



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

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**DETERMINACIÓN DE LOS RECEPTORES PARA ESTRÓGENOS Y  
PROGESTERONA, EN TEJIDOS PLACENTARIOS FETALES Y MATERNOS  
PORCINOS, Y SU RELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN SÉRICA Y TISULAR**

- **Autor:** M.V. VIGLIERCHIO, María del Carmen
- **Director:** Dra. YAFUL, Graciela Noemí
- **Codirector:** Dra. WILLIAMS, Sara Inés
- **Lugar de trabajo:** Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa

**Miembros del Jurado**

- Dr. CASTILLO, Víctor (UBA)
- Dra. MACHUCA, Mariana (UNLP)
- Dra. QUIROGA, María Alejandra (UNLP)

- Año 2020 -

## AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Dra. Graciela Yaful y Dra. Sara Williams por su confianza, dedicación, apoyo y paciencia constantes desde el inicio de esta tesis.

A mi compañera de “las chicas de blanco”, Mónica García por estar cada vez que la necesité, y por los intensos debates mantenidos cada vez que compartíamos cada una de las inmunohistoquímicas en el laboratorio y a Yolanda Marrón por su incansable entusiasmo y apoyo incondicional.

A los miembros jurados de esta tesis, Dr. Víctor Castillo, Dra. Mariana Machuca y Dra. María Alejandra Quiroga, por sus aportes en cada informe de avance.

A la Dras. Mirta Koncurat, Delia Williamson, Carolina Vélez y a todo el grupo de investigación de placenta porcina por despertar mi interés en esta línea de investigación, por los momentos compartidos en el laboratorio, en los cursos y Jornadas.

A Ruben, mi marido, Esteban, mi hijo y Mónica, mi hermana por el incansable apoyo en cada momento de este trabajo y la confianza y fuerza que me transmitieron en todo momento.

A mis padres y hermanos, por ayudarme a creer que podía lograr lo que anhelaba.

A las Facultades de Ciencias Veterinarias de la UNLPam y UNLP, por haber permitido llevar este estudio adelante y brindarme ayuda económica; y por aceptar mi plan de tesis y este estudio en placenta porcina respectivamente.

A todo el equipo docente de Química Biológica actual, a Teresa y Rubén que fueron mis profesores y a los estudiantes de segundo año de la carrera de Medicina Veterinaria por contribuir indirectamente a este desarrollo.

A Daniel por su apoyo a esta investigación.

**ÍNDICE**

AGRADECIMIENTOS.....	II
PRESENTACIONES EN CONGRESOS.....	VIII
PUBLICACIONES.....	XV
ABREVIATURAS.....	XVI
LISTA DE TABLAS.....	XIX
LISTA DE FIGURAS.....	XXII
RESUMEN.....	XXVI
SUMMARY.....	XXVIII
INTRODUCCIÓN.....	1
Producción Porcina.....	1
Reproducción Porcina.....	3
Hormonas esteroideas.....	10
Receptores de hormonas esteroideas.....	14
Receptor de Estrógenos.....	15
Receptor de Progesterona.....	17
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos.....	21
Hipótesis.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22

Animales.....	22
Tractos Reproductivos.....	22
Extracción de sangre.....	24
Obtención de homogenatos de placenta materna (HoPM), homogenatos de placenta fetal (HoPF) y de útero no gestante porcino (HoUP).....	25
Determinación de hormonas esteroideas en suero y extractos placentarios.....	25
Análisis microscópico de la estructura de la placenta y útero.....	26
Determinación de receptores de hormonas esteroideas en tejidos placentarios y endometrio porcino.....	27
Inmunohistoquímica.....	27
Receptor de Estrógenos.....	27
<i>Determinación de Receptor de Estrógenos <math>\alpha</math></i> .....	27
<i>Determinación de Receptor de Estrógenos <math>\beta</math></i> .....	29
Receptor de Progesterona.....	29
<i>Determinación de Receptor de Progesterona isoforma A</i> .....	29
<i>Determinación de Receptor de Progesterona isoforma B</i> .....	30
Observaciones microscópicas de las inmunohistoquímicas.....	30
Determinación del Porcentaje de Área inmunomarcada (%AIM).....	32
Análisis estadísticos.....	34
Hormonas esteroideas.....	34
Receptores de hormonas esteroideas.....	34

RESULTADOS.....	36
TRACTOS REPRODUCTIVOS.....	36
DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS.....	37
DETERMINACIÓN DE ESTRÓGENOS.....	37
Determinación de Estrógenos en suero.....	37
Determinación de Estrógenos en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM).....	38
Determinación de Estrógenos en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF).....	40
DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA.....	41
Receptores de Progesterona en suero.....	41
Determinación de Progesterona en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM).....	42
Determinación de Progesterona en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF).....	44
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS MEDIANTE EL USO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	45
Receptores de Estrógenos $\alpha$ .....	45
Receptores de Estrógenos $\beta$ .....	46
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE PROGESTERONA MEDIANTE EL USO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	48
Receptores de Progesterona isoforma A.....	48
Receptores de Progesterona isoforma B.....	51
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE PROGESTERONA MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DE IMÁGENES: PORCENTAJE DE ÁREA INMUNOMARCADA EN ÚTERO Y PLACENTA PORCINA.....	52

DETERMINACIÓN DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\alpha$ .....	52
Receptor de Estrógenos $\alpha$ en epitelio luminal endometrial.....	52
Receptor de Estrógenos $\alpha$ en epitelio glandular endometrial.....	52
Receptor de Estrógenos $\alpha$ en tejido conectivo endometrial.....	53
Receptor de Estrógenos $\alpha$ en Trofoblasto.....	54
DETERMINACIÓN DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\beta$ .....	54
Receptor de Estrógenos $\beta$ en tejido epitelial luminal endometrial.....	55
Receptor de Estrógenos $\beta$ en epitelio glandular endometrial.....	56
Receptor de Estrógenos $\beta$ en tejido conectivo endometrial.....	57
Receptor de Estrógenos $\alpha$ en Trofoblasto.....	58
DETERMINACIÓN DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA ISOFORMA A.....	59
Receptor de Progesterona isoforma A en tejido epitelial luminal endometrial.....	60
Receptor de Progesterona isoforma A en epitelio glandular endometrial.....	61
Receptor de Progesterona isoforma A en tejido conectivo endometrial.....	62
Receptor de Progesterona isoforma A en Trofoblasto.....	63
DETERMINACIÓN DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA ISOFORMA B.....	63
Receptor de Progesterona isoforma B en tejido epitelial luminal endometrial.....	63
Receptor de Progesterona isoforma B en epitelio glandular endometrial.....	64
Receptor de Progesterona isoforma B en tejido conectivo endometrial.....	65
Receptor de Progesterona isoforma B en Trofoblasto.....	66

DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	83
ANEXO.....	94
Determinación de Estrógenos en suero.....	93
Determinación de Estrógenos en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM).....	93
Determinación de Estrógenos en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF).....	94
Determinación de Progesterona en suero.....	94
Determinación de Progesterona en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM).....	95
Determinación de Progesterona en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF).....	95
Determinación del Receptor de Estrógenos $\alpha$ .....	96
Determinación del Receptor de Estrógenos $\beta$ .....	97
Determinación del Receptor de Progesterona isoforma A.....	98
Determinación del Receptor de Progesterona isoforma B.....	99

**PRESENTACIONES EN CONGRESOS**

1. Yaful G, Viglierchio M, García MG, Lacolla D, Sierra G, Witt S, Koncurat M, Marrón Y, Williams S, Gastaldo K, Soler J. Determinación de receptores de estrógenos en la gestación porcina. Argentina. Santa Rosa. 2018. Exposición oral. Jornada. Jornada de Ciencia y Técnica 2018. Secretaría de Investigación y Posgrado. Res. 384/18 CS de la UNLPam.
2. Vélez C, Williamson D, Garro A, Clauzure M, Gastaldo K, Soler J, Alderete S, Marrón Y, Viglierchio M, Koncurat M. Concentración de IFN- $\gamma$  en suero y placenta porcina. Argentina. Buenos Aires. 2017. Simposio. I Simposio Internacional, X Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria.
3. Yaful G, García M, Lacolla D, Marrón Y, Moscovakis E, Pitte V, Riesco S, Sierra G, Viglierchio M, Witt S. Determinación de receptores para estrógenos y progesterona en placenta porcina. Argentina. General Pico. 2017. Libro. Resumen. Jornada. X Jornada de Ciencia y Técnica, III Jornada Interinstitucional. FCV – FI – UNLPam. (Res. 447/201 CD FCV – UNLPam). ISBN: 978-950-863-314-9. Pág, 54 - 55.
4. Koncurat M, Williamson D, Bruni M, García M, Garro A, Gelada M, Hernández M, Martín P, Riesco O, Salas C, Sampedro F, Velez C, Viglierchio M, Alderete S, Rodríguez Ruíz M. Estudio de las moléculas de adhesión que participan en la Placentación Porcina. Argentina. General Pico. 2017. Libro. Resumen. Jornada. X Jornada de Ciencia y Técnica, III Jornada Interinstitucional. FCV – FI – UNLPam. (Res. 447/201 CD FCV – UNLPam). ISBN: 978-950-863-314-9. Pág, 30 -31.
5. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Marrón Y, Moscovakis E, Koncurat M, Yaful G Maternal-fetal communication: role of fetal estrogens in porcine pregnancy. Chile, Puerto Varas, X Región. 2017. Congreso. VII Latin American

- Symposium on Maternal Fetal Interaction and Placenta (SLIMP) and VI Latin American Symposium on Reproductive Immunology. Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta (LASRI). Con referato. Resumen publicado en la Revista PLACENTA. Abstracts / Placenta 51 (2017) 98-131. ISSN: 0143-4004. Placenta Vol 51 ([http://www.placentajournal.org/issue/S0143-4004\(17\)X0002-7?page=1](http://www.placentajournal.org/issue/S0143-4004(17)X0002-7?page=1)).
6. Yaful G, Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Pitte V, Bustos J, Koncurat M. Inmunolocalización de receptores de estrógenos beta en la gestación porcina temprana. Brasil. Recife. 2016. Resumen. Congreso. XXV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal.
  7. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Pitte V, Koncurat M, Yaful G. Expresión de los receptores de Estrógenos en Placenta Porcina. Argentina. General Pico. 2016. Exposición oral. Jornadas de Ciencia y Técnica 2016 - “Veinte años de las Jornadas de Ciencia y Técnica”. de la UNLPam.
  8. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Pitte V, Koncurat M, Yaful G. Expresión de Receptores de Estrógenos en Placenta Porcina. Argentina. Chaco. 2016. Libro. Resumen. Congreso. XIII Congreso Nacional de Producción Porcina, XIX Jornadas de Actualización Porcina, VIII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. UNRC. Con referato. ISBN 978-987-688-176-0. Pág. 201.
  9. Yaful G, García M, Lacolla D, Murcia V, Riesco O, Riesco S, Sierra G, Vaquero P, Viglierchio M, Witt S. Determinación de receptores para progesterona isoformas A y B en tejidos Placentarios fetales y maternos de cerdas y su relación con la concentración sérica y tisular. Argentina. General Pico. 2015. Exposición oral. II

Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería de la UNLPam.

10. Viglierchio M, García MG, Riesco O, Williamson DM, Williams S, Lacolla D, Koncurat M, Yaful G. Progesterone receptors and progesterone concentration in serum and porcine maternal placental extracts. Argentina. Mar del Plata. 2015. Revista. Resumen. Congreso. VI Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta and V Latin American Symposium on Reproductive Immunology Meeting. Con referato. Resumen publicado en la revista PLACENTA, VI SLIMP and V LASRI Meeting 2015; 36: 469-521. ISSN: 0143-4004.
11. Viglierchio M, Koncurat M. Determinación de los receptores para estrógenos y progesterona en tejidos fetales y maternos de hembras porcinas y su relación con la concentración sérica y tisular. Jornada Científico-Tecnológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. Comunicación Oral. Resumen publicado en la Revista ANALECTA VET 2014; 34(1-2) p88. Impresa ISSN 0365514-8 Electrónica ISSN 1514-2590.
12. Yaful G, García M, Lacolla D, Murcia V, Riesco O, Riesco S, Sierra G, Vaquero P, Viglierchio M, Witt S. Determinación de receptores para progesterona isoformas A y B en tejidos placentarios fetales y maternos de cerdas y su relación con la concentración sérica y tisular. Argentina. Santa Rosa. 2014. Libro. Resumen. Jornada. Jornada de Ciencia y Técnica 2014: Investigación y Transferencia en la UNLPam. 1º ed. E-Book. ISBN 978-950-863-216-6.
13. Koncurat M, Williamson D, Bruni M, García M, Garro A, Gelada M, Hernández M, Martín P, Riesco O, Salas C, Sampedro F, Vélez C, Viglierchio M. Estudio de las moléculas de adhesión que participan en la placentación porcina. Argentina. Santa

- Rosa. 2014. Libro. Resumen. Jornada. Jornada de Ciencia y Técnica 2014: Investigación y Transferencia en la UNLPam. 1° ed. E-Book. ISBN 978-950-863-216-6.
14. Koncurat M, Bruni M, García M, Garro A, Hernández M, Lacolla D, Riesco O, Vélez C, Viglierchio M, Williamson D. Placentación Porcina. Argentina. Santa Rosa. 2014. Libro. Resumen. Jornada. Jornada de Ciencia y Técnica 2014: Investigación y Transferencia en la UNLPam. 1° ed. E-Book. ISBN 978-950-863-216-6.
15. Viglierchio M, García M, Williams S, Yaful G. Expresión de los receptores para estrógenos y progesterona en ovarios de cerdas gestantes y no gestantes. Argentina. La Plata. 2014. Libro. Resumen. XVI Congreso y 13° Jornadas de Educación en Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. E-book. ISBN 978-987-26182-3-0. Pág. 47. Con referato.
16. Viglierchio, M.; Williams, S.; García, M.; Lacolla, D.; Koncurat, M. y Yaful, Immunolocalización de receptores de progesterona total, isoforma A e isoforma B en úteros de cerdas no gestantes y de cerdas gestantes de 35 días. G. Argentina. Mar del Plata. 2014. Libro. Resumen. Congreso. VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur, XII Congreso Nacional de Producción Porcina, XVIII Jornadas de Actualización Porcina. ISBN 978-987-688-071-8. Pág. 219.
17. Viglierchio M. Determinación de los receptores para estrógenos y progesterona, en tejidos placentarios fetales y maternos de hembras porcinas, y su relación con la concentración sérica y tisular. Argentina. Mar del Plata. 2014. Presentación de seminario de posgrado. Congreso. VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur, XII Congreso Nacional de Producción Porcina, XVIII Jornadas de Actualización Porcina.

18. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Murcia V, Yaful G. Localización de receptores de progesterona isoforma A en úteros de cerdas no gestantes y placenta materna durante la gestación temprana. Cuba. La Habana. 2013. Comunicación oral. XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal.
19. Viglierchio, M. Determinación de los receptores para estrógenos y progesterona en tejidos placentarios fetales y maternos de hembras porcinas, y su relación con la concentración sérica y tisular. Argentina. General Pico. 2013. Comunicación oral. Libro. Jornada. Resumen. VIII Jornada de Ciencia y Técnica y I Jornada Interinstitucional, Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería, UNLPam. E-Book. ISBN 978-950-863-207-4. Pág 15.
20. Viglierchio, M.; García, M.; Lacolla, D.; Murcia, V.; Cerutti, D.; Riesco, O.; Riesco, S.; Sierra, G.; Witt, S.; Koncurat, M.; Yaful, G. Determinación de receptores de progesterona isoforma A en placenta materna durante la gestación porcina y en endometrio de cerdas no gestantes. Argentina. General Pico. 2013. Libro. Jornada. Resumen. VIII Jornada de Ciencia y Técnica y I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería UNLPam. E-Book. ISBN 978-950-863-207-4. Pág 16.
21. Williamson, D.; Vélez, C.; Garro, A.; Viglierchio, M.; García, M.; Hernández, M.; Riesco, O.; Bruni, M.; Martín, P.; Gelada, M.; Sampedro, F.; Salas, C.; Koncurat, M. Expresión de las moléculas de adhesión durante la placentación porcina. Argentina. General Pico. 2013. Libro. Jornada. Resumen. VIII Jornada de Ciencia y Técnica y I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería, UNLPam. E-Book. ISBN 978-950-863-207-4. Pág 13.

22. Viglierchio M, Williams S, García MG, Lacolla L, Koncurat M, Yaful G. Immunolocalization of progesterone receptor isoform a in ovaries and placental tissues during pregnancy in pigs. Brasil. Foz Do Iguacú. 2013. Libro. Resumen. Simposio. V SLIMP - Latin American Symposium on Maternal Fetal Interaction and Placenta, IV LASRI – Latin American Symposium on Reproductive Immunology. Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta. Con referato. Resumen Publicado en la revista PLACENTA. Abstracts for the V SLIMP – IV LASRI Meeting 2013; Placenta 34: A1-A94. ISSN: 0143-4004.
23. Viglierchio M, Williams S, García M.G, Riesco O, Lacolla D, Riesco S, Witt S, Koncurat M, Yaful G. Determinación de receptores de progesterona isoforma A, en ovarios y tejidos placentarios fetales y maternos de cerdas preñadas. Argentina. Capital Federal. 2012. Jornada. Libro de Resúmenes. III Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal – INITRA. 2012. Con referato. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. Res. CD 1637/12. Resúmenes en In Vet Vol. 14 N° 2, 2012. ISSN 1514-6634.
24. Viglierchio M, García M, Riesco O, Lacolla D, Riesco S, Witt S, Yaful G. Determinación de receptores para progesterona isoformas A y B en tejidos placentarios fetales y maternos de cerdas y su relación con la concentración sérica y tisular. Argentina. General Pico. 2012. Libro. Resumen. Jornada. Jornada de Ciencia y Técnica 2012. “Proyectar y Comunicar: estrategias para la investigación en la UNLPam”. 1° ed. Santa Rosa: UNLPam. E-Book. ISBN 978-950-863-178-7.
25. Viglierchio M, Williamson D, Yaful G, Koncurat M. Interrelación de Progesterona, Estrógenos e IL – 15 durante la Preñez Porcina Temprana. Argentina. Esperanza.

2012. Libro. Resumen. Jornada. V Jornadas Científicas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Pág. 30. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL.
26. Yaful G, Viglierchio M, García M, Iglesias G, Torres P, Soler I, Williamson D, Rossi D. Determinación de receptores de progesterona en placenta fetal durante la placentación porcina. Argentina. Salta. 2012. Libro. Resumen. Congreso. XI Congreso Nacional de Producción Porcina, VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur, XVII Jornadas de Actualización Porcina. Pág. 238. Con referato. Resumen publicado en la revista online Infopork.  
[http://www.infopork.com/post/3842/DETERMINACION\\_DE\\_RECEPTORES\\_DE\\_PROGESTERONA\\_EN\\_PLACENTA\\_FETAL\\_DURANTE\\_LA\\_PLACENTACION\\_PORCINA.html](http://www.infopork.com/post/3842/DETERMINACION_DE_RECEPTORES_DE_PROGESTERONA_EN_PLACENTA_FETAL_DURANTE_LA_PLACENTACION_PORCINA.html)
27. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Barrales H, Hernández M, Yaful G. Comparación de técnicas de recuperación antigénica en placentas y úteros porcinos para la determinación de receptores de progesterona Argentina. Salta. 2012. Libro. Resumen. Congreso. XI Congreso Nacional de Producción Porcina, VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur, XVII Jornadas de Actualización Porcina. Pág 236. Con referato. Resumen publicado en la revista online Infopork.  
[http://www.infopork.com/Post/3849/COMPARACION\\_DE\\_TECNICAS\\_DE\\_RECUPERACION\\_ANTIGENICA\\_EN\\_PLACENTAS\\_Y\\_UTEROS\\_PORCINOS\\_PARA\\_LA\\_DETERMINACION\\_DE\\_RECEPTORES\\_DE\\_PROGESTERONA\\_.html](http://www.infopork.com/Post/3849/COMPARACION_DE_TECNICAS_DE_RECUPERACION_ANTIGENICA_EN_PLACENTAS_Y_UTEROS_PORCINOS_PARA_LA_DETERMINACION_DE_RECEPTORES_DE_PROGESTERONA_.html)
28. Koncurat M, Viglierchio M, Hernández M y Williamson D. Detección de la Integrina avb3 durante la Placentación Porcina. Argentina. Trelew. 2009. Libro. Resumen. Jornada. I Jornadas Patagónicas de Biología y III Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas. ISBN 978-987-1591-16-9.

**PUBLICACIONES**

1. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Murcia V, Yaful G. Localización de receptores de progesterona isoforma A en útero de cerdas no gestantes y placenta materna durante la gestación temprana. Revista Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 2014 Vol. 22, Núm. 3, 4: p81-85. ISSN 1022-1301.

**ABREVIATURAS**

AIM	Área inmunomarcada
CD3+	Cluster of differentiation 3+
CL	Cuerpo lúteo
DAB	Diaminobencidina
Dg	Días de gestación
DPC	Diagnostic Product Corporation
Es	Estrógenos
FGF7	Factor de crecimiento fibroblástico 7
G	Gestante
HoPF	Homogenato de Placenta Fetal
HoPM	Homogenato de Placenta Materna
HoUP	Homogenato de útero no gestante porcino
IFM	Interfase feto-materno
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
IL1 $\beta$ 2	Interleuquina 1 beta 2
IFNG	Interferón gamma
IFND	Interferón delta

IGF-I	Factor de crecimiento semejante a la insulina I
LSAB	Labeled streptavidin biotin method
MAPKs	Quinasas de proteínas activadas por mitógenos
MCI	Macizo Celular Interno
NF-kB	Factor nuclear kappa Beta
NG	No Gestante
NGFF	No Gestante en Fase Folicular
NGFL	No Gestante en Fase Luteal
NK	Natural killer
P4	Progesterona
PBS	Solución salina tamponada
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
RE	Receptor de Estrógenos
RE $\alpha$	Receptor de Estrógenos alfa
RE $\beta$	Receptor de Estrógenos beta
RP	Receptor de Progesterona
RPA	Receptor de Progesterona isoforma A
RPB	Receptor de Progesterona isoforma B

TGFB                      Factor de Crecimiento Transformante beta

TNF                        Factor de Necrosis Tumoral

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Expresión del receptor de estrógenos  $\alpha$  sobre epitelio luminal y glandular, tejido conectivo y trofoblasto; en útero de cerda no gestante y placenta de cerda de diferentes períodos de gestación. NGFF: cerda no gestante, fase folicular. NGFL: cerda no gestante, fase luteal. (+): Expresión nuclear con diferentes grados de positividad, (-): Negativo.....45

Tabla 2: Expresión del receptor de estrógenos  $\beta$  sobre epitelio luminal y glandular, tejido conectivo y trofoblasto; en útero de cerda no gestante y placenta de cerda de diferentes períodos de gestación. NGFF: cerda no gestante, fase folicular. NGFL: cerda no gestante fase luteal. (+): Expresión nuclear con diferentes grados de positividad. (-): Negativo.....46

Tabla 3: Expresión del receptor de progesterona isoforma A sobre epitelio luminal y glandular, tejido conectivo y trofoblasto; en útero de cerda no gestante y placenta de cerda de diferentes períodos de gestación. NGFF: cerda no gestante, fase folicular. NGFL: cerda no gestante, fase luteal. (+): Expresión nuclear con diferentes grados de positividad. (-): Negativo .....48

Tabla 4: Expresión del receptor de progesterona isoforma B sobre epitelio luminal y glandular, tejido conectivo y trofoblasto; en útero de cerda no gestante y placenta de cerda de diferentes períodos de gestación. NGFF: cerda no gestante, fase folicular. NGFL: cerda no gestante, fase luteal. (+): Expresión nuclear con diferentes grados de positividad. (-): Negativo.....51

Tabla 1a: Concentración de Estrógenos (pg/ml) en sueros de cerdas no gestantes en fase folicular y luteal, y de cerdas gestantes de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.....94

Tabla 2a: Concentración de Estrógenos (pg/ml) en homogenatos de útero no gestante (HoUP) de cerdas no gestantes en fase folicular y luteal, y de cerdas gestantes (HoPM) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.....94

Tabla 3a: Concentración de Estrógenos (pg/ml) en Homogenatos de placenta fetal de cerdas gestantes (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.....	95
Tabla 4a: Concentración de Progesterona (ng/ml) en sueros de cerdas no gestantes en fase folicular y luteal, y de cerdas gestantes de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.....	95
Tabla 5a: Concentración de Progesterona (ng/ml) en homogenatos de útero no gestante (HoUP) de cerdas no gestantes en fase folicular y luteal, y de cerdas gestantes (HoPM) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.....	96
Tabla 6a: Concentración de Progesterona (ng/ml) en Homogenatos de placenta fetal de cerdas gestantes (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.....	96
Tabla 7a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) del Receptor de Estrógenos $\alpha$ (RE $\alpha$ ) del epitelio luminal y glandular y tejido conectivo endometrial en distintos períodos de gestación. NGFF: no gestante fase folicular; NGFL: no gestante en fase luteal. dg: días de gestación.....	97
Tabla 8a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) del Receptor de Estrógenos $\beta$ (RE $\beta$ ) del epitelio luminal y glandular, tejido conectivo endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NGFF: no gestante fase folicular; NGFL: no gestante en fase luteal. dg: días de gestación.....	98

Tabla 9a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) del Receptor de Progesterona isoforma A (PRA) del epitelio luminal y glandular, y tejido conectivo endometrial en distintos períodos de gestación. NGFF: no gestante fase folicular; NGFL: no gestante en fase luteal. dg: días de gestación.....99

Tabla 10a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) del Receptor de Progesterona isoforma B (PRB) del epitelio luminal y glandular, y tejido conectivo endometrial en distintos períodos de gestación. NGFF: no gestante fase folicular; NGFL: no gestante en fase luteal. dg: días de gestación.....100

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Trofoblasto de 70 dg (Imagen de 8-bit DAB; 400x).....	32
Figura 2: Trofoblasto de 70 dg (Imagen de 8-bit; 400x). A. Marcación en rojo del área inmunomarcada. B. Ventana donde se observa el porcentaje de marrón que ocupó el área previamente establecida (epitelio).....	33
Figura 3: Concentración de Estrógenos (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGFF y NGFL) y cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	38
Figura 4: Concentración de Estrógenos (pg/ml) en Homogenatos de cerdas no gestantes (NGFF y NGFL) y HoPM de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	39
Figura 5: Concentración de Estrógenos (pg/ml) en Homogenatos de placenta fetal (HoPF) de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	40
Figura 6: Concentración de Progesterona (ng/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGFF y NGFL) y cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	42
Figura 7: Concentración de Progesterona (ng/ml) en Homogenatos de cerdas no gestantes (NGFF y NGFL) y HoPM de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	43

- Figura 8: Concentración de Progesterona (ng/ml) en Homogenatos de placenta fetal (HoPF) de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....44
- Figura 9: Placenta porcina. (A) Interfase placentaria de 30 dg negativa a RE $\beta$  (400x). (B) Epitelio trofoblástico de 70 dg con inmunomarcación positiva a RE $\beta$  (400x).....47
- Figura 10: Útero de cerda NGFF. Epitelio luminal y glandular y tejido conectivo expresan inmunomarcación con RPA (400x).....49
- Figura 11: Placenta porcina de 5 dg. (A) Epitelio luminal y glandular, tejido conectivo expresan inmunomarcación con RPA (100x). (B) Inmunomarcación positiva en epitelio luminal y glandular, tejido conectivo con RPA (400x).....50
- Figura 12: Placenta porcina de 17 dg. (A) Epitelio glandular, tejido conectivo y miometrio expresan inmunomarcación con RPA (100x). (B) Inmunomarcación positiva en epitelio glandular con RPA (400x).....50
- Figura 13: Determinación del %AIM de RE $\alpha$  en el epitelio glandular endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....53
- Figura 14: Determinación del %AIM de RE $\alpha$  en el tejido conectivo endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....54

- Figura 15: Determinación del %AIM de RE $\beta$  en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....56
- Figura 16: Determinación del %AIM de RE $\beta$  en el epitelio glandular endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....57
- Figura 17: Determinación del %AIM de RE $\beta$  en tejido conectivo endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....58
- Figura 18: Determinación del %AIM de RE $\beta$  en trofoblasto de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados (17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....59
- Figura 19: Determinación del %AIM de RPA en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....60
- Figura 20: Determinación del %AIM de RPA en el epitelio glandular endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....61

- Figura 21: Determinación del %AIM de RPA en tejido conectivo endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....62
- Figura 22: Determinación del %AIM de RPB en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....64
- Figura 23: Determinación del %AIM de RPB en el epitelio glandular endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....65
- Figura 24: Determinación del %AIM de RPB en tejido conectivo endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....66

**TÍTULO** Determinación de los receptores para estrógenos y progesterona, en tejidos placentarios fetales y maternos porcinos, y su relación con la concentración sérica y tisular

**PALABRAS CLAVES** Porcinos – Placenta Porcina – Estrógenos – Progesterona – Receptores de Estrógenos – Receptores de Progesterona

### **RESUMEN**

Se estudió la expresión de receptores de estrógenos y de progesterona en placentas porcinas de diferentes períodos gestacionales y su relación con la concentración de estrógenos y progesterona en suero y homogenatos de placenta materna y fetal. La expresión de receptores de Estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y de Progesterona (isoformas A y B) se realizó por inmunohistoquímica y la determinación de sus ligandos mediante quimioluminiscencia. Se hallaron diferencias significativas en los valores de estrógenos (Es) a los 17 dg entre los componentes maternos y fetales placentarios y el suero. Se obtuvieron altas concentraciones de progesterona (P4) en extractos fetales a los 17 y 70 dg. A los 17 dg se observó inmunomarcación nuclear del RE $\beta$  en el epitelio luminal y glandular, RPA en epitelio glandular y tejido conectivo, y RE $\beta$  en células epiteliales trofoblásticas. Mientras que a los 70 dg se observó expresión de RPA en epitelio glandular y tejido conectivo, y RE $\beta$  en células epiteliales trofoblásticas. Los resultados obtenidos sugieren que los Es fetales interactúan con los RE $\beta$  en el epitelio trofoblástico y la P4 se liga a los RPA en el tejido conectivo endometrial para modular la expresión de moléculas de señalización y sus receptores relacionados con la implantación, el mantenimiento de la gestación y con la remodelación placentaria. Se postula que la relación

temporal entre las concentraciones séricas y tisulares de Es y P4, y la expresión de sus receptores es determinante para promover la comunicación entre la hembra porcina y los *conceptuses*, y que el descenso de Es hallado entre los 15-20 días de preñez que se acompaña de un aumento de P4, y de una desaparición de los RPA en el epitelio luminal uterino es esencial para la implantación y la continuidad de la gestación.

**TITLE** Estrogen and progesterone receptors determination in porcine fetal and maternal placental tissues, and the relationship with the serum and tissue concentrations

**KEY WORDS** Swines – Porcine Placenta – Estrogens – Progesterone – Estrogen Receptor – Progesterone Receptor

### **SUMMARY**

Estrogens and progesterone receptors expression and their ligands in porcine placentas of different gestational periods and their relationship to the serum and tissue concentration were studied. Estrogen ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and progesterone (isoforms A and B) receptors expression was performed by immunohistochemistry and the determination of hormones (estrogen, progesterone) by quimioluminescence. Significant differences in estrogen (Es) values at 17 gd were found between the placental maternal and fetal components and serum. High progesterone (P4) concentrations were obtained in fetal extracts at 17 and 70 gd. At 17 gd, nuclear immunomarcation of ER $\beta$  in luminal and glandular epithelium, PRA in glandular epithelium and ER $\beta$  in trophoblast was observed. While at 70 gd PRA expression was observed in glandular epithelium and connective tissue and ER $\beta$  in trophoblast. The results obtained suggest that fetal Es is interact with ER $\beta$  in trophoblast and P4 binds to PRA in endometrial connective tissue to modulate the expression of signaling molecules and its receptors related to implantation, gestation maintenance and placental remodeling. It is postulate that the temporal relationship between serum and tissue concentrations of Es and P4, and expression receptors is decisive in promoting communication between the swine female and the *conceptuses*, and that the decrease of Es founded between the 15 – 20 gd that

is accompanied with an increase in P4, and the disappearance of PRA in the uterine luminal epithelium is essential for the implantation and continuity of gestation.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Producción Porcina**

A nivel mundial, la carne porcina es la de mayor consumo, siendo una de las fuentes importantes de proteína animal. China y la UE son los principales productores y consumidores, con más del 70% de la producción total de carne porcina. Sus características de prolificidad y eficiencia en la conversión de alimento a carne, hacen que esta especie sea la más producida a nivel mundial. El aumento de la producción genera oportunidades para todos los que participan en la cadena productiva. La comercialización en los países en desarrollo continúa viéndose impulsada por el aumento de los ingresos y el crecimiento demográfico y fortalecida por tendencias como la urbanización y las variaciones en las preferencias y hábitos alimentarios (Cruzado Ruiz, 2019).

En la Argentina el consumo se encuentra muy por debajo de la carne bovina o aviar, sin embargo en los últimos años comenzó a transitar un camino de posibilidades que la podrían llevar al desarrollo y a la consolidación, intentando dar respuesta a la creciente demanda de proteína animal que exhibe el mercado mundial. La crisis sanitaria que enfrenta China por la fiebre porcina africana, al provocar la muerte de al menos un 30% de los rodeos porcinos, disparó la alarma por su expansión hacia otros países del sudeste asiático. Desde los sectores de la producción, se estima que los rodeos deberían incrementarse por encima del 40% y alcanzar un volumen necesario de 10 millones de cabezas, para atender la demanda global junto al crecimiento del consumo interno.

En los últimos años, Goizueta (2016) observó un crecimiento acelerado de la producción de cerdos puesto que en 2015 el sector porcino creció 9,37% en comparación con 2014.

Asimismo, señala que el consumo per c pita de esta carne se ubicó en 2015 en el récord de 11,33 kg, un 10,65% por encima de los niveles del año anterior. Este crecimiento se mantuvo durante los años 2018-2019 reportándose que el consumo de carne de cerdo per cápita llegó a 14,37 kg. Esto significa un incremento importante al compararlo con los 6 kg que se consumían hace 15 años. Este aumento del consumo está favorecido por el precio de la carne vacuna que hizo modificar la dieta de los argentinos en búsqueda de alternativas más económicas (Culasso, 2019).

En la provincia de La Pampa este nuevo escenario competitivo requiere una adaptación de los productores. La adopción continua de tecnología, la gestión y el asociativismo serán herramientas que permitirán a futuro la sostenibilidad productiva, ante un contexto nacional más complejo y competitivo. Además, achicar la brecha tecnológica entre productores, alcanzar mejores canales de comercialización de la producción y trabajar a nivel organizacional mediante el fomento del asociativismo posibilitarán afrontar la situación actual (Mazzola y col., 2017).

Las demandas a nivel mundial y local, la disponibilidad de alimento que conforman la base de la alimentación, la ausencia de amenazas sanitarias y la mejora en las escalas productivas favorecerían un desarrollo de esta producción, tanto a nivel provincial como a nivel país.

En este contexto económico y productivo, existen numerosas evidencias científicas sobre la pérdida embrionaria porcina, y también son variados los parámetros que utilizan los distintos autores en el análisis de este tema, dado que las pérdidas prenatales limitan la rentabilidad económica en la industria porcina (Freking y col., 2007). En cerdos, la mortalidad

embrionaria temprana sin causa específica, ya sea infecciosa o tóxica, está situada entre un 30 a 40 %, observándose que la mayoría de las pérdidas ocurren antes del día 30 de gestación (Pope, 1994; Yaful, 2009; Bazer y Johnson, 2014; Ka y col., 2018), variando este porcentaje hasta en un 50 – 52 % según otros autores (Bosch y col., 2001). El ambiente prenatal proporcionado por la cerda y la placenta como órgano transitorio son indispensables para el desarrollo de la gestación. De ellos no sólo depende la implantación del *conceptus* y el mantenimiento del mismo, sino que además marca la posibilidad de supervivencia postnatal de las crías (van der Lende y van Rens, 2003).

### **Reproducción Porcina**

El cerdo (*Sus scrofa*) ha sido utilizado extensamente en el desarrollo de las ciencias biomédicas como modelo de investigación en salud humana. Ha permitido estudiar enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y endocrinológicas además de alcoholismo, diabetes, nefropatías y trasplante de órganos entre otras (Stachowiak y col., 2016; Renner y col., 2016; Funke y col., 2019), porque representa las condiciones humanas de acuerdo a las similitudes en la anatomía, genética, sistema cardiovascular y patofisiología (Bazer y Johnson, 2014). En estudios sobre biología reproductiva, la placenta porcina permite desentrañar los mecanismos que subyacen en la fertilidad y el desarrollo en mamíferos. La cerda gestante es un recurso excepcional para estudiar la supervivencia embrionaria/fetal, el crecimiento y desarrollo, la placentación, el intercambio de nutrientes y gases entre el endometrio materno y el *conceptus*, la endocrinología de la preñez, la mamogénesis y lactogénesis. Las investigaciones en medicina reproductiva que utilizan el modelo porcino pueden evaluar, durante un prolongado período de peri-implantación, los cambios específicos en la expresión génica como respuesta a diferentes señales químicas que son aplicables a la

salud reproductiva humana y que modifican la morfología celular, la implantación y las secreciones de diversos nutrientes, así como moléculas de adhesión y del citoesqueleto (Bazer y Johnson, 2014).

Desde el punto de vista reproductivo la cerda es poliéstrica continua, con un ciclo estral de 21 días (18-24) (Fernández y col., 2016). Comienza la pubertad cerca de los 7 meses de edad, tiene una gestación de sólo 114 días y produce una camada que promedia los 9 a 10 lechones (Bazer y Johnson, 2014). La pubertad depende de diversos factores: edad, peso, nutrición, factores genéticos, influencias climáticas, ambiente social, estrés, efecto macho entre otros (Fernández y col., 2016). Si bien el ciclo estral comienza con las manifestaciones del estro en la cerda y la ovulación ocurre en la tercera parte del mismo, desde los procesos hormonales y bioquímicos, se consideran dos fases diferenciadas fisiológicamente, la fase folicular y la fase luteal. En la primera predomina el efecto de los estrógenos (Es) mientras que en la segunda el predominio hormonal es de la progesterona (P4). En las cerdas, el apareamiento ocurre durante el estro en las últimas 24 a 72 horas y la ovulación se produce aproximadamente 44 horas después del inicio del estro (Bazer y Johnson, 2014). Luego de la fertilización, en la región ampular del oviducto, los cigotos diploides comienzan a segmentarse rápidamente. Éste es un período de intensa replicación sin crecimiento celular (Senger, 2012). El tracto reproductivo materno sustenta las demandas del embrión en desarrollo, muchos investigadores sugieren la presencia de una comunicación temprana entre las gametas, embriones y el tracto reproductivo de la hembra antes de la primera señal de reconocimiento materno de la preñez (Bazer y Thatcher, 1977; Ziecik y col., 2017). El *conceptus* (embrión y sus membranas placentarias asociadas) porcino se desplaza desde el oviducto hacia el útero en el estadio de cuatro células, alrededor de 60 a 72 horas después de iniciado el estro (Bazer y

Johnson, 2014). Cuando el embrión llega al estado de mórula (3,5 días), las blastómeras se compactan entre sí estableciendo comunicaciones diferentes entre ellas, que promueven la formación de una cavidad llena de líquido denominada blastocele (Senger, 2012). El *conceptus* se transforma en blastocisto esférico (0,5-1 mm) rodeado por la zona pelúcida, no muestra aumento de tamaño aunque se va expandiendo hacia los días 5 ó 6 por acumulación de líquido. La ubicación de cada célula en relación a esa cavidad influiría en la diferenciación celular. Las células que se localizan en la región central constituyen el macizo celular interno (MCI) y las que se encuentran en la periferia forman el trofoblasto. En la cavidad uterina las células epiteliales trofoblásticas sintetizan enzimas proteolíticas que digieren parte de la zona pelúcida (Senger, 2012). Bazer y Johnson (2014) revisan las numerosas investigaciones que estudian las comunicaciones orquestadas entre el embrión y el endometrio materno, resaltando que la ausencia de factores esenciales para el desarrollo induce fallos y pérdidas embrionarias. El *conceptus* entre el día 6-7 sintetiza y secreta estradiol, que coincide con la expansión de 2 a 6 mm, llegando al día 10 y 11 a sufrir cambios dramáticos en forma y tamaño elongándose rápidamente desde 100 a 800  $\mu$ m hacia el día 16, antes de adherirse al epitelio uterino para iniciar la formación de una placenta epiteliocorial no invasiva (Bazer y Johnson, 2014; Ka y col., 2018).

Si la gestación persiste, el cuerpo lúteo (CL) porcino continúa la secreción de P4 y se mantiene hasta el fin de la gestación (Ziecik y col., 2017; Ka y col., 2018). En la especie porcina, las señales de reconocimiento de la preñez secretadas por el *conceptus* previenen al útero de exhibir efectos luteolíticos sobre el CL (Bazer y Thatcher, 1977; Spencer y Bazer, 2004a; Bazer y Johnson, 2014; Ka y col., 2018). A partir de la hipótesis propuesta por Bazer y Thatcher en 1977 sobre el rol de los estrógenos en el reconocimiento materno de la preñez,

numerosos autores concuerdan que la producción de Es fetales entre los días 10-12 de gestación es crítica para impedir la regresión del CL, al modificar la secreción de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) hacia el lumen uterino, permitir la implantación de los *conceptuses* y constituir la primera comunicación entre el *conceptus* y el endometrio materno para el establecimiento de la gestación porcina (Ziecik, 2002; Spencer y Bazer, 2004a; Franczak y Kotwica, 2008; Krzymowski y Stefanczyk-Krzybowska, 2008, Bazer y Johnson, 2014; Ziecik y col., 2017). Por otro lado, nuevos desarrollos tecnológicos permitieron a Whyte y col. (2018) establecer el rol esencial de la liberación de interleuquina 1 beta 2 (IL1 $\beta$ ) para la rápida elongación del *conceptus* porcino y a Meyer y col. (2019) demostrar que la producción de Es fetales por parte de los *conceptuses* no es esencial en el estadio de peri-implantación para la elongación del *conceptus* y mantenimiento del CL, pero sí es vital para el mantenimiento de la preñez más allá del día 30 de gestación. En estudios previos, Bazer y Johnson (2014) observaron que la secreción de IL1 $\beta$  por el trofoblasto porcino está temporalmente asociada con la elongación y el inicio de la secreción de Es por parte del blastocisto y con la modulación de la interacción entre el *conceptus* y el útero de una manera autócrina o parácrina.

Hay un considerable conocimiento de la regulación hormonal y la localización y expresión de genes en el útero y el *conceptus* durante el periodo de peri-implantación en los cerdos (Bazer y Johnson, 2014; Franczak y col., 2017; Ka y col., 2018; Zglejc-Waszak y col., 2019). En un medio ambiente dominado por la P4, el establecimiento de la preñez requiere: secreción de Es del *conceptus*, secreción de histotrofo a partir del epitelio luminal y glandular uterino para sostener la adhesión, el desarrollo y el crecimiento del *conceptus* y, remodelación de la interfase epitelial uterina y trofoblástica durante la implantación (Bazer y Johnson, 2014; Ka y col., 2018). Estos eventos complejos se establecen a través de redes de señalización que son

producidas por señales moleculares endócrinas, parácrinas y autócrinas que permiten la comunicación entre el *conceptus*, el endometrio de la hembra gestante (Wojciechowicz y col., 2016; Franczak y col., 2017; Zglejc-Waszak y col., 2019) y el miometrio (Wojciechowicz y col., 2016). Entre otras moléculas, la IL1 $\beta$ , el Interferón gamma (IFNG) y el Interferón delta (IFND) (Ka y col., 2018), el factor de crecimiento transformante beta (TGFB) y el factor de crecimiento fibroblástico 7 (FGF7), son señales activas cuya expresión está regulada por las hormonas de la gestación y regulan la expresión de otros genes en el trofoblasto y/o el epitelio o estroma uterino (Bazer y Johnson, 2014).

La implantación es el proceso por el cual el blastocisto se adhiere al útero y conduce al establecimiento de una placenta funcional y a una preñez exitosa. Durante el período de peri-implantación, el epitelio uterino y el trofoblasto del *conceptus* desarrollan competencia para adherirse (Bazer y Johnson, 2014). Entre los 15 a 17 días de gestación (dg) las moléculas de adhesión remodelan la morfología del endometrio y del trofoblasto a través del desarrollo de microvellosidades que permiten la implantación (Williamson, 2011). Numerosos autores han investigado la relación entre las moléculas de adhesión (Vélez, 2017; Ka y col., 2018), la polimerización de los microtúbulos de las células epiteliales uterinas y las señalizaciones que participan en la implantación (Wetendorf y DeMayo, 2012; Shukla y col., 2019). El proceso de placentación incluye el establecimiento de una red de vascularización endometrial que se vuelve distendida y más densa.

Diferentes estudios reportan que las mayores pérdidas embrionarias se producen en los primeros 28 días de la gestación (Pope, 1994; Yaful, 2009; Bazer y Johnson, 2014; Ka y col., 2018), donde el “*fit*” entre los epitelios trofoblástico y uterino debe estar sincronizado para evitar esas pérdidas. Estas células orquestan interacciones bidireccionales espacio -

temporales reguladas en forma endócrina, parácrina y autócrina modulando las interacciones entre ellas y la matriz extracelular. Las respuestas del endometrio son complejas, además de la remodelación de las células epiteliales uterinas luminales y glandulares, secreta histotrofo para nutrir y promover el desarrollo del *conceptus*. El estroma uterino se transforma para controlar el movimiento del *conceptus* a través de la pared uterina durante la implantación, mientras se genera un ambiente rico en citoquinas que directamente promueven la angiogénesis para asegurar suficiente flujo de sangre a la placenta para la nutrición hemotrófica y el desarrollo fetal. Los cambios funcionales en el útero son disminución del glucocalix apical, la remodelación del citoesqueleto del epitelio uterino y la pérdida de polaridad (Bazer y Johnson, 2014).

Las interacciones entre la superficie apical de las células epiteliales uterinas y el trofoblasto comienzan con: pre contacto no adhesivo, aposición y adhesión y concluye con la formación de una verdadera placenta epiteliocorial que sostiene el desarrollo fetal a través de la gestación (Bazer y Johnson, 2014).

La placenta porcina desde el punto de vista anatómico e histológico es epiteliocorial, difusa, adecidua, plegada y no invasiva (Amoroso, 1952; Perry, 1981). Es un órgano transitorio que provee una interfase para el intercambio metabólico de gases, micronutrientes (aminoácidos, glucosa) y macromoléculas (proteínas), así como la producción de hormonas, citoquinas (Vélez, 2017) y otras moléculas responsables del mantenimiento de la preñez; de la estimulación del desarrollo de las glándulas mamarias (Spencer y Bazer, 2004b) y la promoción del crecimiento fetal (Senger, 2012; Bazer y Johnson, 2014). El trofoblasto porcino se adhiere directamente al epitelio luminal uterino. La intensa remodelación para formar crestas coriónicas y sus correspondientes invaginaciones endometriales resulta en

plegamientos que incrementan el área de intercambio. Hay una progresiva interdigitación de las vellosidades (Cristofolini, 2010, Vélez, 2017) sobre el trofoblasto y el epitelio uterino que cubre la totalidad de la placenta a excepción de las aperturas de las glándulas uterinas donde el trofoblasto forma un bolsillo llamado aréola por donde las secreciones de las glándulas superficiales y profundas son absorbidas y transportadas a través de la placenta por pinocitosis para liberarse en la circulación fetal (Bazer y Johnson, 2014).

En el estadio de adhesión, el blastocisto inicia la gastrulación, el embrión consta de tres capas germinales discernibles que se transformarán en los primordios de órganos embrionarios hacia el 18 a 20 dg (Sinkora y Butler, 2009). A los 28 – 30 dg comienza la osificación y el desarrollo del sistema inmunológico, a los 30 dg se detectan las primeras células CD3+, según Sinkora y Butler (2009). En este estadio de la gestación, Vélez (2017) halló IL1 $\beta$  en la interfase placentaria porcina, dado su rol proinflamatorio estaría participando como citoquina reguladora de las moléculas de adhesión, integrina  $\alpha\beta$ 3 y fibronectina. A la organogénesis principal finaliza el día 35 de gestación con el hígado fetal como constituyente mayoritario de los tejidos embrionarios. Aunque el sistema linfático está fisiológicamente formado al final de la organogénesis, los elementos linfoides y linfocitos son poco frecuentes en los diferentes órganos hasta que la médula ósea comienza su actividad hematopoyética hacia el día 40 de gestación. Según Sinkora y Butler (2009) el período fetal comienza a partir del día 36 y puede ser dividido en dos fases de crecimiento, la primera desde el 36 al 55 dg donde el crecimiento es alométrico y la segunda fase del día 55 hasta el nacimiento en la cual el crecimiento es isométrico. A los 70 dg se alcanza el mayor crecimiento placentario y se terminan de formar las vellosidades secundarias y terciarias de la interfase feto-materna (Cristofolini, 2010). Además, a los 70 dg las placentas inician un estado de meseta en su desarrollo y los fetos comienzan a crecer de manera exponencial. En este período también se

observa la mayor remodelación placentaria celular determinada por estudios de apoptosis por Cristofolini (2010). Por otra parte, Vélez (2017) halló una elevación de la IL1 $\beta$  en placenta fetal a los 60 dg y en placenta materna a los 70 dg sugiriendo que se necesitaría un ambiente proinflamatorio para regular la apoptosis y la proliferación celular en la interfase feto-materna.

Al término de la gestación, la maduración del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal conduce a un incremento en la secreción de cortisol fetal, inducción de la secreción de Es, oxitocina, relaxina y prolactina y sus respectivos receptores que son requeridos para la liberación de la camada y el inicio de la lactación (Bazer y Johnson, 2014). Además, numerosos autores (revisado por Vélez, 2017) determinaron un aumento de citoquinas proinflamatorias que favorecerían la activación de macrófagos, neutrófilos y células Natural killer (NK). Estas citoquinas producirían un aumento de prostaglandinas que facilitarían las contracciones uterinas. Vélez (2017) observó un aumento de IL1 $\beta$  en suero que promovería un ambiente útero-placentario proinflamatorio al final de la gestación.

### **Hormonas esteroideas**

El concepto moderno que establece que las hormonas regulan el crecimiento y la diferenciación celular ya fue enunciado hace más de un siglo por Ernest Starling cuando acuñó el término “hormona” para indicar a los mensajeros químicos que pueden coordinar las actividades y crecimiento de diferentes partes del cuerpo. Desde los comienzos hubo una intensa investigación para conocer la naturaleza química y las acciones de las hormonas (Starling, 1905; Tata, 2005).

En respuesta a la acción de las principales hormonas esteroides secretadas por el ovario, Es y P4, se produce una serie de modificaciones en el endometrio y el miometrio de la cerda

gestante que permite la implantación de los embriones (Hafez y Hafez, 2003; Renthal y col., 2015; Morales-Lázaro y col., 2019). La acción principal de dichas hormonas sobre el útero gestante de los mamíferos es la proliferación y diferenciación de las células endometriales (Rider y col.; 1998; Squires, 2006; Senger, 2012). Además, el mantenimiento de la preñez requiere de interacciones recíprocas entre el *conceptus* y el endometrio. En los cerdos, el ambiente uterino está influenciado por eventos que se superponen inducidos por la secreción de Es por el *conceptus* y la exposición del epitelio uterino a la P4, la hormona de la gestación. Estas dos hormonas y los genes que ellas regulan orquestan los cambios en el desarrollo en el útero que son apropiados para una implantación exitosa y la placentación. Numerosos trabajos apoyan la hipótesis que las hormonas placentarias actúan directamente sobre el endometrio uterino regulando la diferenciación y función de las células uterinas (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004; Sukjumlong y col., 2005; Sukjumlong y col, 2009; Steinhauer y col., 2017). La placenta produce una variedad de hormonas, tanto proteicas como esteroides, que actúan de manera parácrina sobre el endometrio para promover cambios en la expresión de los genes que soportan el crecimiento y el desarrollo del *conceptus* (Spencer y Bazer, 2004b; Wojciechowiec y col., 2016; Ka y col., 2018).

Los estrógenos desempeñan un rol imprescindible 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. Además, intervienen en el transporte del embrión hacia los cuernos uterinos, en la migración y en el espaciamiento equidistante en el interior de los cuernos uterinos antes de la elongación rápida y adhesión a la superficie endometrial (Meyer y col., 2019). Pueden influir en la descarga de histamina por el endometrio que llevaría a un

aumento del flujo sanguíneo del miometrio y un consecuente aumento de la contractibilidad de las células musculares (Pope y col, 1982).

En cerdos, los mayores factores que afectan el flujo sanguíneo en los vasos que irrigan al útero son los estrógenos y la progesterona, particularmente la relación Es/P4 y la presencia de citoquinas, que interactúan para regular la función secretoria del endometrio (Krzymowski y Stefanczyk-Krzymowska, 2004).

Otras investigaciones detectaron valores altos de Es séricos a los 5 dg contrastándolos con las concentraciones halladas en cerdas cíclicas, tanto en fase folicular como luteal y hallaron actividad esteroideogénica en el endometrio uterino desde los 5 días post-fertilización (Yaful, 2009; Geisert y col., 2017) considerando una producción y liberación de Es bifásica por el *conceptus* porcino hacia el lumen uterino durante el período de establecimiento de la preñez y la placentación. Un primer incremento ocurre durante el período de elongación rápida en los días 11 a 12 de gestación y un segundo incremento sostenido durante la adhesión y el desarrollo de la placenta desde el día 15 al 25 de gestación. Los resultados de esas investigaciones que coinciden con las de Spencer y Bazer (2004a) indican que los Es son necesarios para prolongar la secreción de PGF2 $\alpha$ , molécula luteolítica, hacia el lumen uterino (Zeicik y col., 2017). En tanto, Franczak y Kotwica (2008) demostraron que el endometrio y miometrio porcino producen estradiol en cultivo y que el endometrio produce más estradiol que el miometrio durante la preñez temprana, y ambos pueden incrementar su producción *in vitro* si se proporciona P4 al medio de cultivo.

En la gestación temprana se determinaron altas concentraciones de Es en el componente placentario materno (Franczak y Kotwica, 2008), cuya diferencia es significativa cuando se contrastan con las concentraciones de los extractos placentarios fetales (Yaful, 2009). El primer reporte de la capacidad del blastocisto porcino de sintetizar y liberar Es durante el

período de mantenimiento del CL y establecimiento de la preñez data del año 1973, esta investigación fue verificada por numerosos estudios que demostraron la capacidad de sintetizar estrógenos durante el período de elongación del trofoblasto (Bazer y Johnson, 2014, Ziecik y col., 2017; Meyer y col. 2019)

Durante la gestación temprana, los Es placentarios actúan sobre el epitelio endometrial incrementando la expresión de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento semejante a la insulina I (IGF-I), el FGF-7 (Bazer y Johnson, 2014) y la osteopontina (Spencer y Bazer, 2004a). Estos factores estimulan la actividad mitótica del trofoectodermo (Wilson y Ford, 2000) y permiten el desarrollo del *conceptus* mediante acciones parácrinas y autócrinas (Persson y col, 1997; Spencer y Bazer, 2004a). Flöter y col. (2019) observaron en el período de peri-implantación una vulnerabilidad a la exposición de estrógenos en dosis creciente sobre la expresión génica del endometrio.

Yaful (2009) detectó aumento de P4 en suero a los 15-20 dg, durante el período de implantación. Mientras que Knight y Kukoly (1990) observaron que la concentración de P4 placentaria en cultivos *in vitro* aumenta linealmente entre los 25 y los 40 días, pero estos autores no especifican el componente placentario fetal o materno que la sintetiza. En contraste, Yaful y col. (2005) determinaron en los extractos placentarios fetales, en el período de post-implantación, altas concentraciones de P4, y sugirieron que la placenta fetal es una fuente alternativa de producción de P4 durante la preñez porcina.

Yaful (2009) sugiere, además de la regulación sistémica promovida por la P4 y los Es una regulación parácrina por parte de estas dos hormonas sobre las glándulas uterinas, ya que encontraron variaciones significativas en las concentraciones placentarias fetales y maternas;

por lo que postularon que dicha acción local se debería principalmente al componente de origen fetal debido a su marcada actividad de esteroideogénesis.

### **Receptores de hormonas esteroideas**

Aunque conocemos mucho acerca de los detalles de la maquinaria transcripcional sería imposible saber cómo las hormonas regulan la expresión sin conocer sus receptores. Los receptores de las hormonas han sido comúnmente clasificados en dos principales grupos: los receptores de membrana y los receptores nucleares. La primera evidencia de la existencia de los receptores nucleares llegó en 1961 cuando un equipo de investigadores marcaron radiactivamente a estradiol en tejidos sexuales femeninos y hallaron que formaba un complejo en el núcleo con una proteína que cumplía los criterios para ser un receptor (Tata, 2005).

Los receptores son proteínas específicas que pueden ubicarse en el citoplasma o el núcleo generando respuestas clásicas o genómicas que se inducen por la unión de la hormona esteroidea con receptores nucleares. La interacción hormona-receptor produce un cambio conformacional, la dimerización del receptor y posterior translocación al núcleo. El complejo molecular formado actúa como factor de transcripción inducido por ligando para activar o reprimir genes claves (Attar, 2000; Tata, 2005), involucrados en muchos aspectos de la fisiología y patología de los mamíferos. Sirven como sensores de estímulos, maestros reguladores de eventos moleculares que gobiernan complejas redes genéticas regulatorias (Zhao y col., 2019).

Los efectos de los receptores nucleares en la transcripción están mediados por reclutamiento de moléculas reguladoras, que pueden ser blanco de otras modificaciones tales como metilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación o fosforilación y pueden regular su actividad, niveles y localización.

También los receptores pueden estar ubicados en la membrana celular y promueven respuestas no clásicas o genómicas a través de señalizaciones rápidas. Por medio de estos mecanismos “no genómicos” las hormonas esteroideas pueden incrementar el calcio intracelular o activar las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) o la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) para provocar efectos celulares.

Por lo tanto, las hormonas esteroideas y sus receptores están involucradas en eventos sucesivos como la elongación del *conceptus*, la implantación y la placentación a través de un diálogo molecular espacio - temporal específico y promueven la remodelación del endometrio y el trofoblasto.

### **Receptor de Estrógenos**

El primer receptor que ligaba estrógenos (RE), en células de útero de rata, fue caracterizado en 1966 por un grupo de investigadores que describieron al receptor como una proteína de 66 kDA localizada en el núcleo y de gran especificidad (Miller y col. 2017). En el año 1986 dos grupos de investigación publicaron los primeros datos que identificaban al RE, su secuencia y analizaban su estructura. Más tarde, Kuiper y col. (1996) identificaron el segundo receptor de estrógenos y fue designado como RE $\beta$ . Investigaciones recientes han mostrado que RE $\alpha$  existe como una de tres isoformas distinguibles de acuerdo a su PM. Sin embargo, los eventos de señalización asociados con cada uno de esos receptores, así como las interacciones entre ellos y el rol de cada uno en la proliferación celular permanecen confusos.

Los estrógenos ejercen sus efectos mediante la unión a RE. Éstos fueron aislados de órganos como gónadas, útero, pulmón, riñón y glándula adrenal en fetos y embriones obtenidos en diferentes estadios gestacionales (Knapczyk y col., 2008).

Los RE son proteínas que actúan como factor de transcripción activados por ligando. Pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que incluye miembros de los receptores de esteroides. La estructura funcional es similar al del receptor de progesterona (RP) con una secuencia de homología en el dominio de ligamiento al ADN.

Los receptores nucleares para estrógenos RE $\alpha$  and RE $\beta$  corresponden a proteínas sintetizadas a partir de genes diferentes. Reconocen ligandos similares y se caracterizan por tener diferentes actividades funcionales (Koehler y col., 2005).

En fase folicular, los Es actúan en el útero a través de interacciones con sus respectivos RE intracelulares, inducen la síntesis de su propio receptor así como del RP en diferentes especies; en contraste, durante la fase lútea, P4 regula negativamente los niveles de RE y RP (Bazer y col., 2010).

El RE $\alpha$  e presente en el epitelio uterino y glandular entre el día 12 y 15 del ciclo estral y de la preñez en el cerdo (Bazer y Johnson, 2014, Ka y col. 2018). La expresión del ARNm endometrial es más alta en el día 10, declina para el día 15 y luego se incrementa en el día 18 del ciclo estral y de la preñez. Sin embargo, en las cerdas gestantes el RE $\alpha$  permanece suprimido después del día 18 dg. La proteína se localiza en epitelio luminal y glandular, y en el estroma durante el estro. Es detectable en epitelio luminal y glandular a los 5 y 15 días del ciclo estral y de la preñez, mientras en el estroma decrece marcadamente (Ka y col., 2018).

Los Es secretados por los *conceptuses* porcinos se ligan al RE $\alpha$  el cual incrementa la expresión de FGF7 en epitelio uterino, pero esto ocurre solo después de que la P4 desregula la expresión de sus receptores en epitelio uterino y elimina un bloqueo para la expresión de genes inducidos por Es (Bazer y Johnson, 2014). El FGF7 estimula la proliferación, diferenciación, migración y angiogénesis. La regulación hormonal de la expresión de FGF7

refleja la complejidad de las interacciones entre las hormonas sexuales esteroideas y sus receptores en el ambiente uterino de los cerdos y otras especies (Bazer y Johnson, 2014). Bazer y col. (2018) descubrieron que FGF7 es una estramedina en preñez temprana expresada por el epitelio luminal uterino, durante la peri-implantación y cuyo receptor expresado por el trofoectodermo promueve la adhesión del *conceptus*.

El RE $\beta$ , es un subtipo de REs que se diferencia fundamentalmente del RE $\alpha$  en el dominio de transactivación AF1, en el extremo amino terminal de la proteína receptora. La activación completa del RE requiere que los coactivadores se ligan simultáneamente a los dos dominios de transactivación. En contraste a estos datos, ER $\beta$  parece poseer una débil actividad transcripcional AF1 y un dominio AF2 totalmente funcional. Se considera un receptor no funcional, con efectos antiproliferativos y que promueve la diferenciación celular en presencia del ligando (Koehler y col., 2005).

El RE $\beta$  se expresa en epitelio luminal y glandular en el endometrio durante el ciclo estral y la preñez, y en el trofoectodermo del *conceptus* sobre el día 12 de gestación, pero la función y la regulación no está completamente dilucidada en cerdos (Ka y col., 2018).

### **Receptor de Progesterona**

La progesterona participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos en los mamíferos. La P4 ejerce sus efectos sobre el tejido blanco primariamente vía el receptor nuclear de la progesterona (RP) (Tranguch y col., 2006; Durlej y col., 2010). El RP es una proteína de 946 aminoácidos que actúa como un factor de transcripción activado por ligando. Pertenece a la superfamilia de receptores nucleares que incluye miembros de los receptores de esteroides. La estructura funcional es similar al del receptor de estrógenos (RE) con una secuencia de homología en el dominio del ligamiento al ADN. La respuesta biológica a la P4 está mediada

por dos isoformas del RP denominadas RPA y RPB. Las isoformas RPA y RPB son transcritos a partir de dos promotores diferentes de un mismo gen que son inducidos por los estrógenos, los cuales poseen efectos fisiológicos diferentes (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004; Durlej y col., 2010). La isoforma A carece de 164 aminoácidos contenidos en el extremo N-terminal de la isoforma B (Wetendorf y col., 2017). Mulac-Jericevic y Conneely (2004), utilizando al ratón como modelo, lograron diferenciar los efectos de los dos tipos de receptores, encontrando que la expresión de RPB permite una normal ovulación e implantación, mientras que RPA disminuye severamente la ovulación, perjudica la implantación y la decidualización, produciendo infertilidad.

En tejidos humanos, RPA y RPB son co-expresados en forma equivalente. La expresión de una isoforma predomina en determinados tejidos y circunstancias. El RPA es la mayor isoforma localizada en el estroma uterino y RPB es la isoforma predominante en las glándulas endometriales. La mama normal humana puede expresar ambas isoformas del receptor de progesterona. En la mayoría de las líneas celulares, el RPA funciona como un represor de la transcripción, mientras que la función de RPB es activar la transcripción de los mismos genes (Guerra Araiza y Camacho Arroyo, 2000). También RPA funciona como represor de la actividad de los RE (Giangrande y McDonnell, 1999).

El crecimiento del *conceptus* y su implantación no sólo está regulado por la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo sino también por la expresión de receptores de progesterona en el epitelio y el estroma uterino (Geisert y col., 2006). Las respuestas morfológicas y fisiológicas de la P4 están mediadas por la interacción con receptores hormonales específicos. Sukjumlong y col. (2005) demostraron que los RP pueden ser inducidos tanto por los estrógenos como por la progesterona. La presencia de RE se requiere para la síntesis de los

RP en la célula. El promotor génico para la síntesis de RP es inducido por estrógenos (Giangrande y McDonnell, 1999).

La expresión del RP en estos compartimentos celulares está bajo control endócrino y temporal. Coordina la comunicación entre las células del estroma y del epitelio endometrial, lo cual es crítico para el desarrollo y la función. Algunos estudios mencionan que los RP no se detectan en el epitelio luminal entre los días 12 a 18 de gestación (Okulicz y col., 1998) ni al día 6 durante el período de blastocisto (Ying y col., 2000). Sin embargo, la expresión de los RP fue detectada por PCR en la fase de filamento (Kowalski y col., 2000). Además, según otras investigaciones los RP también se localizan por inmunohistoquímica en el núcleo de todos los tipos celulares del útero durante las diferentes fases del ciclo estral (Ka y col., 2018) y la gestación temprana (Sukjumlong y col., 2005; Ka y col., 2018). También en placenta materna en muestras de períodos gestacionales tempranos se observó marcación en el epitelio y en glándulas uterinas (Yaful, 2009).

Por otro lado, otros autores proponen que el crecimiento del *conceptus* y la implantación uterina están temporalmente asociados con la desaparición de los RP en el epitelio uterino (Geisert y col., 2006; Spencer y Bazer, 2004a). La progesterona inhibiría la expresión de sus receptores mediante la activación del factor nuclear kappa B (NF-kB). Aunque los estudios *in vivo* demostraron la importancia de la expresión del RP en el estroma, no pudieron demostrar su rol en la función uterina en el epitelio luminal (Wetendorf y col., 2017). En ovejas, la concentración de P4 regula negativamente la expresión de los RP en el endometrio luminal y en el epitelio de la superficie glandular (Spencer y col., 2004). Yaful (2009) halló aumentada la expresión de los RP en las glándulas uterinas endometriales durante el período de 23 a 49 días de preñez acompañándose de bajas concentraciones de P4 en los extractos placentarios maternos. Mientras que para Geisert y col. (2006), al igual que para Okulicz y col. (1998) y

Ka y col. (2018) la implantación de los embriones se asocia con una desaparición temporaria de los RP del epitelio uterino, indicando que la pérdida del RP en las células epiteliales uterinas es un pre-requisito para la receptividad uterina a la implantación, la expresión génica por el epitelio luminal y el transporte de moléculas para el *conceptus* en desarrollo.

Kowalski y col. (2000) y Sukjumlong y col. (2005), detectan dichos RP en la fase de la gestación temprana en coincidencia con los resultados hallados por Yaful (2009); donde si bien la expresión de los RP fue marcada a los 15 y 40 días de preñez, también se detectó disminución de su expresión en el epitelio uterino a los 35 días.

El RP se localiza en el miometrio a través de todos los días del ciclo estral y de la preñez (Ka y col., 2018).

En todos los mamíferos las hormonas esteroideas y sus receptores son indispensables para habilitar los cambios que se producen en el útero durante el ciclo estral y en la preñez. Los efectos de las hormonas y sus receptores deben ser comprendidos en el contexto de cambios temporales y espaciales, que producen factores parácrinos que regulan las funciones de proliferación y/o diferenciación del epitelio endometrial.

Por lo tanto, comprender los mecanismos que posibilitan la preñez permitirá originar estrategias que incrementen la tasa de sobrevivencia embrionaria, en esta especie de alto valor productivo.

## **Objetivo General**

Determinar la presencia de los receptores para estrógenos y progesterona en tejidos placentarios fetales y maternos, y estudiar la relación entre dichos receptores y la concentración sérica y tisular de las hormonas esteroides mencionadas que participan en la gestación.

## **Objetivos Específicos**

1. Determinar por inmunohistoquímica la localización de los receptores de estrógenos y progesterona en el tejido placentario fetal y materno, y en el útero no gestante de hembras porcinas.
2. Establecer las concentraciones de estrógenos y progesterona en suero y en homogenatos de extractos placentarios maternos (HoPM), fetales (HoPF) y útero no gestante (HoU).

## **Hipótesis**

La presencia y localización de los receptores de estrógenos y progesterona en tejidos placentarios fetales y maternos, se relacionan con la concentración sérica y tisular de estrógenos y progesterona, permitiendo una preñez exitosa en las hembras porcinas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron 24 tractos reproductivos de cerdas destinadas a faena, entre segundo y tercer parto, cruza (Landrace x Large White) con períodos gestacionales comprendidos entre los 5 y 72 días de gestación (dg) y 8 úteros de cerdas no gestantes (NG), 4 en fase folicular (NGFF) y 4 en fase luteal (NGFL). Los tractos se obtuvieron de frigoríficos de la zona de General Pico, provincia de La Pampa, Argentina (35° 45' y 63° 50' de latitud y longitud, respectivamente). Todos los animales se encontraban en buen estado de salud con plan sanitario completo. La sanidad de los animales fue acreditada mediante evaluación de su historia clínica a través de una entrevista con el productor. Además, se les realizó un examen *post-mortem*, análisis clínicos, parasitológicos y bacteriológicos, declarándolos en buen estado de salud, libres de enfermedades diagnosticables.

### **Tractos Reproductivos**

Los tractos reproductivos gestantes (n=16) se obtuvieron de cerdas que se encontraban en diferentes períodos gestacionales: 5 dg (n=4), 15-20 dg (n=4), 30-35 dg (n=4) y 63-78 dg (n=4). Se determinó la edad gestacional de acuerdo al promedio de la longitud céfalo-caudal de los embriones/fetos obtenidos de cada cerda según la tabla desarrollada por Marrable (1971), utilizando un calibrador y regla manual.

Las muestras se agruparon en cuatro períodos según etapas relacionadas al desarrollo de la gestación porcina: 5 dg; 15-20 dg (en adelante 17 dg); 30-35 dg (en adelante 30 dg); 63-78 dg (en adelante 70 dg).

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

En las cerdas gestantes (G) de 5 dg los embriones fertilizados se recuperaron y procesaron según lo descrito previamente por Soede y col. (1995) con solución salina tamponada (PBS) de los cuernos y se contaron a través de una lupa Stemi 2000-CS, Carl Zeiss (Göttingen, Alemania). Las muestras se tomaron de porciones de endometrio a una distancia de la bifurcación de los cuernos uterinos de  $7 \pm 2$  cm.

En cerdas de 17 dg, al no poderse identificar los embriones por palpación, los cuernos uterinos se seccionaron por su curvatura mayor para visualizar la posición de los filamentos/embriones. En esta fase de gestación se tomó muestras de placenta materna y de los filamentos/embriones.

En las cerdas de 30 y 70 dg se realizó la palpación de los cuernos uterinos para detectar la ubicación de los fetos. Luego los cuernos uterinos se incidieron por la curvatura mayor para observar el sitio de implantación y recoger las muestras de tejido placentario. Primero se obtuvieron muestras de la interfase feto-materna, luego se separó fácilmente la placenta fetal de la materna, dado el tipo de placenta no invasiva, para obtener muestras de cada estructura por separado. Cada placenta fetal fue extraída y colocada en la mesada; se analizó su estructura anatómica, se la pesó, se midió su longitud y se procedió a la extracción de muestras tisulares de la porción embrionaria. La placenta materna se analizó macroscópicamente confirmando su estructura normal y se tomaron muestras de la porción central de cada unidad feto-materna.

A las muestras de interfase feto-materna (IFM) se les realizó tratamiento histológico para la determinación de receptores de estrógenos y progesterona mediante inmunohistoquímica. Con respecto a las muestras de placenta fetal y de placenta materna se procedió a realizar extractos placentarios porcinos: Homogenatos de Placenta Materna (HoPM) y Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF) para la determinación de los niveles de Es y P4 durante la gestación.

Los úteros de cerdas NG en fase folicular (NGFF) y en fase luteal (NGFL), fueron utilizados como control. Las muestras se extrajeron de la curvatura mayor tanto del cuerno izquierdo como del cuerno derecho. Se realizó la toma de muestra en forma pareada para la confección de preparados para microscopía óptica y homogenatos de útero porcino (HoUP) para la determinación de las hormonas esteroideas Es y P4.

### **Extracción de sangre**

Luego de extraída la sangre, por corte de la vena yugular de las cerdas G y NG, se la mantuvo en baño termostático a 37°C hasta lograr la adecuada retracción del coágulo y el exudado del suero. Una vez trasvasado el mismo, a fin de clarificar el suero, se lo centrifugó a 1800 rpm (500 g) durante 10 minutos. Se fraccionó el suero en alícuotas, se rotuló y conservó a –20°C hasta su uso.

### **Obtención de homogenatos de placenta materna (HoPM), homogenatos de placenta fetal (HoPF) y de útero no gestante porcino (HoUP)**

Los extractos placentarios se obtuvieron de la siguiente manera: se extrajeron del tracto reproductivo muestras de aproximadamente 5 g de tejido placentario porcino materno y de 5 g de placenta fetal, y se trituró y maceró por separado cada tejido, con tres partes de solución fisiológica a fin de obtener una masa homogénea. Luego se centrifugó el tejido homogeneizado a 1800 rpm (500 g) por 10 minutos por 2 veces consecutivas, y el

sobrenadante se alicuotó y conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Con este procedimiento se realizaron los HoPM y los HoPF (Koncurat y col., 1999).

Los extractos de útero no gestante (HoUP), se extrajeron de cada cuerno uterino, en la zona de la curvatura mayor, una muestra de 5 g de tejido. Luego, dichas muestras extraídas fueron procesadas con la misma técnica previamente descripta.

### **Determinación de hormonas esteroideas en sueros y extractos placentarios**

La determinación de Es y P4 en suero, HoPM, HoPF y HoUP, se realizó por Inmunoensayo Enzimático Quimioluminiscente (Broes y LeBlanc, 2014) en fase sólida en un equipo DPC (*Diagnostic Product Corporation*, Los Angeles, CA).

Cada unidad de análisis de la hormona respectiva, contiene una bola recubierta de anticuerpos policlonales de conejo anti-hormona. El anticuerpo anti-hormona se encuentra unido a una perla de poliestireno y encerrado en una copa de reacción denominada *Immulatest Unit*<sup>®</sup>. La muestra compete en la *Test Unit*<sup>®</sup> con hormonas marcadas con un “ligando” durante 30 minutos. El material no unido se descarta por lavado centrífugo. En una segunda etapa se agrega un anticuerpo “anti-ligando” marcado con la enzima fosfatasa alcalina. La *TestUnit*<sup>®</sup> se incuba por otros 30 minutos y el material no unido nuevamente se descarta por lavado centrifugado. Posteriormente, se agrega un sustrato (éster fosfato de adamantyl dioetano) cuya hidrólisis generará un compuesto quimioluminiscente (emisión de luz) el que se lee en un fotomultiplicador incorporado en el equipo. Esta técnica consiste en un sistema que automáticamente maneja muestras, reactivos, incubaciones, separación, medición y cálculo de concentraciones y posteriormente los cálculos se realizan automáticamente en una curva maestra que se recalibra antes de usar.

Todas aquellas muestras en las que se obtuvieron concentraciones que estaban por encima del intervalo de calibración del ensayo se diluyeron. El factor de corrección de dicha dilución se realizó manualmente.

### **Análisis microscópico de la estructura de la placenta y útero**

Se realizaron cortes histológicos para microscopía óptica. Se extrajeron muestras de 1 cm<sup>2</sup> de tejido placentario, tanto materno como fetal y se las fijó en formol tamponado con fosfato al 10% (Luna, 1968) durante 12 a 24 hs. Luego las muestras fueron lavadas con agua de grifo, durante una a dos horas (Celani y col., 1984) y fueron deshidratadas de la siguiente manera: se las colocó en alcohol 70° por 10 horas; a continuación en alcohol 96° (Bialcohol®, Argentina) por 4 horas, nuevamente en alcohol 96° 4 horas, luego se las colocó en alcohol 100° dos horas por dos veces, a continuación se colocaron en Benzoato de bencilo durante toda la noche, finalmente se las sumergió en xilol (Dorwil®, Argentina) una hora por dos veces. Seguidamente las muestras se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de cada muestra con un espesor de aproximadamente 5 µm, montando dos o tres cortes en cada portaobjetos positivado (Genex, USA); previamente al montaje se colocaron los cortes en un baño termostatzado a 40°C con agua. Seguidamente se colorearon con Hematoxilina-Eosina (Luna, 1968), un preparado de cada placenta de cada período de gestación analizado y de útero NG. Las muestras fueron observadas con un microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) y la adquisición de imágenes se realizó con una cámara Canon, PowerShot G20, de 7.1 megapíxeles (Canon, Tokio Japón).

## **Determinación de receptores de hormonas esteroideas en tejidos placentarios y endometrio porcino**

Se determinó la expresión de receptores de estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ : RE $\alpha$  y RE $\beta$ ) y de progesterona (isoformas A y B: RPA y RPB) por inmunohistoquímica y sobre los resultados obtenidos se realizó la cuantificación de imágenes para la determinación del porcentaje de área inmunomarcada (%AIM).

### **Inmunohistoquímica**

Debido a la escasa disponibilidad de anticuerpos anti-receptores hormonales específicos para porcinos, se trabajó con anticuerpos que reaccionan con la especie humana, porcina y murina, ya utilizados por Durlej y col. (2010), Jankowski y col. (2001) y Tang y col. (2018). Sobre los cortes histológicos de cada período de gestación se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta LSAB (Labeled Streptavidin Biotin Method).

### **Receptor de Estrógenos**

#### *Determinación de Receptor de Estrógeno $\alpha$*

La desparafinación de los cortes se realizó mediante 3 baños con xilol (Dorwil®, Argentina) durante 10 min cada baño y luego se sumergió los cortes en una batería de alcoholes con graduación decreciente (alcohol 100°, dos baños de 5 min cada uno; alcohol 96°, dos baños de 5 min cada uno y alcohol 70°, un baño de 5 min). Luego de desparafinar los cortes se lavó el tejido con solución salina tamponada (PBS) sumergiendo los cortes dos veces durante 10 min, se agregó peróxido de hidrógeno al 5% en PBS (para bloquear la peroxidasa endógena) durante 20 min y se lavó con PBS (dos baños de 5 min cada uno, en adelante: 2x5). Se realizó tratamiento de recuperación antigénica, con este fin se utilizó un microondas de uso

doméstico, en el que se sometió los cortes, en baño térmico con buffer citrato 0.01 M, pH 6.0 (Durlej y col., 2010) por 3 min a 100% de potencia y 9 min al 50% de potencia; posteriormente las muestras se dejaron enfriar 20 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS (2x5). Se colocó bloqueante de biotina endógena (Avidin-biotin-blocking-reagents, Cell Marque, USA): primero se incubó por 10 min con avidina y luego de un baño de 5 min con PBS se incubó por 10 min con biotina. Se lavó el tejido con PBS (2x5). Se utilizó Tritón X-100 al 0.1% en PBS, durante 5 minutos para permeabilizar las membranas celulares. Se lavó el tejido con PBS (1x5). Se utilizó suero de caballo al 1% en PBS por 30 min a fin de bloquear las uniones inespecíficas (Durlej y col., 2010). Se agregó un anticuerpo de ratón anti-receptor de estrógenos  $\alpha$  humano monoclonal RE $\alpha$  (F-10): sc-8002 (Santa Cruz Biotechnology, USA), (Jankowski y col., 2001) dilución 1:100, incubando aproximadamente 20 horas a 4°C. Luego de la incubación, se dejaron los cortes a temperatura ambiente por 10 min y se los lavó con PBS (2x5). Se agregó un segundo anticuerpo biotilado, inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra (Cytoscan Biotinylated Link, Cell Marque, USA), se incubó durante 30 min y se lavó con PBS (2x5). Se colocó estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Cytoscan™ HRP DetectionSystem, Cell Marque, USA), se incubó durante 30 min y se lavó con PBS (2x5). A continuación se cubrió con solución cromógena diaminobencidina (DAB Substrate Kit, Cell Marque, USA) durante 15 min (bajo control de microscopio óptico), se cortó la coloración con un pasaje de agua corriente, luego se lavó con agua destilada (un pasaje) y se contrastó con hematoxilina activada por 1 min (Biopur, Argentina). Luego se sumergió en agua destilada 5 min para viraje. A las muestras se las deshidrató (usando una batería de alcoholes de graduación creciente, 1 min en alcohol 70°, y un pasaje por cada siguiente baño: dos veces en alcohol 96°, dos veces en alcohol 100° y dos veces en xilol), y se las montó con un cubreobjetos utilizando un medio de montaje

sintético (Canadax®, Biopur, Argentina). El control negativo se trató igual que las muestras, sólo que no se agregó el anticuerpo primario, en su reemplazo se utilizó PBS.

#### *Determinación de Receptor de Estrógenos $\beta$*

Para la determinación de RE $\beta$  se utilizó un anticuerpo de ratón anti-receptor de estrógenos  $\beta$  humana-babuino monoclonal, [14C8] ab288 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (Tang y col., 2018), dilución 1:250. Se utilizó la misma técnica descrita para la determinación de la expresión del RE $\alpha$ . El control negativo se trató igual que las muestras, sólo que no se agregó el anticuerpo primario sino PBS.

#### **Receptor de Progesterona**

##### *Determinación de Receptor de Progesterona isoforma A*

Para la determinación del Receptor de progesterona isoforma A (RPA) se agregó el anticuerpo de ratón monoclonal anti-receptor de progesterona isoforma A, clone 16, NCL-L-PGR-312 (Leica Biosystems, Novocastra Lab, Newcastle, United Kingdom), dilución 1:100 (Durllej y col., 2010).

Hasta la incubación del anticuerpo primario, se utilizó la misma técnica descrita para la determinación de la expresión del receptor de estrógeno  $\alpha$ ; sólo que luego de la incubación del anticuerpo primario, se agregó el segundo anticuerpo biotilado (inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra, Dako Cytomation, Dinamarca) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Se colocó estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Streptavidin- HRP, Dako Cytomation, Dinamarca) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Luego se procedió con la misma técnica descrita para el RE $\alpha$ . Los controles

negativos se trataron igual que las muestras, sólo que no se agregó el anticuerpo primario, se agregó PBS. Se utilizó miometrio de cada muestra como control positivo.

#### *Determinación de Receptor de Progesterona isoforma B*

Para la determinación del receptor de progesterona isoforma B (RPB) se agregó el anticuerpo de ratón monoclonal anti-receptor de progesterona isoforma B, NCL-L-PGR-clone SAN 27 (Leica Biosystems, Novocastra Lab, Newcastle, United Kingdom), dilución 1:100 (Durlej y col., 2010).

Hasta la incubación del anticuerpo primario, se utilizó la misma técnica descrita para la determinación de la expresión del receptor de estrógeno  $\alpha$ ; sólo que luego de la incubación del anticuerpo primario, se agregó el segundo anticuerpo biotilnado (inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra, Dako Cytomation, Dinamarca) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Se colocó estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Streptavidin- HRP, Dako Cytomation, Dinamarca) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Luego se procedió con la misma técnica descrita para el RE $\alpha$ . Los controles negativos se trataron igual que las muestras, sólo que en lugar de agregar el anticuerpo primario, se agregó PBS.

#### **Observaciones microscópicas de las inmunohistoquímicas**

Los resultados de las inmunohistoquímicas se observaron en un microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) montado con una cámara Canon PowerShot G20 (Tokio, Japón). Se analizó el corte a bajo aumento (40x) y luego se realizaron microfotografías (n=5) a 100x con el fin de demostrar homogeneidad de tinción y las estructuras placentarias en general. A continuación, se tomaron microfotografías (n=20) a 400x, de cada estructura estudiada

(epitelio luminal endometrial, glándulas, tejido conectivo y trofoblasto), de todas las muestras. Los resultados de la determinación de la expresión de los receptores fueron expresados en forma semicuantitativa, considerándose como coloración positiva, la observación de un desarrollo de coloración marrón en los núcleos celulares, dentro de las estructuras analizadas, con una escala elegida en función de la expresión detectada, determinando que: (+) expresión nuclear con diferentes grados de positividad, (-) negativo.

A fin de poder evaluar cuantitativamente la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona en la interfase placentaria porcina en los períodos de gestación seleccionados, fueron tomadas imágenes de los resultados de la inmunohistoquímica para su posterior análisis morfométrico. Se utilizó la técnica de cuantificación de imágenes utilizando el software ImageJ (Ferreira y Rasband, 2012).

El proceso de selección de campos microscópicos, con el fin de efectuar después las cuantificaciones histométricas, se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios: las áreas seleccionadas para las cuantificaciones fueron aquellas que, habiendo sido valoradas por tres observadores experimentados, se consideraron adecuadas, rechazándose aquellos campos microscópicos con artefactos de corte. En cada campo microscópico, tomado con un objetivo de 400x, se realizaron las diferentes determinaciones morfométricas de cada una de las estructuras seleccionadas, utilizando preparaciones inmunomarcadas con anticuerpos anti-receptor de estrógenos  $\alpha$ , anti-receptor de estrógenos  $\beta$ , anti-receptor de progesterona isoforma A y anti-receptor de progesterona isoforma B.

Todas las muestras histológicas fueron fotografiadas con un microscopio Carl Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) equipado con una cámara digital Canon PowerShot G20 (Tokio, Japón), adquiridas con el software Axiovision (AxioVision 4.8, Carl Zeiss) y procesadas en formato TIFF. Todas las fotografías fueron realizadas con el objetivo de 400x. A fin de

analizar la interfase feto-materna, de cada preparado se extrajeron imágenes del epitelio luminal (EL) y glandular (EG) y estroma endometrial (TC) del útero no gestante (NG); de la placenta materna se observó el EL, EG y TC, y de la placenta fetal, el trofoblasto (Tr). Estas imágenes se procesaron con el software ImageJ.

### **Determinación del Porcentaje de Área inmunomarcada (%AIM)**

Para el análisis morfométrico del área ocupada por las moléculas, en relación con el área total, tanto de los tejidos endometriales como del trofoblasto, se procedió a determinar el %AIM. En cada imagen primero se ajustó brillo y contraste en forma automática por el software y luego se realizó la separación de colores mediante la herramienta “*color deconvolution*” lo cual permitió separar la imagen original en tres imágenes monocromáticas (rojo-verde-azul: RGB, siglas en inglés), que contienen los colores del método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) utilizando la opción H-DAB. Entre las imágenes RGB, se creó una imagen correspondiente al revelado con DAB de color marrón. Debido a que las regiones de interés son aquellas que expresaron una tinción de color marrón, sólo la imagen de 8-bit DAB fue conservada (Figura 1).

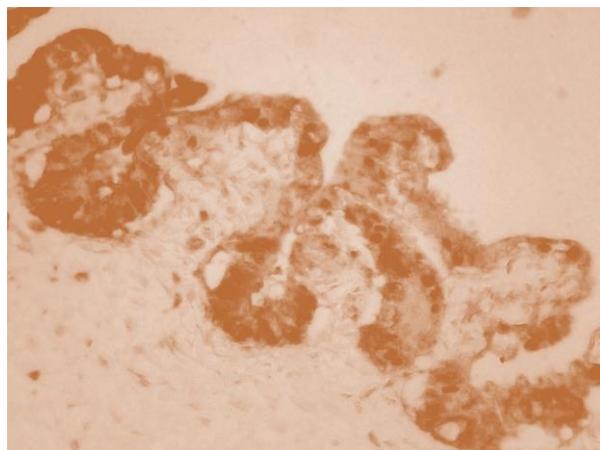


Figura 1: Trofoblasto de 70 dg (Imagen de 8-bit DAB; 400x).

Con las imágenes de 8-bit DAB se procedió a delimitar el área a analizar, que para el presente trabajo fue el epitelio luminal y glandular así como el estroma endometrial, y el trofoblasto. Seguidamente se realizó la segmentación de la imagen a cuantificar, mediante el uso de la herramienta “*threshold*” (umbral), con el fin de separar los pixeles más oscuros que el valor de umbral (Figura 2).

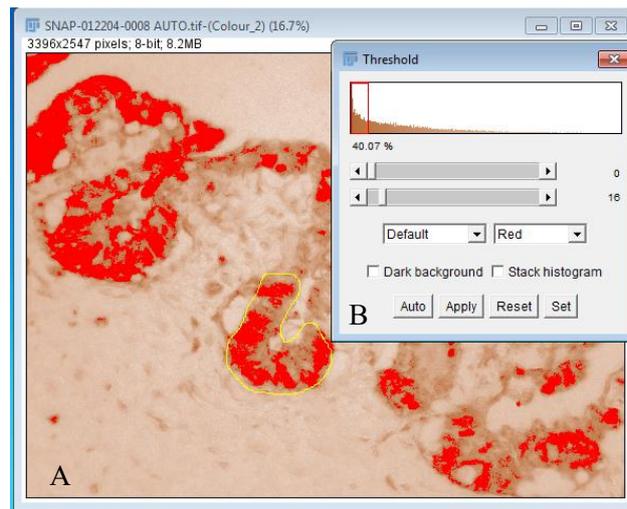


Figura 2: Trofoblasto de 70 días de gestación (Imagen de 8-bit; 400x). A. Marcación en rojo del área inmunomarcada. B. Ventana donde se observa el porcentaje de marrón que ocupó el área previamente establecida (epitelio).

A partir de esta selección, se tuvieron en consideración las áreas que presentaron inmunotinción, para distinguirlas de aquellas con tinción negativa; así, entonces, se procedió a cuantificar el área correspondiente a la superficie total del epitelio luminal, glandular y estroma en la imagen y el área de la inmunoexpresión de los receptores de las hormonas esteroideas estudiadas. El resultado se expresó como la proporción entre el área específicamente marcada (núcleos positivos) y el área total del tejido de cada imagen: porcentaje de área inmunomarcada (%AIM; Figura 2) y se los colocó en una planilla de Excel. Los resultados finales del porcentaje de área inmunomarcada de cada estructura y de

cada período de gestación, se expresaron como el promedio de los datos obtenidos de las 20 fotos analizadas.

### **Análisis estadísticos**

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos de la determinación de hormonas esteroideas en sueros, extractos placentarios y extractos de útero no gestante, éstos fueron ordenados en los 4 períodos de gestación elegidos: 5 dg, 17 dg, 30 dg y 70 dg, y cerdas no gestantes (NG). Las diferencias entre las concentraciones de las hormonas esteroideas de los diferentes períodos de gestación fueron analizadas mediante un análisis de varianza y el test de Tukey ( $p < 0,05$ ), una prueba de comparaciones múltiples. En los casos en que no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas, se utilizó el test de varianza no paramétrica, Kruskal-Wallis.

A la observación de los resultados de la expresión de los receptores ( $RE\alpha$ ,  $RE\beta$ , RPA, RPB) primero se realizó un análisis cualitativo, con una escala elegida en función de la coloración detectada, determinando que: (+) = expresión nuclear con diferentes grados de positividad, (-) = negativo. Luego, a las microfotografías de 400x se las analizó mediante el software de imágenes ImageJ (Ferreira y Rasband, 2012) expresando los resultados de un modo cuantitativo (Vasconcellos y col., 2014). Se determinó sobre la interfase placentaria el porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de los receptores de estrógenos y progesterona ( $RE\alpha$ ,  $RE\beta$ , RPA, RPB). Las áreas a analizar fueron el epitelio luminal, glandular y tejido conectivo endometrial y trofoblasto. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza y el test de Tukey ( $p < 0,05$ ); y en los casos que no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas, se utilizó un test no paramétrico, Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS

### TRACTOS REPRODUCTIVOS

Se recolectaron 24 tractos reproductivos provenientes de cerdas en diferentes estadios de gestación, comprendidos entre 5 a 70 días de gestación, y de cerdas no gestantes.

De los 24 tractos reproductivos:

- Ocho correspondieron a úteros de cerdas no gestantes en las diferentes fases del ciclo estral, cuatro en fase folicular y cuatro en fase luteal. Las mismas se tomaron como controles.
- El resto de los tractos reproductivos (16) fueron placentas provenientes de cerdas gestantes en diferentes períodos gestacionales tempranos.

Los tractos reproductivos fueron procesados con los diferentes métodos y técnicas descritas en el apartado Materiales y Métodos.

La gestación se consideró en este trabajo en cuatro periodos: 5 días que se correspondería con el periodo de pre-implantación, el 2do período entre 15 a 20 días fin de la “ventana de implantación”, el 3er período de 30 a 35 días como post-implantacional y el 4to período de 68 a 72 días como fin de las remodelaciones placentarias.

## **DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS**

En este estudio la determinación de la concentración de hormonas estrógenos y progesterona se realizó mediante la técnica de quimioluminiscencia.

## **DETERMINACIÓN DE ESTRÓGENOS**

Se determinó la presencia de estrógenos en sueros, en homogenatos de úteros de cerdas NG (HoUP) y en homogenatos de extractos placentarios maternos (HoPM) y fetales (HoPF) de los distintos períodos gestacionales seleccionados.

### **Determinación de Estrógenos en suero**

Se realizó un análisis de la varianza y un test de Tukey de las concentraciones de Estrógenos en muestras de suero de cerdas no gestantes y gestantes de los diferentes períodos de gestación (Tabla 1, Anexo). Se observaron diferencias significativas entre cerdas NGFF en relación con NGFL ( $31 \pm 2$  vs  $18 \pm 7,79$  pg/ml;  $p < 0,0001$ ). (Figura 3; Tabla 1a, Anexo). Con respecto a la gestación, se hallaron diferencias significativas entre las concentraciones de Es de las cerdas de 70 dg comparadas con los períodos de 17 dg y 30 dg ( $50$  vs  $31$  y  $31,60$  pg/ml, respectivamente;  $p < 0,0001$ ).

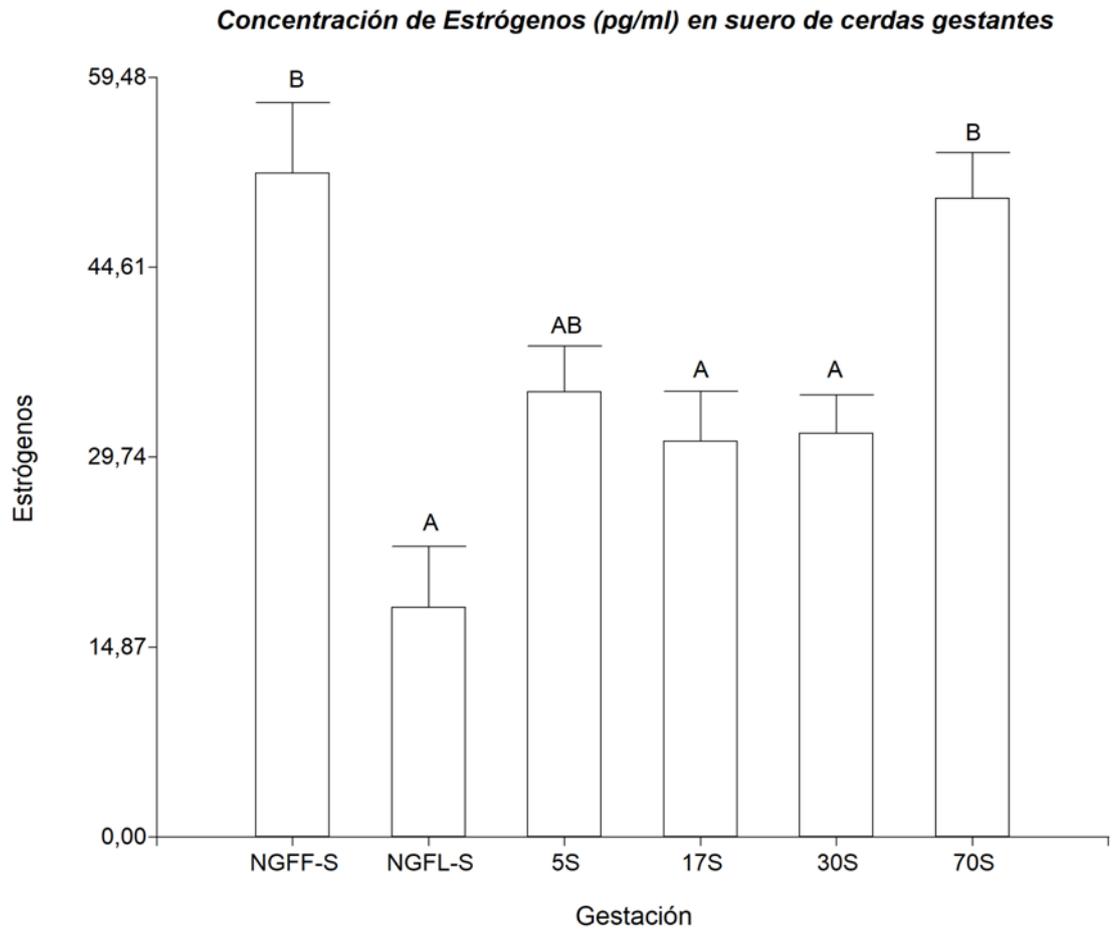


Figura 3: Concentración de Estrógenos (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGFF y NGFL) y cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### **Determinación de Estrógenos en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM)**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de las concentraciones de Estrógenos en extractos de útero no gestante (HoUP) y gestante (HoPM) en distintos períodos de gestación. Se observaron diferencias significativas en la concentración de Es en HoPM entre los diferentes períodos gestacionales. La concentración de Es en el HoPM se halló significativamente más elevada a los 30 dg comparada con los períodos de 5, 17 y 70 dg y

útero no gestante (NGFF y NGFL) (974,96 vs 346,8; 581,12; 571,94 y 567 y 530,25 pg/ml, respectivamente;  $p < 0,0001$ ). (Figura 4; Tabla 2a, Anexo).

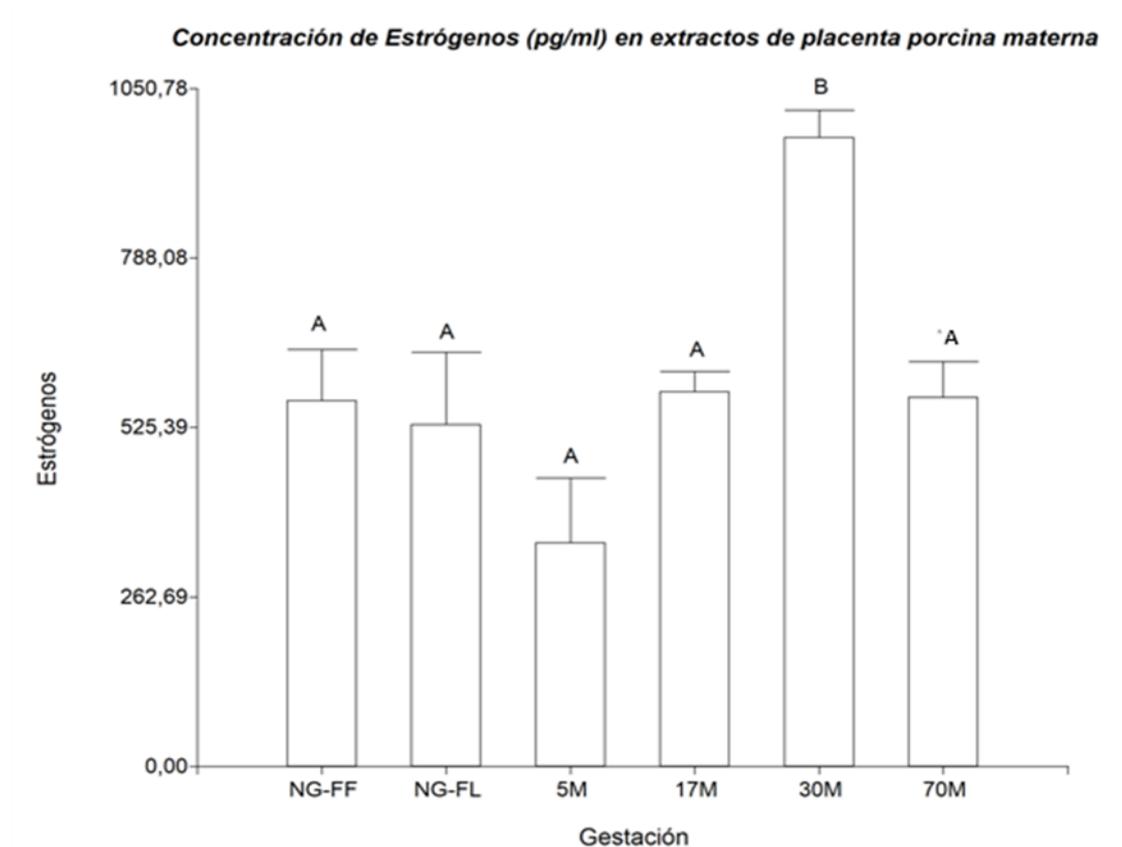


Figura 4: Concentración de Estrógenos (pg/ml) en Homogenatos de cerdas no gestantes (NGFF y NGFL) y HoPM de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### Determinación de Estrógenos en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF)

Se realizó un análisis de la varianza de las concentraciones de Es en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF) en distintos períodos de gestación. Se observó diferencias significativas en la concentración de Es en placenta fetal a los 17 dg (7398,75 pg/ml) con respecto a la concentración hallada a los 30 y 70 dg (2064; 2632,25 pg/ml, respectivamente;  $p < 0.0001$ ) (Figura 5; Tabla 3a, Anexo).

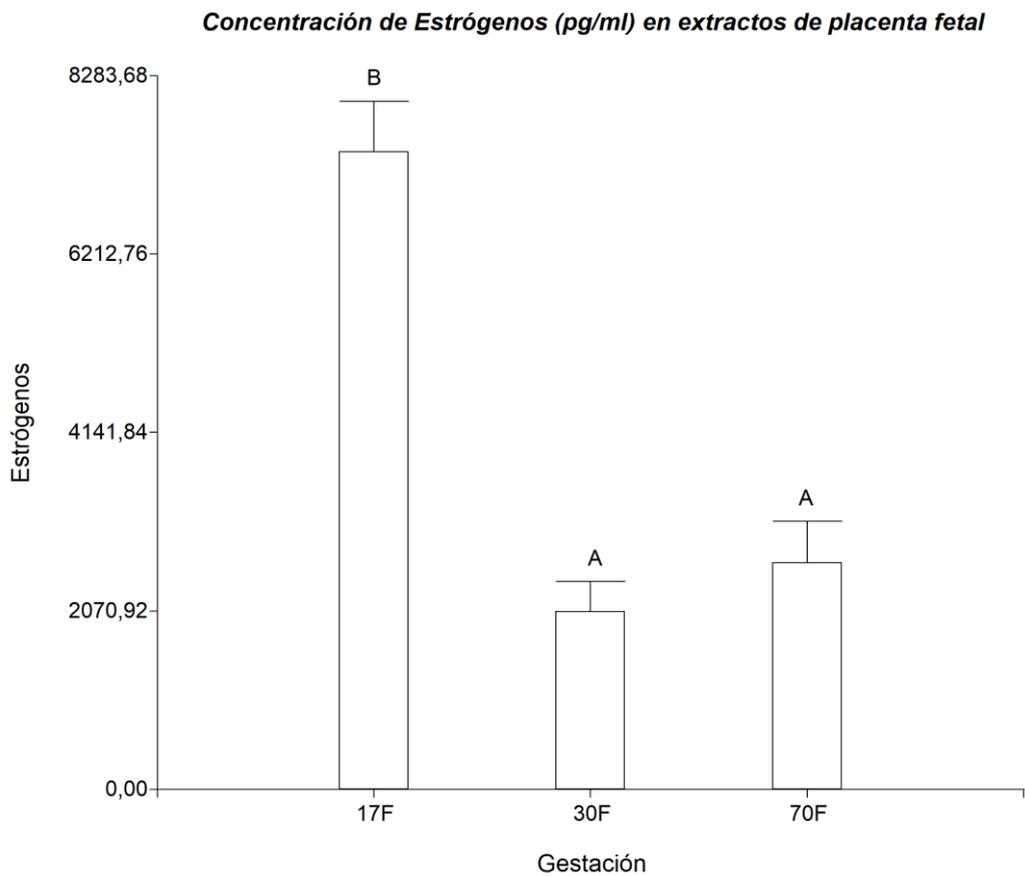


Figura 5: Concentración de Estrógenos (pg/ml) en Homogenatos de placenta fetal (HoPF) de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## **DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA**

Se determinó la concentración de Progesterona (P4) en sueros, en homogenatos de úteros de cerdas NG y en homogenatos de extractos placentarios maternos (HoPM) y fetales (HoPF) de los distintos períodos gestacionales seleccionados.

### **Determinación de Progesterona en suero**

Se realizó un análisis de la varianza y un test de Tukey de las concentraciones de Progesterona en muestras de suero de cerdas NG y G de los diferentes períodos de gestación (Tabla 4, Anexo). Se observaron diferencias significativas entre cerdas NG en fase folicular y fase luteal (0,59 ng/ml vs 21,09 ng/ml;  $p < 0,0001$ ). Respecto a la gestación, se observó un incremento en la concentración de P4 en suero a los 17 dg cuya diferencia es significativa con los valores hallados en las cerdas G de 5, 30 y 70 dg (38,36 vs 25,99; 26,09 y 25,72 ng/ml, respectivamente;  $p < 0,0001$ ). No se hallaron diferencias significativas entre la concentración de P4 en suero de cerdas NGFL y cerdas G de 5, 30 y 70 dg ( $p > 0,05$ ). (Figura 6; Tabla 4a, Anexo).

**Concentración de Progesterona (ng/ml) en suero de cerdas gestantes**

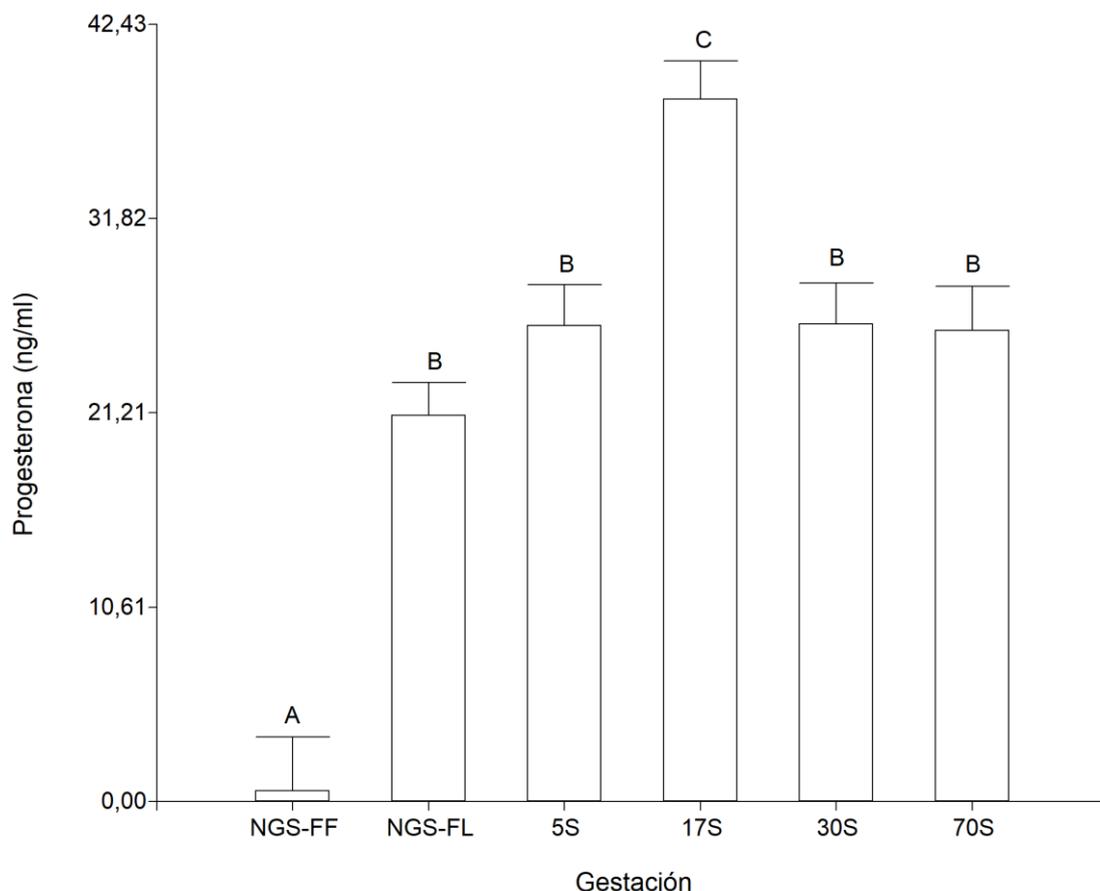


Figura 6: Concentración de Progesterona (ng/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGFF y NGFL) y cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Determinación de Progesterona en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM)**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de las concentraciones de Progesterona en extractos de útero no gestante (HoUP) y gestante (HoPM) en distintos períodos de gestación. Se hallaron diferencias significativas en la concentración de P4 en homogenatos de placenta materna de 70 dg (2,25 ng/ml) comparados con los homogenatos de cerdas NGFF (0,57 ng/ml) y con los HoPM de 5 dg (0,98 ng/ml);  $p < 0.0001$ ). A los 17 dg (1,79 ng/ml) como

a los 70 dg (2,25 ng/ml), se observó un aumento de la P4 en HoPM, pero las diferencias no fueron significativas con respecto a los 30 dg (1,35 ng/ml) y a los extractos uterinos en fase luteal (1,36 ng/ml) (Figura.;  $p>0,05$ ). No se observó diferencias significativas entre las concentraciones de P4 en HoUP comparadas con los HoPM de 5 dg (0,57 y 1,36 ng/ml vs 0,98 ng/ml;  $p>0,05$ ). (Figura 7; Tabla 5a, Anexo).

**Concentración de Progesterona (ng/ml) en extractos de placenta porcina materna**

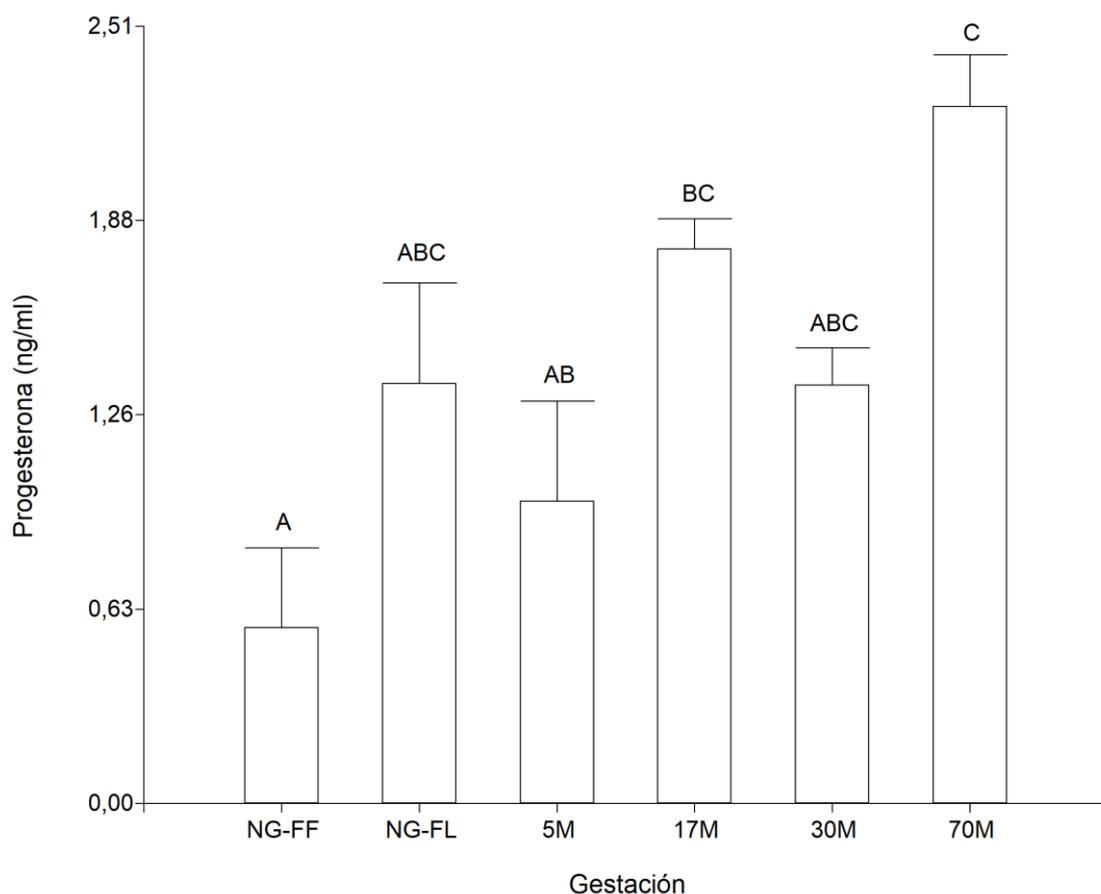


Figura 7: Concentración de Progesterona (ng/ml) en Homogenatos de cerdas no gestantes (NGFF y NGFL) y HoPM de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

### Determinación de Progesterona en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF)

Se realizó un análisis de la varianza de las concentraciones de P4 en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF) en distintos períodos de gestación. Se hallaron diferencias significativas entre los HoPF de 17 dg (72,45 ng/ml) y 70 dg (73,14 ng/ml) cuando se compararon con los extractos fetales de 30 dg (31,14 ng/ml), pero no se observaron diferencias entre los valores hallados a los 17 dg y 70 dg. ;  $p < 0.05$ ) (Figura 8; Tabla 6a, Anexo).

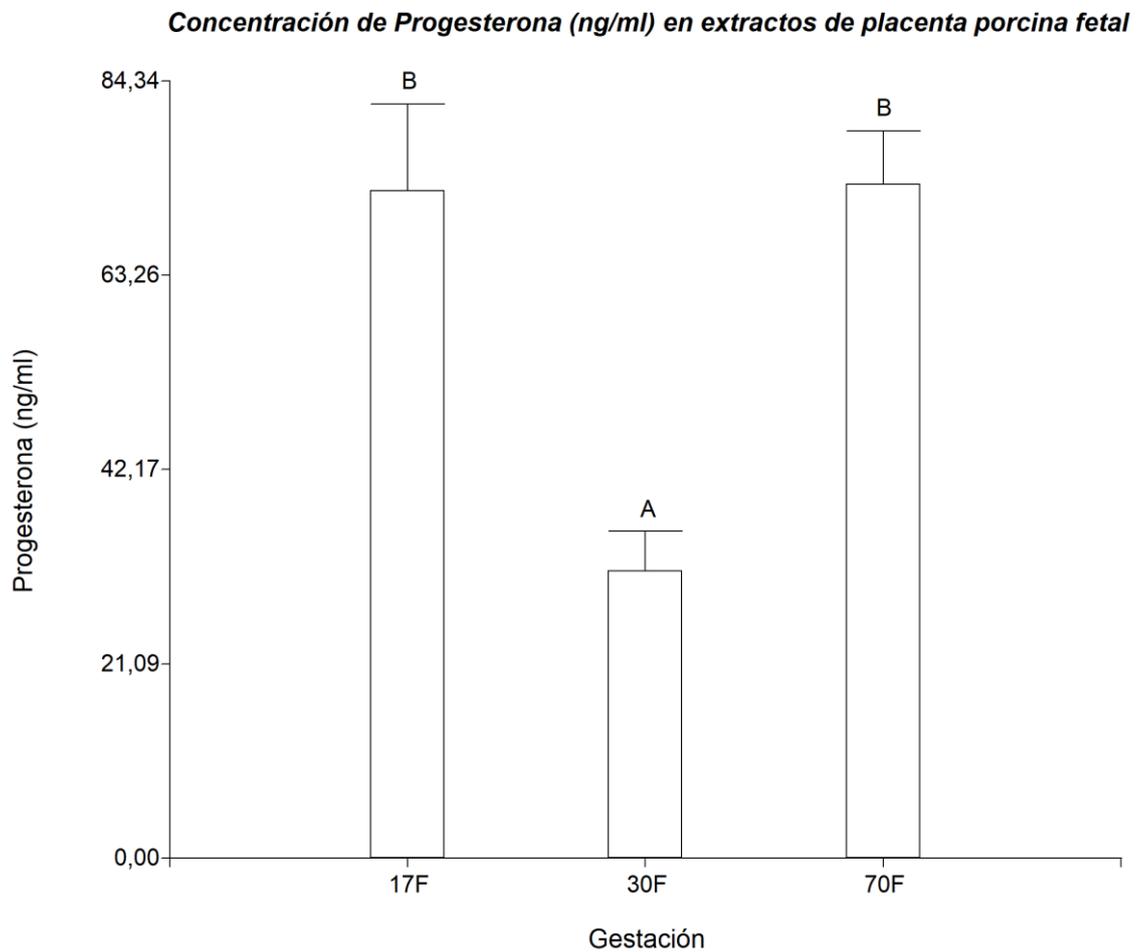


Figura 8: Concentración de Progesterona (ng/ml) en Homogenatos de placenta fetal (HoPF) de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS MEDIANTE EL USO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

### Receptores de Estrógenos $\alpha$

Se determinó la presencia del receptor de estrógenos  $\alpha$  mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta sobre cortes desparafinados de úteros de cerdas no gestantes y en muestras de placenta materna y fetal de los distintos períodos gestacionales seleccionados.

Los resultados de la inmunohistoquímica realizada, se detallan en la Tabla 1.

Días Gestación (dg)	Epitelio luminal	Epitelio glandular	Tejido conectivo	Trofoblasto
NGFF	-	+	+	
NGFL	-	+	-	
5 dg	-	-	-	
17 dg	-	-	-	-
30 dg	-	-	-	-
70 dg	-	-	-	-

Tabla 1: Expresión del receptor de estrógenos  $\alpha$  sobre epitelio luminal y glandular, tejido conectivo y trofoblasto; en útero de cerda no gestante y placenta de cerda de diferentes períodos de gestación. NGFF: cerda no gestante, fase folicular. NGFL: cerda no gestante, fase luteal.

(+): Expresión nuclear con diferentes grados de positividad, (-): Negativo.

La inmunexpresión nuclear positiva para el receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) se localizó en el epitelio glandular en las cerdas NGFF y NGFL y sólo en tejido conectivo de las cerdas NGFL.

En el resto de los períodos estudiados y tejidos analizados no se observó inmunexpresión.

### Receptores de Estrógenos $\beta$

Los resultados de la inmunohistoquímica para la determinación de la expresión del receptor de estrógenos  $\beta$  realizada sobre cortes desparafinados de diferentes períodos de gestación, se detallan en la Tabla 2.

Días Gestación (dg)	Epitelio luminal	Epitelio glandular	Tejido conectivo	Trofoblasto
NGFF	+	+	+	
NGFL	+	+	-	
5 dg	+	+	-	
17 dg	-	+	-	+
30 dg	-	+	-	-
70 dg	-	-	-	+

Tabla 2: Expresión del receptor de estrógenos  $\beta$  sobre epitelio luminal y glandular, tejido conectivo y trofoblasto; en útero de cerda no gestante y placenta de cerda de diferentes períodos de gestación. NGFF: cerda no gestante, fase folicular. NGFL: cerda no gestante fase luteal.

(+): Expresión nuclear con diferentes grados de positividad. (-): Negativo.

En las cerdas NGFF y NGFL se halló inmunomarcación nuclear del receptor de estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ) en el epitelio luminal y glandular endometrial, y sólo en tejido conectivo de las cerdas NGFF.

En las cerdas de 5 dg la inmunomarcación nuclear del RE $\beta$  se localizó en el epitelio luminal y glandular endometrial. Se halló expresión del RE $\beta$  en epitelio glandular endometrial y en células epiteliales trofoblásticas de las cerdas de 17 dg.

En las cerdas de 30 dg se halló expresión nuclear del RE $\beta$  en epitelio glandular endometrial.

Mientras que en las cerdas de 60-70 dg la inmunotinción se localizó en las células epiteliales trofoblásticas (Figura 9B)

En el resto de los tejidos analizados no se halló inmunoexpresión (Figura 9A).

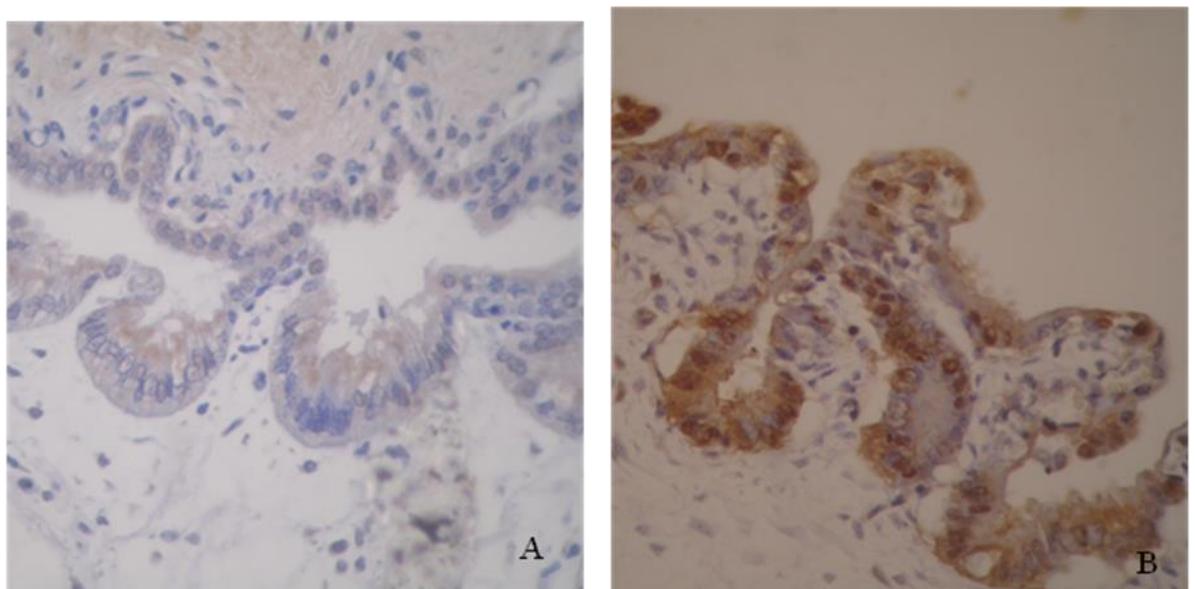


Figura 9: Placenta porcina. (A) Interfase placentaria de 30 dg negativa a RE $\beta$  (400x). (B) Epitelio trofoblástico de 70 dg con inmunomarcación positiva a RE $\beta$  (400x).

## DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE PROGESTERONA MEDIANTE EL USO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

### Receptores de Progesterona isoforma A

Los resultados de la inmunohistoquímica para la determinación de la expresión del receptor de progesterona isoforma A realizada sobre cortes desparafinados de diferentes períodos de gestación, se detallan en la Tabla 3.

Días Gestación (dg)	Epitelio luminal	Epitelio glandular	Tejido conectivo	Trofoblasto
NGFF	+	+	+	
NGFL	-	+	+	
5 dg	+	+	+	
17 dg	-	+	+	-
30 dg	-	+	+	-
70 dg	-	+	+	-

Tabla 3: Expresión del receptor de progesterona isoforma A sobre epitelio luminal y glandular, tejido conectivo y trofoblasto; en útero de cerda no gestante y placenta de cerda de diferentes períodos de gestación. NGFF: cerda no gestante, fase folicular. NGFL: cerda no gestante, fase luteal.

(+): Expresión nuclear con diferentes grados de positividad. (-): Negativo.

En cerdas NGFF y NGFL se halló inmunotinción nuclear del receptor de progesterona isoforma A (RPA) en el epitelio glandular y tejido conectivo; y sólo en el epitelio luminal de las cerdas NGFF (Figura 10).

En las cerdas de 5 (Figura 11), 17 (Figura 12), 30 y 60-70 dg se halló expresión nuclear del RPA en epitelio glandular y tejido conectivo, mientras que sólo se observó expresión nuclear en epitelio luminal de cerdas de 5 dg (Figura 11 A y B).

En todos los períodos analizados se observó inmunoexpresión de RPA en el núcleo de las células miometriales y se consideró un control positivo en las experiencias de IHQ porque en el miometrio gestante, el RPA es imprescindible para disminuir la motilidad uterina que conduce a un mantenimiento de la gestación exitoso.

No se halló inmunotinción en el resto de los tejidos analizados.

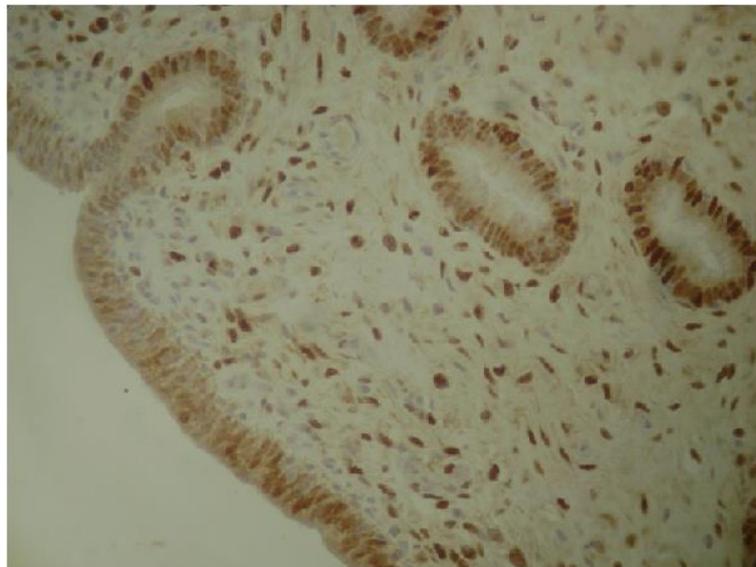


Figura 10: Útero de cerda NGFF. Epitelio luminal y glandular y tejido conectivo expresan inmunomarcación con RPA (400x).

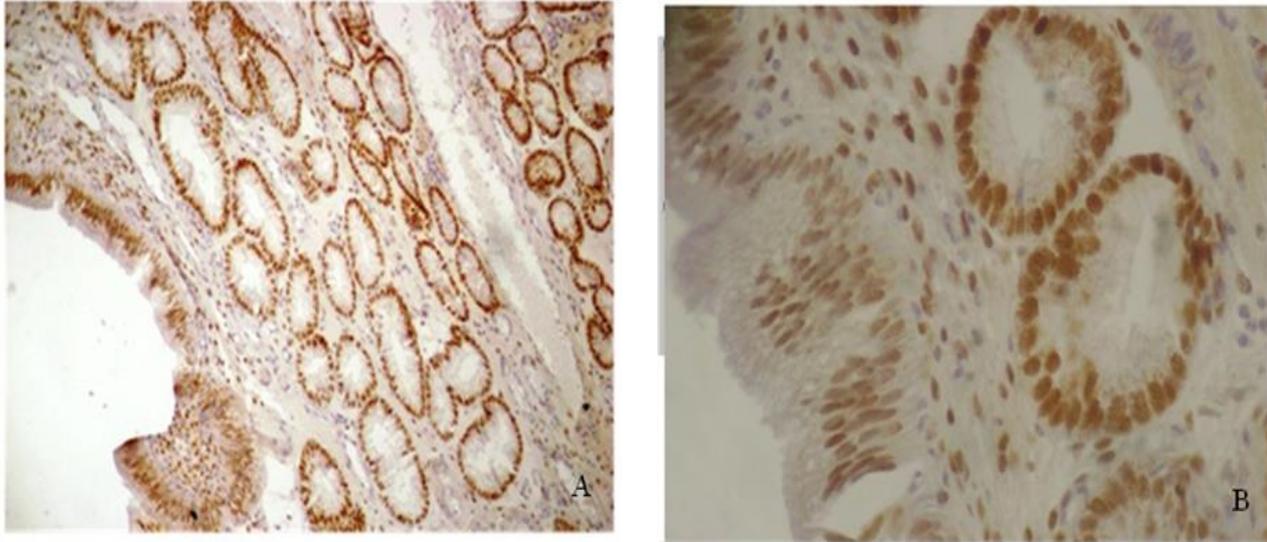


Figura 11: Placenta porcina de 5 dg. (A) Epitelio luminal y glandular, tejido conectivo expresan inmunomarcación con RPA (100x). (B) Inmunomarcación positiva en epitelio luminal y glandular, tejido conectivo con RPA (400x).

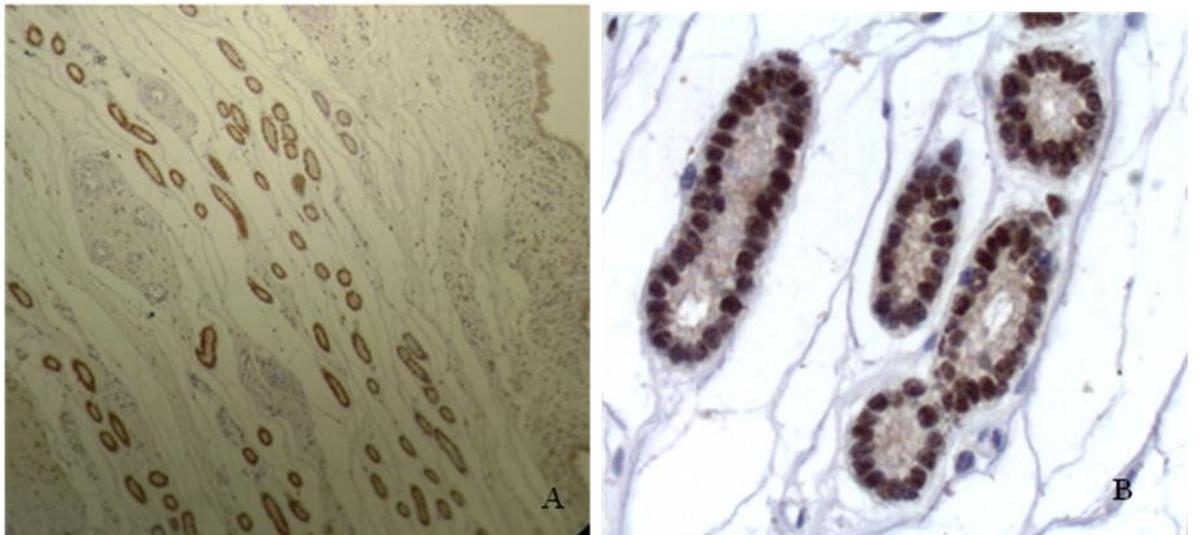


Figura 12: Placenta porcina de 17 dg. (A) Epitelio glandular, tejido conectivo y miometrio expresan inmunomarcación con RPA (100x). (B) Inmunomarcación positiva en epitelio glandular con RPA (400x)

### Receptores de Progesterona isoforma B

Los resultados de la inmunohistoquímica para la determinación de la expresión del receptor de progesterona isoforma B, realizada sobre cortes desparafinados de diferentes períodos de gestación, se detallan en la Tabla 4.

Días Gestación (dg)	Epitelio luminal	Epitelio glandular	Tejido conectivo	Trofoblasto
NGFF	+	+	+	
NGFL	-	-	-	
5 dg	-	-	-	
17 dg	-	-	-	-
30 dg	-	-	+	-
70 dg	-	-	-	-

Tabla 4: Expresión del receptor de progesterona isoforma B sobre epitelio luminal y glandular, tejido conectivo y trofoblasto; en útero de cerda no gestante y placenta de cerda de diferentes períodos de gestación. NGFF: cerda no gestante, fase folicular. NGFL: cerda no gestante, fase luteal.

(+): Expresión nuclear con diferentes grados de positividad. (-): Negativo.

En las cerdas NGFF y NGFL se halló inmunotinción del receptor de progesterona isoforma B (RPB) en epitelio luminal, glandular y tejido conectivo endometrial.

Se observó inmunotinción del RPB en tejido conectivo endometrial, en cerdas de 30 dg.

En el resto de los períodos estudiados y tejidos analizados no se observó inmunoexpresión nuclear.

### DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE PROGESTERONA MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DE IMÁGENES:

## **PORCENTAJE DE ÁREA INMUNOMARCADA EN ÚTERO Y PLACENTA PORCINA**

El análisis del área inmunomarcada (%AIM) de los receptores de Estrógenos ( $RE\alpha$ ,  $RE\beta$ ) y de los receptores de Progesterona (RPA y RPB), se realizó en el epitelio luminal y glandular, y tejido conectivo endometrial de útero porcino no gestante (NG) y sobre la interfase placentaria porcina: epitelio luminal (EL), epitelio glandular (EG) y tejido conectivo (TC) endometrial de placenta materna, y trofoblasto (Tr) de la placenta fetal.

### **DETERMINACIÓN DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\alpha$**

Se determinó la presencia del receptor de estrógenos  $\alpha$  ( $RE\alpha$ ) mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta sobre cortes desparafinados de úteros de cerdas NG y en muestras de placenta materna y fetal de los distintos períodos gestacionales seleccionados y luego se estableció su %AIM.

#### **Receptor de Estrógenos $\alpha$ en epitelio luminal endometrial**

No se observó expresión del  $RE\alpha$  en epitelio luminal endometrial de las cerdas NG y G de los distintos períodos seleccionados.

#### **Receptor de Estrógenos $\alpha$ en epitelio glandular endometrial**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del  $RE\alpha$  en epitelio glandular en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. Se halló diferencias significativas entre el %AIM del  $RE\alpha$  en el epitelio glandular endometrial de cerdas NGFF (21,98%) y NGFL (20,21%) cuando se comparan con los %AIM del epitelio

glandular de la placenta materna de los diferentes períodos de gestación (1,11; 0,36; 0,64 y 0,59%) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 13; Tabla 7a, Anexo).

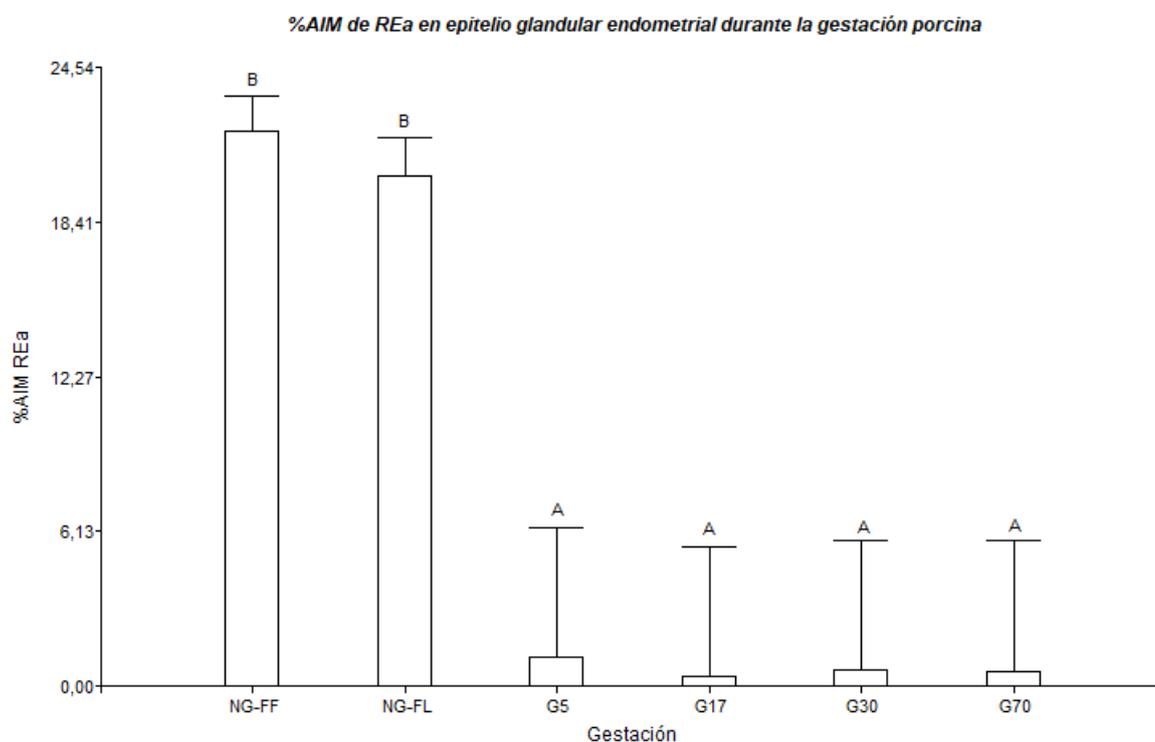


Figura 13: Determinación del %AIM de RE $\alpha$  en el epitelio glandular endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### **Receptor de Estrógenos $\alpha$ en tejido conectivo endometrial**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RE $\alpha$  en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. Se halló diferencias significativas entre el %AIM del RE $\alpha$  en el tejido conectivo endometrial de cerdas NGFF (5,32%) cuando se compara con los %AIM del tejido conectivo endometrial de cerdas NGFL (0,26%) y de la placenta materna de los diferentes períodos de gestación (0,03; 0,42; 0,05 y 0,16%) ( $p = 0,0009$ ). (Figura 14; Tabla 7a, Anexo).

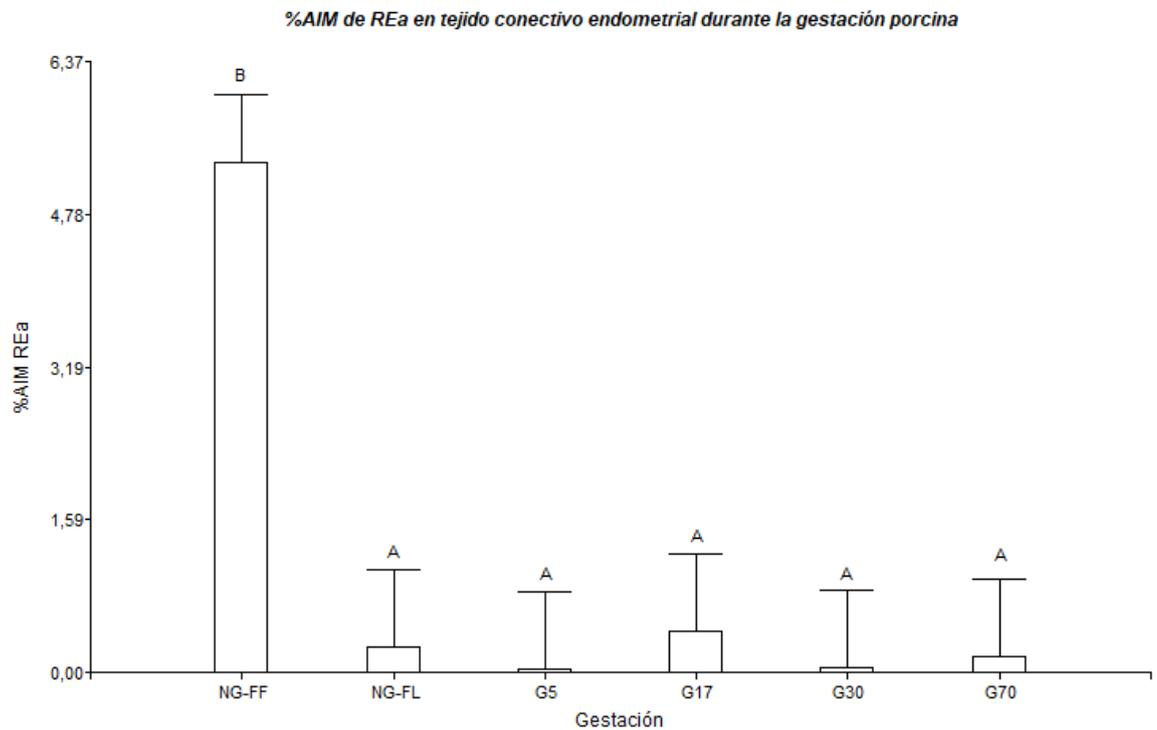


Figura 14: Determinación del %AIM de RE $\alpha$  en el tejido conectivo endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### Receptor de Estrógenos $\alpha$ en Trofoblasto

No se halló expresión del RE $\alpha$  en Trofoblasto de las cerdas G de los distintos períodos seleccionados.

## DETERMINACIÓN DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\beta$

Se determinó la presencia del receptor de estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ) mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta sobre cortes desparafinados de úteros de cerdas NG y en muestras de placenta materna y fetal de los distintos períodos gestacionales seleccionados y luego se estableció su %AIM.

### Receptor Estrógenos $\beta$ en tejido epitelial luminal endometrial

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RE  $\beta$  en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. Se halló diferencias significativas entre el %AIM del epitelio luminal de las cerdas NGFF (15,73%) cuando se comparó con la expresión en las cerdas G de 17, 30 y 70 dg (0,61; 0,71 y 0,44%, respectivamente;  $p=0,0045$ ). No se observó diferencias significativas entre los %AIM de las cerdas NGFF vs NGFL y de 5 dg (15,73 vs 12,31 y 7,22%;  $p>0,05$ ) (Figura 15; Tabla 8a, Anexo).

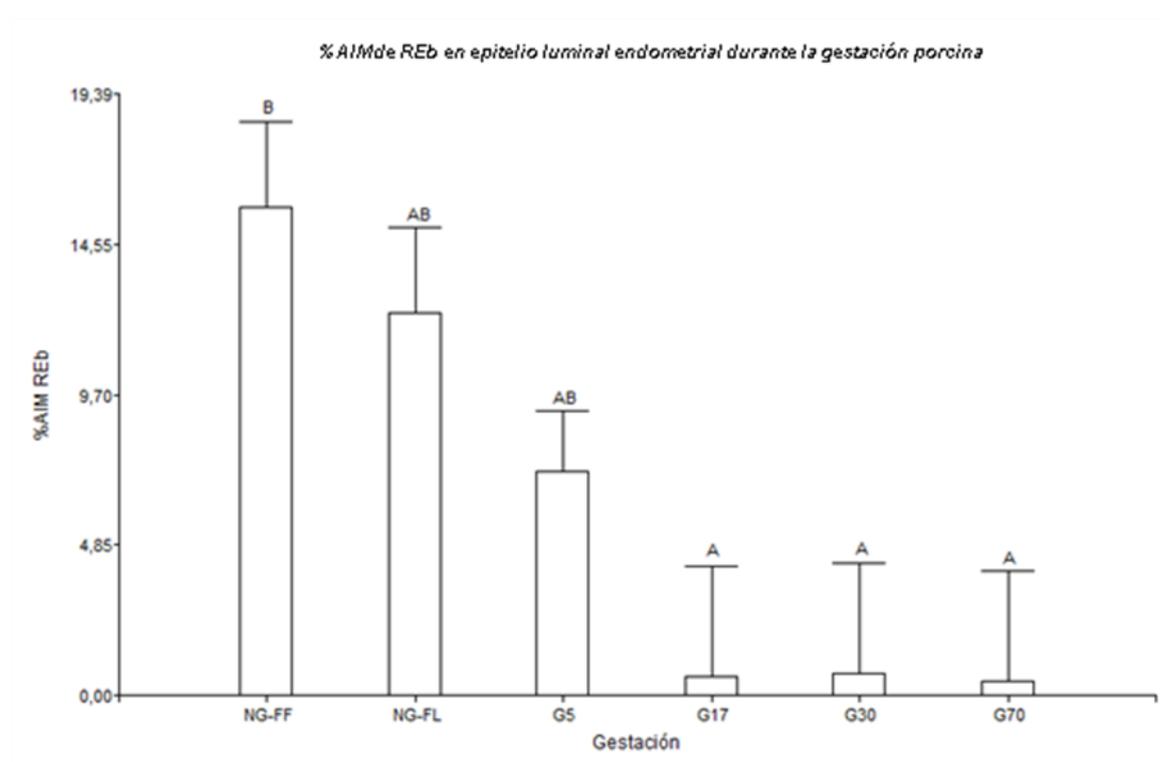


Figura 15: Determinación del %AIM de RE $\beta$  en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### Receptor de Estrógenos $\beta$ en epitelio glandular endometrial

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RE  $\beta$  en el epitelio glandular en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. Se observaron diferencias significativas en el %AIM del RE $\beta$  en epitelio glandular del endometrio de cerdas NG y G. Los valores más elevados se determinaron en NGFF, NGFL, 17 dg y 30 dg (22,31%; 19,89%; 20,58% y 19,98%; respectivamente,  $p < 0,0001$ ). A los 70 dg el área de expresión fue significativamente menor (0,59%,  $p < 0,0001$ ) (Figura 16; Tabla 8a, Anexo).

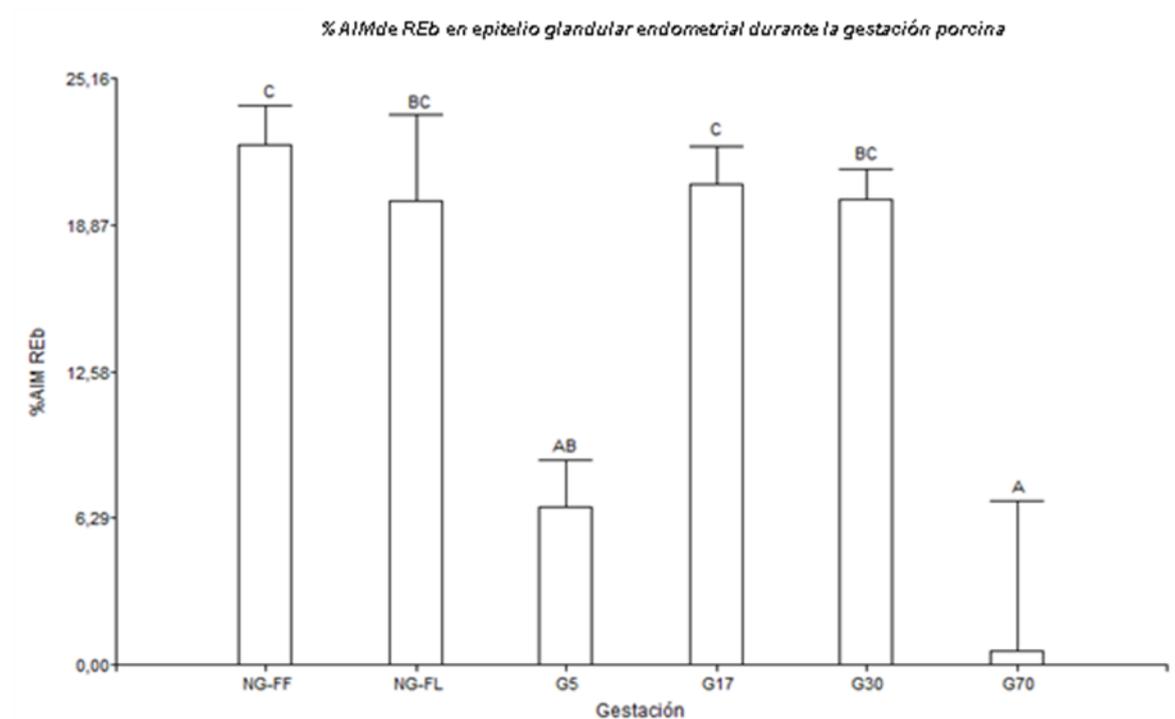


Figura 16: Determinación del %AIM de RE $\beta$  en el epitelio glandular endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### Receptor de Estrógenos $\beta$ en tejido conectivo endometrial

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RE  $\beta$  en el tejido conectivo en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. Se observaron diferencias significativas entre el %AIM en el tejido conectivo de cerdas NGFF cuando se comparan con la expresión en las cerdas G de 5, 30 y 70 dg (3,16% vs 0,03%; 0,05% y 0,16%; respectivamente,  $p = 0,0001$ ) (Figura 17; Tabla 8a, Anexo).

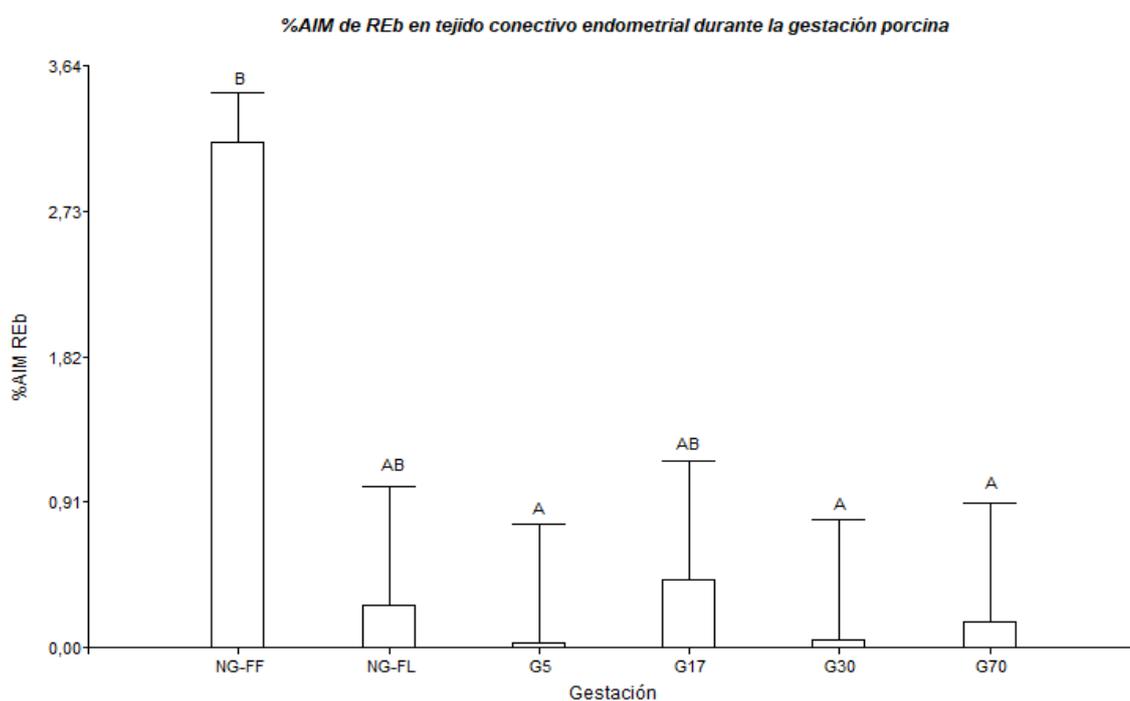


Figura 17: Determinación del %AIM de RE $\beta$  en tejido conectivo endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### Receptor de Estrógenos $\alpha$ en Trofoblasto

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RE  $\beta$  en el trofoblasto de muestras de cerdas G de distintos períodos de gestación. Se observaron diferencias significativas entre el %AIM de la expresión de RE $\beta$  en cerdas G de 17 y 70 dg vs las cerdas G de 30 dg (15,71%; 26,70% vs 0,45%; respectivamente,  $p=0,0001$ ) (Figura 18; Tabla 8a, Anexo).

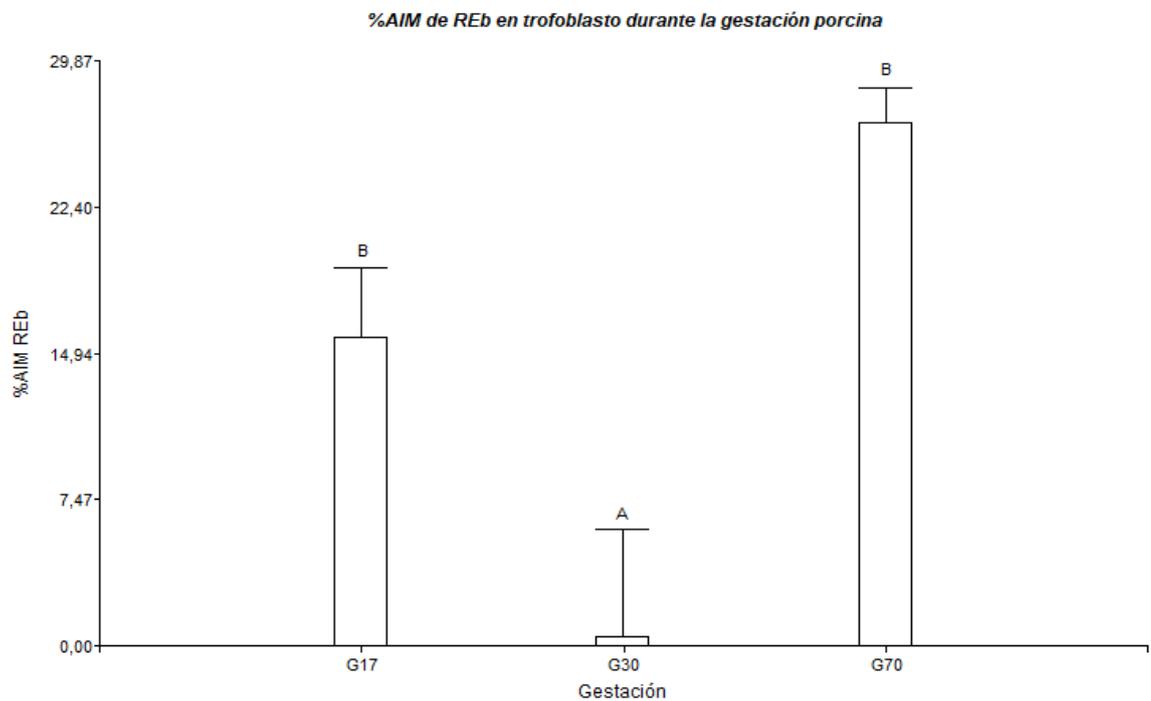


Figura 18: Determinación del %AIM de RE $\beta$  en trofoblasto de cerdas gestantes (G) de los períodos gestacionales seleccionados (17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

### DETERMINACIÓN DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA ISOFORMA A

Se determinó la presencia del receptor de progesterona isoforma A (RPA) mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta sobre cortes desparafinados de úteros de cerdas NG y en muestras de placenta materna y fetal de los distintos períodos gestacionales seleccionados y luego se estableció su %AIM.

### **Receptor de Progesterona isoforma A en tejido epitelial luminal endometrial**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RPA en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. Se halló diferencias significativas en el %AIM del epitelio luminal de las cerdas NGFF (39,18%) cuando se comparó con la expresión en las cerdas G de 17, 30 y 70 dg (0,61; 0,71 y 0,44%, respectivamente;  $p < 0,0001$ ). No se observó diferencias significativas en el %AIM de las cerdas NGFF vs las cerdas de 5 dg (39,18% vs 32,77%;  $p > 0,05$ ). Se halló diferencias significativas entre las cerdas NGFF y NGFL (39,18% vs 0,58%; respectivamente,  $p < 0,0001$ ) (Figura 19; Tabla 9a, Anexo).

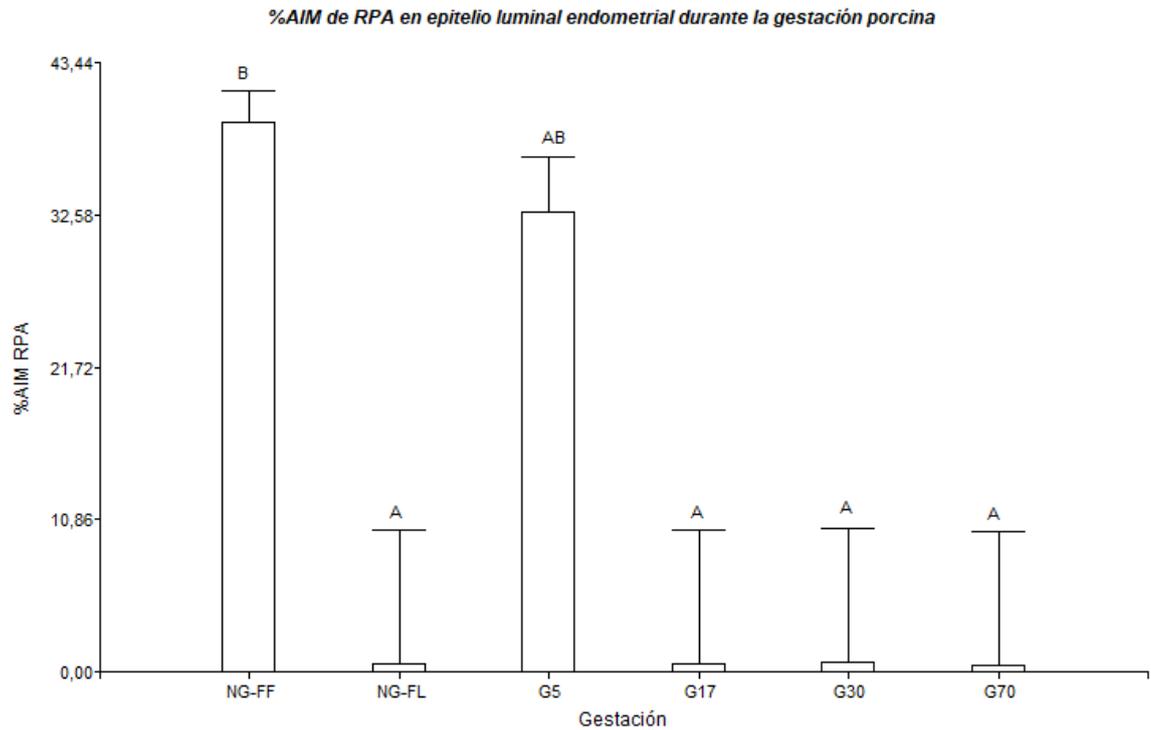


Figura 19: Determinación del %AIM de RPA en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### **Receptor de Progesterona isoforma A en epitelio glandular endometrial**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RPA en el epitelio glandular en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. En las cerdas G se observó un incremento en los valores del %AIM a los 17 dg (46,28%) para disminuir a los 30 y a los 70 dg (9,5; 13,33%; respectivamente,  $p < 0,0001$ ). No se observó diferencias significativas en el %AIM del RPA del epitelio glandular, entre NGFF y G de 5 y 17 dg (47,12% vs 34,03% y 46,28%; respectivamente,  $p > 0,05$ ). En las cerdas NG se halló diferencias significativas en la expresión entre NGFF vs NGFL (47,12% vs 20,49%;  $p < 0,0001$ ) (Figura 20; Tabla 9a, Anexo).

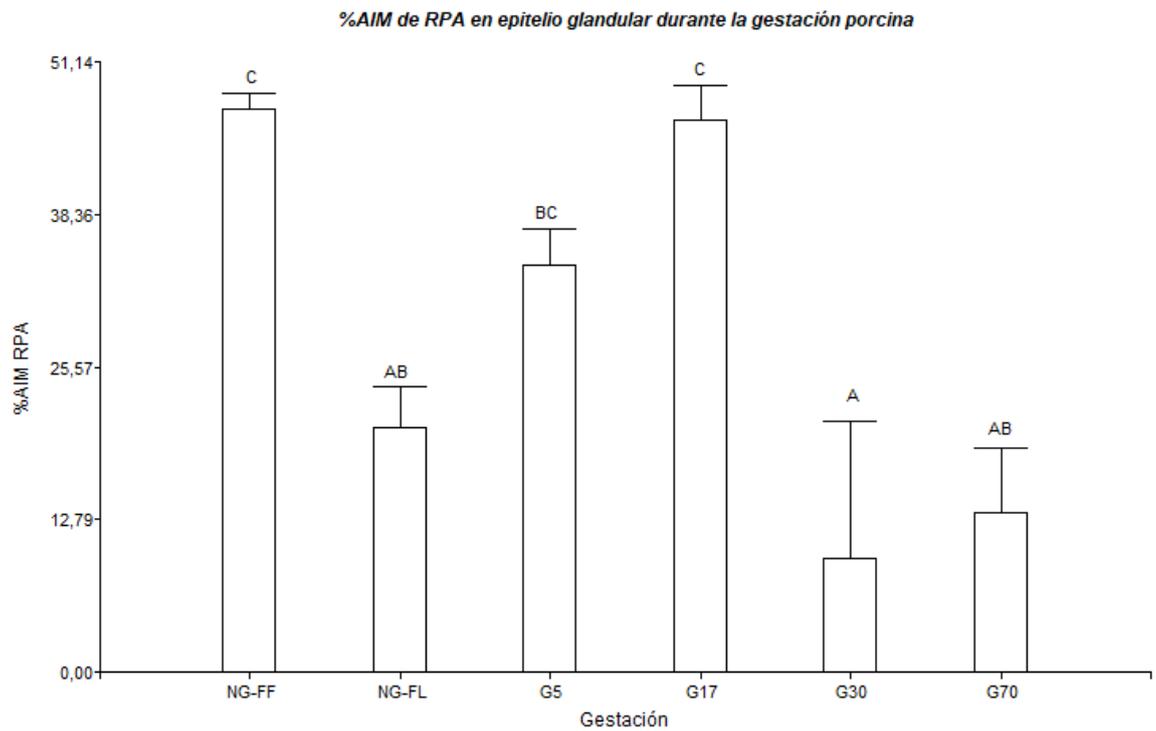


Figura 20: Determinación del %AIM de RPA en el epitelio glandular endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### **Receptor de Progesterona isoforma A en tejido conectivo endometrial**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RPA en el tejido conectivo en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. A los 5 dg se observa el mayor valor de %AIM en el tejido conectivo (5,21%) disminuyendo en cerdas G de 17, 30 y 70 dg (3,70; 2,85 y 2,72 %; respectivamente,  $p < 0,0001$ ). Se halló diferencias significativas entre el %AIM entre cerdas de 5 dg y NG, 30 dg y 70 dg (5,21 vs 3,12; 3,39; 2,85 y 2,72 %; respectivamente,  $p < 0,0001$ ) (Figura 21; Tabla 9a, Anexo).

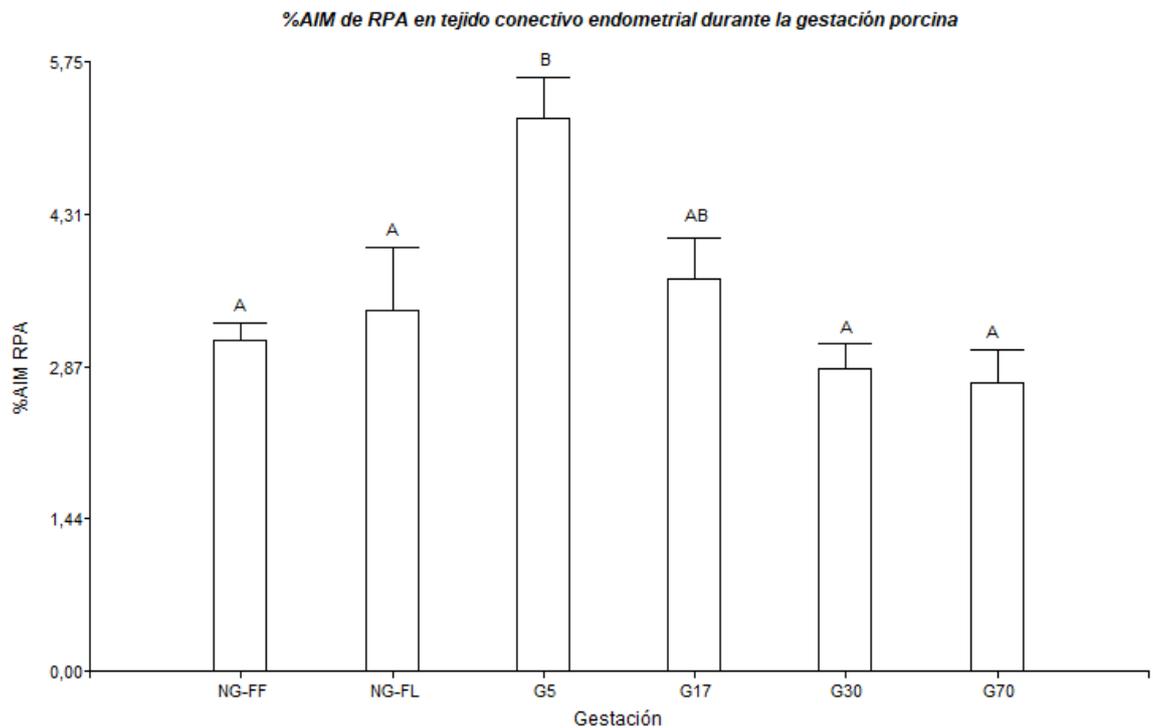


Figura 21: Determinación del %AIM de RPA en tejido conectivo endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### **Receptor de Progesterona isoforma A en Trofoblasto**

No se halló expresión del RPA en Trofoblasto de las cerdas G de los distintos períodos seleccionados.

### **DETERMINACIÓN DEL ÁREA INMUNOMARCADA DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA ISOFORMA B**

Se determinó la presencia del receptor de progesterona isoforma B (RPB) mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta sobre cortes desparafinados de úteros de cerdas no gestantes y en muestras de placenta materna y fetal de los distintos períodos gestacionales seleccionados y luego se estableció su %AIM.

### **Receptor de Progesterona isoforma B en tejido epitelial luminal endometrial**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RPB en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. Se halló diferencias significativas en el %AIM del epitelio luminal de las cerdas NGFF (22,56%) cuando se comparó con la expresión en las cerdas NGFL (0,58%) y las cerdas G de 5, 17, 30 y 70 dg (0,66; 0,61; 0,71 y 0,44%, respectivamente;  $p < 0,0001$ ). No se observó diferencias significativas en el %AIM de las cerdas NGFL vs las cerdas G de los distintos períodos seleccionados (0,58% vs 0,66; 0,61; 0,71 y 0,44%; respectivamente,  $p > 0,05$ ) (Figura 22; Tabla 10a, Anexo).

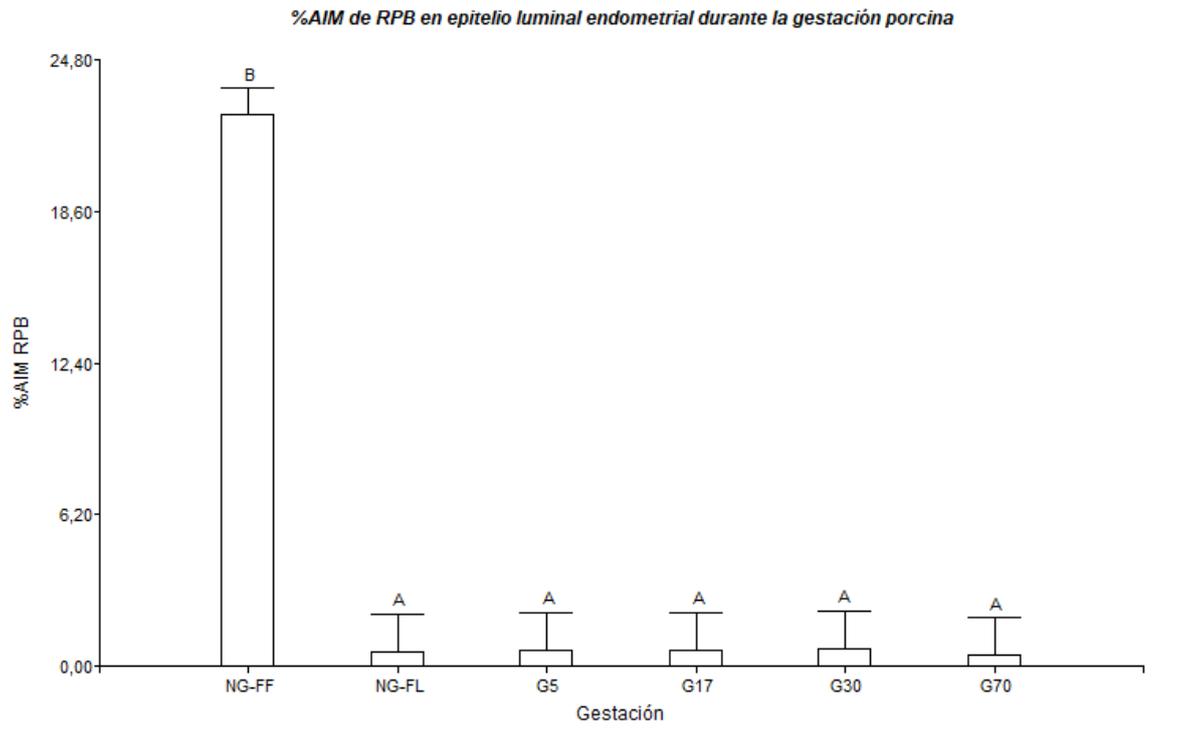


Figura 22: Determinación del %AIM de RPB en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### **Receptor de Progesterona isoforma B en epitelio glandular endometrial**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RPB en el epitelio glandular en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. Se observó diferencias significativas en el %AIM del RPB del epitelio glandular, entre NGFF y NGFL y G de los periodos gestacionales seleccionados (24,52% vs 0,71; 1,11; 0,36; 0,64 y 0,59%; respectivamente,  $p < 0,0001$ ) (Figura 23; Tabla 10a, Anexo).

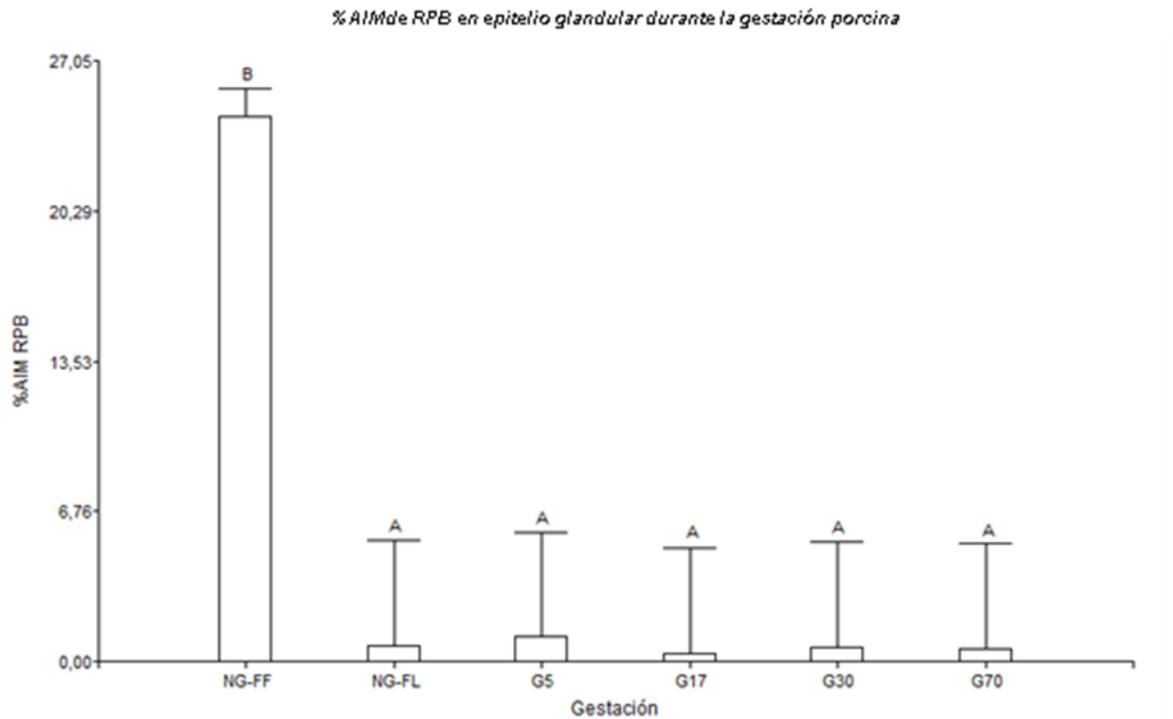


Figura 23: Determinación del %AIM de RPB en el epitelio glandular endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### **Receptor de Progesterona isoforma B en tejido conectivo endometrial**

Se realizó un análisis de la varianza entre las medias de los %AIM de la expresión del RPB en el tejido conectivo en muestras de endometrio NG y G de distintos períodos de gestación. No se observó diferencias significativas entre el %AIM del RPB en cerdas NGFF (3,43%) y cerdas de 30 dg (4,03%;  $p > 0,05$ ) (Figura 24; Tabla 10a, Anexo).

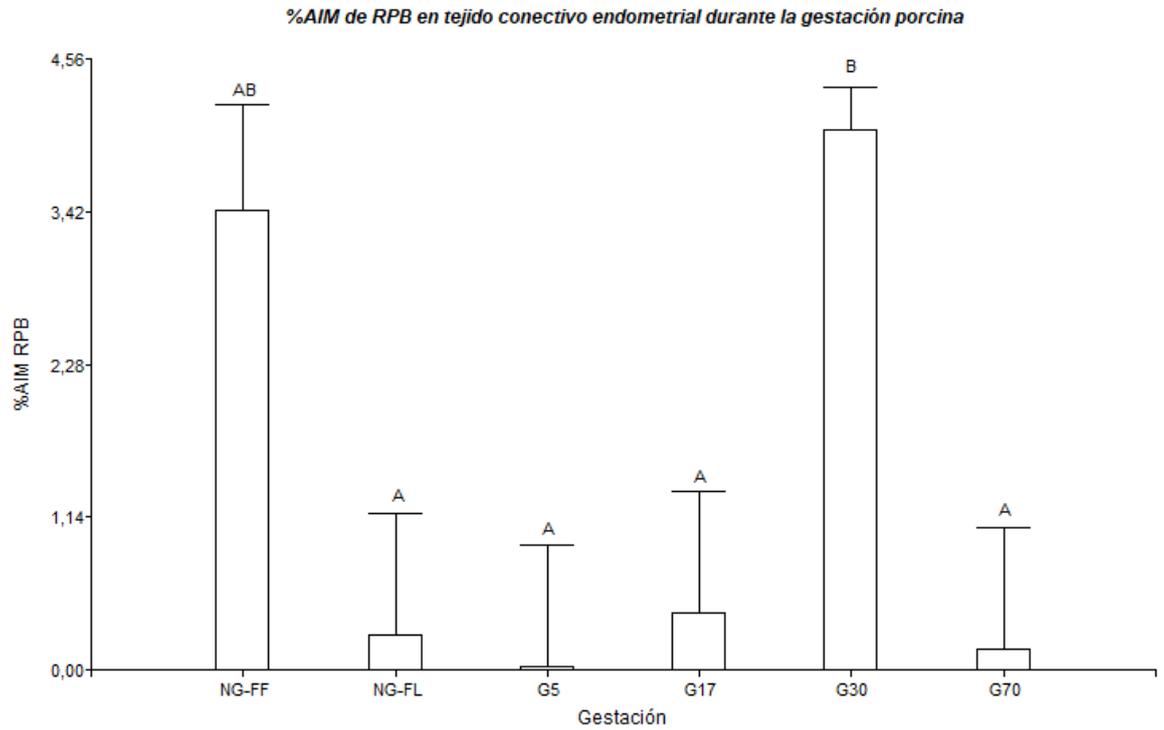


Figura 24: Determinación del %AIM de RPB en tejido conectivo endometrial no gestante (NG) y gestante (G) de los períodos gestacionales seleccionados (5 dg, 17 dg, 30 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### **Receptor de Progesterona isoforma B en Trofoblasto**

No se halló expresión del RPB en Trofoblasto de las cerdas G de los distintos períodos seleccionados.

## DISCUSIÓN

Pocos estudios investigan la relación entre los receptores nucleares de estrógenos y progesterona y la concentración de las hormonas esteroideas en la gestación porcina temprana. La progesterona y los estrógenos proporcionan un medio ambiente uterino favorable que aumenta la tasa de sobrevivencia prenatal en esta especie. Las experiencias de este trabajo de tesis fueron planificadas para identificar las relaciones entre las localizaciones de los receptores en diferentes tejidos placentarios endometriales y trofoblástico y su rol como blanco de acción de ligandos que promueven respuestas celulares específicas para permitir la implantación y mantener la gestación.

En la cerda gestante cada *conceptus* debe transformarse rápidamente para poder implantarse en un área específica de cada cuerno uterino; así como también el endometrio, particularmente el epitelio luminal y glandular uterino, debe estar preparado para permitir la nidación y la continuidad de la preñez. En esta interacción entre los *conceptuses* y el endometrio gestante, las señales químicas provenientes de cada uno son responsables de los cambios específicos en la expresión génica que producirán el remodelamiento celular, la implantación y las secreciones de diversos nutrientes, así como de la expresión de moléculas de adhesión (Williamson, 2011; Vélez, 2017) y del citoesqueleto (Bazer y Johnson, 2014).

Las principales hormonas esteroideas secretadas por el ovario, Es y P4, producen una serie de modificaciones en el endometrio y el miometrio de la cerda gestante que permiten la implantación de los embriones (Rider y col.; 1998; Senger, 2012).

Los estrógenos desempeñan un rol imprescindible 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. Además, intervienen en el transporte del embrión hacia los cuernos uterinos, en la migración y en el espaciamiento equidistante en el interior de los cuernos uterinos antes de la elongación rápida y adhesión a la superficie endometrial (Bazer y Johnson, 2014; Ka y col., 2018; Meyer y col., 2019).

Los valores de Es sistémicos encontrados en nuestro trabajo indican concentraciones altas en cerdas NG en fase folicular, datos que acuerdan con las observaciones de Sukjumlong y col. (2009), mientras que las concentraciones elevadas en cerdas gestantes de 5 días (Viglierchio y col., 2017) coinciden con las informadas por Williamson y col. (2008), Yaful (2009), Williamson (2011) y Ka y col. (2019). Las concentraciones disminuyen a los 17 días para aumentar nuevamente a los 30 días. Estas variaciones en los niveles de estrógenos serían necesarias para la proliferación y diferenciación endometrial así como para la remodelación del trofoblasto durante la fase de implantación y post-implantación.

Las determinaciones de Es en los extractos maternos de las cerdas de 5 dg fueron menores que en los extractos uterinos de cerdas cíclicas ya sea en fase folicular como luteal, lo que indica actividad esteroideogénica en el endometrio uterino, datos informados por Franczak y Kotwica (2008), Yaful (2009), Williamson (2011), Whyte y col. (2018), Meyer y col. (2019).

Durante la etapa de pre- implantación y elongación de los *conceptuses* entre los 17 a 20 días determinamos diferencias significativas entre las concentraciones de Es en el componente placentario materno cuando se contrastan con las concentraciones de los extractos

placentarios fetales y los valores séricos en coincidencia con Franczak y Kotwica (2008), Yaful (2009) y Williamson (2011), siendo las concentraciones de Es del componente fetal más altas que en los extractos maternos. Estos datos reafirman la capacidad de sintetizar estrógenos del trofoblasto durante el período de elongación, resultados informados por Bazer y Thatcher en 1977, Bazer y Johnson (2014), Ziecik y col. (2017), Meyer y col. (2019). El rol de los estrógenos en esta etapa de la gestación según la hipótesis propuesta por Bazer y Thatcher (1977) es esencial para el reconocimiento materno de la preñez, e impedir la regresión del CL, al modificar la secreción de  $PGF2\alpha$  hacia el lumen uterino.

En los extractos maternos a los 30 dg se obtuvieron concentraciones de Es que se incrementaron en las etapas estudiadas a medida que se desarrolla la preñez, sin embargo los valores fueron claramente inferiores a los encontrados en extractos placentarios fetales provenientes de 17, 30 y 70 dg (Viglierchio y col., 2017), estos resultados concuerdan con investigaciones realizadas previamente por nuestro grupo de investigación (Williamson y col., 2008; Yaful, 2009; Williamson, 2011). Esos estudios sugieren que la presencia de Es es importante durante toda la gestación (Williamson, 2011), más allá del período de implantación en acuerdo con lo demostrado por Bazer y Thatcher en 1977 y propuesto por Whyte y col. (2018), Chatuphonprasert y col. (2018) y Meyer y col. (2019). Postulamos que la esteroidogénesis endometrial es esencial para proveer de estrógenos al endometrio uterino así como precursores o intermediarios que serán utilizados por los *conceptuses* para la síntesis de estrógenos fetales

Además de los estrógenos, en la mayoría de las especies mamíferas la presencia de la progesterona es crítica en todos los estadios de la gestación, incluyendo fertilización,

implantación, decidualización y mantenimiento de la gestación (Squires, 2006; Wetendorf y col., 2017).

En nuestras investigaciones determinamos que la concentración de P4 en suero en cerdas no gestantes en fase folicular fue inferior a la hallada durante la gestación temprana (Viglierchio y col., 2014) y a los valores hallados en las cerdas no gestantes en fase luteal. Estos datos coinciden con las determinaciones de Sukjumlong y col. (2009) y concuerdan con la luteinización y esteroidogénesis de progesterona por los cuerpos lúteos y el mantenimiento de los mismos a través de los períodos estudiados.

Con respecto a las concentraciones de P4 en suero de las cerdas gestantes observamos que las cerdas de 5 dg tuvieron menor concentración que las cerdas de 17-20 dg, estos resultados acuerdan con Yaful (2009), Sukjumlong y col. (2009) en sugerir que su rol a nivel sistémico es esencial para habilitar los cambios que permiten la adhesión e implantación (Viglierchio y col. 2014), y proveer de un útero quiescente, resultante de la unión de la P4 a sus receptores en el miometrio para promover una baja actividad miometrial en las diferentes etapas de la gestación.

Observamos una mayor concentración de P4 en suero durante los 17-20 dg, siendo este valor superior al hallado en cerdas de 5, 30 y 70 dg, estos datos sugieren un rol sistémico de la progesterona que se explicaría con la esteroidogénesis producida en los cuerpos lúteos y consistente con el aumento de peso de los mismos, determinado por Yaful en 2009. Este aumento de P4 y el descenso de estrógenos durante la fase de implantación permitirían

explicar el rol conjunto de estas dos hormonas para habilitar los cambios necesarios y permitir la adhesión e implantación de los *conceptuses*.

En nuestro laboratorio, a diferencia de los valores séricos hallados se obtuvieron altas concentraciones de P4 en extractos fetales a los 17 y 70 dg, sin embargo los valores fueron claramente inferiores a los encontrados en extractos placentarios maternos provenientes de cerdas de 5, 17, 30 y 70 dg. Acordamos con Yaful y col. (2005) que determinaron altas concentraciones de P4 en los extractos placentarios fetales en el período de post-implantación, cuando sugirieron que la placenta fetal es una fuente alternativa de producción de P4 durante la preñez porcina, en tanto diferimos con Knight y Kukoly (1990) que observaron que la concentración de P4 placentaria en cultivos *in vitro* aumenta linealmente entre los 25 y los 40 días, puesto que estos autores no especifican el componente placentario fetal o materno que la sintetiza.

Algunos estudios con los cuales este grupo de investigación acuerda sugieren, además de la regulación sistémica promovida por la P4 y los Es, una regulación parácrina por parte de estas dos hormonas sobre las glándulas uterinas, ya que detectaron variaciones significativas en las concentraciones placentarias; por lo que postularon que dicha acción local se debería principalmente al componente de origen fetal debido a su marcada actividad de esteroidogénesis (Yaful, 2009). Por otro lado, Hafez y Hafez (2003) expresan que el rol de la P4 sérica es aumentar la actividad secretora de las glándulas del endometrio (Wetendorf y DeMayo, 2012) e inhibir la motilidad del miometrio por alteración de la permeabilidad iónica de los músculos del miometrio, provocando la disminución de la excitabilidad de la célula (Renthal y col., 2015; Morales-Lázaro y col., 2019).

Los Es y la P4 regulan la expresión génica al ligarse a proteínas específicas que actúan como receptores. Los receptores hallados en el presente trabajo corresponden a receptores nucleares que actúan como factor de transcripción activados por ligando (RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RPA y RPB) (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004; Sukjumlong y col., 2005; Koehler y col., 2005; Knapczyk y col., 2008; Sukjumlong y col., 2009; Durlej y col., 2010; Wetendorf y DeMayo, 2012; Steinhauser y col., 2017; Wetendorf y col., 2017).

Los receptores nucleares para estrógenos (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ) corresponden a proteínas sintetizadas a partir de genes ubicados en cromosomas diferentes que reconocen ligandos similares, tienen alta homología en la secuencia y se diferencian por su actividad transcripcional. Mientras que los RE $\alpha$  se consideran receptores que ejercen efectos proliferativos e inductores de la expresión de los RP (Knapczyk y col., 2008), el RE $\beta$  es un subtipo de REs no funcional, con efecto antiproliferativo y que promueve la diferenciación celular en presencia de ligando (Koehler y col., 2005).

En las cerdas NG observamos que la inmunexpresión nuclear positiva para el receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) se localizó en el epitelio glandular en las cerdas NGFF y NGFL y sólo en tejido conectivo de las NGFL, estos resultados coinciden con Sukjumlong y col. (2009); Bazer y Johnson (2014) y Ka y col. (2018) cuando manifiestan que el RE $\alpha$  es presente en el epitelio glandular entre el día 12 y 15 del ciclo estral y con las investigaciones que detectan expresión del ARNm endometrial más altas en el día 10, disminuye al día 15 y luego se incrementa en el día 18 del ciclo estral (Citado por Ka y col., 2018). Otros autores observaron inmunexpresión RE $\alpha$  en epitelio uterino del ciclo estral (Knapczyk-Stwora y col., 2011;

Citado por Ka y col, 2018), resultados que no concuerdan con las determinaciones obtenidos en nuestras investigaciones.

En cerdas gestantes no observamos expresión de RE $\alpha$  en el endometrio de los períodos estudiados, resultados que acuerdan con Ka y col. (2018) que manifiestan que este receptor permanece suprimido después del día 18 dg, a diferencia de Knapczyk-Stwora y col. (2011) que hallaron expresión de RE $\alpha$  durante la gestación en el endometrio.

Con respecto a la inmunoexpresión nuclear del RE $\beta$  en cerdas no gestantes, los datos obtenidos en nuestros estudios indican una mayor expresión del RE $\beta$  en fase folicular en epitelio luminal y glandular endometrial que en fase luteal y sólo en tejido conectivo de las cerdas NGFF. Estos resultados acuerdan con investigaciones que detectan niveles bajos de ARNm de RE $\beta$  en todas las etapas del ciclo estral (Sukjumlong y col., 2009) y con los estudios que localizan baja intensidad de expresión de RE $\beta$  en fase luteal temprana (Knapczyk-Stwora y col., 2011).

En las cerdas gestantes de 5 y 17 dg observamos inmunomarcación de RE $\beta$  en el epitelio luminal y glandular endometrial. Estos resultados coinciden con Sukjumlong y col. (2009) y Knapczyk-Stwora y col. (2011), que hallan expresión endometrial en cerdas gestantes similares a las cerdas de fase luteal temprana. Por otra parte, en nuestro estudio hallamos localización de RE $\beta$  en células epiteliales trofoblásticas en gestaciones de 17 dg, mientras que en otras investigaciones hallan RE $\beta$  sobre el día 12 de gestación en el trofoblasto del *conceptus* sin dilucidar la función y la regulación en los cerdos (Ka y col., 2018). En base a estos hallazgos postulamos que los estrógenos de los *conceptuses* se ligan a los RE $\beta$  en el

epitelio trofoblástico y en el epitelio glandular endometrial para promover la síntesis y liberación de moléculas que participan en un diálogo espacio - temporal entre los embriones y la hembra porcina que permitan la adhesión e implantación.

En las cerdas de 30 dg observamos expresión nuclear del RE $\beta$  en epitelio glandular endometrial, datos que coinciden parcialmente con las investigaciones de Knapczyk-Stwora y col. (2011), puesto que estos autores detectan RE $\beta$  también en epitelio luminal y además observan expresión esporádica en las células estromales en esta fase de gestación. Teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio de investigación, sugerimos que la expresión de RE $\beta$  puede estar relacionada con la observación de Vélez en 2017 de IL-1 $\beta$  en la interfase placentaria porcina que por su comportamiento proinflamatorio estaría participando como regulador de las moléculas de adhesión.

Observamos a los 70 dg en epitelio trofoblástico inmunomarcación de RE $\beta$  hipotetizando que los estrógenos fetales se ligan a los RE $\beta$  para promover la síntesis y liberación de moléculas de señalización relacionadas con el remodelamiento placentario (Viglierchio y col., 2017). La inmunoexpresión de RE $\beta$  coincide con la observación de Vélez en 2017 de un pico de concentración de IL- 1 $\beta$  en la placenta fetal y un aumento de expresión de la integrina  $\alpha v\beta 3$  a los 60 dg. Sugerimos una dependencia de la citoquina proinflamatoria y de la molécula de adhesión con los Es y su receptor RE $\beta$  con su rol de modulación de cambios fisiológicos, previos a la intensa remodelación placentaria a los 70 dg en la que predomina un ambiente proapoptótico (Cristofolini, 2010; Vélez, 2017).

El crecimiento del *conceptus* y su implantación no sólo está regulado por la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo sino también por la expresión de receptores de progesterona en el epitelio y el estroma uterino (Geisert y col., 2006; Wetendorf y DeMayo, 2012; Steinhauser y col., 2017; Wetendorf y col. 2017). Las respuestas morfológicas y fisiológicas de la P4 están mediadas por la interacción con receptores hormonales específicos. El RP inhibe la proliferación epitelial inducida por estrógenos y activa genes claves de progesteronas que regulan la implantación.

Con respecto a las isoformas del RP (RPA y RPB), RPA actúa como un represor dominante de la isoforma B y además disminuye la respuesta a otras hormonas esteroideas tales como andrógenos y estrógenos. Mientras que RPB actúa como una isoforma activadora de genes claves de progesterona (Attar y col., 2000; Wu y DeMayo, 2017; Steinhauser y col. 2017).

En las cerdas NGFF y NGFL observamos inmunotinción nuclear del receptor de progesterona isoforma A (RPA) en el epitelio glandular y tejido conectivo; y sólo en el epitelio luminal de las cerdas NGFF (Viglierchio y col., 2013), determinaciones que coinciden con otras investigaciones que localizan los RP por inmunohistoquímica en el núcleo de todos los tipos celulares del útero durante las diferentes fases del ciclo estral (Sukjumlong y col., 2005; Steinhauser y col. 2017; Ka y col., 2018). En contraste, no acordamos con Sukjumlong y col. (2009) que observaron una baja expresión del ARNm del RP en el endometrio, sin embargo coincidimos en la expresión de RPA y en los altos niveles del ARNm de RP en el miometrio.

En las cerdas gestantes de 5 dg determinamos expresión de RPA en epitelio luminal y glandular, estroma y miometrio (Viglierchio y col., 2013), en coincidencia con Sukumlong y col., 2005; Steinhäuser y col. (2017) y Ka y col. (2018) y en discrepancia con los estudios de Ying y col. (2000) que al día 6 de gestación en período de blastocito, no observaron RP en epitelio luminal.

Los datos obtenidos en las cerdas de 17 dg manifiestan inmunexpresión de RPA en epitelio glandular y tejido conectivo y no en epitelio luminal. Postulamos que el crecimiento y la implantación de los *conceptuses* están asociados con la desaparición temporal de los RPA en epitelio luminal uterino, a pesar de las altas concentraciones de progesterona sérica detectada en este periodo de gestación. Esta ausencia de RPA se considera un pre-requisito para la receptividad uterina a la implantación, la expresión génica del epitelio luminal y es consistente con la expresión de moléculas de adhesión que promueven la interacción entre el epitelio trofoblástico y el epitelio materno. La progesterona inhibiría la expresión de sus receptores mediante la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Otros estudios *in vivo* demostraron la importancia de la expresión del RP en el estroma, no pudieron demostrar su rol en la función uterina en el epitelio luminal (Wetendorf y col., 2017). En ovejas, la concentración de P4 regula negativamente la expresión de los RP en el endometrio luminal y en el epitelio de la superficie glandular (Spencer y col., 2004b).

En las cerdas de gestaciones de 30 y 60-70 dg hallamos expresión nuclear del RPA en epitelio glandular y tejido conectivo, estos datos coinciden con Okulicz y col., 1998; Ying y col., 2000; Sukjumlong y col., 2005; Yaful, 2009; Steinhauser y col., 2017; Ka y col., 2018 que hallaron expresión de RP, sin embargo es importante remarcar que esas investigaciones no discriminan entre la isoforma RPA ni RPB.

Nuestros resultados determinan la presencia de RPA en cerdas gestantes y observamos a partir de la fase de pre-implantación una disminución de la expresión de RPA en intensidad y en los diferentes tejidos analizados, de manera que entre los 30 a 70 dg la expresión se mantiene en el estroma pero disminuye hasta desaparecer en glándulas uterinas.

En las cerdas NGFF y NGFL se halló inmunotinción del receptor de progesterona isoforma B (RPB) en epitelio luminal, glandular y tejido conectivo endometrial. Se observó inmunotinción del RPB en tejido conectivo endometrial, en cerdas de 30 dg.

Finalmente nuestros resultados determinan que la expresión del RPA es mayor que la expresión de RPB, siendo la isoforma A la predominante en las cerdas gestantes en los tejidos analizados. Además la inmunoexpresión del RPA disminuye en los tejidos analizados a medida que avanza la gestación.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos de la expresión de los receptores de Es y P4 y las concentraciones de las hormonas esteroideas analizamos el diálogo entre las hormonas Es y P4 y sus receptores y observamos en las cerdas no gestantes en fase folicular una tendencia a incrementar la expresión de RPA cuando aumenta la concentración de Es en el HoM y de P4

en el suero, por lo que hipotetizamos que son los Es los que a través de su interacción sobre sus receptores específicos (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ) inducen la síntesis en el endometrio uterino de RPA para preparar la unión de la progesterona a sus receptores.

Con respecto a las cerdas de 15 a 17 dg observamos una diferencia significativa entre los valores sistémicos de P4 y Es en suero, HoM y HoF con predominio de la concentración de esteroides en el homogenato fetal. En esta etapa gestacional el diálogo entre las hormonas esteroideas y sus receptores específicos en los *conceptuses* y el endometrio adquiere un rol crucial en el reconocimiento materno de la preñez y en la implantación exitosa. Proponemos que los Es fetales interactúan con los RE $\beta$  expresados en el epitelio trofoblástico y glandular endometrial; estableciendo una vía de señalización que promueve la diferenciación en la interfase entre los epitelios modulando la expresión de integrinas y sus ligandos para lograr una exitosa implantación y mantenimiento de la gestación. Además, los Es fetales podrían promover un cambio de polaridad en la célula epitelial luminal para permitir la excreción de la PGF2 $\alpha$  hacia la luz uterina, impidiéndose de esta manera la luteólisis. Por otro lado, participando en forma conjunta con los Es, la P4 sérica y fetal se une específicamente a los RPA del estroma, del epitelio glandular y del miometrio para habilitar los cambios necesarios en el epitelio uterino que permiten el contacto, la adhesión, la implantación y la nutrición histotrófica de los *conceptuses*. Sugerimos que este diálogo espacio temporal específicamente regulado en la interfase entre la cerda y los embriones forma parte de las señales de reconocimiento materno de la gestación en la especie porcina y promueve la inmunotolerancia por parte del endometrio induciendo la expresión de moléculas que modulan el comportamiento del tejido materno.

En las cerdas gestantes de 70 dg el aumento de los niveles de P4 en suero y Es y P4 en los homogenatos fetales, se corresponde con la inmunoexpresión de RPA endometriales y de RE $\beta$  en epitelio trofoblástico. A partir de esta interacción, P4 - RPA en el componente placentario materno y Es - RE $\beta$  en el componente placentario fetal, aseveramos que esta comunicación sostiene la gestación y promueve la síntesis y liberación de moléculas de señalización y sus receptores relacionadas con la remodelación placentaria en esta etapa de la gestación.

Nuestros resultados sugieren que en la hembra gestante las células del estroma uterino controlan o regulan la respuesta de las células epiteliales para permitir el acercamiento y contacto del *conceptus*. Diálogo que se establece a través de redes de señalización que son producidas por señales moleculares endócrinas, parácrinas y autócrinas que promueven la comunicación entre el *conceptus* y el endometrio permitiendo una gestación exitosa.

## CONCLUSIONES

Es de remarcar que aunque la progesterona es la hormona de la gestación, la expresión de sus receptores nucleares de respuesta genómica no se relaciona en forma directa con la concentración de su ligando en suero o en los tejidos maternos y fetales, particularmente a los 15-20 días de gestación, donde el incremento de P4 es significativo y los receptores específicos no se encuentran en el epitelio endometrial. La ausencia de inmunolocalización de RPA en el epitelio uterino, en fase de perimplantación y postimplantación, es un marcador de receptividad ya que permite la expresión de moléculas que intervienen en el anclaje y posterior adhesión e implantación de los *conceptuses*.

Por los resultados hallados en este estudio se postula que durante la gestación temprana es determinante la relación temporal entre las concentraciones séricas de Es y P4, y la expresión de los receptores nucleares específicos ya que la expresión temporo - espacial de los receptores promueve las señalizaciones de cada hormona y que el descenso de Es hallado entre los 15-20 días de preñez que se acompaña de un aumento de P4, y de una desaparición de los RPA en el epitelio luminal uterino es importante para la implantación de los productos y la continuidad de la preñez, dado que las concentraciones sistémicas son las que acondicionarían el organismo de la cerda para mantener la gestación.

Además, existiría en esta especie una regulación parácrina especial en la interfase feto materna por parte de las hormonas esteroideas, donde los Es placentarios, principalmente los de origen fetal provocan la diferenciación del estroma uterino durante la gestación temprana,

proceso necesario para estimular y regular la síntesis de los receptores de progesterona y de factores de crecimiento.

Se hipotetiza que los cambios en los parámetros reproductivos uterinos estarían determinados no solo por la concentración sérica de las hormonas gestacionales sino también, y de manera determinante, por la presencia de P4 y Es en la interfase feto materna, hormonas producidas de manera regulada por la placenta, principalmente por el componente de origen fetal. Y que esas hormonas para poder expresar su potencial de información génica deben ligarse a un receptor específico, por lo tanto la presencia de los receptores permite la transducción de la información en una cascada de señalización cuyo resultado será la expresión o represión de la información génica.

Las dos hormonas esteroides por su composición química lipídica difunden a través de las membranas plasmáticas. Por lo que se postula que la P4 sintetizada por la placenta ejerce su acción principalmente sobre el endometrio gestante y la interfase feto-materna sobre los RPA. En tanto que los Es fetales, además de regular la expresión de sus propios receptores RE $\beta$  y otras moléculas de la interfase como citoquinas y factores de crecimiento, serían necesarios para los embriones/fetos durante la preñez temprana.

Se postula que las altas concentraciones de progesterona placentaria fetal contribuirían en la interfase feto materna para inducir particularmente la diferenciación glandular a través de la unión con los RPA y la secreción de proteínas uterinas, por lo que su uso sería estrictamente local, metabolizándose en la interfase.

Se remarca el hallazgo de la expresión del receptor nuclear de estrógenos  $\beta$  que junto a las hormonas sintetizadas y secretadas por la placenta fetal, marcan una intensa actividad esteroidogénica y de modulación de la proliferación del embrión/feto como de la respuesta en el endometrio materno, tanto en la etapa de implantación como en la etapa de finalización de las remodelaciones placentarias. Los estrógenos fetales actuarían durante la gestación temprana principalmente a nivel de la interfase feto-materna para permitir una gestación exitosa.

**Al determinar que la placenta fetal es fuente de Es y P4, futuros desarrollos podrían contribuir a discernir el rol conjunto de la placenta fetal y de los cuerpos lúteos.**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Amoroso EC. Placentation. In: Physiology of Reproduction. Marshall's editors, London, 1952, Vol 2, p. 127-331.
2. Attar R. Receptores Nucleares. En: Kazanietz M. Farmacología Molecular. Receptores, transducción de señales y activación de genes. 1° edición. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires, 2000, p. 307 – 324.
3. Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. Mechanisms for the establishment and maintenance of pregnancy: synergies from scientific collaborations. Biol Reprod. 2018; 99(1):225-241.
4. Bazer FW, Johnson GA. Pig blastocyst-uterine interactions. Differentiation. 2014; 87, 52–65.
5. Bazer FW, Thatcher WW. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F2 $\alpha$  by the uterine endometrium. Prostaglandins. 1977; 14:111-129.
6. 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):135-152.
7. Bosch RA, Alanis GA, Allende RA, Blanch MS, Bosch P, Callejas S. En: Actualización en temas de reproducción animal. Córdoba, Argentina: Compilador, Bosch R.A; Universidad Nacional de Río Cuarto, editores, 2001, p. 150-152.
8. Broes A, LeBlanc SJ. Comparison of commercial progesterone assays for evaluation of luteal status in dairy cows. Can Vet J. [internet]. 2014; 55(6): 582-584. [PMC free article]

9. Celani M, Fernández Surribas J, von Lawzewitsch I. Lecciones de Histología Veterinaria. Volumen 1. Ed Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. 1984, p. 36.
10. Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K, Ellinger J. Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta. Front Pharmacol. 2018; 9(1027): 1-29.
11. Cristofolini AL. Estudio de la remodelación celular durante la placentación porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. 2010.
12. Cruzado Ruiz E. Caracterización de la comercialización de carne de cerdo (*Sus scrofa domesticus*) en la ciudad de Bambamarca, periodo 2018. Tesis de Grado. Escuela Académico Profesional de Ingeniería en Agronegocios - Sede Bambamarca, Universidad Nacional de Cajamarca. 2019.  
<http://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/2869>
13. Culasso L. Asociación Argentina de Productores Porcinos (AAPP). 2019.
14. Durlej M, Tabarowski Z, Slomczynska M. Immunohistochemical study on differential distribution of progesterone receptor A and progesterone receptor B within the porcine ovary. Anim Reprod Sci. 2010; 121: 167-173.
15. Fernández V, Barrales H, Compagnoni M, Williams S. Cap. 33. Fisiología del ciclo estral de la cerda. En: Stornelli MA, De la Sota RL (Coord.). Manual de Reproducción de animales de producción y compañía. 1ra. edición. La Plata, Buenos Aires, Argentina. Ed. Edulpa, 2016. p 453-456.
16. Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide. IJ1.46r. 2012 [internet] [Disponible en: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>]

17. Flöter VL, Bauersachs S, Fürst RW, Krebs S, Blum H, Reichenbach M, Ulbrich SE. Exposure of pregnant sows to low doses of estradiol-17 $\beta$  impacts on the transcriptome of the endometrium and the female preimplantation embryos. Biol Reprod. 2019; Vol 100 (3): 624-640. <https://doi.org/10.1093/biolre/iyoy206>
18. Franczak A, Kotwica G. Secretion of estradiol-17  $\beta$  by porcine endometrium during early pregnancy and luteolysis. Theriogenology. 2008; 69: 283-289.
19. Franczak A, Zglejc K, Waszkiewicz E, Wojciechowicz B, Martyniak M, Sobotka W, Okrasa S, Kotwica G. Periconceptional undernutrition affects in utero methyltransferase expression and steroid hormone concentrations in uterine flushings and blood plasma during the peri-implantation period in domestic pigs. Reprod Fertil Dev. 2017; 29(8):1499-1508. doi: 10.1071/RD16124.
20. Freking BA, Leymaster KA, Vallet JL, Christenson RK. Number of fetuses and conceptus growth throughout gestation in lines of pigs selected for ovulation rate or uterine capacity. J Anim Sci. 2007; 85: 2093-2103.
21. Funke S, Beutgen VM, Bechter L, Schmelter C, Zurawski V, Perumal N, Pfeiffer N, Grus FH. An In-Depth View of the Porcine Trabecular Meshwork Proteome. Int J Mol Sci. 2019; 20, 2526.
22. Geisert RD, Ross JW, Ashworth MD, White FJ, Johnson GA, DeSilva 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: 131-145.
23. Geisert RD, Whyte JJ, Meyer AE, Mathew DJ, Juárez MR, Lucy MC, Prather RS, Spencer TE. Rapid conceptus elongation in the pig: An interleukin 1 beta 2 and estrogen-regulated phenomenon. Mol Reprod Dev. 2017; 84(9):760-774.

24. Giangrande PH, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. Recent Prog Horm Res. 1999; 54: 291-313; discussion 313-4.
25. Goizueta E. Proyecto de inversión: Criadero intensivo de cerdos. Servicios Agropecuarios. Tesis de Grado. Universidad Siglo 21. 2016 repositorio.uesiglo21.edu.ar
26. Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. Las isoformas del receptor a progesterona: función y regulación. Inv Clin. 2000; 52(6): 686-691.
27. Hafez ESE, Hafez B, editores. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7 ed. México (DF): McGraw-Hill Interamericana Editores; 2003.
28. Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, McCann SM, Gutkowska J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. Proc Natl Acad Sci. [internet] 2001; 98(20):11765-11770. [PMC free article].
29. Ka H, Seo H, Choi Y, Yoo I, Han J. Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin-1 $\beta$  at the time of implantation in pigs. J Anim Sci Biotechnol. 2018; 9:44.
30. Knapczyk K, Duda M, Szafranska B, Wolsza K, Panasiewicz G, Kozirowski M, Slomczynska M. Immunolocalisation of oestrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ) in porcine embryos and fetuses at different stages of gestation. Acta Vet Hung. 2008; 56: 221-233.
31. Knight JW, Kukoly CA. In vitro release of progesterone and estrone by the porcine throughout gestation. Domest Anim Endocrinol. 1990; 7(4):497-508.
32. Koehler KF, Helguero LA, Haldosen L-A, Warner M, Gustafsson J-A. Reflections on the Discovery and Significance of Estrogen Receptor  $\beta$ . Endocr Rev. 2005; 26(3):465-478.

33. Koncurat M, Greco C, Vivas A. Hallazgo del factor precoz de preñez (EPF) en extractos placentarios porcinos. Rev Brasil Reprod Anim. 1999; 3 (23):193-195.
34. Kowalski AA, Grady LG, Choi I, Katzenellenbogen BS, Simmen F, Simmen RCM. Expression of estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and  $\beta$  and progesterone receptor (PR) by porcine embryos suggests potential autocrine functions in development. Biol Reprod. 2000; 62: 106-113.
35. Krzymowski T, Stefanczyk-Krzybowska S. The oestrous cycle and early pregnancy – a new concept of local endocrine regulation. Vet J. 2004; 168(3):285-296.
36. Krzymowski T, Stefanczyk-Krzybowska S. The role of the endometrium regulation of the animal oestrous cycle. Reprod Domest Anim. 2008; 43:80-91.
37. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci. 1996; 93(12):5925-5930.
38. Luna LG. Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces. Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Company. 1968.
39. Marrable AW. The Embryonic Pig: A Chronological Account. Ed. Pitman Medical Exeter. London. 1971.
40. Mazzola W, Suquia J, Succurro G, Zanotti N. Los efectos de las intervenciones institucionales en el resultado económico de la producción porcina en la provincia de La Pampa. Semiárida Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam. 2017; 27(2):11-28 2. [http://dx.doi.org/10.19137/semiarida.2017\(02\).11-28](http://dx.doi.org/10.19137/semiarida.2017(02).11-28)
41. Meyer AE, Pfeiffer CA, Brooks KE, Spate LD, Benne JA, Cecil R, Samuel MS, Murphy CN, Behura S, McLean MK, Ciernia LA, Smith MF, Whitworth KM, Wells KD, Spencer TE, Prather RS, Geisert RD. New perspective on conceptus estrogens in

- maternal recognition and pregnancy establishment in the pig. Biol Reprod. 2019; pii: ioz058. doi: 10.1093/biolre/ioz058. [Epub ahead of print]
42. Miller MM, McMullen PD, Andersen ME, Clewell RA. Multiple receptors shape the estrogen response pathway and are critical considerations for the future of in vitro-based risk assessment efforts. Crit Rev Toxicol. 2017; 47(7):564-580.
43. Morales-Lázaro SL, González-Ramírez R, Rosenbaum T. Molecular Interplay Between the Sigma-1 Receptor, Steroids, and Ion Channels. Front Pharmacol. 2019; 10 (419): 1-12.
44. Mulac-Jericevic B, Conneely, OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. Reproduction. 2004, 128: 139-146.
45. Okulicz WC, Hild-Petito S, Chilton B. Expression of steroid hormone receptor in the pregnant uterus. Endocrinol Pregnancy. 1998; 4: 177-197.
46. Perry JS. The mammalian fetal membranes. J Reprod Fertil. 1981; 62:321-335.
47. Persson E, Sahlin L, Masironi B, Dantzer V, Eriksson H, Rodriguez-Martinez H. Insulin-like growth factor-I in the porcine endometrium and placenta: localization and concentration in relation to steroid influence during early pregnancy. Anim Reprod Sci. 1997; 46:261-281.
48. Pope WF, Maurer RR, Stormshak F. Intrauterine migration of the porcine embryo: influence of estradiol-17 beta and histamine. Biol Reprod. 1982; 27:575-579.
49. Pope WF. Embryonic mortality in swine. In: Zavy MT, Geisert RD, editores. Embryonic Mortality in Domestic Species. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994, p. 53-77.
50. Renner S, Dobenecker B, Blutke A, Zöls S, Wanke R, Ritzmann M, Wolf E. Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and

- translational diabetes research. Theriogenology. 2016; 86(1):406-421. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.055. Epub 2016 Apr 21.
51. Renthal NE, Williams KC, Montalbano AP, Chen CC, Gao L, Mendelson CR. Molecular Regulation of Parturition: A Myometrial Perspectives. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015; 5: a023069. 1-16.
52. Rider V, Kimler BF, Justice WM. Progesterone-growth factor interactions in uterine stromal cells (minireview). Biol Reprod. 1998; 59:464-469.
53. Senger P. Early Embryogenesis and Maternal Recognition of Pregnancy. In: Senger P. Pathways to pregnancy and parturition. 3<sup>o</sup> ed. Redmont, Or. Current Conceptions, 2012c. p. 284-303.
54. Shukla V, Kaushal JB, Kumar R, Popli P, Agnihotri PK, Mitra K, Dwivedi A. Microtubule depolymerization attenuates WNT4/CaMKII $\alpha$  signaling in mouse uterus and leads to implantation failure. Reproduction. 2019. REP-18-0611.R2. doi: 10.1530/REP-18-0611. [Epub ahead of print]
55. Sinkora M, Butler JE. The ontogeny of the porcine immune system. Dev Comp Immunol. 2009; 33(3):273-283.
56. Soede NM, Wetzels CCH, Zondag W, Koning MAI, Kemp B. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. J Reprod Fertil. 1995; 104:99-106.
57. Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. Reprod Biol Endocrinol. 2004a; 2: 49.
58. Spencer TE, Bazer FW. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. J Anim Sci. 2004b; 82: E4- 13.

59. Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. Anim Reprod Sci. 2004; 82-83: 537-550.
60. Squires EJ. *Endocrinología Animal Aplicada*. 1 ed. Editorial Acribia S.A.; 2006.
61. Stachowiak M, Szczerbal I, Switonski M. Genetics of Adiposity in Large Animal Models for Human Obesity-Studies on Pigs and Dogs. Prog Mol Biol Transl Sci. 2016; 140:233-70. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.01.001. Epub 2016 Mar 5.
62. Starling EH. The Croonian Lectures. On the Chemical correlation of the functions of the body. *The Lancet*. 1905; 166(4277), p. 501-503.
63. Steinhauser, CB, Bazer, FW, Burghardt, RC, Johnson GA. Expression of progesterone receptor in the porcine uterus and placenta throughout gestation: Correlation with expression of uteroferrin and osteopontin. Domest Anim Endocrinol. 2017; 58, 19–29.
64. Sukjumlong S, Dalin A-M, Sahlin L, Persson E. Immunohistochemical studies on the progesterone receptor (PR) in the sow uterus during the oestrous cycle and in inseminated sows at oestrus and early pregnancy. Reproduction. 2005; 129: 349-359.
65. Sukjumlong S, Persson E, Dalin A-M, Janson V, Sahlin L. Messenger RNA levels of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and progesterone receptors in the cyclic and inseminated/early pregnant sow uterus. Anim Reprod Sci. 2009; 112: 215-228.
66. Tang YQ, Li C, Sun XJ, Liu Y, Wang XT, Guo YB *et al.* Fructus Ligustris Lucidi modulates estrogen receptor expression with no uterotrophic effect in ovariectomized rats. BMC Complement Altern Med. [internet] 2018; 18(1): 118. Disponible en: pubmed central.
67. Tata JR. One hundred years of hormones. Embo reports. 2005, 6(6).

68. Tranguch S, Smith DF, Dey SK. Progesterone receptor requires a co-chaperone for signalling in uterine biology and implantation. Reprod Biomed Online. 2006; 13: 651-660.
69. van Leeuwen JJJ, Williams SI, Kemp B, Soede NM. Post weaning altrenogest treatment in primiparous sows; the effect of duration and dosage on follicular development and consequences for early pregnancy. Anim Reprod Sci. 2010; 119:258-264.
70. van der Lende T, van Rens BT. Critical periods for foetal mortality in gilts identified by analysing the length distribution of mummified foetuses and frequency of non- fresh stillborn piglets. Anim Reprod Sci. 2003; 75:141-150.
71. Vasconcellos A, Cisternas C, Paredes M. Estudio Inmunohistoquímico Comparativo del Receptor de Estrógeno en Tejido Endometrial de Ovejas Razas Texel y Araucana. Int J Morphol. 2014; 32(3):1120-1124.
72. Vélez CL. Integrinas y su regulación por el sistema inmune durante la gestación porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2017.
73. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Marrón Y, Moscovakis E, Koncurat M, Yaful G. Maternal-fetal communication: role of fetal estrogens in porcine pregnancy. VI SLIMP-Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta. Abstract. Placenta. 2017; Vol 51. [http://www.placentajournal.org/issue/S0143-4004\(17\)X0002-7?page=1](http://www.placentajournal.org/issue/S0143-4004(17)X0002-7?page=1)
74. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Murcia V, Yaful G. Localización de receptores de progesterona isoforma A en útero de cerdas no gestantes y placenta materna durante la gestación temprana. ALPA. 2014; 22, (3, 4): 81-85.

75. Wetendorf M, DeMayo FJ. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. Mol Cell Endocrinol. 2012; 357(1-2): 108-118.
76. Wetendorf M., Wu S-P, Wang X, Creighton CJ, Wang T, Lanz RB, Blok L, DeMayo FJ. Decreased epithelial progesterone receptor A at the window of receptivity is required for preparation of the endometrium for embryo attachment. Biol Reprod. 2017; 96(2): 313-326.
77. Whyte JJ; Meyer AE; Spate LD, Benne JA, Cecil R, Samuel MS, Murphy CN, Prather RS, Geisert RD. Inactivation of porcine interleukin-1 $\beta$  results in failure of rapid conceptus elongation. Proc Natl Acad Sci. 2018; 115(2):307-312.
78. Williamson DM. Estudio de la presencia de integrinas, y su relación con los niveles de esteroides e interleuquinas, durante la placentación porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2011.
79. Williamson DM, Yaful GN, Riesco OF, Koncurat MA. Progesterona, estrógenos y expresión de integrinas en la gestación temprana porcina. Ciencia Veterinaria. 2008; 10(1): 13-23.
80. Wilson ME, Ford SP. Effect of estradiol-17 beta administration during the time of conceptus elongation on placental size at term in Meishan pigs. J Animal Sci. 2000; 78: 1047-1052.
81. Wojciechowicz B, Kotwica G, Zglejc K, Waszkiewicz E, Franczak A. Expression of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the effects of LH, FSH and prolactin on oestrone and 17  $\beta$ -oestradiol secretion in the endometrium of pigs during early pregnancy and the oestrous cycle. Reprod Fertil Dev. 2016; 29(5): 975-984.

82. Yaful G, Riesco O, Koncurat M. Concentración de progesterona en placenta materna, fetal y líquido amniótico durante la gestación porcina. ALPA. 2005; 13:136-137.
83. Yaful GN. Estudio de la Placenta Porcina: Concentración de Hormonas Esteroides y Parámetros de Eficiencia Reproductiva. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2009.
84. Ying CW, Hsu WL, Hong WF, Cheng WTK, Yang YC. Estrogen receptor is expressed in pig embryos during preimplantation development. Mol Reprod Dev. 2000; 55: 83-88.
85. Zglejc-Waszak K, Waszkiewicz EM, Franczak A. Periconceptional undernutrition affects the levels of DNA methylation in the peri-implantation pig endometrium and in embryos. Theriogenology. 2019; 123:185-193.  
doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.10.002. Epub 2018 Oct 3.
86. Zhao L, Zhou S, Gustafsson JA. Nuclear receptors: recent drug discovery for cancer therapies. Endocr Rev. 2019; er.2018-00222. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00222> [Epub ahead of print]
87. Ziecik AJ. Old, new and the newest concepts of inhibition of luteolysis during early pregnancy in pig. Domest Anim Endocrinol. 2002, 23 (1-2): 265-275.
88. Ziecik AJ, Przygodzka E, Kaczmarek MM. Corpus Luteum Regression and Early Pregnancy Maintenance in Pigs. In R. Meidan (ed.). *The Life Cycle of the Corpus Luteum*. Springer International Publishing Switzerland, 2017, p. 227–248.

## ANEXO

### Determinación de Estrógenos en suero

**Tabla 1a:** Concentración de Estrógenos (pg/ml) en sueros de cerdas no gestantes en fase folicular y luteal, y de cerdas gestantes de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Estado Fisiológico	Estrógenos (pg/ml)
NGFF	52
NGFL	18
5 dg	34,86
17 dg	31
30 dg	31,60
70 dg	50

### Determinación de Estrógenos en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM)

**Tabla 2a:** Concentración de Estrógenos (pg/ml) en homogenatos de útero no gestante (HoUP) de cerdas no gestantes en fase folicular y luteal, y de cerdas gestantes (HoPM) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Estado Fisiológico	Estrógenos (pg/ml)
NGFF	567
NGFL	530,25
5 dg	346,8
17 dg	581,12
30 dg	974,96
70 dg	571,94

### Determinación de Estrógenos en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF)

**Tabla 3a:** Concentración de Estrógenos (pg/ml) en Homogenatos de placenta fetal de cerdas gestantes (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Estado Fisiológico	Estrógenos (pg/ml)
17 dg	7398,75
30 dg	2064
70 dg	2632,25

### Determinación de Progesterona en suero

**Tabla 4a:** Concentración de Progesterona (ng/ml) en sueros de cerdas no gestantes en fase folicular y luteal, y de cerdas gestantes de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Estado Fisiológico	Progesterona (ng/ml)
NGFF	0,59
NGFL	21,09
5 dg	25,99
17 dg	38,36
30 dg	26,09
70 dg	25,72

### Determinación de Progesterona en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM)

**Tabla 5a:** Concentración de Progesterona (ng/ml) en homogenatos de útero no gestante (HoUP) de cerdas no gestantes en fase folicular y luteal, y de cerdas gestantes (HoPM) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Estado Fisiológico	Progesterona (ng/ml)
NGFF	0,57
NGFL	1,36
5 dg	0,98
17 dg	1,79
30 dg	1,35
70 dg	2,25

### Determinación de Progesterona en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF)

**Tabla 6a:** Concentración de Progesterona (ng/ml) en Homogenatos de placenta fetal de cerdas gestantes (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Estado Fisiológico	Progesterona (ng/ml)
17 dg	72,45
30 dg	31,14
70 dg	73,14

### Determinación del Receptor de Estrógenos $\alpha$

**Tabla 7a:** Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) del Receptor de Estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) del epitelio luminal y glandular y tejido conectivo endometrial en distintos períodos de gestación. NGFF: no gestante fase folicular; NGFL: no gestante en fase luteal. dg: días de gestación.

<b>Días Gestación (dg)</b>	<b>Epitelio luminal</b>	<b>Epitelio glandular</b>	<b>Tejido conectivo</b>
<b>NGFF</b>	1,03	21,98	5,32
<b>NGFL</b>	0,58	20,24	0,26
<b>5 dg</b>	0,66	1,11	0,03
<b>17 dg</b>	0,61	0,36	0,42
<b>30 dg</b>	0,71	0,64	0,05
<b>70 dg</b>	0,44	0,59	0,16

### Determinación del Receptor de Estrógenos $\beta$

**Tabla 8a:** Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) del Receptor de Estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ) del epitelio luminal y glandular, tejido conectivo endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NGFF: no gestante fase folicular; NGFL: no gestante en fase luteal. dg: días de gestación.

Días Gestación (dg)	Epitelio luminal	Epitelio glandular	Tejido conectivo	Trofoblasto
NGFF	15,73	22,31	3,16	
NGFL	12,31	19,89	0,26	
5 dg	7,22	6,74	0,03	
17 dg	0,61	20,58	0,42	15,71
30 dg	0,71	19,98	0,05	0,45
70 dg	0,44	0,59	0,16	26,70

### Determinación del Receptor de Progesterona isoforma A

**Tabla 9a:** Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) del Receptor de Progesterona isoforma A (PRA) del epitelio luminal y glandular, y tejido conectivo endometrial en distintos períodos de gestación. NGFF: no gestante fase folicular; NGFL: no gestante en fase luteal. dg: días de gestación.

<b>Días Gestación (dg)</b>	<b>Epitelio luminal</b>	<b>Epitelio glandular</b>	<b>Tejido conectivo</b>
<b>NGFF</b>	39,18	47,12	3,12
<b>NGFL</b>	0,58	20,49	3,39
<b>5 dg</b>	32,77	34,03	5,21
<b>17 dg</b>	0,61	46,28	3,70
<b>30 dg</b>	0,71	9,50	2,85
<b>70 dg</b>	0,44	13,33	2,72

### Determinación del Receptor de Progesterona isoforma B

**Tabla 10a:** Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) del Receptor de Progesterona isoforma B (PRB) del epitelio luminal y glandular, y tejido conectivo endometrial en distintos períodos de gestación. NGFF: no gestante fase folicular; NGFL: no gestante en fase luteal. dg: días de gestación.

<b>Días Gestación (dg)</b>	<b>Epitelio luminal</b>	<b>Epitelio glandular</b>	<b>Tejido conectivo</b>
<b>NGFF</b>	22,56	24,52	3,43
<b>NGFL</b>	0,58	0,71	0,26
<b>5 dg</b>	0,66	1,11	0,03
<b>17 dg</b>	0,61	0,36	0,42
<b>30 dg</b>	0,71	0,64	4,03
<b>70 dg</b>	0,44	0,59	0,16