 días en las glándulas uterinas. Ver Tabla 4.

Tracto Reproductivo	Epitelio Uterino	Velloidades		Glándulas Uterinas	Vasos Sanguíneos Maternos	Tejido Conectivo	
		Fet.	Mat.			Fet.	Mat.
Útero vacío	+			-	+++		+++
37 días		+	++	++	+/-	+	++
60 días		+	+	-	+++	+++	+++
70 días		+++	+	-	+	+	+
80 días		+	-	-	++	++	+++
114 días		+			-	+	

Fet: Fetal; Mat: Materno; ND: No Determinado; +, ++, +++: Diferentes Grados de Positividad.

Tabla 4: Expresión de la integrina $\alpha\beta3$ en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales.

En la gestación de 37 días la expresión de $\alpha\beta3$ fue baja en las vellosidades fetales e intermedia en las vellosidades maternas y en las glándulas (figura 20).

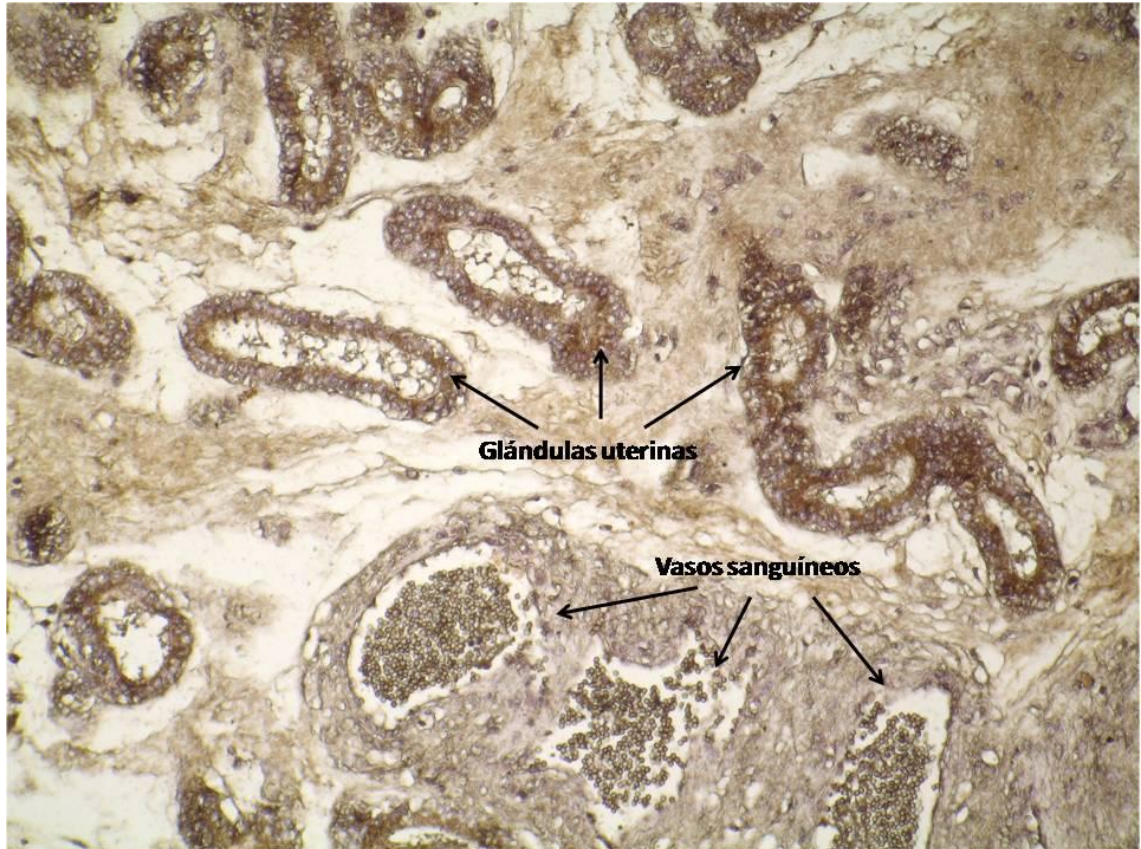


Fig. 20: Microfotografía de de un corte de tejido placentario materno de 37 días de gestación. Se aprecia el marcaje de $\alpha\beta 3$ en las glándulas endometriales y en el estroma. IHQ 400x.

La expresión de la integrina $\alpha\beta 3$ a los 60 días de gestación mostró baja intensidad de marcaje en vellosidades fetales y maternas y ausencia en glándulas uterinas. Por el contrario se halló alta expresión en vasos sanguíneos maternos y tejido conectivo tanto fetal como materno (figura 21).



Fig. 21: Microfotografía de una interfase feto-materna de 60 días de gestación con expresión baja de $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ en las vellosidades placentarias. Y ausencia de expresión en glándulas uterinas. IHQ 100x.

En cortes de tejido placentario de 70 días de preñez se pudo observar que la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ presenta alta expresión a nivel de las vellosidades fetales y baja expresión en las maternas. Los vasos sanguíneos, así como el tejido conectivo fetal y materno presentaron baja expresión, y hubo ausencia de marcación en glándulas endometriales (figura 22).

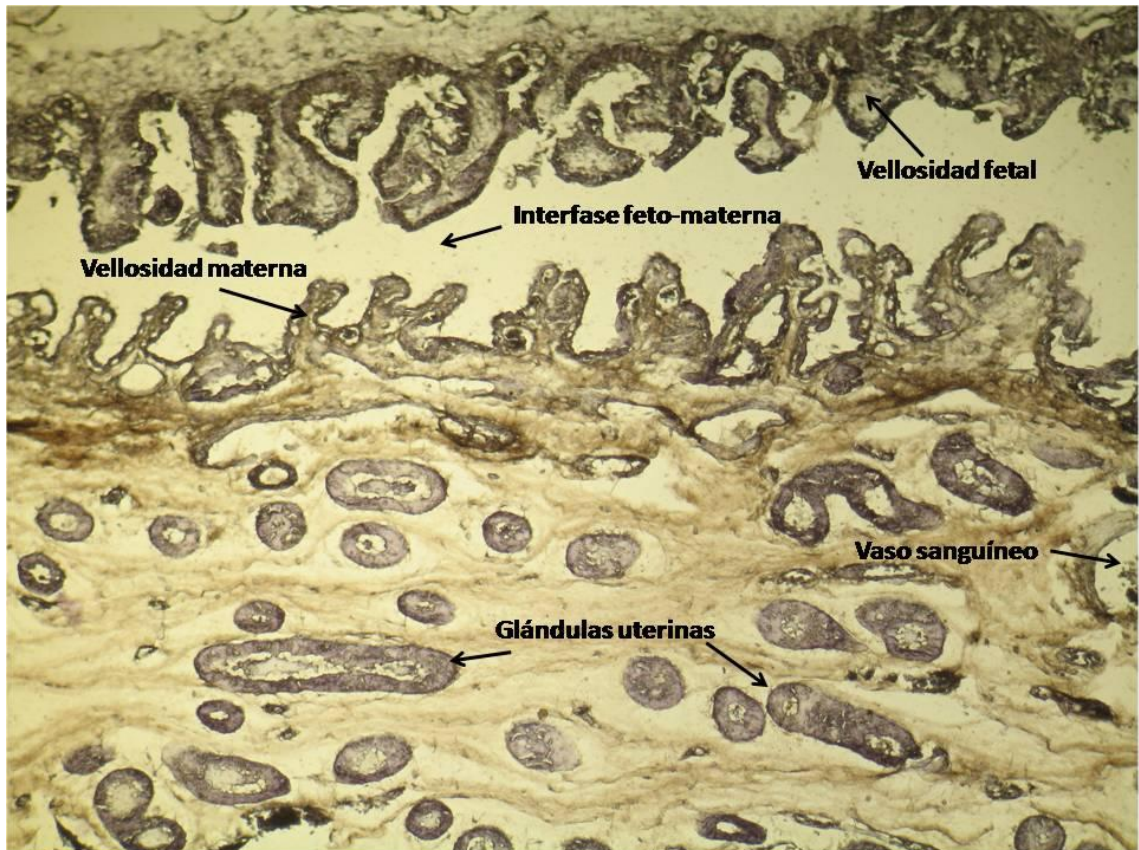


Fig. 22: Microfotografía de una interfase de 70 días de gestación con alta expresión en las vellosidades fetales y baja expresión en vellosidades maternas y ausencia de marcaje en las glándulas endometriales. IHQ 100x.

A los 80 días de gestación la integrina $\alpha v \beta 3$ disminuyó su expresión en las vellosidades, siendo negativa en las maternas; tampoco se expresó en glándulas endometriales. Su presencia se observó en vasos sanguíneos y tejido conectivo fetal y materno (figura 23).

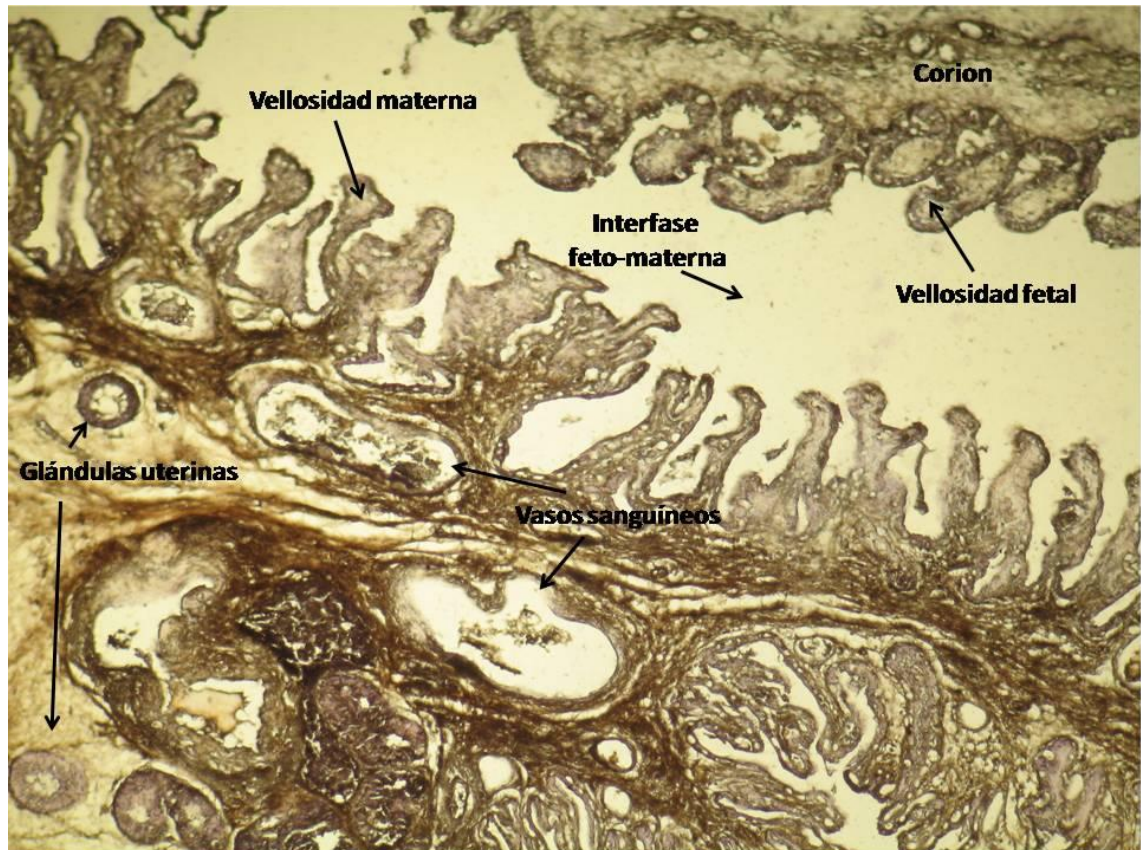


Fig. 23: Microfotografía de corte placentario de 80 días de gestación con baja expresión de $\alpha v \beta 3$ en las vellosidades fetales y sin expresión en las vellosidades maternas y las glándulas uterinas. IHQ 100x.

DETERMINACIÓN DE HORMONAS

En el proyecto de tesis se planificó la determinación de hormonas por RIA, lo que conlleva el uso de material radioactivo de riesgo, por lo tanto se utilizó un test de correlación para vincular RIA con quimioluminiscencia en los resultados, analizando muestras tomadas al azar, por duplicado, de suero, extractos placentarios maternos y fetales porcinos de distintos períodos gestacionales para la determinación de P_4 (Tabla 5, Anexos). Se decidió utilizar éste último método de menor riesgo para determinar las concentraciones de E_2 .

La relación entre quimioluminiscencia y RIA arrojó un $R^2=0,9282$ con un valor $p<0,001$, lo que evidencia un alto índice de correlación, como se observa en la figura 24.

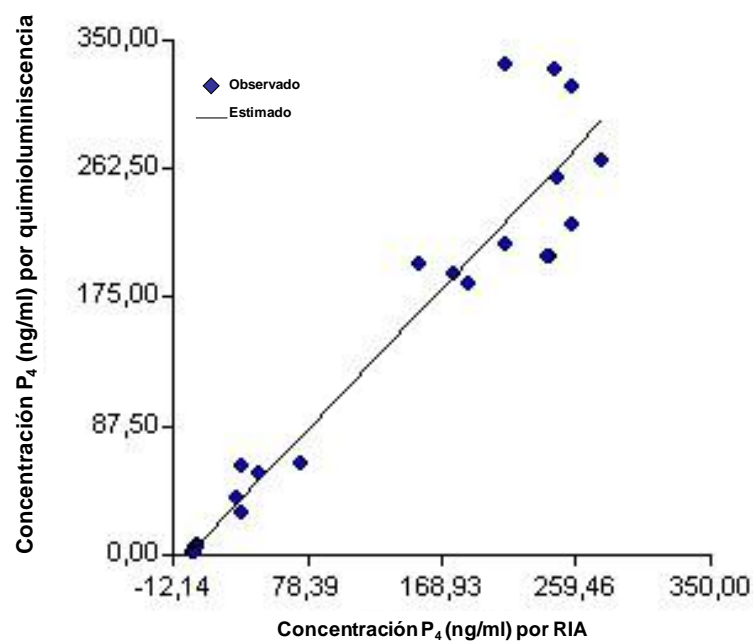


Fig. 24: Análisis de correlación de las concentraciones de P_4 determinadas mediante quimioluminiscencia y radioinmunoensayo en muestras de suero, y homogenatos de placentarios maternos y fetales, $n=30$, (polinomio lineal, $y=2.12+1.05^x$; $r^2=0.92$, $P<0.001$). Se presentan los valores promedios observados y los estimados por la función polinomial.

Determinación de progesterona

La determinación de P₄ se realizó en suero, HoPM, HoPF y HoU, y los resultados se detallan en tabla 6 (Anexos).

Concentración de progesterona (ng/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0) y homogenatos de placenta materna. Figura 25 y figura 26.

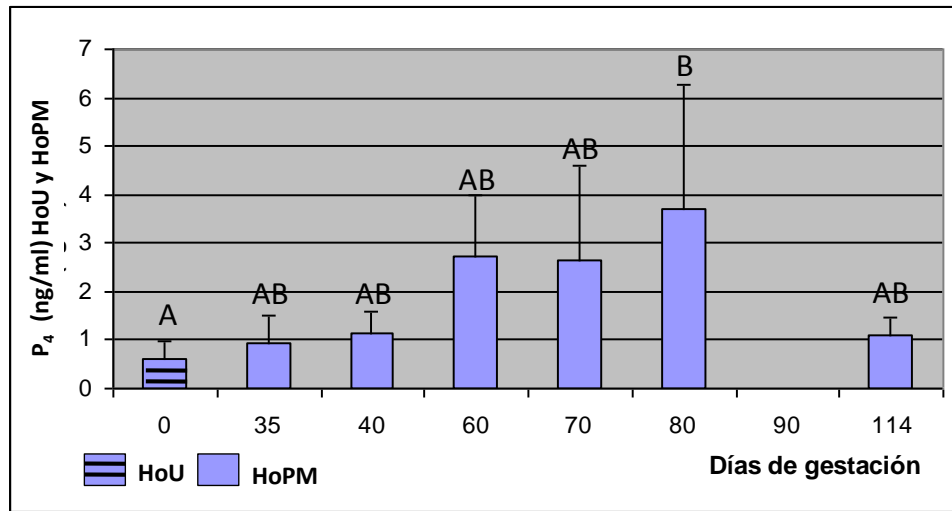


Fig. 25: Valores medios y desvío estándar de P₄ (ng/ml) en HoU y HoPM. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; p<0,05).

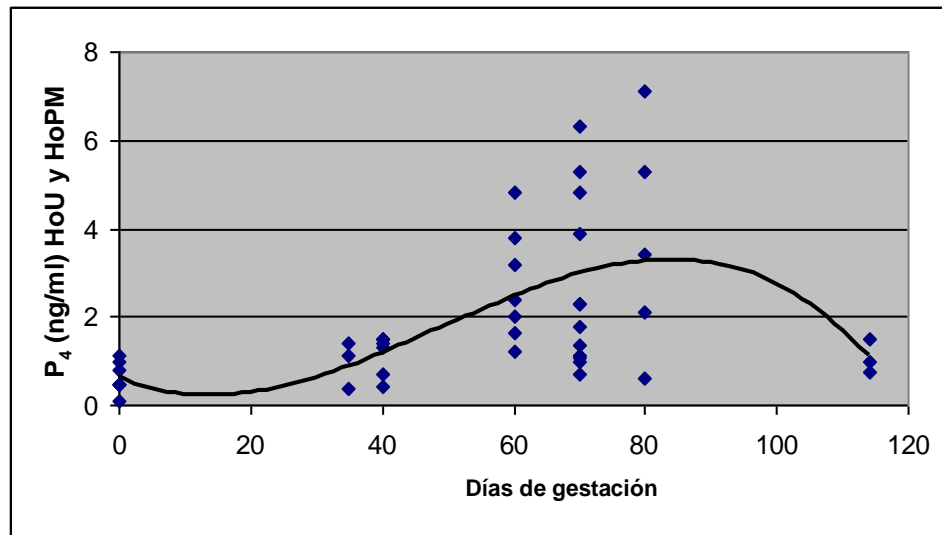


Fig. 26: Análisis de regresión de los valores de progesterona (ng/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0) y homogenato de placenta materna a distintos tiempos. Polinomio cúbico; $y = -1,8E-0,5x^3 + 0,0026x^2 - 0,063x + 0,6327$; R² ajustado = 0,2993; p=0,0007.

Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de P₄ en HoU de hembras vacías ($0,63 \pm 0,35$) vs concentraciones de P₄ en HoPM en hembras preñadas ($2,04 \pm 1,19$): $p = 0,03$. Con respecto al R² si bien fue significativo el valor fue bajo.

Concentraciones de progesterona (ng/ml) en homogenatos de placenta fetal.

Figura 27 y 28.

Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de P₄ en HoU (día 0) de hembras vacías ($0,63 \pm 0,35$) y las concentraciones de P₄ en HoPF de hembras preñadas en diferentes períodos gestacionales ($51,58 \pm 15,55$): $p < 0,0001$.

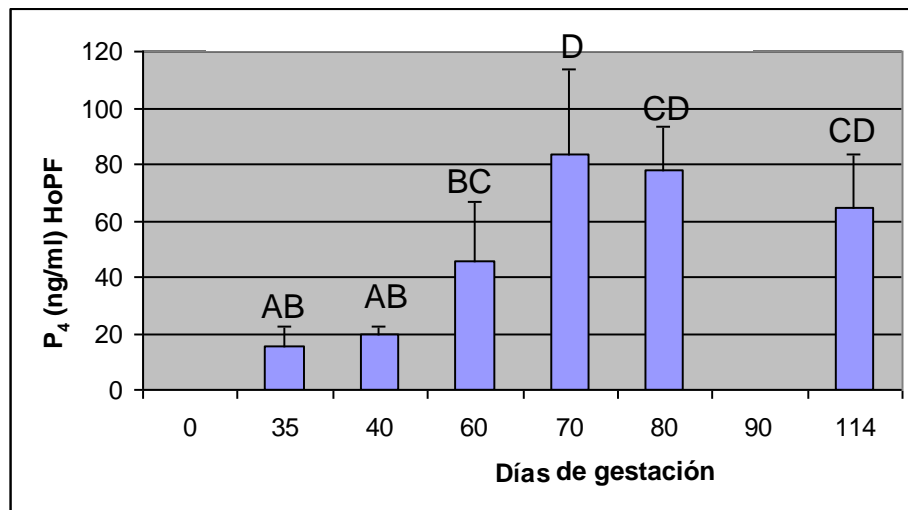


Fig. 27: Valores medios y desvío estándar de P₄ (ng/ml) en HoPF. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$).

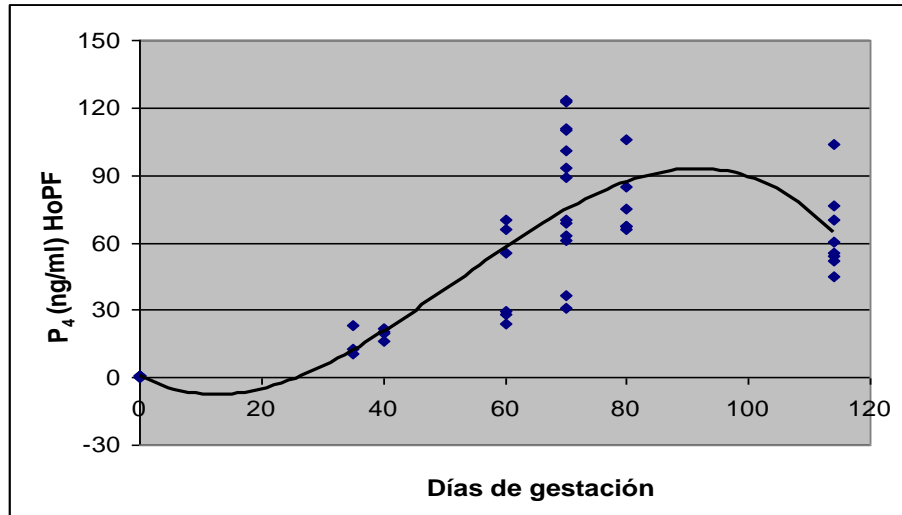


Fig. 28: Análisis de regresión de los valores de progesterona (ng/ml) en homogenato de placenta fetal a distintos tiempos. Polinomio cúbico; $y = -0,0004x^3 + 0,0634x^2 - 1,3994x + 0,7045$; R^2 ajustado = 0,6613; $p < 0,0001$.

A diferencia del R^2 hallado en HoU y HoPM, en los HoPF el R^2 obtuvo mayor significancia aunque también se observa la dispersión entre los días 60-80 de gestación.

Concentración de progesterona (ng/ml) en suero. Figura 29 y 30.

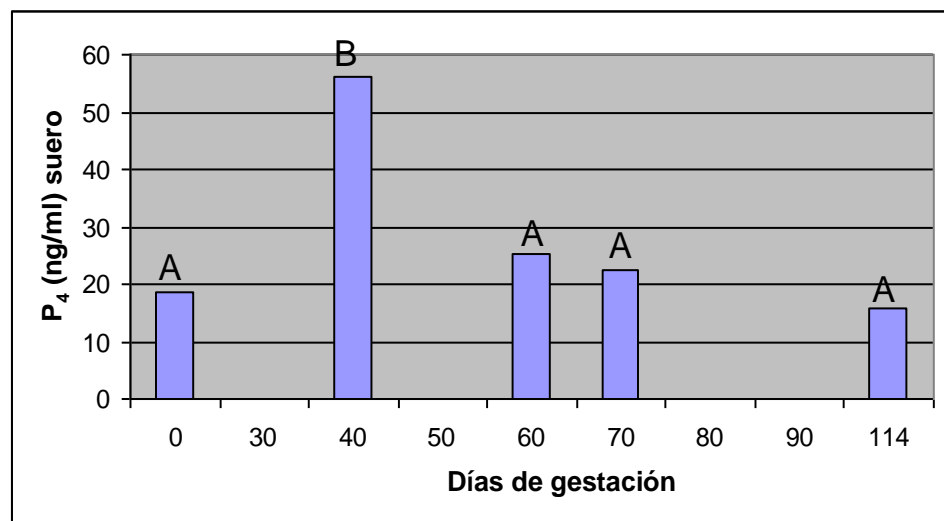


Fig. 29: Valores medios de P₄ (ng/ml) en suero de cerdas en diferentes períodos gestacionales, día 0 corresponde a hembras vacías. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$).

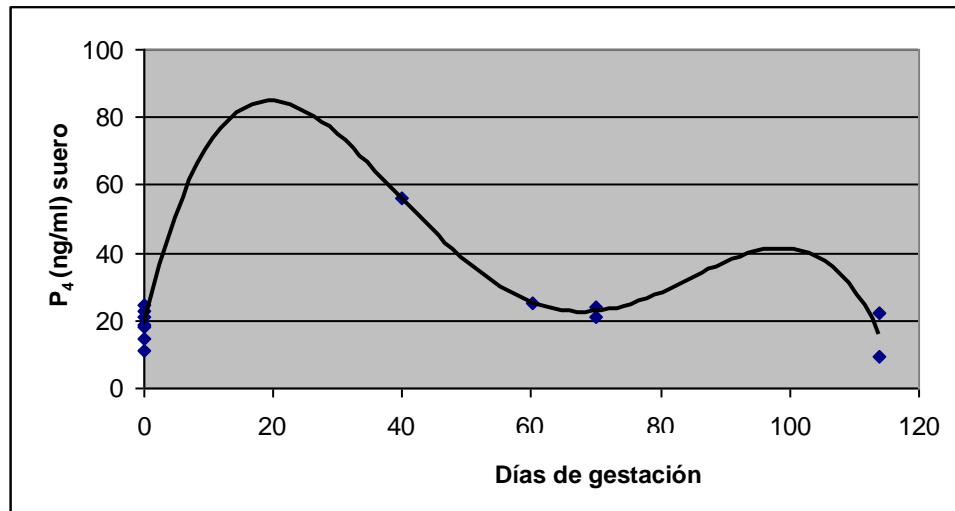


Fig. 30: Análisis de regresión de los valores de progesterona (ng/ml) en suero de hembras vacías (día 0) y en distintos períodos de gestación. Polinomio de cuarto orden; $y = -1,5E-05x^4 + 0,0037x^3 - 0,3005x^2 + 7,9384x + 18,6286$; R^2 ajustado = 0,7808; $p = 0,002$.

Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de P₄ en suero de hembras vacías ($18,63 \pm 4,73$) con respecto al de hembras preñadas ($29,97 \pm 9,33$): $p = 0,0059$

Además, se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de P₄ entre los HoPM y los HoPF al realizar un análisis de la varianza ($p < 0,0001$) a un factor (tejido) con bloque (día). (Fig. 31).

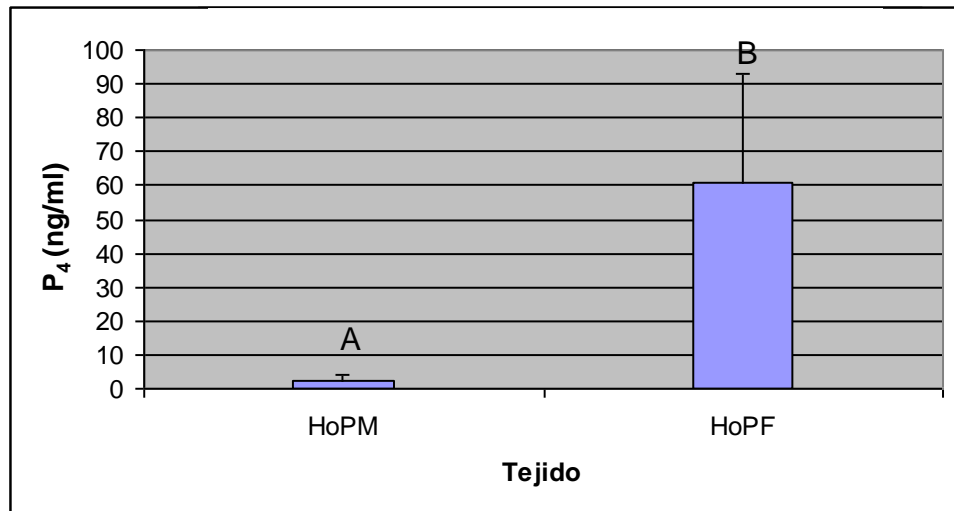


Fig. 31: Valores medios de progesterona (ng/ml; desvío estándar) en HoPM y HoPF durante la gestación. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA; $p < 0,0001$).

Determinación de estrógenos

La determinación de estrógenos se realizó en suero, HoPM, HoPF y HoU, los resultados se detallan en la tabla 7 (Anexos).

Concentración de estrógenos (pg/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0)

y homogenatos de placenta materna. Figura 32 y 33.

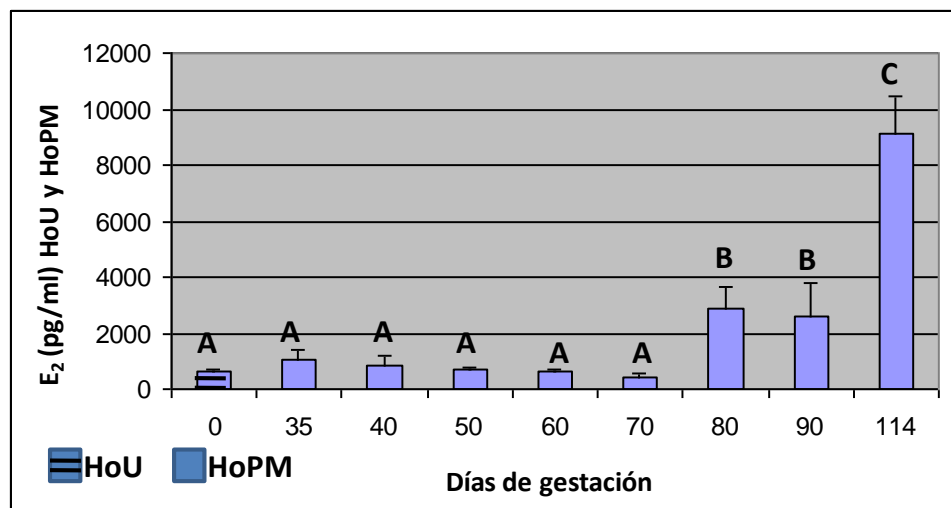


Fig. 32: Valores medios y desvío estándar de E₂ (pg/ml) en HoU (día 0) y HoPM. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$).

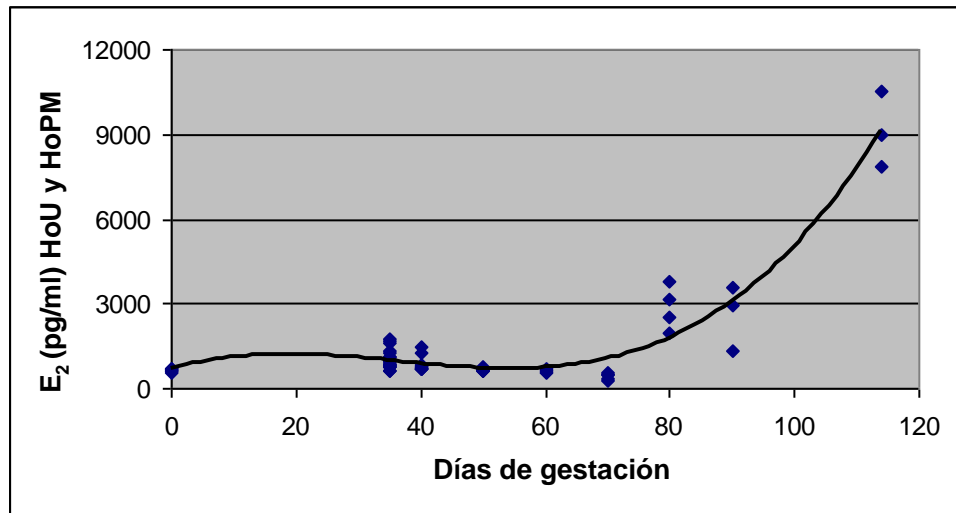


Fig. 33: Análisis de regresión de los valores de estrógeno (pg/ml) en homogenato de útero vacío y homogenato de placenta materna de distintos períodos de gestación. Polinomio cúbico; $y = 0,0211x^3 - 2,3182x^2 + 63,8439x + 688,4983$; R^2 ajustado = 0,9124; $p < 0,0001$.

Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de E₂ en HoU de hembras vacías ($658,2 \pm 59,95$) y E₂ de HoPM en hembras preñadas ($2285,76 \pm 519,91$): $p = 0,03$.

Concentración de estrógeno (pg/ml) en homogenatos de placenta fetal.

Figura 34 y 35.

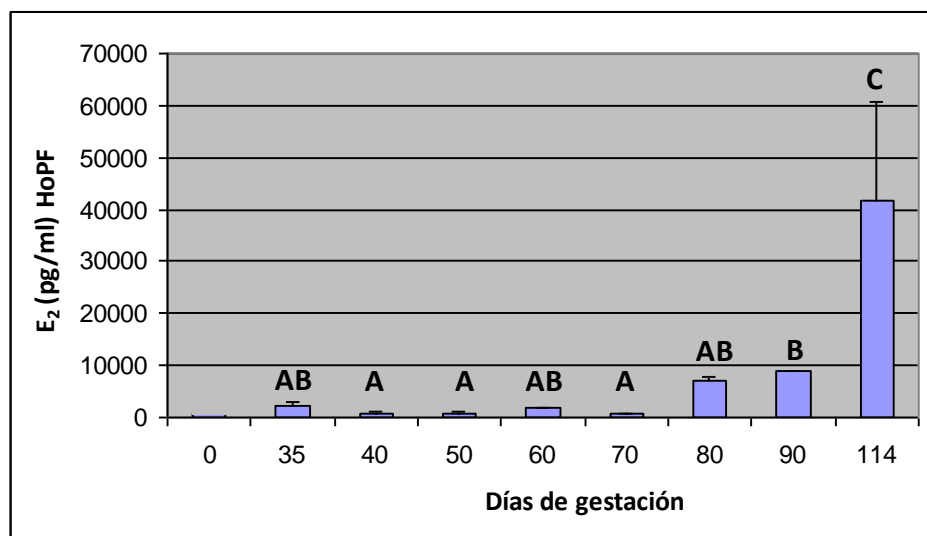


Fig. 34: Valores medios y desvío estándar de E₂ (pg/ml) en HoPF. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$).

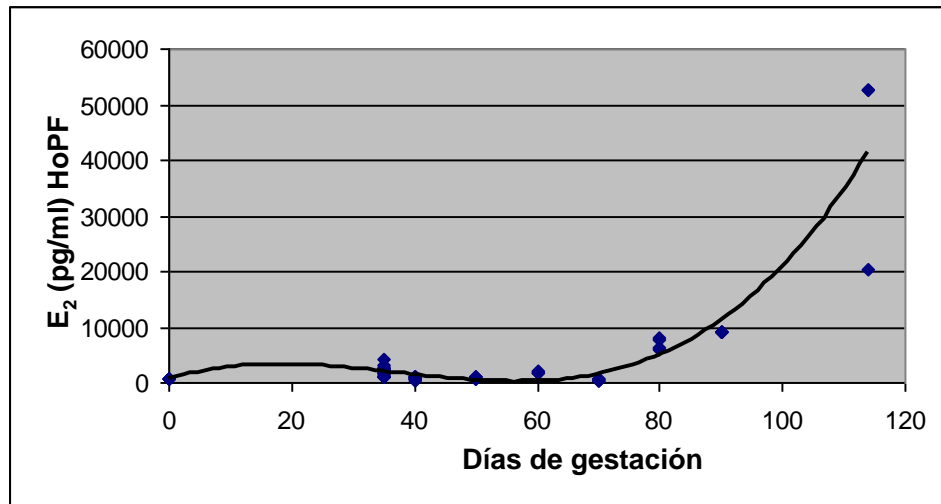


Fig. 35: Análisis de regresión de los valores de estrógeno (pg/ml) en homogenato de placenta fetal de distintos períodos de gestación. Polinomio cúbico; $y = 0,1087x^3 - 12,2038x^2 + 336,0042x + 540,0882$; R^2 ajustado = 0,8529; $p < 0,0001$.

Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de E_2 en HoU de hembras vacías ($658,2 \pm 59,95$) vs E_2 en HoPF de hembras preñadas ($8012,44 \pm 2639,48$): $p < 0,0001$

Concentración de estrógeno (pg/ml) en suero. Figura 36 y 37.

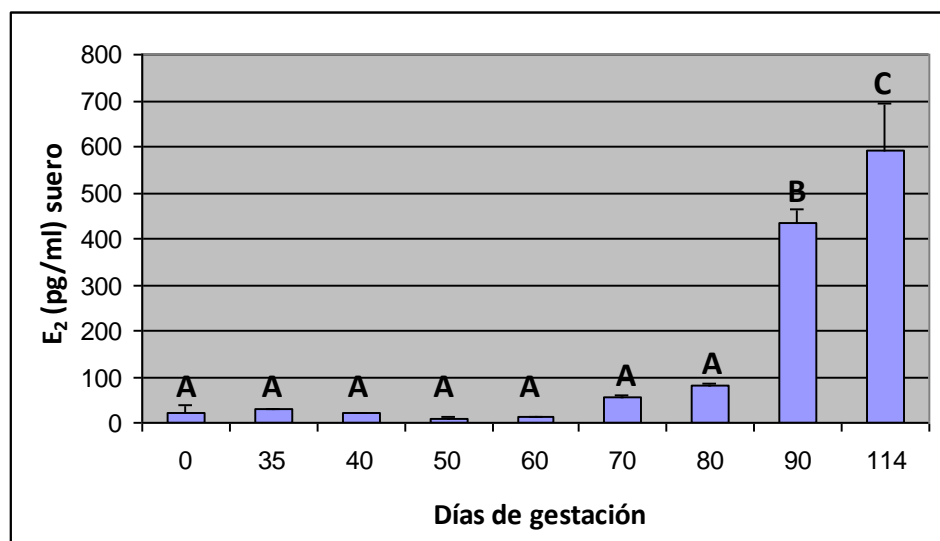


Fig. 36: Valores medios de estrógeno (pg/ml) y desvío estándar en suero de hembras vacías (día 0) y en cerdas de diferentes períodos de gestación. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p < 0,05$).

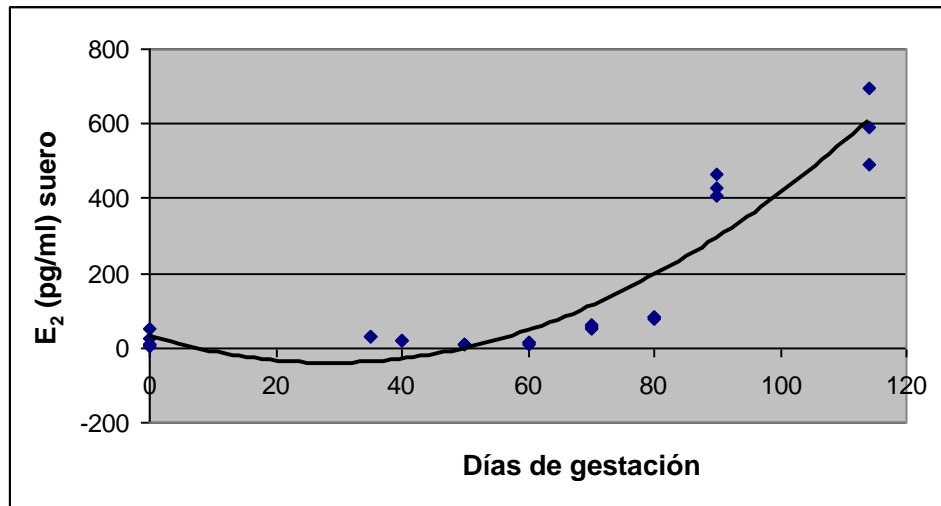


Fig. 37: Análisis de regresión de los valores de estrógeno (pg/ml) en suero de cerdas vacías y de cerdas en diferentes períodos de gestación. Polinomio cuadrado; $y = 0,0895x^2 - 5,1611x + 32,2446$; R^2 ajustado 0,8594; $p < 0,0001$.

Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de E₂ en suero de hembras vacías ($19,36 \pm 19,55$) comparado con las concentraciones en suero de hembras preñadas ($154,69 \pm 18,33$): $p = 0,0059$.

Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de E₂ en suero, HoPM y HoPF realizándose un análisis de la varianza ($p < 0,0001$) a un factor (tejido) con bloque (día) y como test de comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Figura 38.

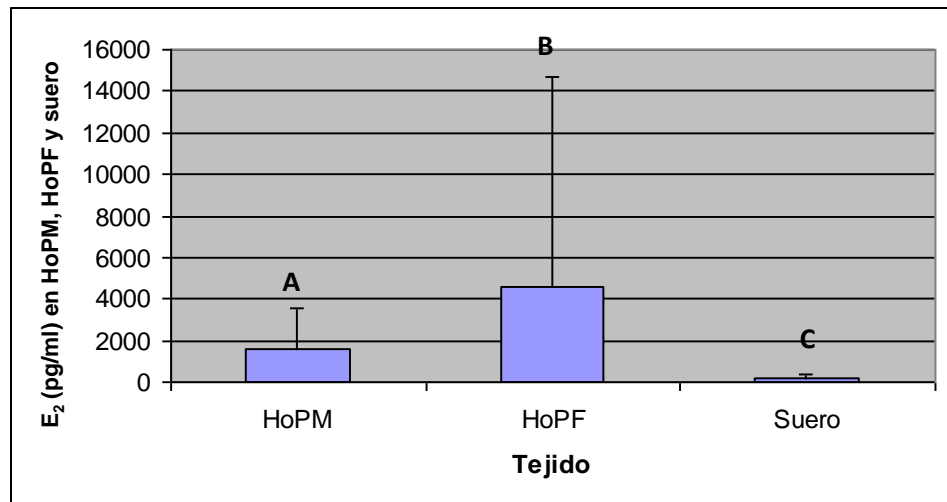


Fig. 38: Valores medios de E₂ (pg/ml) y desvío estándar en suero, HoPM y HoPF. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; p<0,05).

E₂ en HoU de hembras vacías vs E₂ en HoPF de hembras preñadas: p = 0,0006

E₂ en suero de hembras vacías vs E₂ en suero de hembras preñadas: p<0,0001

DETERMINACIÓN DE INTERLEUQUINAS

Se realizó mediante ELISA la determinación de citoquinas en homogenatos de placenta porcina materna y fetal y sueros porcinos provenientes de diferentes períodos de gestación.

Determinación de IFN- γ

Las concentraciones de IFN- γ determinados en suero, HoU, HoPM y HoPF se detallan en la tabla 8 (Anexos) y figura 39. Se aprecia un elevado valor de IFN- γ a los 32 días en HoPF.

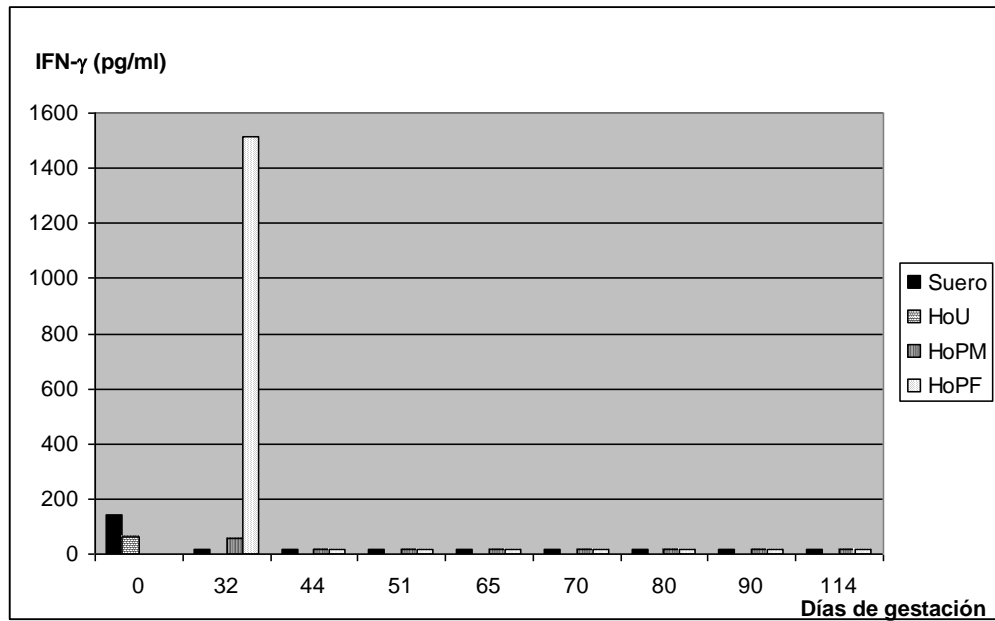


Fig. 39: Concentración de IFN- γ (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

En las figuras 40, 41 y 42 se aprecian las regresiones halladas de IFN- γ con el programa INFOSTAT v 1.1.

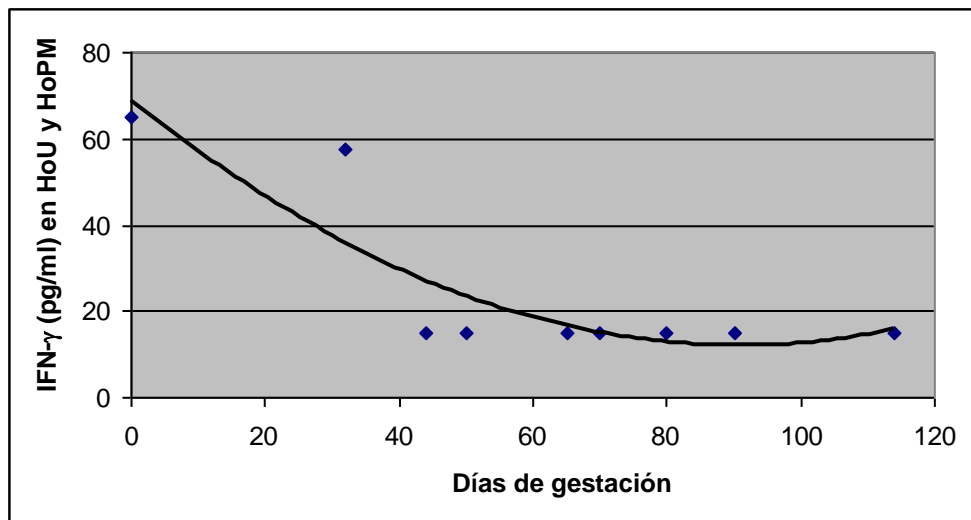


Fig. 40: Regresión de la concentración de IFN- γ (pg/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0) y homogenatos de placenta materna en distintos días de la gestación porcina. Los valores menores a 15 pg/ml fueron considerados iguales a 15 pg/ml. Polinomio cuadrado; $y = 0,0069x^2 - 1,2548x + 68,9588$; R^2 ajustado 0,7119; $p = 0,0101$.

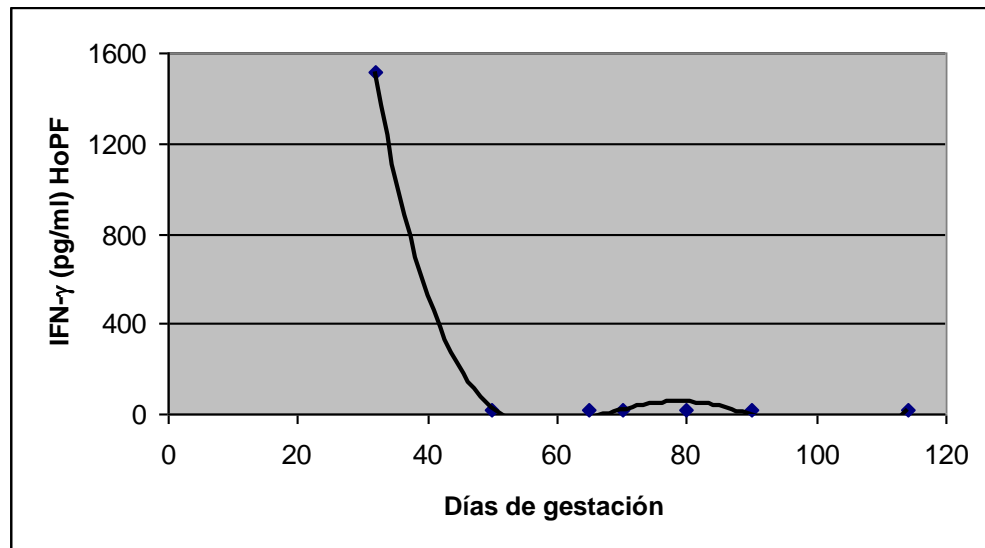


Fig. 41: Regresión de la concentración de IFN- γ (pg/ml) en homogenatos de placenta fetal provenientes de distintos días de la gestación porcina. Los valores menores a 15 pg/ml fueron considerados iguales a 15 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = 0,0005x^4 - 0,1508x^3 + 17,6883x^2 - 895,6747x + 16510,964$; R^2 ajustado = 0,995; $p = 0,0033$.

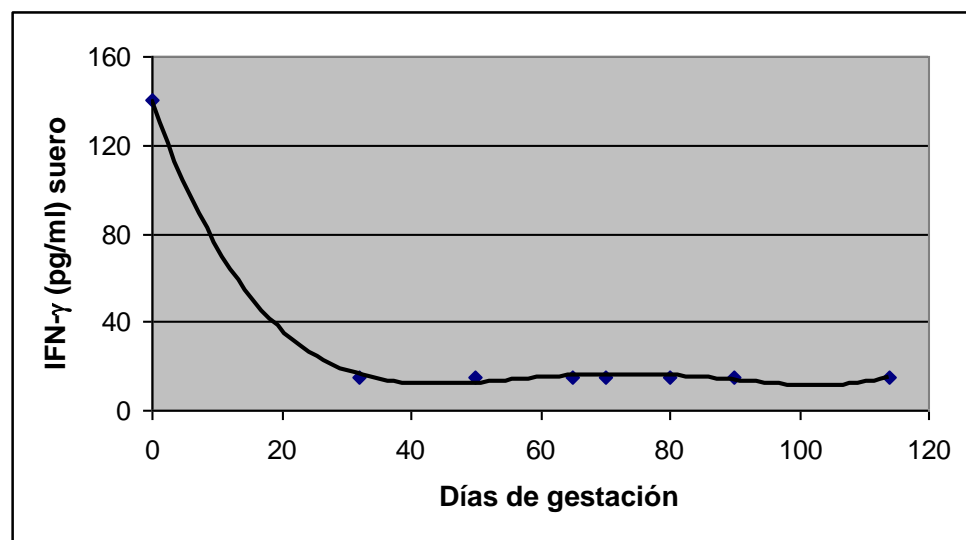


Fig. 42: Regresión de la concentración de IFN- γ (pg/ml) en suero de cerdas vacías (día 0) y de cerdas en distintos períodos gestacionales. Los valores menores a 15 pg/ml fueron considerados iguales a 15 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = 0,0000064x^4 - 0,0019x^3 + 0,1944x^2 - 8,3933x + 140,3742$; R^2 ajustado = 0,9978; $p = 0,0001$.

Se destaca el R^2 hallado con alta significación en HoPF y suero.

Determinación de IL-6

Las concentraciones de IL-6 determinadas en suero, HoU, HoPM y HoPF se detallan en la tabla 9 (Anexos) y figura 43.

No se incluyeron gráficos para IL6 en homogenato de placenta materna por no haberse encontrado algún modelo con un R^2 ajustado mayor a 0,0001.

Al igual que lo descubierto con el IFN- γ , la IL-6 presentó alta concentración a los 32 días de preñez en HoPF.

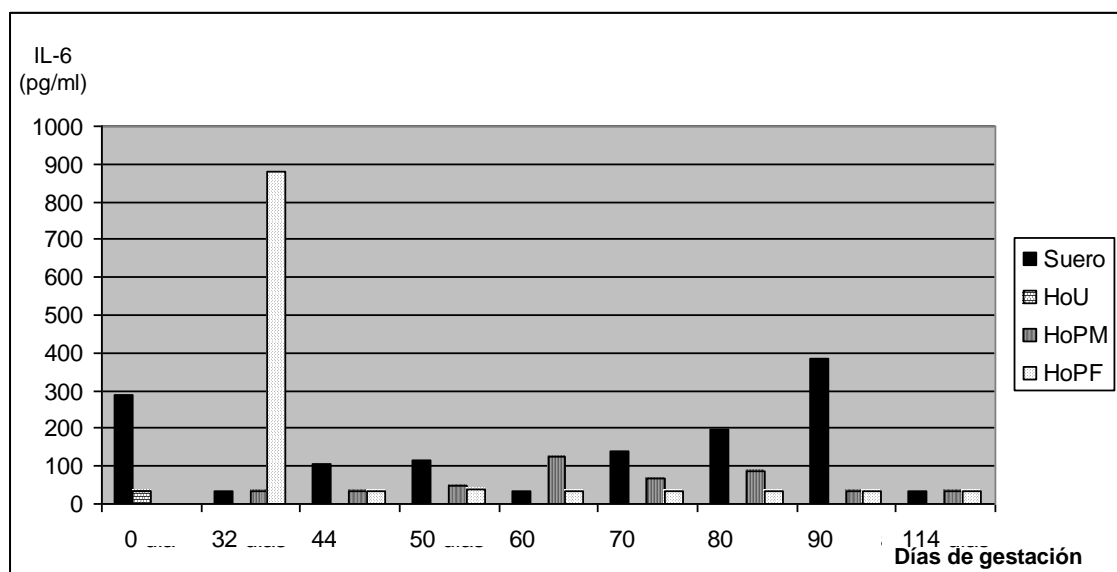


Fig. 43: Concentración de IL-6 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

En las figuras 44 y 45 se aprecian las regresiones halladas de IL-6 con el programa INFOSTAT v 1.1.

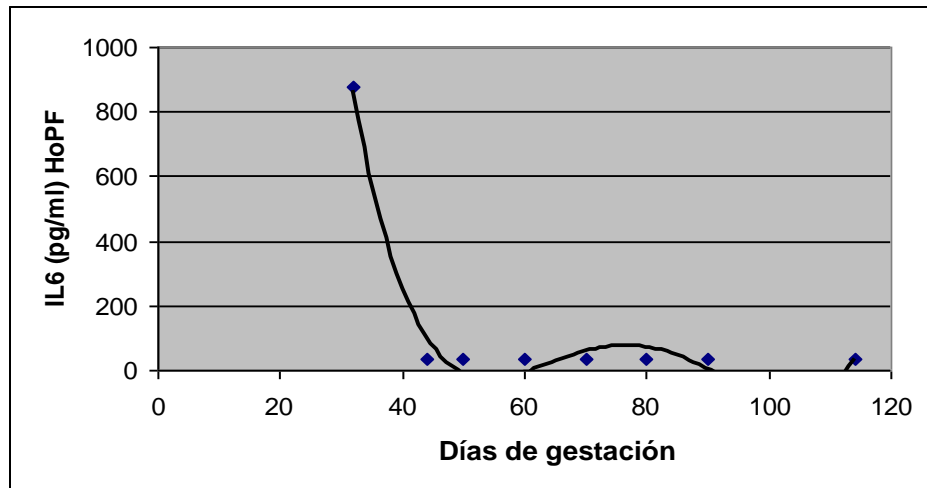


Fig. 44: Regresión de los valores de IL-6 (pg/ml) en homogenato de placenta fetal en distintos períodos gestacionales. Los valores menores a 34 pg/ml fueron considerados iguales a 34 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = 0,0004x^4 - 0,1151x^3 + 13,0727x^2 - 6369792x + 11247,0769$; R^2 ajustado = 0,9626; $p=0,001$.

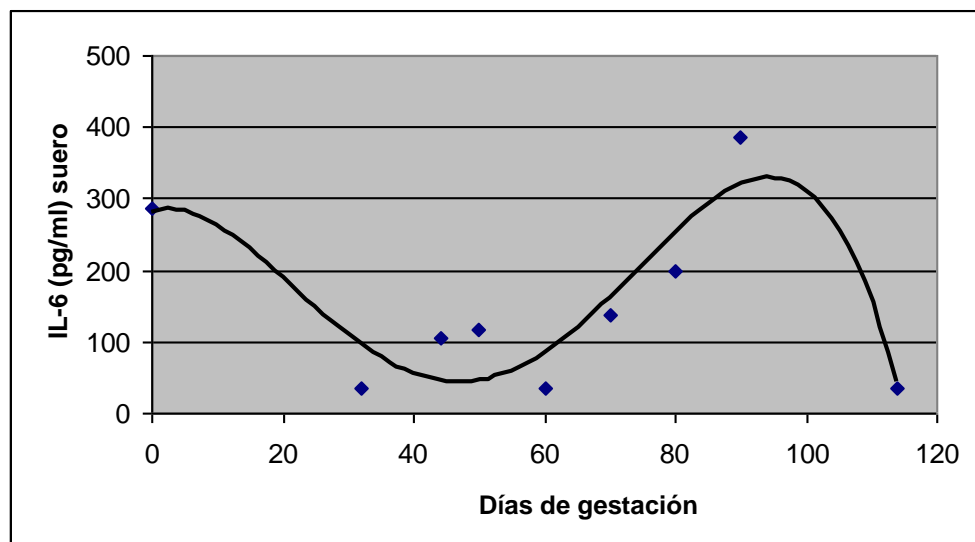


Fig. 45: Regresión de los valores IL- 6 (pg/ml) en suero de cerdas vacías y cerdas en distintos períodos de gestación. Los valores menores a 34 pg/ml fueron considerados iguales a 34 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = -0,0001x^4 + 0,0114x^3 - 0,57x^2 + 2,7512x + 281,6792$; R^2 ajustado = 0,6227; $p = 0,0934$.

Determinación de IL-12

Las concentraciones de IL-12 determinadas en suero, HoU, HoPM y HoPF se detallan en la tabla 10 (Anexos) y figura 46.

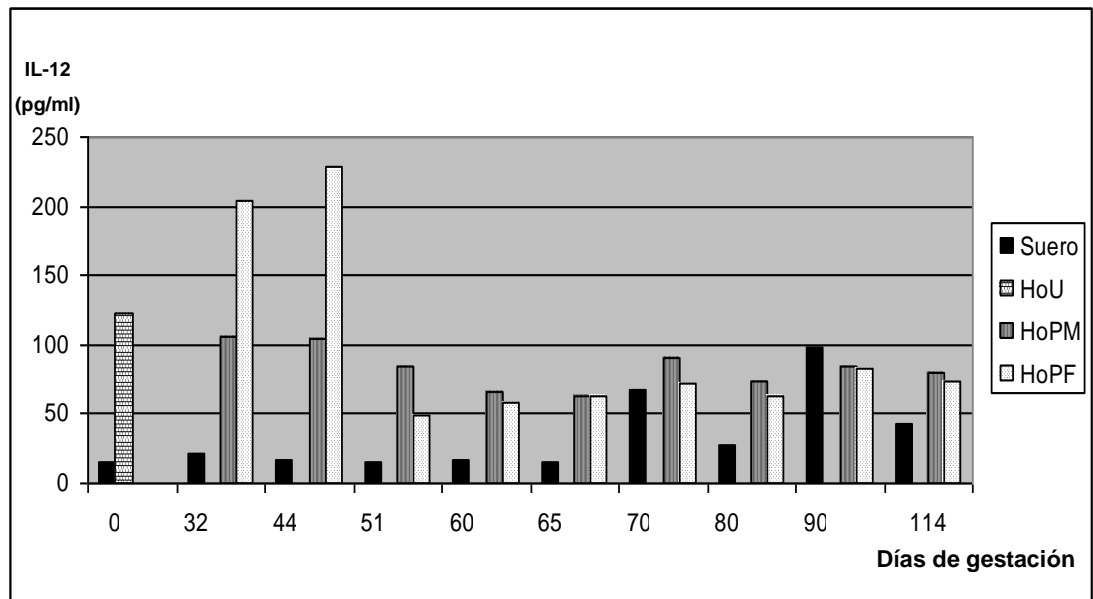


Fig. 46: Concentración de IL-12 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

En las figuras 47, 48 y 49 se aprecian las regresiones de IL-12 determinadas con el programa INFOSTAT v 1.1.

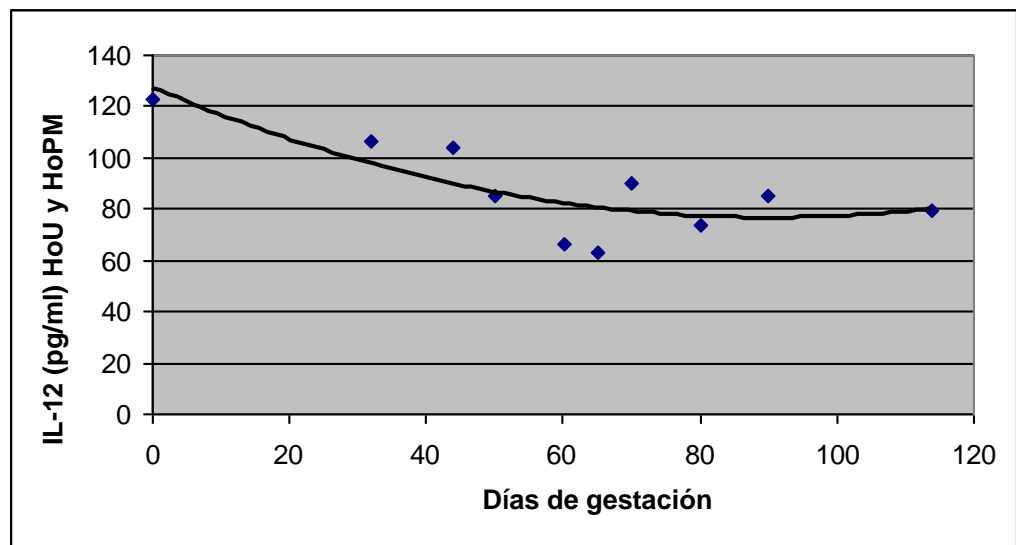


Fig. 47: Regresión de los valores de interleuquina 12 (pg/ml) en homogenatos de útero vacío (día 0) y homogenatos de placenta materna en distintos períodos gestacionales. Polinomio cuadrado; $y = 0,01x^2 - 1,13x + 127,21$; R^2 ajustado = 0,5707; $p = 0,0215$.

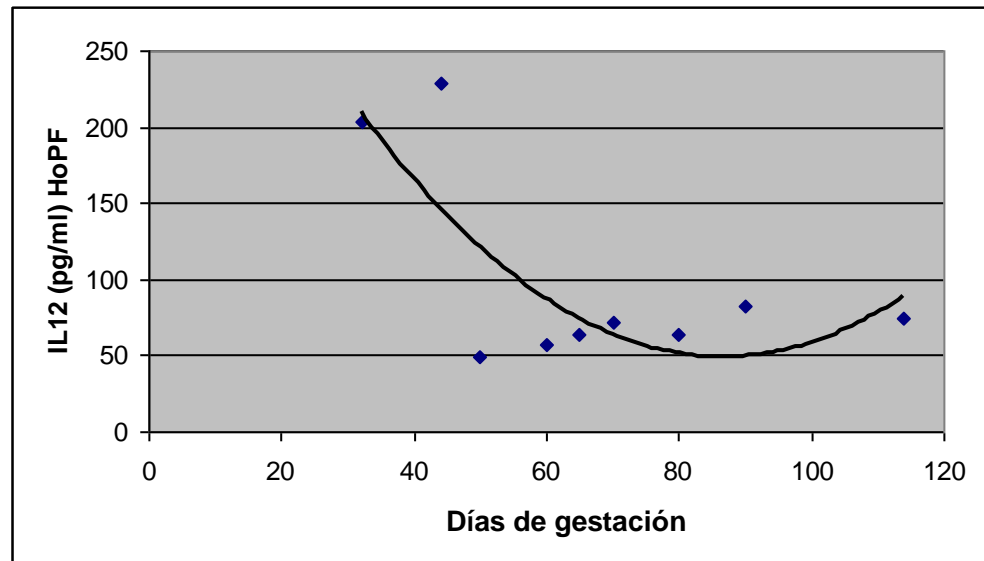


Fig. 48: Regresión de los valores de interleuquina 12 (pg/ml) en homogenato de placenta fetal en distintos períodos gestacionales. Polinomio cuadrado; $y = 0,0537x^2 - 9,3072x + 452,552$; R^2 ajustado = 0,4732; $p = 0,0617$.

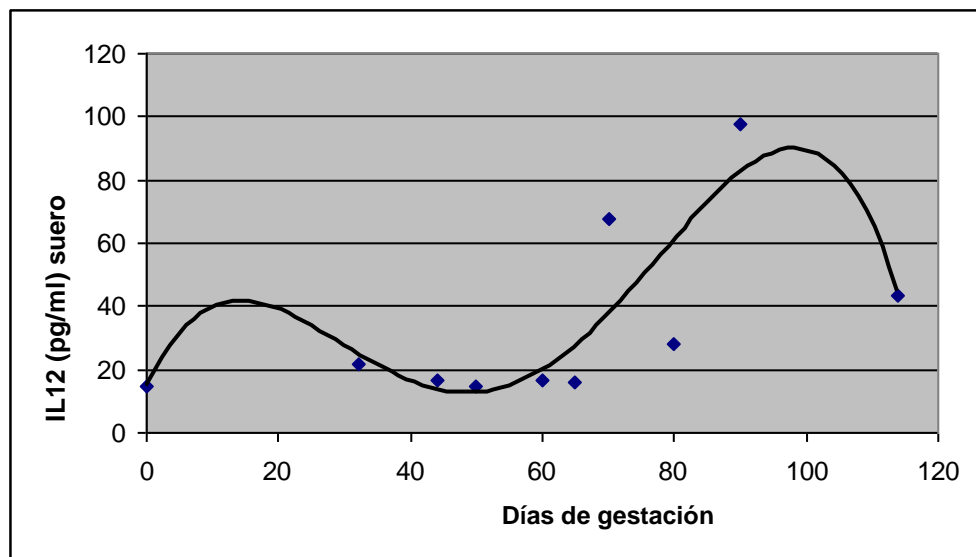


Fig. 49: Regresión de los valores de interleuquina 12 (pg/ml) en suero en cerdas vacías (día 0) y cerdas en distintos períodos gestacionales. Polinomio de cuarto orden; $y = -0,000016x^4 + 0,0035x^3 - 0,22x^2 + 4,4x + 14,49$; R^2 ajustado = 0,3943; $p = 0,1746$.

Determinación de IL-15

Las concentraciones de IL-15 determinadas en suero, HoU, HoPM y HoPF se presentan en la tabla 11 (Anexos) y figura 50.

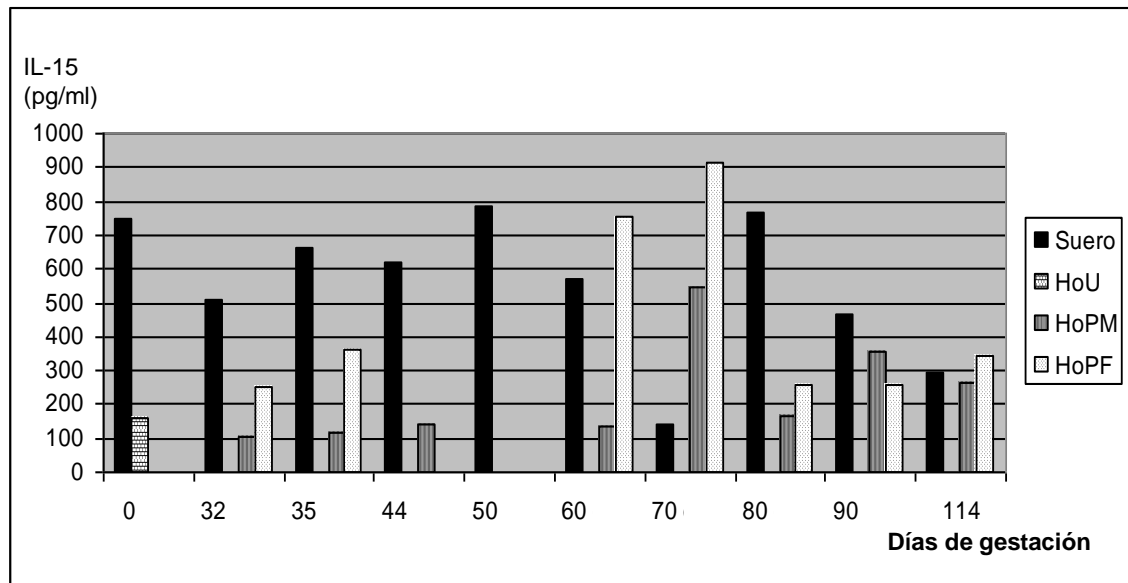


Fig. 50: Concentración IL-15 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

En las figuras 51, 52 y 53 se aprecian las regresiones halladas de IL-15 con el programa INFOSTAT v 1.1.

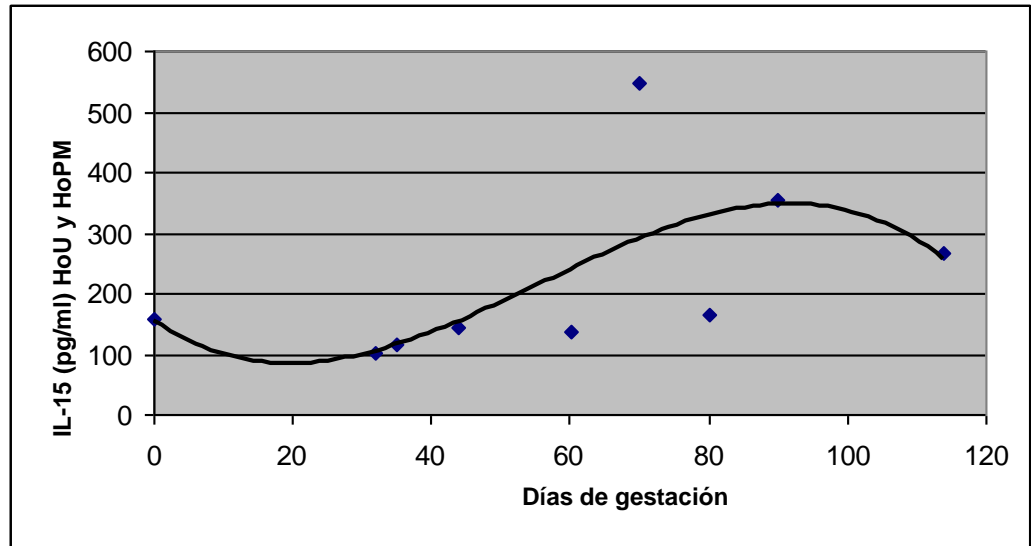


Fig. 51: Regresión de la concentración de interleuquina 15 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (días 0) y homogenatos de placenta materna en distintos períodos de gestación. Polinomio cúbico; $y = -1,4E-03x^3 + 0,24x^2 - 7,69x + 155,02$; R^2 ajustado = 0,03; $p = 0,4369$.

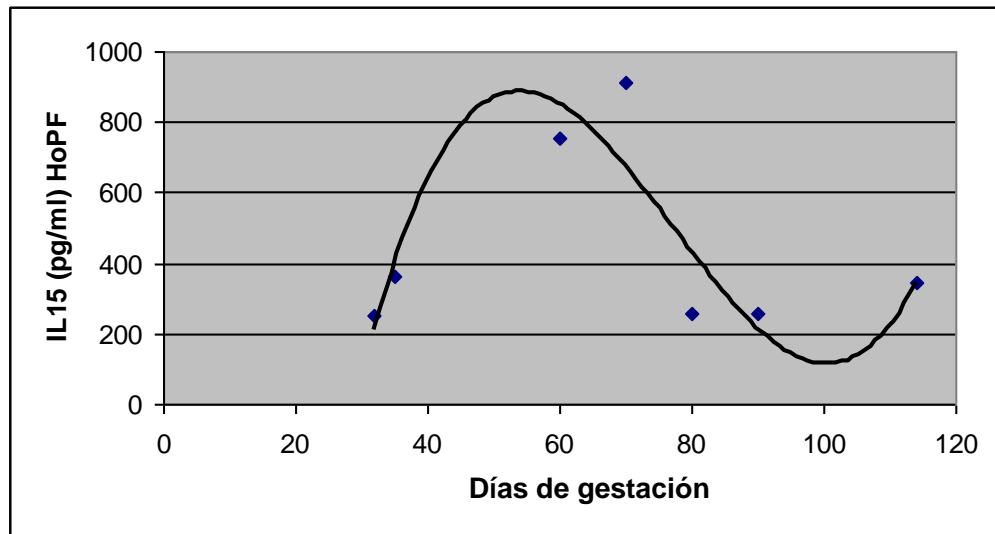


Fig. 52: Regresión de la concentración de interleuquina 15 (pg/ml) en homogenato de placenta fetal en distintos períodos de gestación. Polinomio cúbico; $y = 0,02 x^3 - 3,54x^2 + 248,66 - 4622,31$; R^2 ajustado = 0,54; $p = 0,1733$.

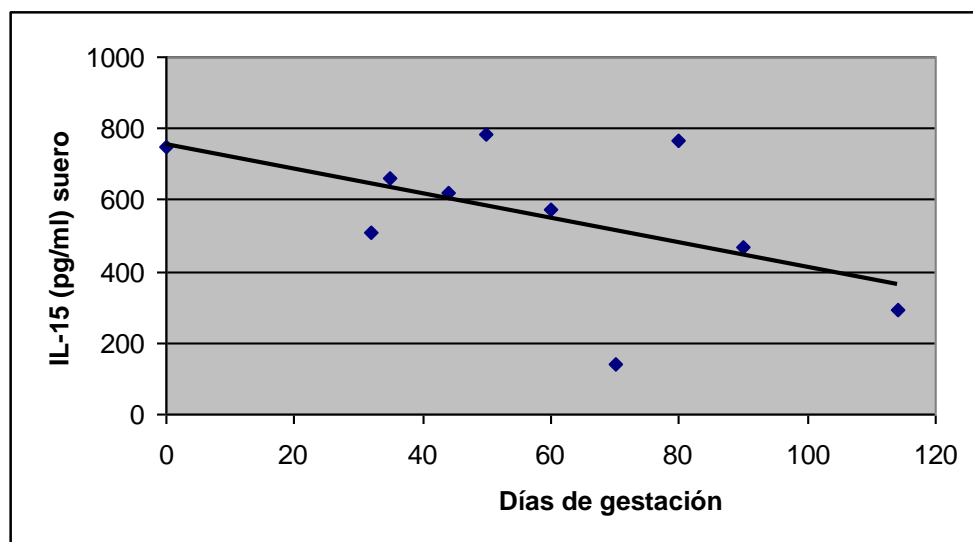


Fig. 53: Regresión lineal de la concentración de interleuquina 15 (pg/ml) en suero de cerdas de distintos períodos gestacionales. $Y = -3,44x + 753,95$; $R^2 = 0,28$; $p = 0,1145$.

Determinación de IL-18

Las concentraciones de IL-18 determinadas en suero, HoU, HoPM y HoPF se detallan en la tabla 12 (Anexos) y figura 54.

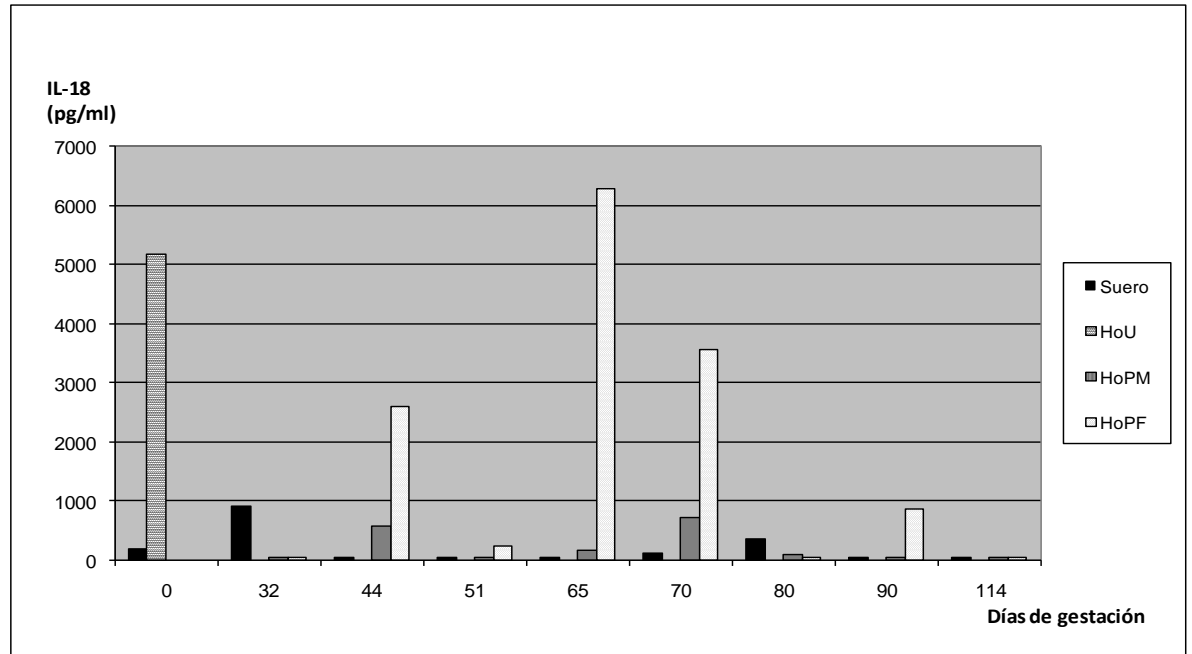


Fig. 54: Concentración IL-18 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

En las figuras 55, 56 y 57 se presentan las regresiones halladas en la concentración de IL-18 con el programa INFOSTAT v 1.1.

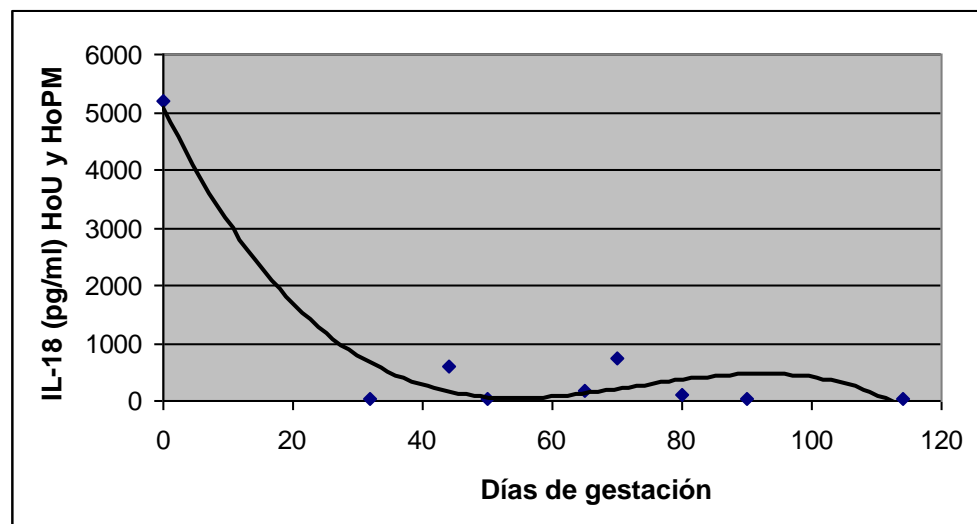


Fig. 55: Regresión de la concentración de interleuquina 18 (pg/ml) en homogenatos de útero vacío y homogenatos de placenta materna en distintos períodos gestacionales. Los valores menores a 39 pg/ml fueron considerados iguales a 39 pg/ml. Polinomio cúbico; $y = -0,0153x^3 + 3,3739x^2 - 231,1314x + 5086,898$; R^2 ajustado = 0,9206; $p = 0,0011$.

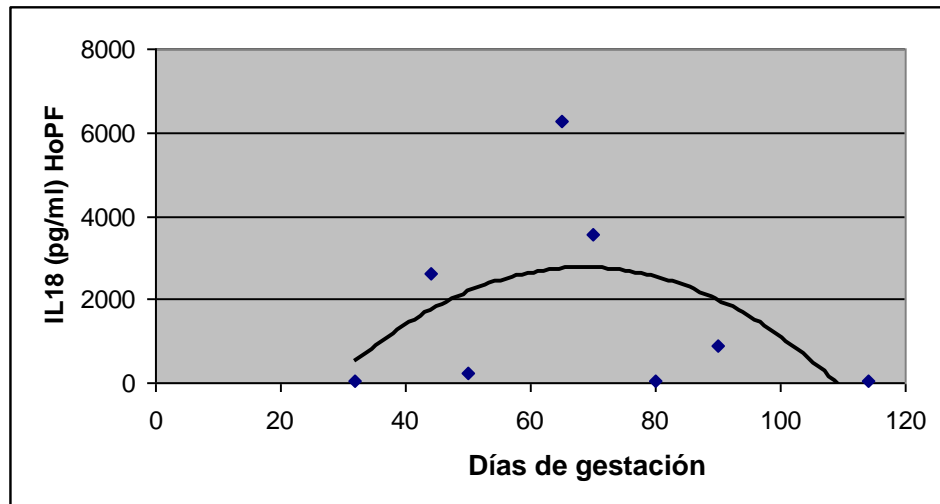


Fig. 56: Regresión de la concentración de interleuquina 18 (pg/ml) en homogenato de placenta fetal en distintos períodos de gestación. Los valores menores a 39 pg/ml fueron considerados iguales a 39 pg/ml. Polinomio cuadrado; $y = -1,6814x^2 + 230,9114x - 5174,2698$; R^2 ajustado = 0,000037; $p = 0,4312$.

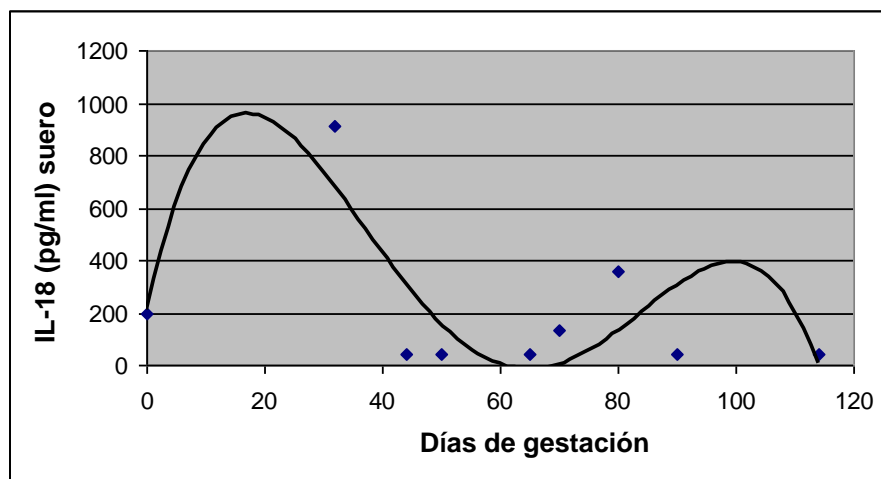


Fig. 57: Regresión de la concentración de interleuquina 18 (pg/ml) en suero de cerdas vacías y cerdas en distintos períodos gestacionales. Los valores menores a 39 pg/ml fueron considerados iguales a 39 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = -0,0002x^4 + 0,0551x^3 - 4,2293x^2 + 100,9257x + 213,2146$; R^2 ajustado = 0,1494; $p = 0,3888$.

DISCUSIÓN

La placenta es un órgano integrado por estructuras de origen fetal y materno, originado especialmente para la gestación. En cerdos, dado el tipo de placenta epiteliochorial y no invasiva, el trofoblasto se encuentra en íntimo contacto con los tejidos maternos; por lo tanto las interacciones entre los epitelios trofoblástico y endometrial son cruciales. Nos planteamos estudiar la expresión de una familia de moléculas de adhesión, las integrinas, en la placenta porcina en distintos momentos de la gestación, así como su posible regulación por parte de hormonas esteroideas y de determinadas citoquinas. Los resultados aquí presentados aportan datos de interés sobre éstas sustancias durante la placentación porcina a partir del día 30 hasta el parto, ya que hemos encontrado que si bien numerosos trabajos analizan la importancia de las integrinas durante la implantación, son muy escasos los que analicen aspectos semejantes durante períodos posteriores de la gestación.

Un primer hallazgo, de características esencialmente metodológicas, es que en nuestro laboratorio detectamos que la placenta porcina en los períodos gestacionales estudiados autofluoresce (datos sin publicar), lo que es coincidente con lo reportado por Keys *et al.*, (1989) en la gestación porcina temprana. Por lo antedicho, las experiencias realizadas en este trabajo de tesis se efectuaron a través de una técnica de inmunohistoquímica directa o indirecta empleando HRP. Por ello es difícil de relacionar nuestros resultados con los publicados por Bowen *et al.*, (1996), que estudió, durante la implantación porcina, la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ y $\beta 3$ en el epitelio luminal uterino por inmunofluorescencia indirecta.

En nuestra investigación hallamos que la integrina $\alpha v\beta 3$ y la subunidad $\beta 3$ se expresan en las vellosidades y el estroma endometrial al final del primer tercio de la gestación porcina (± 38 días). Además, encontramos alta expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el transcurso de la gestación solo hasta los 70 días, mientras que la subunidad $\beta 3$ se expresó hasta el final de la preñez. Las subunidades αv y $\beta 3$ fueron halladas por varios autores en diferentes especies con distinto tipo de placentación, pero solamente en el período de implantación. Así, se encontraron en la interfase feto-materna de mono reshus (Li *et al.*, 2003), en el epitelio luminal del útero murino (Lessey and Arnold, 1998), en el endometrio y las células del blastocisto caprino (García y *col.*, 2004) y en el embrión y el trofoblasto del conejo (Illera *et al.*, 2003).

En porcinos, Rashev *et al.*, (2005), en estudios realizados durante la preñez temprana, encontraron que la expresión de $\alpha 5\beta 1$ fue elevada en trofoectodermo, superficie epitelial del endometrio uterino y glándulas endometriales, disminuyendo levemente a los 35 días. Por el contrario, nosotros detectamos la subunidad $\beta 1$ con alta positividad, a partir de los 37 días de preñez y hasta el final de la gestación. Además, dada la presencia cuantiosa de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas en los tejidos placentarios, sugerimos su participación en el establecimiento y el mantenimiento de la arquitectura de la interfase feto-materna, particularmente en el mantenimiento de la arborización de las vellosidades, ya que la expresión de ésta subunidad solo disminuye en la placenta a término (Williamson y Koncurat, 2009).

La expresión de la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas no se halló en glándulas uterinas en ningún período estudiado, pero se manifestó con alta intensidad en las vellosidades trofoblásticas fetales y maternas, al igual que en los vasos sanguíneos durante la gestación, por lo que postulamos que ésta subunidad participaría en los

procesos moleculares que permiten la formación de las zonas interaerolares para mantener estable la morfología de la interfase feto-materna (Williamson y Koncurat, 2009).

Además, postulamos que la alta positividad de la subunidad $\alpha 3$ en el trofoblasto, acompañada de la baja expresión de $\alpha \nu \beta 3$ y de $\beta 1$, que se observa al final de la gestación se debería a que éstas moléculas formarían parte de las señales moleculares necesarias para el desprendimiento de la placenta fetal en el parto, en ésta especie adecidua (Williamson y Koncurat, 2008).

Las diferencias de expresión halladas en las integrinas podrían explicarse en el hecho de que la placenta porcina varía continuamente de tamaño, forma y estructura interna durante toda la gestación. Las reestructuraciones a nivel celular se reflejan a través de la muerte celular programada y de la actividad mitótica; un adecuado equilibrio entre ambos procesos fundamentales se mantiene durante la placentación porcina y permite comprender la variación de la expresión de determinadas integrinas en el tejido placentario en un momento determinado.

Por otro lado, se ha encontrado que la integrina $\alpha \nu \beta 3$ se expresa en las células endoteliales. El uso de antagonistas de la integrina sugiere que puede jugar un rol crucial en el desarrollo vascular (Zhu *et al.*, 2002). Además, cuando analizamos su presencia en función de la concentración de P_4 y de E_2 determinadas en este estudio, en cerdas mestizas de nuestra zona, claramente la subunidad $\beta 1$ y la integrina $\alpha \nu \beta 3$ se encuentran presentes cuando el tejido es rico en P_4 y su expresión disminuye marcadamente cuando predominan los E_2 . Este resultado parece indicar que los estrógenos regulan la expresión de receptores de integrinas, tal como ocurre en células trofoblásticas humanas (Das C and Basak, 2003).

En cuanto a la progesterona, Du Mesmil *et al.*, 1959, encontraron que cinco CL son suficientes para mantener la preñez con concentraciones de P_4 en plasma mayores a 5ng/ml. Mientras que Thomford *et al.*, 1984, hallaron que la gestación se mantuvo con menos de 5 CL; observando que los niveles de P_4 declinan 24 horas después de la reducción de los CL, pero en un período corto de tiempo, y se elevaban nuevamente a un nivel intermedio entre pre y post-reducción de los cuerpos lúteos.

Yaful y *col.*, (2005), descubrieron en los extractos placentarios fetales altas concentraciones de P_4 , hipotetizando que la placenta fetal es una fuente alternativa de producción de P_4 durante la preñez porcina. En éste trabajo de tesis observamos que la P_4 a partir de los 60 días de gestación se encuentra elevada en los homogenatos placentarios fetales concordando con la hipótesis de Yaful y *col.* A partir de nuestros resultados postulamos que los niveles de P_4 hallados en los homogenatos placentarios fetales a partir de los 60 días de gestación serían una fuente alternativa que podría mantener el desarrollo de los fetos en casos de reducción del número de cuerpos lúteos.

En concordancia con Franczak and Kotwica (2008) y Yaful, (2009), encontramos concentraciones altas de E_2 en los extractos placentarios maternos, comparados con las concentraciones en suero. Pero las concentraciones de E_2 de los extractos placentarios fetales fueron mas altas que en las maternas, de manera tal que se puede afirmar que la secreción estrogénica es debida principalmente al componente placentario de origen fetal. Estos resultados indicarían que la presencia de E_2 es importante durante toda la gestación porcina, más allá del período de implantación según lo demostrado por Bazer and Thatcher (1977).

En coincidencia con Choi *et al.*, 1997 y Koncurat, 2003, obtuvimos en los homogenatos de placenta materna y fetal porcina, así como en suero, un aumento significativo de los niveles de E_2 al final de la preñez, evento considerado necesario para el desencadenamiento del parto. Estos trabajos previos fueron realizados en la interfase feto-materno, por lo tanto el presente estudio junto al de Yaful, (2009), son los primeros que permiten establecer la prevalencia del componente placentario fetal en la producción de E_2 . Como ya se mencionó, uno de los probables mecanismos por los cuales podrían actuar los estrógenos durante el parto es mediante la modificación de la expresión de integrinas.

Con respecto al IFN- γ , en nuestro trabajo determinamos un pico de producción de IFN- γ a los 32 días de gestación, solo en los homogenatos de placenta porcina fetal (1.515,07 pg/ml), ya que en HoPM hallamos 57,63 pg/ml. En el resto de los períodos estudiados y al momento del parto los valores fueron menores de 15 pg/ml, límite de sensibilidad del *kit* utilizado, tanto en los homogenatos de placenta materna y fetal porcina como en sueros. Por su parte, Koncurat *y col.*, (2001), que detectaron IFN- γ utilizando un anticuerpo anti- IFN- γ humano, determinaron la presencia de IFN- γ durante la gestación a nivel de la interfase feto-materna y en otro trabajo, Koncurat, (2003), lo halló al comienzo y al final de la preñez porcina, postulando que esta molécula sería necesaria para el desencadenamiento del parto. Además, Martínez *y col.*, (2005), encontraron en sobrenadantes de cultivo de placenta fetal porcina de 30 días altos niveles de IFN- γ , un resultado semejante se halló en los homogenatos de tejido placentario (1000 pg/ml); las concentraciones descendieron a los 60 días de gestación (600 pg/ml) en los extractos placentarios y no fueron detectables en suero, aumentando

en los extractos placentarios y en suero (1200 pg/ml) en el parto. Las discrepancias en los valores hallados hacia la mitad y el final de la preñez en parte pueden deberse a que las determinaciones de IFN- γ fueron realizadas en el caso de esos autores con un *kit* comercial humano y en ésta tesis con un Ac anti- IFN- γ porcino. Según <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, existe una homología de secuencia del 75% entre el IFN- γ porcino y humano, lo que hace suponer que los estudios citados detectaron falsos positivos por falta de especificidad en el anticuerpo utilizado. Si bien esta citoquina es reconocida por su función proinflamatoria, en la placenta humana parece actuar como un inhibidor de una invasión trofoblástica excesiva (Hu *et al.*, 2008), por lo que en una especie con placentación no invasiva como la porcina, la elevada concentración postimplantación podría formar parte de los mecanismos que impiden la invasión trofoblástica. En otros tipos celulares se ha demostrado que este interferón puede regular la expresión de las subunidades de integrinas (Van Valen *et al.*, 1994), por lo que no debiera descartarse la posibilidad de que esa función también apareciera en la placenta.

Existen pocos estudios previos que analicen los niveles fisiológicos de la IL-6 en cerdas durante la preñez. Modric *et al.*, (2000), encontraron un incremento de la expresión del gen de la IL-6 a los días 11/12 del desarrollo del *conceptus* y en el endometrio y en la placenta en fase de post-implantación (días 30 y 60 de gestación).

En los estudios realizados con otras especies, algunos autores (Opsjon *et al.*, 1993; Agarwal *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2010) observaron un incremento de la IL-6, o de la expresión del gen de la IL-6, al momento del parto en la gestación humana y murina. En nuestro trabajo sólo se observó un gran incremento de la concentración de

IL-6 en los homogenatos de placenta fetal porcina a los 32 días de gestación, encontrando niveles de concentración muy bajos tanto en HoPM, HoPF como en suero en los diferentes períodos estudiados.

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica, según Tizard, (2009), regula la transición del proceso de la inflamación, y en la mayoría de los mamíferos para que pueda llevarse a cabo la implantación debe producirse una inflamación controlada que posibilite una gestación exitosa. En el útero porcino este proceso se presenta con particularidades, tales como presencia marcada de E₂, además de una remodelación tisular, tanto del útero como de la placenta y los embriones, que implica una gran actividad de angiogénesis y una fuente alternativa de producción de IL-6 es el endotelio vascular durante la inflamación (Male *et al.*, 2007).

También se sabe que la IL-6 es una citoquina capaz de inducir la síntesis de inmunoglobulinas y participa en la glicosilación de las IgG. Margni, (1996) demostró que luego de la implantación, en diferentes especies, la madre produce anticuerpos bloqueantes (Ac asimétricos), los cuales son esenciales para prevenir el rechazo inmune del feto. Concordando con ese resultado, en nuestro laboratorio, (Williamson y *col.*, 2005; Garro y *col.*, 2006; Garro y *col.*, 2010), observamos la presencia de Ac asimétricos en cerdas preñadas en diferentes períodos gestacionales tapizando el lumen endometrial. Así, está comprobado que la IL-6 producida por la placenta humana es capaz de incrementar la proporción de Ac asimétricos monoclonales secretados *in vitro*, además, que ratones *knock-out* para IL-6 presentaron una disminución significativa en los niveles séricos de Ac asimétricos, lo cual se acompañó de un aumento en el índice de aborto (Gutierrez y *col.*, 2008). Por lo tanto, el incremento de IL-6 que se observa en la placenta fetal en el día 32 podría relacionarse con un mecanismo para disminuir las

posibilidades de rechazo del *conceptus* en el que estarían involucrados los anticuerpos asimétricos.

Según Flood, (1974), los efectos de los estrógenos en el endometrio están restringidos a la región cercana al *conceptus*, debido a que el endometrio porcino convierte los E₂ en estrona y luego en sulfato de estrona que es inactivo biológicamente. Coincidiendo con ese estudio, nosotros hallamos presencia de E₂ solamente en los extractos placentarios fetales. Asimismo, fue demostrado que el estradiol reduce la expresión del ARNm de la IL-6 y la secreción de la proteína IL-6 en cultivos primarios de células deciduales de rata (Deb *et al.*, 1999). Por otra parte Yaful, (2009), halló una marcada secreción bifásica de E₂ durante la preñez temprana porcina, particularmente a los 5 días y entre los 15-19 días de preñez, lo que hace suponer que serían los E₂ los que regulan la expresión de la IL-6 durante la preñez temprana porcina, ya que solo la detectamos a partir del día 32 de gestación (Koncurat *y col.*, 2010).

Además, dado el marcado incremento encontrado en éste estudio de IL-6, que coincide con un aumento de la concentración de E₂ en la placenta fetal, debe recordarse que las funciones de ésta citoquina no se limitan al sistema inmune y al proceso de inflamación, ya que se ha descrito que interviene activamente en los procesos de osteogénesis (Girasole *et al.*, 1992) y angiogénesis (Gutierrez *y col.*, 2008). Por todo esto, nuestros resultados parecen demostrar que durante la gestación porcina la IL-6 estaría regulada por la concentración de estrógenos y marcaría el correcto establecimiento de la preñez, contribuyendo además su presencia el comienzo del desarrollo del sistema inmunitario y la osificación fetal.

No hemos encontrado estudios que evalúen la presencia y el rol de la IL-12 durante el transcurso de la gestación porcina. En nuestro laboratorio, detectamos picos de concentración a los 70 y 90 días de gestación en suero pero que son inferiores a los valores hallados en extractos placentarios maternos, que se mantienen altos y constantes durante toda la gestación. Mientras que en HoPF se encontró un pico de concentración solamente en el período comprendido entre los 32 y los 44 días de preñez que a su vez es mayor al dosado en extractos placentarios maternos.

Un rol clásico de la IL-12 es favorecer la respuesta tipo Th1, activando a los macrófagos y a las NK e induciendo la producción de IFN- γ , por lo que aumenta la actividad citolítica de linfocitos T y NK. También se sabe que el IFN- γ aumenta la producción de IL-12 y a su vez que IL-12 puede actuar en forma sinérgica con la IL-18 para provocar una respuesta Th1 (Tizard, 2009).

Marzusch *et al.*, (1997), demostraron que la IL-2 y la IL-12 no aumentan la secreción de IFN- γ por macrófagos deciduales, pero actúan sinérgicamente para estimular la liberación de IFN- γ por LGL CD56⁺⁺ deciduales cultivadas. Además, células LGL estimuladas con IL-12 e IL-2 y co-incubados con macrófagos deciduales exhibieron elevada secreción de IFN- γ . Estos resultados sugieren que las interacciones entre LGL deciduales y macrófagos pueden jugar un importante rol en la regulación del equilibrio de citoquinas en la interfase materno-fetal promoviendo preferencialmente una respuesta inmune basada en Th1, que contribuiría al control del desarrollo de la placenta humana.

Pocos trabajos estudiaron la presencia de IL-15 en la gestación, éstos se refieren solamente al primer trimestre de la gestación humana, especie con placentación

hemocorial, deciduada (Verma *et al.*, 2000; Ashkar *et al.*, 2003; Boomsma *et al.*, 2009). Ningún trabajo investigó la presencia de IL-15 en la especie porcina durante su preñez. Nosotros encontramos en la presente tesis que las hembras vacías porcinas presentan una alta expresión de IL-15 en homogenatos uterinos que difieren significativamente con respecto a los valores hallados durante la gestación. La concentración sérica de IL-15 fue alta y se manifestó de forma pulsátil durante la preñez, salvo a los 70 días que descendió significativamente. Sólo en este período, se halló un aumento de IL-15 en los HoPM y HoPF porcinos en relación a los valores séricos, lo que hace suponer que la IL-15 sería necesaria en la interfase feto-materna, tanto en los componentes placentarios maternos como fetales.

En la mujer la IL-15 está relacionada con la aparición de NK a los 15 días de gestación, nuestros resultados no apoyan estos hallazgos, ya que los aumentos de IL-15 en HoPF se producen solo a los 60-70 días de preñez. Aunque se sabe que las NK aparecen tempranamente en el endometrio gestante porcino (Yu *et al.*, 1993; Engelhardt *et al.*, 1997; Dimova *et al.*, 2008) parece entonces que esta citoquina debe cumplir funciones diferentes durante la preñez humana y porcina.

Se sugiere que la expresión del ARNm de la IL-15 es regulada por hormonas esteroideas, especialmente P₄, ya que se encontró IL-15 en el sobrenadante de cultivo de células deciduales y la adición de P₄ estimuló dicha secreción (Okada *et al.*, 2000). En coincidencia con dicho trabajo nosotros hallamos concentraciones elevadas en suero de IL-15 y P₄ a los 40 días de preñez y lo mismo acontece a los 60 y 70 días cuando aumenta significativamente la P₄ y la IL-15 en los HoPF. De ésta manera, parece que si bien son diferentes las funciones de IL-15 en ambas especies, los mecanismos que regulan su expresión podrían ser similares.

Como se sabe, los macrófagos son una fuente de producción de IL-15 en el útero (Tizard, 2009). Cristofolini, (2010), comunica el hallazgo de abundantes células fagocitarias en el endometrio porcino a los 60 días de preñez, lo que nos hace pensar que la IL-15 detectada en ese período gestacional en los extractos placentarios fetales se debería a la presencia de P₄ que estimula la biosíntesis de IL-15.

Al analizar los resultados obtenidos de IL-15 tanto en suero como en los extractos placentarios, sean de origen fetal o materno, llama la atención que, de todas las citoquinas estudiadas, la IL-15 es la única que se mantiene elevada durante la gestación, disminuyendo solo a término. Se podría suponer que, en parte, su presencia sería necesaria para estimular la síntesis de IgG por células B, ya que en nuestro laboratorio hemos hallado marcada presencia de IgG (simétricas y asimétricas) sobre el lumen uterino gestante, postulando que dichas IgG protegerían la gestación (Garro y *col.*, 2010).

Encontramos que en hembras vacías la concentración de la IL-18 es mayor en los extractos uterinos que en suero de cerdas vacías y preñadas. Además, se halló que la IL-18 se expresa en forma de picos pulsátiles durante el transcurso de la gestación solamente en los extractos placentarios fetales. Según Ashworth *et al.*, (2010), la IL-18 es producida por el endometrio y está relacionada con la implantación porcina, ya que la asocia con el pico de IFN- γ que se observó entre los días 15 y 18 de gestación. Nosotros no encontramos esa asociación en las etapas más avanzadas de la preñez, ya que la IL-18 solo la hallamos a partir de los 44 días de preñez en extractos placentarios fetales, así como también a los 65 y 70 días (Ver fig. 54), mientras que la presencia del IFN- γ fue notoria a los 32 días.

Asimismo, como la IL-15, la IL-18 es producida, también entre otras células por los macrófagos, promueve la producción de IFN- γ y potencia la actividad de las NK induciendo una respuesta inmune tipo Th1 (Male *et al.*, 2008). Además, estas dos citoquinas se expresan solamente en los extractos placentarios fetales en momentos semejantes de la gestación porcina, lo que hace suponer que son sintetizadas por el componente placentario fetal, como acontece con la P₄.

Con respecto a las citoquinas estudiadas en este trabajo de tesis, se destaca su presencia sobre todo en los extractos placentarios fetales y se presentan como relevantes en dos momentos de la gestación, a los 32 días y a los \pm 60 días. Desde el punto de vista de la biología reproductiva de la cerda, dichos tiempos marcan eventos importantes. Así, 32 días en una gestación exitosa, es considerada como el inicio de la osificación fetal y el comienzo del desarrollo del sistema inmunológico fetal, ya que a los 42-44 días pudieron detectarse los primeros Ac fetales (Butler *et al.*, 2009). Por otro lado, alrededor del día 60 se alcanza al mayor crecimiento placentario, ya que a partir de ahí, son los fetos los que presentan el mayor aumento de tamaño con respecto al desarrollo de la placenta. En nuestro laboratorio, estudiando apoptosis, hemos podido demostrar que las mayores remodelaciones celulares placentarias se presentan hacia el día 60-70 de preñez (Cristofolini, 2010).

Ya Butler y Howard en 2002 postularon que en cerdos, el paradigma establecido en ratón de células Th1/Th2 no se puede determinar, debido a las particularidades de las poblaciones linfocitarias porcinas y a los perfiles de liberación de citoquinas que poseen. En coincidencia con ellos no creemos que una preñez porcina exitosa deba reflejar una respuesta inmune tipo Th2 como fue postulado por Wegmann *et al.*, 1993,

ya que encontramos un perfil de citoquinas diferente. Estos datos son coincidentes con los estudios mas actuales que parecen demostrar que aún en el ratón, la inmunología de la preñez y la red de citoquinas que se establecen son demasiado complejas para explicarlas solamente mediante el modelo Th1/Th2 (Zenclunsen *et al.*, 2007). La combinación de citoquinas elegidos en este trabajo, IL-12, IL-15 e IL-18 corresponden a citoquinas relevantes en la activación de las células NK, y se está estudiando como la P₄ regula la activación de dichas células (Spallanzani *et al.*, 2010). Por nuestros resultados postulamos que el hallazgo de esas citoquinas en momentos puntuales de la gestación porcina, así como la del IFN- γ , se debería a células predominantes del sistema inmune innato.

Es de destacar, que así como hallamos correlación entre el sistema endócrino e inmunológico, también estas coincidencias aparecen en la expresión de las integrinas.

Así, las integrinas estudiadas en este trabajo de tesis muestran, en general, un patrón de expresión que acompaña los aumentos de P₄ provenientes de los extractos placentarios fetales y una disminución de su presencia a partir de los \pm 80 días de preñez, en donde los tejidos placentarios, tanto fetales como maternos, están embebidos de E₂. Solo con la subunidad β 3 se observó una discordancia en la expresión a los 60 días de preñez, que coincide con los altos valores hallados de las citoquinas estudiadas en éste momento particular de la gestación.

Será necesario profundizar los estudios de las moléculas de adhesión en relación a la presencia en la interfase feto-materna, estroma uterino y corion fetal, como así también sobre las células efectoras del sistema inmune innato, a fin de comprender los mecanismos celulares y moleculares que regulan la expresión de estas moléculas en una gestación porcina exitosa.

CONCLUSIONES

Se sugiere que la subunidad $\beta 1$ de las integrinas en los tejidos placentarios participa en el armado de la arquitectura de la interfase feto-materna, particularmente en el mantenimiento de la arborización de las vellosidades, mientras que la subunidad $\alpha 3$ estaría involucrada en los procesos moleculares que permiten la formación de las zonas interaerolares para mantener estable la morfología de la interfase feto-materna. Por su parte $\alpha \nu \beta 3$ y $\beta 1$ formarían parte de las señales moleculares necesarias para el desprendimiento de la placenta fetal en el parto.

Encontramos que la subunidad $\beta 1$ y la integrina $\alpha \nu \beta 3$ se encuentran presentes cuando el tejido es rico en P_4 y su expresión disminuye marcadamente cuando predominan los E_2 . Las integrinas estudiadas muestran, en general, un patrón de expresión que acompaña los aumentos de P_4 provenientes de los extractos placentarios fetales y una disminución de su presencia a partir de los ± 80 días de preñez, en donde los tejidos placentarios, tanto fetales como maternos, están embebidos de E_2 .

Postulamos que los homogenatos placentarios fetales a partir de los 60 días de gestación serían una fuente alternativa de P_4 que podría mantener el desarrollo de los fetos en casos de reducción del número de cuerpos lúteos.

El IFN- γ , la IL-6 y la IL-12 muestran un pico de producción conjunta a los 32 días de gestación, solo en los homogenatos de placenta porcina fetal.

Nuestros resultados parecen demostrar que durante la gestación porcina la IL-6 estaría regulada por la concentración de estrógenos y que su presencia a los 32 días marcaría el correcto establecimiento de la preñez, coincidiendo con el comienzo del desarrollo del sistema inmunitario y la osificación fetal.

La IL-15 es la única citoquina que se mantiene elevada durante la gestación, disminuyendo solo a término, postulamos que, en parte, su presencia sería necesaria para estimular la síntesis de IgG por células B necesarias para proteger la gestación porcina.

La IL-15 y la IL-18 se expresan solamente en los extractos placentarios fetales a los \pm 60-70 días de la gestación porcina, lo que hace suponer que son sintetizadas por el componente placentario fetal, como acontece con la P₄.

Por nuestros resultados postulamos que el hallazgo de las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 en momentos puntuales de la gestación porcina, así como la del IFN- γ , se debería predominantemente a la acción de células del sistema inmune innato.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal R, Loganath A, Roy AC, Wong YC, Lindoff C, Ng SC. Increased expression of interleukin 6 in term compared to the first trimester human placental villi. *Horm Metab Res* 2000;32(5):164-8.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. 4 ed. Ed Omega. 2004.
3. Amoroso EC. Placentation. In: *Physiology of Reproduction*. Ed. Marshall's, London 1952;2:127-331.
4. Ashkar AA, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, Head JR, Croy BA. Assesment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol* 2003; 171(6):2937-44.
5. Ashworth MD, Ross JW, Stein DR, White FJ, Desilva UW, Geisert RD. Endometrial caspase 1 and interleukin-18 expression during the estrous cycle and peri-implantation period of porcine pregnancy and response to early exogenous estrogen administration. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8(1):33-41.
6. Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Biol Reprod* 2008;8(3):179-211.
7. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA. Interferons and uterine receptivity. *Semin Reprod Med* 2009;27(1):90-102.

8. Bazer FW, Thatcher WW. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F₂ α by the uterine endometrium. *Prostaglandins* 1977; 14: 111-29.
9. Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod* 2010;16(3):135-52.
10. Betancourt-Alonso MA, Flores-Pérez FI, Rosas-Velasco C, Pérez-Martínez M. Papel de las citocinas en la implantación embrionaria en mamíferos domésticos. *Vet Méx* 2006;37(3):335-50.
11. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, Amarouchi K, Tklenburg G, Gutknecht D, Fauser BJ, Heijnen CJ, Macklon NS. Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online* 2009;18(1):85-94.
12. Bosch RA, Alanis GA, Allende RA, Blanch MS, Bosch P, Callejas S. En: Actualización en temas de reproducción animal. Compilador, Bosch RA. Ed Universidad Nacional de Río Cuarto 2001;150-52.
13. Botella Llusia J. Integrins and reproduction. *An R Acad Nac Med* 2001;118:73-185.
14. Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC. Spatial and temporal analyses of integrin and muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. *Biol Reprod* 1996;55:1098-106.
15. Bowen JA, Hunt JS. The role of Integrins in Reproduction. *Pro Soc Exp Biol Med* 2000;223:331-43.

16. Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells, Tissues, Organs* 2002;172(3):202-17.
17. Butler JE, Howard C. Summary of the comparative immunoglobulin workshop (CIgW) on immunoglobulins (Igs) and Fc receptors. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;87(3-4):481-84
18. Butler JE, Wertz N, Deschacht N, Kacs Kovics I. Porcine IgG: structure, genetics, and evolution. *Immunogenetics.* 2009;61(3):209-30.
19. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazlabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo implantation. *Dev Biol* 2000;223:217-37.
20. Cencic A, La Bonnardiere C. Trophoblastic interferon-gamma: current knowledge and possible role(s) in early pig pregnancy. *Vet Res* 2002; 33:139-57.
21. Cencic A, Henry C, Lefèvre F, Huet JC, Koren S, La Bonnardière C. The porcine trophoblastic interferon- γ , secreted by a polarized epithelium, has specific structural and biochemical properties. *Eur J Biochem* 2002; 269:2772-81.
22. Cencič A, Guillomot M, Koren S, La Bonnardière C. Trophoblastic interferons: Doy they modulate uterine cellular markers at the time of conceptus attachment in the pig? *Placenta* 2003;24(8-9): 862-69.
23. Chard T. *En: An introduction to radioimmunoassay and related techniques.* 4 ed. Ed Elsevier, Editors Burton RH and Van Knippenberg PH.1990.

24. Choi I, Collante WR, Simmen RC, Simmen FA. A development switch in expression from blastocyst to endometrial placental type cytochrome P450 aromatase genes in the pig and horse. *Biol Reprod* 1997;56:688-96.
25. Climent S, La Torre R, Muniesa Lorda P, Sarasa Barrio M. *Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos*. 1 ed. Ed. Acribia. 2005.
26. Costeas PA, Koumouli A, Giantsiou-Kyriakou A, Papaloizou A, Koumas L. Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss. *Hum Immunol* 2004;65(2):135-41.
27. Cristofolini AL. *Estudio de la remodelación celular durante la placentación porcina*. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Río Cuarto. 2010.
28. Dantzer V. Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat Embryol* 1985;172:281-93.
29. Das C, Basak S. Expression and regulation of integrin receptors in human trophoblast cells: role of estradiol and cytokines. *Indian J Exp Biol* 2003;41(7):748-55.
30. Deb S, Tessier C, Prigent-Tessier A, Barkai U, Ferguson-Gottschall S, Srivastava RK, Faliszek J, Gibori G. The expression of interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor, and gp130-kilodalton glycoprotein in the rat decidua and a decidual cell line: regulation by 17beta-estradiol and prolactin. *Endocrinol* 1999;140(10):4442-50.
31. Dellman, D. *Histología Veterinaria*. 2º ed. Ed. Acribia, Zaragoza, España. 1994. pp 291-306.

32. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod* 2005;11(6):613-30.
33. Dimova T, Mihaylova A, Spassova P, Georgieva R. Establishment of the porcine epitheliochorial placenta is associated with endometrial T-cell recruitment. *Am J Reprod Immunol* 2007;57(4):250-61.
34. Dimova T, Mihaylova A, Spassova P, Georgieva R. Superficial implantation in pigs is associated with decreased numbers and redistribution of endometrial NK-cell populations. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:359-69.
35. Du Mesnil du Buisson F, Dauzier L. Contrôle mutuel de l'ovarie chez la truie. *Ann Zootech* 1959;8:147-59.
36. Engelhardt H, Croy BA, King GJ. Role of uterine immune cells in early pregnancy in pigs. *J Rep Fert* 1997;52:115-31.
37. FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Consumo mundial de carne de cerdo. Abril 2010. URL: <http://faostat.fao.org>.
38. Fischer HE, Bazer FW, Fields MJ. Steroid metabolism by endometrial and conceptus tissues during early pregnancy and pseudopregnancy in gilts. *J Reprod Fertil* 1985;75:69-78.
39. Flood PF. Steroid-metabolizing enzymes in the early pig conceptus and in the related endometrium. *J Endocr* 1974;63:413-14.
40. Foxcroft GR, Dixon WT, Treacy BK, Jiang L, Novak S, Mao J, Almeida FCL. Insights into conceptus-reproductive tract interactions in the pig. *J Anim Sci* 2000;77:1-15.

41. Franczak A, Kotwica G. Secretion of estradiol-17 β by porcine endometrium and myometrium during early pregnancy and luteolysis. *Theriogenology* 2008;69(3):283-9.
42. García P, Nieto A, Sanchez MA, Pizarro M, Flores JM. Expression of alphav, alpha4, alpha5 and beta3 integrin subunits, fibronectin and vitronectin in gota peri-implantation. *Anim Reprod Sci* 2004;80(1-2):91-100.
43. Garro A, Gentile T, De León R, Koncurat M. Determinación de IgG asimétricas en sueros de hembras preñadas en diferentes períodos gestacionales. En: *Memorias V congreso de producción porcina del MERCOSUR 2006 Mayo 22-24; Córdoba, Argentina. 2006. p. 266.*
44. Garro A, Gentile T, De León R, Koncurat M. Determinación de anticuerpos asimétricos en extractos placentarios porcinos. En: *XXVII Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán 2010 Octubre 13-15; Tafí del Valle, Tucumán, Argentina. 2010. p. 231.*
45. Geisert RD, Ross JW, Ashworth MD, White FJ, Johnson GA, De Silva U. Maternal recognition of pregnancy signal or endocrine disruptor: the two faces of oestrogen during establishment of pregnancy in the pig. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2006;62:131-45.
46. Geneser F. *Histología*. 3 ed. Ed. Panamericana SA, España. 2006.
47. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC. 17 β -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts 22 *in vitro*: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogen. *J Clin Invest* 1992;89:883-91.

48. Gutierrez G, Junovich G, Dubinsky V, Pasqualini R S, Gentile M T. El rol de la interleuquina 6 en el éxito gestacional. *SAEGRE* 2008;15:43-7.
49. Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7 ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003.
50. Hanashi H, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Suzuki N, Kabir-Salmani M, Nagamatsu S, Iwashita M, Nakamura Y. Physiologic Role of decidual beta1 integrin and focal adhesion kinase in embryonic implantation. *Endocr J* 2003;50(2):189-98.
51. Hasan M, Najjam S, Gordon MY, Gibbs RV, Rider CC. IL-12 is a heparin-binding cytokine. *J Immunol* 1999;162:1064-70.
52. Hu Y, Tan R, MacCalman CD, Eastabrook G, Park S, Dutz JP, von Dadelszen P. IFN- γ -mediated extravillous trophoblast outgrowth inhibition in first trimester explant culture: a role for insulin-like growth factors. *Mol Hum Rep* 2008;14(5):281-9.
53. Huang HY. The cytokine network during embryo implantation. *Chang Gung Med J* 2006;29(1):25-36.
54. Illera MJ, Lorenzo PL, Gui YT, Beyler SA, Apparao KBC, Lessey BA. A role for $\alpha\beta 3$ integrin during implantation in the rabbit model. *Biolg Reprod* 2003;68:766-71.
55. Jaeger LA, Johnson GA, Ka H, Garlow JG, Burghardt RC, Spencer TE, Bazer FW. Functional analysis of autocrine and paracrine signaling at the uterine-conceptus interface in pigs. *Reprod Suppl*, 2001;58:191-207.
56. Joyce MM, Burghardt JR, Burghardt RC, Hooper N, Bazer FW, Johnson GA. Uterine MHC class I molecules and 2-microglobulin are regulated by

- progesterone and conceptus interferons during pig pregnancy. *J Immunol*, 2008;181:2494-505.
57. Keys JL, King GJ, Laforest JP. Autofluorescence of the porcine endometrium during early pregnancy. *Biol Reprod* 1989;40:220-2.
58. Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, Honjo H. IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 2000;63:683-7.
59. Knight JW and Kukoly CA. In vitro release of progesterone and estrone by the porcine placenta throughout gestation. *Domest Anim Endocrinol* 1990;7:497-508.
60. Koncurat MA. Estudio inmunoendócrino de la preñez porcina. Papel de la placenta [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Río Cuarto; 2003.
61. Koncurat MA, Martínez R, Greco C y Vivas A. IFN- γ concentration in serum and porcine placental extracts from different gestation ages. *Biocell* 2001;25(3):23.
62. Koncurat MA, Yaful GN, Riesco OF, Williamson DM. Determinación de IL-6, progesterona y estrógenos en la preñez porcina temprana. En: *Memorias XXVII Jornadas científicas Asociación de biología de Tucumán*. 2010 Octubre 13-15; Tafí del Valle, Tucumán, Argentina. 2010. p. 145.
63. Leboutteiller P, Rodríguez AM, Mallet V, Girr M, Guillaudeux T, Lenfant E. Placental expression of HLA class I genes. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:216-25.
64. Lessey BA, Arnold JT. Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the establishment of uterine receptivity. *J Reprod Immunol* 1998;39(1-2):105-16.

65. Li Q, Yan-Ling W, Su-Xia B, Shao-Hui J, Wei Q, Shuang T, Yun-Shang P. Temporal and spatial expression of integrins and their extracellular matrix ligands at the maternal-fetal interface in the rhesus monkey during pregnancy. *Biol Reprod* 2003;69:563-71.
66. MacIntyre MD, Lim HC, Ryan K, Kimmins S, Small JA, Maclaren LA. Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. *Biol Reprod* 2002;66:1430-36.
67. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I.M. *Inmunología. Fundamentos*. 11 ed. Ed. Panamericana SA, España. 2008.
68. Margni RA. *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos*. 5 ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. 1996. p. 799-851.
69. Margni RA, Zenclussen AC. During pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies. *Am J Reprod Immunol* 2001;46:181-87.
70. Marrable AW. In: *The embryonic pig: a chronological account*. Ed. Exeter, Pitman Medical, London. 1971. p. 30-51.
71. Martinez R, Greco C, Koncurat M, Escribano C, Vivas A. Hormonas esteroideas e interferon-gamma durante la preñez en porcinos. *RedVet* 2004;10:5.
72. Marzusch K, Buchholz F, Ruck P, Handgretinger R, Geiselhart A, Engelmann L, Dietl J. Interleukin-12 and interleukin-2 stimulated release of interferon- γ by uterine CD56⁺⁺ large granular lymphocytes is amplified by decidual macrophages. *Hum Reprod* 1997;12(5):921-24.

73. Modric T, Kowalski AA, Green ML, Simmen RC, Simmen FA. Pregnancy-dependent expression of leukaemia inhibitory factor (LIF), LIF receptor-beta and interleukin-6 (IL-6) messenger ribonucleic acids in the porcine female reproductive tract. *Placenta* 2000;21(4):345-53.
74. Mueller A, Siemer J, Schereiner S, Koesztner H, Hoffmann J, Binder H, Beckmann MW, Dittrich R. Role of estrogen and progesterone in the regulation of uterine peristalsis: results from perfused non-pregnant swine uteri. *Hum Reprod* 2006;21:1863-8.
75. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod* 2009;80:848-59.
76. Oh MJ, Croy BA. A map of relationships between uterine natural killer cells and progesterone receptor expressing cells during Mouse pregnancy. *Placenta*. 2008;29(4):317-23.
77. Okada H, Nakajima T, Sanezumi M, Ikuta A, Yasuda K, Kanzaki H. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(12):4765-70.
78. Opsjhn SL, Wathen NC, Tingulstad S, Wiedswang G, Sundan A, Waage A, Austgulen R. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;169(2 Pt 1):397-404.
79. Perry JS, Rowlands IW. Early pregnancy in the pig. *J Reprod Fertil* 1962;4:175-88.
80. Pope WF, Maurer RR, Stormshak F. Intrauterine migration of the porcine embryo: influence of estradiol-17 beta and histamine. *Biol Reprod* 1982;27:575-9.

81. Qsuires E J. Endocrinología animal aplicada. Editorial Acribia S.A. 2006.
82. Rabinovich AG. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. 1 ed. Ed. Panamericana SA, España. 2004.
83. Ramsoondar JJ, Christopherson RJ, Guilbert LL, Dixon WT, Ghahary A, Ellis S, Wegmann TG, Piedrahita JA. Lack of class I major histocompatibility antigens on trophoblast of periimplantation blastocyst and term placenta in the pig. *Biol Reprod* 1999;60:387-97.
84. Rashev P, Georgieva R, Rees D. Expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin and fibronectin during early pregnancy in pigs. *Folia Biol* 2005;51:121-5.
85. Reddy KV, Mangale SS. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. *Tissue cell* 2003; 35:260-273.
86. Robertson SA. Control of the immunological environment of the uterus. *Reviews of Reprod* 2000;5:164-74.
87. Robertosn SA, Christiaens I, Dorian CL, Zaragoza DB, Care AS, Banks AM, Olson DM. Interleukin-6 is an essential determinant of on-time parturition in the mouse. *Endocrinol* 2010;151(8):3996-4006.
88. SAGPyA-Dirección de Animales Menores y de Granja, en base a datos de SENASA y ONCCA. Argentina; 2010.
89. Sánchez-Vizcaíno, JM. 2ª Ed. Curso de introducción a la inmunología porcina. <http://www.sanidadanimal.org/cursos/inmuno2/>. 2004
90. Scaglia, H. Hormonas. En: Curso de posgrado endocrinología de la reproducción; 2005 Dic 10-18; Fac Cs Vet-UNLPam.General Pico, La Pampa, Argentina.2005.

91. Spallanzani R, Rossi L, Avila D, Domaica C, Ziblat A, Rabinovich G, Salatino M, Zwirner N. Immunoregulatory effects of progesterone on peripheral blood-derived human NK cells involve down-regulation of NKp46. En: First French-Argentine Immunology Congress. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 2-5 noviembre, 2010. Buenos Aires, Argentina. 2010. p. 123-124.
92. Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2004a;2:1-15.
93. Spencer TE, Bazer FW. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci* 2004b;82(E. Suppl):4-13.
94. Thomford PJ, Sander HKL, Kendall JZ, Sherwood OD, Dziuk P. Maintenance of pregnancy and levels of progesterone and relaxin in the serum of gilts following a stepwise reduction in the number of corpora lutea. *Biol Reprod* 1984;31:494-8.
95. Tizard IR. Introducción a la inmunología veterinaria. 8 ed. Ed. Elseiver, España. 2009.
96. USDA y Comisión de la Unión Europea. Consumo aparente "per cápita" de carne de cerdo en diferentes países (kg / habitante / año). 2010. URL: <http://www.usda.gov>
97. van Valen F, Hanenberg H, Jürgens H, Eur J. Expression of functional very late antigen-alpha 1, -alpha 2, -alpha 3 and -alpha 6 integrins on Ewing's sarcoma and primitive peripheral neuroectodermal tumour cells and modulation by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha. *Cancer*. 1994;30A(14):2119-25.

98. Verma S, Hiby SE, Loke YW, King A. Human decidua natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol Reprod* 2000;62:959-68.
99. Vivas A, Koncurat M, Merkis C, Zubeldía D, Fernandez S, Greco C. Relación entre el factor precoz de preñez (EPF) y progesterona en extractos placentarios porcinos. *Rev Arg Produc Anim*, 1998;18:358-9.
100. Vonnahme KA, Wilson ME, Foxcroft GR, Ford SP. Impacts on conceptus survival in a common swine herd. *J Anim Sci* 2002;80:553-9.
101. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann T. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
102. Whole Hog. Proyecciones de FAO para la Industria del Cerdo al año 2016. 2006.
103. Williamson D, Gentile T, Garro A, Koncurat M. Presencia de anticuerpos IgG asimétricos en sueros durante la gestación porcina. En: *Memorias Sociedad Biología de Córdoba-XV Jornadas Científicas*. 2005. Agosto 4-6; Villa Giardino, Córdoba, Argentina. 2005. p. 46.
104. Williamson DM, Koncurat MA. Expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ y de las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 1$ en la placentación porcina. En: *Memorias del IX Congreso Nacional de Producción Porcina*. 2008. Mayo 26-28; Potrero de los Funes, San Luis, Argentina 2008. p. 214.
105. Williamson DM, Koncurat MA. Expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ y de las subunidades de integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$ durante la placentación porcina. *InVet* 2009;11(1):31-7.

106. Wilson ME, Sonstegard TS, Smith TP, Fahrenkrug SC, Ford SP. Differential gene expression during elongation in the preimplantation pig embryo. *Genesis* 2000;26(1):9-14.
107. Wilson ME, Ford SP. Comparative aspects of placental efficiency. *Reprod* 2001;(58):223-32.
108. Yaful G. Estudio de la placenta porcina: Concentración de hormonas esteroides y parámetros de eficiencia reproductiva. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de La Plata. 2009.
109. Yaful G, Riesco O, Koncurat M. Concentración de progesterona en placenta materna, fetal y líquido amniótico durante la gestación porcina. *ALPA* 2005;13:136-7.
110. Yu Z, Croy BA, Chapeau C, King GJ. Elevated endometrial natural killer cell activity during early porcine pregnancy is conceptus-mediated. *J Rep Immunol* 1993;24(2):153-64.
111. Zenclussen AC, Schumacher A, Zenclussen ML, Wafula P, Volk HD. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Expert Rev Mol Med* 2007;9(10):1-14.
112. Zhu J, Motejlek K, Wang D, Zang K, Schmidt A, Reichardt LF. β 8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Develp* 2002; 129(12): 2891–903.

ANEXOS

Tabla 5. Determinación de P₄ por Quimioluminiscencia y RIA en HoPM, HoPF y suero en diferentes períodos gestacionales.

Período de Gestación	Tipo de muestras	P ₄ ng/ml	
		Quimioluminiscencia	RIA
37 días	HoPF	28,20	34,80
	HoPM	2,04	1,65
40 días	Suero	56	46,7
	HoPM	1,86	3,00
	HoPF	60	34,20
	HoPM	4,50	3,60
60 días	HoPF	61,80	73,50
	HoPM	2,37	2,64
	HoPM	4,20	3,30
	HoPM	3	1,98
70 días	HoPF	330	245,40
	HoPF	190,20	177
	HoPM	6,90	4,90
	HoPF	333	212,40
	HoPF	267,90	277,50
	HoPM	5,40	4,20
	HoPF	184,20	187,20
	HoPM	2,10	1,95
71 días	HoPF	210,90	211,50
	HoPM	2,49	2,61
	HoPM	2,43	3,30
80 días	HoPM	2,22	3
	HoPF	318	256,20
	HoPF	225	256,80
	HoPF	197,70	153,90
	HoPF	255,60	246,60
	HoPF	202,20	242,40
	HoPF	202,80	240,60
114 días	HoPM	2,37	2,07
	Suero	38,8	31,8

HoPM: homogenato de placenta materna HoPF: homogenato de placenta fetal

Tabla 6: Concentración P₄ (ng/ml) en HoPM, HoPF y suero de cerdas vacías y de diferentes períodos de gestación.

Días	HoU	HoPM	HoPF	Suero
Vacía	0,63 ±0,35			18,63 ±4,73
35		0,95±0,54	15,06± 6,74	S/D
40		1,14± 0,46	19,6± 2,59	56,00
60		2,72± 1,28	45,6 ±20,77	25,40
70		2,66± 1,92	83,25 ±30,69	22,6±2,12
80		3,7 ±2,57	77,85 ±15,57	S/D
90		S/D	S/D	S/D
114		1,08 ±0,38	64,69 ±18,86	15,9±9,33

Tabla 7: Concentración E₂ (pg/ml) en HoPM, HoPF y suero de cerdas vacías y de diferentes períodos de gestación.

Días	HoU	HoPM	HoPF	Suero
Vacía	658,20± 59,95			19.36±19,55
35		1040,67±329,66	2058,71± 826,23	29,50 ±2,12
40		867,33 ±295,92	826,25± 202,55	21,5±0,71
50		682,29 ±58,84	912,86 ±105,98	10±1
60		643,00 ±75,02	1898,00 ±118,88	12,42±1,38
70		441,60 ±108,63	637,50 ±144,97	56,67±4,04
80		2864,25± 782,28	6926,25 ±993,21	80,83±3,75
90		2616±1160,73	9000±0	434±31,19
114		9131±1348,2	41840 ±18724,07	592,67±102,5

Tabla 8: Concentración IFN- γ (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.

Concentración de IFN- γ (pg/ml)				
Día	Suero	HoU	HoPM	HoPF
0	140,47	64,91		
32	15		57,63	1515,07
44	15		15	15
51	15		15	15
65	15		15	15
70	15		15	15
80	15		15	15
90	15		15	15
114	15		15	15

Tabla 9: Concentración IL-6 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.

Concentración de IL-6 (pg/ml)				
Días	Suero	HoU	HoPM	HoPF
0	286,46	34		
32	34		34	878,29
44	104,14		34	34
50	116,46		48,4	37
60	34		126,74	34
70	137		66	34
80	198,04		87	34
90	384,85		34	34
114	34		34	34

Tabla 10: Concentración IL-12 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.

Concentración de IL-12 (pg/ml)				
Días	Suero	HoU	HoPM	HoPF
0	14,7658	122,7477		
32	21,9796		106,5165	203,9034
44	16,5692		103,8114	228,2499
51	14,7658		84,8751	49,7076
60	16,569		65,9388	57,8232
65	15,6675		63,2337	63,2337
70	67,9678		90,2856	71,349
80	28,2917		74,0544	63,2337
90	97,7248		84,8751	82,17
114	43,621		79,4646	74,0544

Tabla 11: Concentración IL-15 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.

Concentración de IL-15 (pg/ml)				
Días	Suero	HoU	HoPM	HoPF
0	747,705	158,001		
32	510,602		102,21	248,658
35	661,697		116,157	360,27
44	622,18		144,051	
50	782,573			
60	573,364		137,079	754,245
70	138,675		548,523	911,157
80	768,626		164,973	255,63
90	466,435		353,262	255,63
114	292,095		266,091	346,287

Tabla 12: Concentración IL-18 (pg/ml) en homogenato de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal como suero proveniente de distintos períodos de preñez.

Concentración de IL-18 (pg/ml)				
Días	Suero	HoU	HoPM	HoPF
0	195,489	5186,286		
32	912,3322		39	39
44	39		590,5983	2613,06
51	39		39	254,664
65	39		163,7967	6286,332
70	129,8629		722,7693	3558,933
80	357,0314		99,0882	39
90	39		39	868,7076
114	39		39	39