



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**INTEGRINAS Y SU REGULACION POR EL SISTEMA INMUNE DURANTE LA
GESTACION PORCINA**

- **Autor:** M.V. VÉLEZ, Carolina Lucía
- **Director:** Dra. KONCURAT, Mirta Adriana
- **Codirector:** Dr. BARBEITO, Claudio Gustavo
- **Lugar de trabajo:** Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa

Miembros del Jurado

- Dra. DÍAZ, Alcira Ofelia (UNMDP)
- Dr. MÓRTOLA, Eduardo (UNLP)
- Dra. MUNDO, Silvia (UBA)

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Dra. Mirta Koncurat por su confianza, dedicación, instrucción, apoyo y paciencia constantes desde el inicio de esta tesis.

A mi co-director Dr. Claudio Barbeito por estar cada vez que lo necesité y todas las correcciones y enseñanzas en mi camino por esta tesis.

A los miembros jurados de esta tesis, Dra. Alcira Díaz, Dr. Mórtola Eduardo y Dra. Mundo Silvia, por sus aportes en cada informe de avance.

A mis compañeros de investigación, a todo el grupo de investigación, agradezco por cada momento compartido juntos en el laboratorio y cursos, aprendiendo técnicas y metodologías, compartiendo ideas y llevando adelante esta línea de investigación que tanto nos apasiona.

A mi marido Alejandro, por el apoyo incondicional en cada momento de este trabajo y los sacrificios que vivimos junto a nuestros hijos Valentina, Agustina y Santino; congresos, viajes, cursos afuera; siempre caminando juntos hacia adelante.

A mis padres Mari y Ricardo, por estar siempre incondicionalmente, cuidando nietos, dándome fuerzas y aliento, en todo momento para ayudarme a poder doctorarme.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLPam, por haber permitido llevar este estudio adelante y brindarme ayuda económica cada vez que necesité para capacitación o congresos.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, por aceptar mi plan de tesis y apoyar este estudio en placenta porcina y permitirme la oportunidad de doctorarme en ciencias veterinarias.

A CONICET, por su aceptación en el estudio de este proyecto en placenta porcina y brindarme la beca interna doctoral que permitió la realización de esta tesis doctoral.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
INDICE	V
PRESENTACIONES EN CONGRESOS	X
PUBLICACIONES	XVIII
ABREVIATURAS	XIX
LISTA DE TABLAS.....	XXII
LISTA DE FIGURAS	XXVII
RESUMEN.....	XXXIX
SUMMARY	XLI
INTRODUCCIÓN.....	1
Producción porcina.....	1
Hembra Porcina	5
Ciclo estral	5
Gestación Porcina	7
Moléculas de adhesión y sus ligandos en la gestación	10
Integrinas.....	10
Integrina $\alpha v\beta 3$	12
Integrina $\alpha 5\beta 1$	13
Ligandos	14
Fibronectina:.....	15
Laminina:.....	16
Colágeno V:.....	16
Sistema inmunológico en la gestación.....	18
Citoquinas en la gestación porcina	23
Interleuquina 1 β (IL-1 β)	23
Interleuquina 2 (IL-2).....	25

Interleuquina 4 (IL-4).....	26
Interleuquina 10 (IL-10):	27
Objetivo General	30
Objetivos Específicos.....	30
Hipótesis	30
MATERIALES y MÉTODOS	31
Animales	31
Tractos Reproductivos	31
Extracción de sangre	34
Obtención de Suero.....	34
Obtención de homogenatos de placenta materna (HoPM), homogenatos de placenta fetal (HoPF) y de útero no gestante porcino (NGM)	34
Análisis de la estructura de la placenta y útero.....	35
Determinación de integrinas y sus ligandos.....	35
Inmunohistoquímica	36
Técnica de Cuantificación de imágenes.....	39
Determinación de la concentración de interleuquinas (ILs) en NGM, HoPM, HoPF y Sueros de cerdas gestantes y no gestantes.....	44
Determinación de IL-1 β	44
Determinación de IL-2	45
Determinación de IL-4	45
Determinación de IL-10	45
Análisis de los resultados – Estadística	46
Integrinas y ligandos.....	46
Interleuquinas	47
DETERMINACION DE LA EXPRESIÓN DE INTEGRINAS Y SUS LIGANDOS MEDIANTE EL USO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.	48

Integrina $\alpha v\beta 3$	48
Integrina $\alpha 5\beta 1$	52
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE LAS INTEGRINAS.	56
Fibronectina.....	56
Laminina	60
Colágeno V.....	64
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE INTEGRINAS Y SUS LIGANDOS MEDIANTE CUANTIFICACION DE IMÁGENES: DENSIDAD ÓPTICA Y PORCENTAJE DE ÁREA INMUNOMARCADA EN INTERFASE PLACENTARIA. ..	68
Densidad óptica (DO) de la integrina $\alpha v\beta 3$	68
DO de la integrina $\alpha v\beta 3$ en placenta materna	69
DO de la integrina $\alpha v\beta 3$ en placenta fetal	70
%AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$	72
%AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$ en placenta materna	74
%AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$ en placenta fetal.....	75
Densidad óptica (DO) de la integrina $\alpha 5\beta 1$	76
DO de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en placenta materna	78
DO de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en placenta fetal	79
%AIM de integrina $\alpha 5\beta 1$	80
%AIM de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en placenta materna	82
%AIM de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en placenta fetal.....	83
Densidad Óptica (DO) de fibronectina (FN).....	84
DO de la FN en placenta materna	85
DO de la FN en placenta fetal	86
%AIM de fibronectina (FN).....	87
%AIM de FN en placenta materna	88
%AIM de FN en placenta fetal.....	89

Densidad óptica (DO) de laminina (LAM)	90
DO de laminina en placenta materna.....	92
DO de laminina en placenta fetal.....	93
%AIM de laminina (LAM)	94
%AIM de laminina en placenta materna.....	96
%AIM de laminina en placenta fetal	97
Densidad óptica (DO) del colágeno V (COLV)	98
DO de colágeno V en placenta materna.....	100
DO de colágeno V en placenta fetal	101
%AIM de colágeno V (COLV).....	102
%AIM de colágeno V en placenta materna	104
%AIM de colágeno V en placenta fetal	105
DETERMINACIÓN DE INTERLEUQUINAS	106
Determinación de Interleuquina 1 beta (IL-1 β).....	106
Determinación de IL-1 β en suero	106
Determinación de IL-1 β en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM).....	108
Determinación de IL-1 β en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF).....	110
Determinación de Interleuquina 2 (IL-2)	111
Determinación de IL-2 en suero.....	111
Determinación de IL-2 en Homogenatos de Placenta Materna	113
Determinación de IL-2 en Homogenatos de Placenta Fetal	115
Determinación de Interleuquina 4 (IL-4)	116
Determinación de IL-4 en suero.....	116
Determinación de IL-4 en Homogenatos de Placenta Materna	118
Determinación de IL-4 en Homogenatos de Placenta Fetal	120
Determinación de Interleuquina 10 (IL-10)	121

Determinación de IL-10 en suero	121
Determinación de IL-10 en Homogenatos de Placenta Materna	123
Determinación de IL-10 en Homogenatos de Placenta Fetal	125
DISCUSION.....	126
BIBLIOGRAFÍA	145
ANEXO	166
Determinación de la integrina $\alpha v\beta 3$	166
Determinación de la integrina $\alpha 5\beta 1$	168
Determinación de la Fibronectina	170
Determinación de la Laminina.....	172
Determinación de Colágeno V.....	174
Determinación de IL-1 β	176
Determinación de IL-2	177
Determinación de IL-4	178
Determinación de IL-10	179

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

1. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Clauzure, Mariángel; Koncurat, Mirta. Relación entre IL-1 β , $\alpha\beta3$ y fibronectina durante la gestación porcina. Argentina. Capital Federal. 2017. Jornada. Libro de resúmenes. V Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Con Referato.
2. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Koncurat, Mirta. IL-1 β , IL-2, IL-4 and IL-10 profile during porcine gestation. Puerto Varas, X Región, Chile. 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.
3. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Koncurat, Mirta. Determinación de IL-2 e IL-4 durante la gestación porcina. Argentina. Capital Federal. 2016. Comunicación Oral. Jornada. IIX Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria AAV. Con referato. Resumen publicado en Revista SOMEVE. Rev. med. vet. 2017;98(1):25–77. ISSN:1852-771X. <http://www.someve.com.ar/index.php/revista/ultimo-numero.html>
4. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; García, Mónica; Koncurat, Mirta. Determinación de IL-1 β e IL-10 durante la gestación 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.

5. Koncurat, Mirta; Williamson Delia; Bruni María; García Mónica; Garro Adriana; Gelada Marcos; Hernández, Mabel; Martín Pamela; Riesco Oscar; Salas, Carlos; Sampedro Florencia; Vélez, Carolina; Viglierchio, María Del Carmen. Estudio de Moléculas de Adhesión que Participan en la Placentación Porcina. Este proyecto forma parte del programa “Regulación de la placentación porcina por progesterona, moléculas de adhesión y el sistema inmunológico”. Comunicación Oral. Resumen. IX Jornada De Ciencia Y Técnica – II Jornada Interinstitucional Facultad De Ciencias Veterinarias – Facultad De Ingeniería UNLPam. 2015
6. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Riesco, Oscar; Martín, Pamela; García, Mónica; Yaful, Graciela; Koncurat, Mirta. Estrogens, progesterone and integrin-fibronectin interaction during porcine placentation. 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 2015. Con referato. Resumen publicado en la revista PLACENTA, VI SLIMP and V LASRI Meeting 2015; 36: 469-521. ISSN: 0143-4004.
7. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Martín, Pamela; Sampedro, Florencia; Koncurat, Mirta. Inmunoexpresión de Integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, laminina y fibronectina en interfase placentaria porcina. Chile. Puerto Varas. 2015. Comunicación Oral. Libro. Resumen. Congreso. XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal y XL Congreso de la Sociedad Chilena de Producción Animal, SOCHIPA. – ALPA. Con referato.

8. Vélez, Carolina; Koncurat, Mirta. Perfil de IL-1 β durante la gestación porcina. Argentina. Tandil. 2015. Libro. Resumen. Jornada. II Jornada Internacional- VIII Jornada y Reunión Anual. AAV. Con referato.
9. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Martín, Pamela; Koncurat, Mirta. Estrógenos y expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ y fibronectina en la interfase feto-placentaria durante la gestación porcina. Argentina. Mar del Plata. 2014. Libro. Resumen. Congreso. XVIII Jornadas de Actualización Porcina, XII Congreso Nacional de Producción Porcina, VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. Facultad de Ciencias Veterinarias UNRC. Con referato. Publicado en página online ENGORMIX <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/estrogenos-expresion-integrina-avb3-t31676.htm>
10. Vélez, Carolina; Barbeito, Claudio; Koncurat, Mirta. Estudio de Integrinas y su Regulación por el Sistema Inmune Innato y Adquirido durante la placentación porcina. Comunicación Oral. Argentina. Mar del Plata. 2014. Comunicación Oral. Resumen. Congreso. XVIII Jornadas de Actualización Porcina, XII Congreso Nacional de Producción Porcina, VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. Facultad de Ciencias Veterinarias UNRC. Presentación publicada en página online ENGORMIX <https://www.engormix.com/MA-porcicultura/videos/gestacion-porcina-video-carolina-velez-cppmcnpp-2014-t30581.htm>
11. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Sampedro, Florencia; Martín, Pamela; García, Mónica; Koncurat, Mirta. Expresión de integrinas $\alpha v\beta 3$ y fibronectina en interfase placentaria porcina. Argentina. La Plata. 2014. Libro. Resumen. Congreso. XVI Congreso

- de Ciencias Morfológicas y 13º Jornadas de Educación en Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Con referato.
12. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; García, Mónica; Riesco, Oscar; Martín, Pamela; Sampedro, Florencia; Koncurat, Mirta. Progesterona y expresión de las integrinas $\alpha v \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$ y su ligando fibronectina en la interfase feto-materna de la gestación porcina. Argentina. Buenos Aires. 2014. Libro. Resumen. Jornada. VII Jornadas y Reunión Anual AAV 2014. Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria, UBA. Con referato.
13. Vélez, CL; Koncurat, M. Estudio de Integrinas y su Regulación por el Sistema Inmune Innato y Adquirido durante la placentación porcina. Jornada Científico-Tecnológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Comunicación Oral. Resumen publicado en la Revista ANALECTA VET 2014; 34(1-2) p87. Impresa ISSN 0365514-8 Electrónica ISSN 1514-2590.
14. Williamson, Delia; Vélez, Carolina; Martín, Pamela; Sampedro, Florencia; Garro, Adriana; García, Mónica; Riesco, Oscar; Bruni, María; Gelada, Marcos; Salas, Carlos; Hernández, Mabel; Viglierchio, Ma Del Carmen; Koncurat, Mirta. Estudio de 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.
15. Vélez, Carolina; Martín, Pamela; Hernández, Mabel; Williamson, Delia; Koncurat, Mirta. Expression of fibronectin during porcine placentation. 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; 34: A1–A94. ISSN: 0143-4004.
16. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Sampedro, Florencia; García, Mónica; Hernández, Mabel; Koncurat, Mirta. Expresión de fibronectina en la placenta porcina. Argentina. La Plata. 2013. Comunicación Oral. Libro. Resumen. Congreso. XV Congreso y 12º Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. Con referato.
17. Williamson, Delia; Vélez, Carolina; Garro, Adriana; Viglierchio, Ma Del Carmen; García, Mónica; Hernández, Mabel; Riesco, Oscar; Bruni, María; Martín, Pamela; Gelada, Marcos; Sampedro, Florencia; Salas, Carlos; Koncurat, Mirta. Expresión de las moléculas de adhesión durante la placentación porcina. Argentina. General Pico. 2013. Libro. Resumen. Jornada. VIII Jornadas de Ciencia y Técnica. I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias - Facultad de Ingeniería. UNLPam.
18. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Bruni, María; Riesco, Oscar; Garro, Adriana; Yaful, Graciela; Koncurat, Mirta. Fibronectina y progesterona durante la gestación porcina. Argentina. Casilda. 2013. Libro. Resumen. Jornada. I curso internacional VI jornadas y reunión anual Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias UNR. Con referato.
19. C Vélez, D Williamson, O Riesco, M Koncurat. Concentración de interleuquina-15 en suero y extractos placentarios porcinos durante la preñez porcina. Argentina. Esperanza, Sta. Fe. 2012. Libro. Resumen. Jornada. V Jornadas Científicas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Con referato.

20. Williamson, Delia; Riesco, Oscar; Vélez, Carolina; Koncurat, Mirta. Determinación de IL-15, IL-18 y Progesterona durante la gestación porcina. Argentina. Salta. 2012. Libro. Resumen. Congreso. XVII Jornadas de Actualización Porcina, XI Congreso Nacional de Producción Porcina, VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur. Facultad de Ciencias Veterinarias UNRC. Con referato. Resumen publicado en página online ENGORMIX <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/determinacion-progesterona-durante-gestacion-t30293.htm>
21. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Riesco, Oscar; Koncurat, Mirta. Concentración de Interleuquina-15 en suero y extractos placentarios porcinos durante la preñez porcina. Argentina. Esperanza. 2012. Libro. Resumen. Jornada. V Jornadas Científicas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Immunología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias UNL. Con referato.
22. Koncurat, Mirta; Williamson, Delia; Yaful, Graciela; Garro, Adriana; Vélez, Carolina; Bruni, María; Riesco, Oscar; Viglierchio, Ma Del Carmen; Lacolla, Daniel; García, Mónica; Hernández, Mabel. Programa de Investigación: Regulación de la placentación porcina por progesterona, moléculas de adhesión y el sistema inmunológico. Proyecto: Estudio de moléculas de adhesión que participan en la placentación porcina. Argentina. General Pico. 2012. Libro. Resumen. Jornada. VIII Jornada de Ciencia y Técnica 2012. UNLPam.
23. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Martín, Pamela; Koncurat, Mirta. Integrina a2b1, subunidad b1 y Progesterona durante la gestación porcina. Argentina. Salta. 2012. Libro. Resumen. Congreso. XVII Jornadas de Actualización Porcina, XI Congreso Nacional de Producción Porcina, VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur. Facultad de

Ciencias Veterinarias UNRC. Con referato. Resumen publicado en la revista online INFOPORK <http://www.infopork.com/2014/10/integrina-2-1-subunidad-1-y-progesterona-durante-la-gestacion-porcina/>

24. Koncurat M, Riesco O, Vélez C, Williamson D. Concentración de IL-15 y progesterona en extractos placentarios maternos, fetales y suero en la preñez porcina. Argentina. Río Cuarto. 2011. Libro. Resumen. Jornada. IV Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Con referato.
25. Koncurat, Mirta; Vélez, Carolina; Riesco, Oscar; Williamson, Delia. Expresión de la integrina $\alpha 2\beta 1$ y de la subunidad $\beta 1$ en la placentación porcina. Argentina. San Juan. 2011. Libro. Resumen. 2º Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de La República Argentina. Con referato.
26. Williamson, Delia; Riesco, Oscar; Vélez, Carolina; Yaful, Graciela; Koncurat, Mirta. Expresión de integrinas y concentración de progesterona y estrógenos durante la preñez porcina. Argentina. General Pico. 2011. Revista. Resumen. Jornada. VII Jornada de Ciencia y Técnica 2011. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam.
27. Koncurat, M, Riesco, O F, Vélez, C Y Williamson, D M. Determinación de la concentración de IL-18, IL-15, IL-12, IL-6 e IFN-g; en homogenatos placentarios maternos, fetales y suero a través de la gestación porcina. Uruguay. Montevideo. 2011. Libro. Resumen. Congreso. XXII Reunión Latinoamericana de Producción Animal. Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Con referato.

28. Koncurat, Mirta; Williamson, Delia; Vélez, Carolina y Riesco, Oscar. Concentration of IL-6, IL-12 and IFN-γ in serum and placental extracts during porcine gestation. Libro. Resumen. Congreso. First French-Argentine Immunology Congress. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 2-5 noviembre, 2010. Buenos Aires, Argentina. 2010. Con referato.
29. Williamson D, Riesco O, Vélez C y Koncurat M. Determinación de la concentración de IL-18, IL-15 e IL-12 en suero, homogenatos placentarios maternos y fetales durante la gestación porcina. Argentina. Río Cuarto. 2010. Libro. Resumen. Congreso. X Congreso Nacional de Producción Porcina. al 11 de agosto de 2010. Mendoza Capital. (ISBN: 978-950-665-616-4). p 277. Con referato.

PUBLICACIONES

1. Williamson, Delia; Riesco, Oscar; Vélez, Carolina; Koncurat, Mirta. Determinación de la concentración de IFN-γ, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 en suero, extractos placentarios maternos y fetales a través de la gestación porcina. Revista Ciencia Veterinaria. General Pico. Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. 2011 vol.13 n°1. p31 - 41. ISSN 1515-1883.
2. Vélez, Carolina; Williamson, Delia; Koncurat, Mirta. Detección de Fibronectina durante la placentación porcina. Revista Archivos Latinoamericanos de producción animal. Asociación Latinoamericana de Producción Animal. 2013 vol.22 n°1/2. p31-36. ISSN 1022-1301.
3. Vélez, Carolina; Barbeito, Claudio; Koncurat, Mirta. $\alpha v\beta 3$ Integrin and fibronectin expressions and their relation to estrogen and progesterone during placentation in swine. Biotechnic & Histochemistry. En prensa.

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpos.

Ag: Antígenos.

AIM: Área inmunomarcada

DAB: Diaminobencidina.

DE: Desvío estándar.

DO: Densidad Óptica.

DPC: Diagnostic Product Corporation.

E2: Estrógenos.

EE: Error estándar.

ELISA: Enzimainmunoanálisis.

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

Fc: Factor cristalizable.

Fet: Fetal.

FN: Fibronectina.

GF: Gestante fetal.

GM: Gestante materno.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

H-E: Hematoxilina eosina.

HoPF: Homogenato de placenta porcina fetal.

HoPM: Homogenato de placenta porcina materna.

HoPP: Homogenato de placenta porcina.

HoU: Homogenato de útero porcino no gestante.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

IFM: Interfase feto-materna.

IFN: Interferón.

IgG: Inmunoglobulina G.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IL: Interleuquina.

LE: Epitelio luminal uterino.

LH: hormona luteinizante

LIF: Factor inhibidor de leucemia.

LSAB: Labeled streptavidin biotin method.

Mat: Materno.

MEC: Matriz extracelular.

NG: No Gestante

NK: Célula natural killer.

NKu: Célula natural killer uterina.

OPN: Osteopontina

P4: Progesterona.

PBS: Solución salina tamponada.

PGF2 α : Prostaglandina F2 α .

RGD: secuencia de arginina-glicina-aspartato

SBP: Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa

SSH: Solución salina de Hank´s.

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta

Th: Linfocitos T auxiliares.

TMB: Tetrametilbencidina.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

Tr: Trofoectodermo

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ sobre epitelio endometrial, glándulas endometriales y trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. ND: no determinado. +, ++, +++: diferentes grados de positividad. -: Negativo. *: Tinción en porción apical del trofoblasto. **: Tinción en porción apical-basal del trofoblasto.	48
Tabla 2: Expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre epitelio endometrial, glándulas endometriales y trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. ND: no determinado. +, ++, +++: diferentes grados de positividad. -: Negativo. *: Tinción en porción apical del trofoblasto.	52
Tabla 3: Expresión de FN sobre epitelio endometrial, glándulas endometriales y trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. ND: no determinado. +, ++, +++: diferentes grados de positividad. -: Negativo. *: Tinción en porción apical del trofoblasto.	56
Tabla 4: Expresión de laminina sobre epitelio endometrial, glándulas endometriales y trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. +, ++, +++: diferentes grados de positividad. -: Negativo. ND: no determinado. Δ : en parches.....	60
Tabla 5: Expresión de Col V en el epitelio endometrial, las glándulas endometriales, y el trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. +, ++, +++: diferentes grados de positividad. -: Negativo. ND: no determinado.	64

Tabla 1a: Media de la densidad óptica (DO) de Integrina $\alpha v\beta 3$ en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).....	166
Tabla 1b: Media de la densidad óptica (DO) de la integrina $\alpha v\beta 3$ del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.....	166
Tabla 2a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de Integrina $\alpha v\beta 3$ en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).....	167
Tabla 2b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de la integrina $\alpha v\beta 3$ del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.....	167
Tabla 3a: Media de la densidad óptica (DO) de Integrina $\alpha 5\beta 1$ en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).....	168
Tabla 3b: Media de la densidad óptica (DO) de la integrina $\alpha 5\beta 1$ del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.....	168
Tabla 4a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de Integrina $\alpha 5\beta 1$ en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).....	169

Tabla 4b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de la integrina $\alpha 5\beta 1$ del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.....	169
Tabla 5a: Densidad Óptica (DO) de Fibronectina (FN) en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).....	170
Tabla 5b: Medias de densidad óptica (DO) de fibronectina (FN) analizadas en el epitelio luminal endometrial y el trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: No gestante. dg: días de gestación.	170
Tabla 6a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de FN en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).	171
Tabla 6b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de fibronectina (FN) del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.....	171
Tabla 7a: Densidad Óptica (DO) de Laminina (LAM) en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).....	172
Tabla 7b: Media de la densidad óptica (DO) de laminina (LAM) del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.....	172

Tabla 8a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de Laminina en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).....	173
Tabla 8b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de LAM del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.....	173
Tabla 9a: Media de la densidad óptica (DO) de colágeno (COLV) en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).....	174
Tabla 9b: Media de la densidad óptica (DO) de colágeno (COLV) del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.....	174
Tabla 10a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de COLV en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).....	175
Tabla 10b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de colágeno V (COLV) del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.....	175
Tabla 11a: Concentración de IL-1 β en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS); homogenatos de útero no gestante (NGM), homogenatos de útero gestante (HoPM) y homogenatos de placenta fetal (HoPF).....	176

Tabla 11b: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en suero, homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.	176
Tabla 12a: Concentración de IL-2 en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS); homogenatos de útero no gestante (NGM), homogenatos de útero gestante (HoPM) y homogenatos de placenta fetal (HoPF).	177
Tabla 12b: Concentración de IL-2 (pg/ml) en suero, extractos de útero no gestante (NGM), homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) en distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.	177
Tabla 13a: Concentración de IL-4 en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS); homogenatos de útero no gestante (NGM), homogenatos de útero gestante (HoPM) y homogenatos de placenta fetal (HoPF).	178
Tabla 13b: Concentración IL-4 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.	178
Tabla 14a: Concentración de IL-10 en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS); homogenatos de útero no gestante (NGM), homogenatos de útero gestante (HoPM) y homogenatos de placenta fetal (HoPF).	179
Tabla 14b: Concentración IL-10 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.	179

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Placenta fetal de 70 dg.....	32
Figura 2: Trofoblasto de 30 días de gestación (Imagen de 8-bit DAB; 400x). Se observa la delimitación del epitelio (línea amarilla) para la posterior medición del % AIM.....	41
Figura 3: Trofoblasto de 30 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).	42
Figura 4: Trofoblasto de 30 días de gestación (Imagen de 8-bit; 400x). Se observa la delimitación sólo de la inmunomarcación, para determinar la media de la intensidad de tinción marrón. En la ventana de resultados se observa cómo se expresan los mismos.	43
Figura 5: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal negativo a integrina $\alpha v\beta 3$ (400x).	49
Figura 6: Placenta porcina de 30 días de gestación. A. Moderada expresión citoplasmática de $\alpha v\beta 3$ (++) en las células epiteliales del endometrio. B. Fuerte expresión citoplasmática de $\alpha v\beta 3$ (+++) en las células trofoblásticas (400x).	49
Figura 7: Interfase placentaria porcina de 60 días de gestación. A. Fuerte expresión citoplasmática de $\alpha v\beta 3$ (+++) en las células epiteliales endometriales (flecha) y en la zona apical de las células trofoblásticas (cabeza de flecha) (400x). B. y C. Microfotografías del epitelio luminal materno (B) y del trofoblasto (C) donde se aprecia con detalle la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ (400x).	50

- Figura 8: Placenta porcina de 70 dg. A: Moderada expresión de integrina $\alpha v\beta 3$ (++) en las células epiteliales endometriales. B: Moderada expresión de integrina $\alpha v\beta 3$ (++) en la zona apical de las células trofoblásticas (400x)51
- Figura 9: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Leve expresión de $\alpha v\beta 3$ (A) en las células trofoblásticas. En el inserto (B) se observa con mayor detalle la inmunotinción apical de la integrina $\alpha v\beta 3$ en las células trofoblásticas (400x)51
- Figura 10: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal negativo a integrina $\alpha 5\beta 1$ (400x)52
- Figura 11: Placenta porcina de 30 días de gestación. A. Leve expresión citoplasmática de integrina $\alpha 5\beta 1$ (+) en las células epiteliales del endometrio (400x). B. Moderada expresión citoplasmática de integrina $\alpha 5\beta 1$ (++) en las células trofoblásticas (100x)53
- Figura 12: A. Interfase placentaria porcina de 60 días de gestación. Integrina $\alpha 5\beta 1$ negativa en las células epiteliales endometriales y leve positividad en las células trofoblásticas (400x). B. Microfotografía del trofoblasto donde se aprecia con detalle la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (400x)54
- Figura 13: Placenta porcina de 70 dg. A: Negatividad de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en las células epiteliales endometriales. B: Negatividad de integrina $\alpha 5\beta 1$ en las células trofoblásticas (400x)54
- Figura 14: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Leve expresión de $\alpha 5\beta 1$ (A) en las células trofoblásticas. En el inserto (B) se observa con mayor detalle la inmunotinción apical de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en las células trofoblásticas (400x)55
- Figura 15: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal negativo a FN (400x) ...57

Figura 16: Placenta porcina de 30 días de gestación. A y B. Expresión citoplasmática fuerte de FN (+++) en las células trofoblásticas (400x)	57
Figura 17: Placenta porcina de 60 días de gestación. A. Expresión citoplasmática fuerte de FN (+++) en las células trofoblásticas (400x). Microfotografías (B) del trofoblasto y del epitelio luminal materno (C) donde se aprecia con detalle la expresión de la FN (400x) ..	58
Figura 18: Placenta porcina de 70 dg. A y B. Expresión leve de FN en las células trofoblásticas (400x).....	59
Figura 19: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Expresión fuerte de FN (inserto) en las células trofoblásticas (400x).	59
Figura 20: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal y glandular negativo a laminina (400x).	60
Figura 21: Placenta porcina de 30 días de gestación. A. expresión leve de laminina (+) en las células epiteliales del endometrio (400x). B. Expresión moderada citoplasmática de laminina (++) en las células trofoblásticas (400x)	61
Figura 22: Interfase placentaria porcina de 60 días de gestación. A. Expresión leve (+) para laminina en las células epiteliales endometriales. B. Microfotografía del trofoblasto donde se aprecia con detalle la expresión de laminina tanto a nivel apical como basal de las vellosidades (400x).	62
Figura 23: Interfase placentaria porcina de 70 días de gestación. A. Negatividad a laminina en las células epiteliales endometriales y en las células trofoblásticas (100x). B y C. Microfotografía del endometrio y el trofoblasto donde se aprecia con detalle la estructura (400x).....	62

- Figura 24: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Moderada expresión de laminina en la porción basal de las células trofoblásticas en la base de las vellosidades y citoplasmática en la punta de las vellosidades. 400x63
- Figura 25: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal y glandular negativo a ColV (400x).....65
- Figura 26: Placenta porcina de 30 días de gestación. A. Leve expresión citoplasmática de ColV (+) en las células epiteliales del endometrio (400x). B. Expresión leve citoplasmática de ColV (+) en las células trofoblásticas (400x).....65
- Figura 27: Interfase placentaria porcina de 60 días de gestación. Leve expresión citoplasmática de ColV (+) en las células epiteliales del endometrio y moderada (++) en las células trofoblásticas (400x).66
- Figura 28: Placenta porcina de 70 dg. A y B negatividad en epitelio endometrial y trofoblasto para ColV (400x).67
- Figura 29: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Leve expresión de ColV en las células trofoblásticas (400x).....67
- Figura 30: Determinación de la DO de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).69
- Figura 31: Determinación de la DO de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales

seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	70
Figura 32: Determinación de la DO de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	71
Figura 33: Determinación del %AIM de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), placenta materna (GM) y placenta fetal (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	73
Figura 34: Determinación del %AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	74
Figura 35: Determinación del %AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	75
Figura 36: Determinación de la DO de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	77

Figura 37: Determinación de la DO de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).....	78
Figura 38: Determinación de la DO de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).	79
Figura 39: Determinación del %AIM de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), placenta materna (GM) y placenta fetal (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).....	81
Figura 40: Determinación del %AIM de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).....	82
Figura 41: Determinación del %AIM de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$)	83
Figura 42: Determinación de la DO de la FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).	84

Figura 43: Determinación de la DO de FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	85
Figura 44: Determinación de la DO de FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	86
Figura 45: Determinación del %AIM de FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	87
Figura 46: Determinación del %AIM de FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	88
Figura 47: Determinación del %AIM de la FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto (GF) de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	89
Figura 48: Determinación de la DO de la expresión de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	91

Figura 49: Determinación de la DO de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	92
Figura 50: Determinación de la DO de la integrina LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	93
Figura 51: Determinación del %AIM de la expresión de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), placenta materna (GM) y placenta fetal (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	95
Figura 52: Determinación del %AIM de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05)	96
Figura 53: Determinación del %AIM de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	97
Figura 54: Determinación de la DO de la expresión de COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	99

Figura 55: Determinación de la DO de colágeno V en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	100
Figura 56: Determinación de la DO del COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	101
Figura 57: Determinación del %AIM de la expresión de COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), placenta materna (GM) y placenta fetal (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	103
Figura 58: Determinación del %AIM de COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05)	104
Figura 59: Determinación del %AIM del COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05)	105
Figura 60: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGS) y suero de cerdas gestantes (GS). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	106

Figura 61: Concentración sérica de IL-1 β (pg/ml) entre cerdas no gestantes (NGS) y diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	107
Figura 62: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y gestante (HoPM) tomando la gestación en bloque. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05)	108
Figura 63: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	109
Figura 64: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPF en los diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	110
Figura 65: Concentración de IL-2 (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGS) y suero de cerdas gestantes (GS). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	111
Figura 66: Concentración sérica de IL-2 (pg/ml) entre cerdas no gestantes (NGS) y diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	112
Figura 67: Concentración de IL-2 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM tomando la gestación en bloque. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	113

Figura 68: Concentración de IL-2 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	114
Figura 69: Concentración de IL-2 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPF en función de los diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	115
Figura 70: Concentración de IL-4 (pg/ml) en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	116
Figura 71: Concentración sérica de IL-4 (pg/ml) entre cerdas no gestantes (NGS) y diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	117
Figura 72: Concentración de IL-4 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	118
Figura 73: Concentración de IL-4 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM a los 30dg. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	119
Figura 74: Concentración de IL-4 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPF en función de los diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	120
Figura 75: Concentración de IL-10 (pg/ml) en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	121

Figura 76: Concentración sérica de IL-10 (pg/ml) entre cerdas no gestantes (NGS) y diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).....	122
Figura 77: Concentración de IL-10 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM tomando la gestación en conjunto. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05)	123
Figura 78: Concentración de IL-10 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).	124
Figura 79: Concentración de IL-10 (pg/ml) en muestras de HoPF en los diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05)	125

TITULO Integrinas y su regulación por el sistema inmune durante la gestación porcina.

PALABRAS CLAVES Porcinos – Placenta Porcina – Integrinas – Fibronectina – Laminina – Colágeno V – Interleuquinas.

RESUMEN

Se estudió la expresión de integrinas y sus ligandos en placas porcinas de diferentes períodos gestacionales y su relación con el sistema inmunológico. La expresión de integrinas ($\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$) y sus ligandos (fibronectina, colágeno V, laminina) se realizó por inmunohistoquímica y la determinación de interleuquinas (IL-1 β , IL2, IL4, IL10) mediante ELISA. Los epitelios de la interfase feto-materna expresaron fuerte integrina $\alpha v\beta 3$ y fibronectina a los 30 y 60 dg, disminuyendo significativamente a los 70 y 114 dg. La $\alpha 5\beta 1$, la laminina y el colágeno V demostraron el mismo patrón de expresión en la interfase, pero más levemente. La inmunomarcación endometrial y trofoblástica, abarcó mayor área a los 30 y 60 dg. La IL-1 β , IL-2 e IL-4 demostraron un patrón similar de concentración en la interfase placentaria y suero; se elevaron en tejido a los 30 y 60-70 dg, disminuyendo significativamente a término; período en aumentaron significativamente en suero. A los 60-70 dg estas citoquinas serían necesarias en la interfase, para favorecer los mecanismos moleculares y celulares que permiten la remodelación placentaria. La presencia de la IL-1 β a los 60 dg se relaciona con la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ y su ligando fibronectina; mientras que a los 70 dg, tanto la IL-1 β como la IL-2 y la IL-4 participarían en los

mecanismos moleculares que permiten la apoptosis para lograr el remodelaje placentario que permitirá el crecimiento exponencial de los fetos. Las concentraciones tisulares placentarias de IL-10 durante la gestación fueron basales; sin embargo, en suero aumentó a los 60 y 114 dg. Se sugiere que las IL-1 β , IL-2 e IL-4 se hallan presentes en suero a término, a fin de facilitar la expulsión de las placenas durante el parto, mientras que la presencia sistémica de la IL-10 permitiría la regulación de la respuesta inmune durante la gestación porcina.

TITLE	Integrins and its regulation by the immune system during the swine gestation.
KEY WORDS	Swines – Porcine Placenta – Integrins – Fibronectin – Laminin – Collagen V – Interleuquins.

SUMMARY

The expression of integrins and their ligands in porcine placentas of different gestational periods and their relationship to the immune system was studied. The expression of integrins ($\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$) and its ligands (fibronectin, collagen V, laminin) was performed by immunohistochemistry and the determination of interleukins (IL-1 β , IL2, IL4, IL10) by ELISA. Epithelia of the fetal-maternal interface expressed strong integrin $\alpha v\beta 3$ and fibronectin at 30 and 60 dg, significantly decreasing at 70 and 114 dg. $\alpha 5\beta 1$, laminin and collagen V demonstrated the same expression pattern at the interface, but more slightly. The endometrial and trophoblastic immunostaining comprised a larger area at 30 and 60 dg. IL-1 β , IL-2 and IL-4 demonstrated a similar pattern of concentration at the placental and serum interface; they were elevated in tissue at 30 and 60-70 dg, significantly decreasing at term; period that significantly increased in serum. At 60-70 dg these cytokines would be necessary at the interface, to favor the molecular and cellular mechanisms that allow placental remodeling. The presence of IL-1 β at 60 dg is related to the expression of the integrin $\alpha v\beta 3$ and its ligand fibronectin; while at 70 dg, both IL-1 β and IL-2 and IL-4 would participate in the molecular mechanisms that allow apoptosis to achieve placental remodeling that will

allow the exponential growth of fetuses. The placental tissue concentrations of IL-10 during gestation were basal; however, serum increased to 60 and 114 dg. It is suggested that IL-1 β , IL-2 and IL-4 are present in serum at term, in order to facilitate the expulsion of the placentas during delivery, whereas the systemic presence of IL-10 would allow the regulation of the immune response during swine gestation.

INTRODUCCIÓN

Producción porcina

A nivel mundial, la porcicultura es la principal actividad pecuaria y fuente de proteína animal, representa el 42% de la producción total de carne (Alonso Pesado y Rodríguez de Jesús, 2016). El cerdo (*Sus scrofa domestica*) es una especie de alto valor productivo, ya que es altamente prolífico y eficiente en la conversión de alimento a carne, estas características hacen que esta especie sea la más producida a nivel mundial, llegando a comercializarse en el año 2015, 110.4 millones de toneladas, según Miazzo y Pisani Claro (2015). China y la UE son los principales productores y consumidores, con más del 70% de la producción total de carne porcina. A su vez, son los países con mayor importación de carne porcina; esto genera que en otros países se impulse la actividad de exportación y como consecuencia, de su crecimiento productivo, económico y el desarrollo de tecnologías. Como resultado de esta situación, en Latinoamérica en el año 2016, Brasil incrementó un 30% sus exportaciones en carne porcina, un proceso similar se observó también Argentina, Colombia y México.

Esta creciente demanda de carne porcina a nivel mundial impulsó a que las empresas genéticas desarrollen líneas porcinas más eficientes en producción, logrando como resultado animales con mejor sabor en sus carnes, resistentes a ciertas enfermedades, hembras que producen lechones con alta tasa de crecimiento y hembras que poseen mejor tasa de parición (Trolliet, 2005; Edwards y col., 2012).

La Argentina produce un 0,38% de la carne porcina a nivel mundial (Miazzo y Pisani Claro, 2015). La producción y el consumo de cerdo están creciendo en Argentina, con un incremento de la producción a un ritmo del 5% anual desde hace 15 años, según datos del INTA Marcos Juárez. La faena de porcinos en 2016 llegó a los 5,9 millones de animales, lo que representa

un crecimiento de casi un 50% en una década, ya que en el 2006 se enviaron a faena aproximadamente 3 millones de cabezas (Informe carne porcina, 2006). En el año 2016 el consumo alcanzó los 12,5 kg/hab (Busellini, 2016).

Debido a la demanda nutricional en la actividad porcina de maíz y soja, el “stock” porcino y la faena de cerdos están concentrados en un 63% y 90%, respectivamente, en las provincias con mayor desarrollo agrario: Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, según estudios realizados por Busellini (2016) utilizando las bases de datos de SENASA e INTA. El porcentaje restante lo encabezan las provincias de Entre Ríos, Formosa, Chaco, Salta, San Luis y La Pampa.

Argentina posee un enorme potencial para ser un país exportador de carne porcina, se destaca el bajo costo de provisión de alimentos, ya que nuestro país es un gran productor de granos y éstos representan más del 60% del costo final del cerdo. Además, se encuentra libre de enfermedades tales como fiebre aftosa y peste porcina clásica; y posee abundantes fuentes de agua dulce (Cohan, 2008). Por otro lado, cuenta con centros de alta tecnología y recursos humanos capacitados.

En la producción porcina, el manejo reproductivo es fundamental para lograr índices óptimos y una mayor eficiencia en cada productor. Para ello es necesario mejorar la eficacia reproductiva, ya que uno de los parámetros que afecta a la eficiencia es el número de capones/cerda/año.

El principal factor para generar un nivel mayor de producción es el tamaño de la camada (Edwards *y col.*, 2012; Kridli *y col.*, 2016). En Estados Unidos, el número promedio de lechones producidos por cerda por año en 2010 fue de 23,6 (Knauer, 2013); cifra que en Argentina se reduce considerablemente (16 a 18 capones/cerda/año) (Brunori, 2013). El número de lechones vivos nacidos por gestación en la especie porcina se ve afectado directamente por la tasa de ovulación, la tasa de fertilización y la supervivencia del

embrión/feto. Con respecto al número de ovulaciones, según estudios de Town *y col.* (2005), las cerdas ovulan entre 20 y 25 óvulos por ciclo estral, con tasas de fertilización cercanas al 95%, el número de embriones tempranos podría ser, en promedio, de alrededor 21.3. Sin embargo, en el momento del parto, el tamaño de la camada se reduce a tan solo 10 a 13 lechones por cerda (Town *y col.*, 2005; Geisert y Schmitt, 2002). Gran parte de esta disminución de lechones nacidos vivos se atribuye a la pérdida espontánea del embrión/feto (Pope, 1994). Se han documentado dos grandes oleadas de pérdidas embrionarias o fetales espontáneas en los cerdos: la primera (aproximadamente un 30%), ocurre alrededor de la implantación, entre los días 10 y 30 de gestación (Stroband y Van der Lende, 1990; Geisert y Schmitt, 2002; Ross *y col.*, 2009). Durante este período, cuando los embriones se adhieren al endometrio receptivo, las variaciones en el crecimiento embrionario y la tasa de elongación de los *concepti* alteran el ambiente uterino, lo que conduce a una menor capacidad de supervivencia de los embriones menos desarrollados (Anderson, 1978; Pope, 1994; Wu *y col.*, 1987; Wilson *y col.*, 1999; Hafez y Hafez, 2003). La segunda ola representa un 10-15% adicional de pérdida, y ocurre alrededor de la gestación media, aproximadamente a los 50-70 días de preñez (Vonnahme *y col.*, 2002; Vallet *y col.*, 2011). Durante este período, el aumento del crecimiento fetal puede llevar a que algunos sitios de implantación excedan su espacio uterino y los fetos no puedan continuar con su desarrollo (Pope, 1994; Wu *y col.*, 1987; Wilson *y col.*, 1999). En Argentina, está documentado que la pérdida embrionaria llega hasta un 50-52% (Bosch *y col.*, 2001).

Estudios realizados con el objetivo de incrementar la tasa de ovulación, la selección de madres por mayor tamaño uterino y de trabajar con semen de calidad óptima que garantice altas tasas de fecundación, no lograron generar estrategias que permitan reducir la incidencia de muerte embrionaria/fetal; por lo que las causas aún siguen siendo desconocidas. Lograr un

conocimiento de la fisiología de la interfase placentaria en distintas etapas de la gestación porcina y su posible relación con el sistema inmunológico, ampliará los conocimientos en este campo y nos dará mayores herramientas para poder trabajar y plantear estrategias alternativas para poder disminuir la tasa de pérdida embrionaria/fetal y así poder aumentar la eficiencia en la producción nacional.

Hembra Porcina

Ciclo estral

La hembra porcina es poliéstrica continua, porque su ciclo estral se repetirá hasta que ocurra una gestación o una disfunción endocrina. Una hembra porcina sana será reproductivamente madura e iniciará su primer ciclo estral aproximadamente a los 6 meses de edad. También, factores tales como el nivel nutricional, el ambiente social, el peso corporal, la época del año, la raza, las enfermedades infecciosas o parasitarias y las deficientes prácticas de manejo, pueden influir en la edad a la pubertad. Al comienzo del estro, la cerda expresará signos de celo y ovulará de ambos ovarios cada 21 días (19 a 23 días) hasta que ocurra la concepción. Durante el estro, la hembra porcina será receptiva al macho durante 40 a 60 hs, durante las cuales, el pico de estradiol (E2) sérico generará la liberación de la hormona luteinizante (LH) desde la pituitaria anterior, lo que desencadenará la ovulación (ruptura de los folículos de Graaf y liberación de los ovocitos), seguida de la luteinización de las células foliculares (células de la granulosa y células de la teca) y la reactivación de la meiosis I de los ovocitos. La ovulación ocurre aproximadamente 38 a 42 hs luego de iniciado el estro (Hafez y Hafez, 2003; Mathew, 2014). Entre el día 3 y 4 del ciclo estral (comienzo de la fase lútea), se formarán los cuerpos hemorrágicos, que para el día 6 a 8 madurarán a cuerpos lúteos funcionales (CL), sintetizando y liberando concentraciones crecientes de progesterona (P4) en la sangre. Desde el día 6 del ciclo estral y hasta el día 16, el ambiente uterino está completamente dominado por la P4. La longitud del ciclo estral del cerdo es controlada por la P4 y es dependiente del útero. La estimulación del útero con P4 durante 10 a 12 días conduce a la producción endometrial de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) luteolítica y su secreción en la sangre, causando luteólisis desde el día 12 al 16 (McCracken, 1999; Hafez y Hafez, 2003),

excepto que se presenten múltiples *concepti* porcinos (por lo menos 2 embriones por cuerno uterino) (Ford y Christenson, 1991), quienes liberan la señal de reconocimiento materno de la gestación (estrógenos), que evita la secreción de PGF2 α a sangre y permite la continuidad de la preñez (Bazer y Thatcher, 1977; Hafez y Hafez, 2003). De lo contrario, si no ocurre la fecundación, el CL involuciona, la P4 sanguínea disminuye y la cerda inicia otra fase folicular, expresando signos de estro (Spencer y *col.*, 2004). El patrón cíclico del ciclo estral, controlado por la P4, permite al cerdo reciclar y volver al estro para otro intento de concepción en ausencia de fecundación.

Con respecto a las hormonas que participan activamente tanto en el ciclo estral como en la gestación; los E2 durante la gestación intervienen 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. Estudios de Choi y *col.* (1997), Koncurat (2003) y Williamson (2011) demostraron que en la placenta fetal ocurre un pico de E2 a los 30 dg, luego desciende y aumenta significativamente en placenta materna y fetal porcina, así como en suero, al final de la preñez, este último incremento es necesario para el desencadenamiento del parto. La P4, considerada la hormona de la preñez, es esencial para crear un ambiente donde se lleven a cabo el crecimiento y desarrollo del conceptus hasta su término. En porcinos, la P4 producida y secretada por los cuerpos lúteos (CL) a lo largo de la gestación (Hafez y Hafez, 2003; Spencer y *col.*, 2004), inhibe la contractibilidad del miometrio, media los cambios de la actividad secretora del útero, regula los efectos de la nutrición sobre la gestación porcina y, en consecuencia, el estado metabólico que determina la sobrevida embrionaria (Mueller y *col.*, 2006; Qsuires, 2006). En nuestro laboratorio Yaful (2009), descubrió en los extractos placentarios fetales altas concentraciones de P4, hipotetizando que

la placenta fetal es una fuente alternativa de producción de P4 durante la preñez porcina. Por el contrario la misma autora no observó en los extractos placentarios maternos ni en líquido amniótico concentraciones elevadas de la hormona. A partir de éstos resultados postuló que la P4 hallada en la placenta fetal es utilizada en la interfase entre madre y *conceptus* o metabolizada dentro del útero.

Gestación Porcina

La gestación es un fenómeno fisiológico que obedece a precisas interacciones entre el *conceptus* y su madre, las cuales se van a llevar a cabo mediante el desarrollo de la placenta. Éste es un órgano transitorio formado por tejidos maternos y embrionarios, responsable de la aceptación del *conceptus*, la sobrevida de los embriones y el éxito de la gestación.

Luego de la fecundación, el cigoto es transportado hacia los cuernos uterinos para su implantación en el endometrio. La implantación es un proceso progresivo, no invasivo en la especie porcina, en el que el *conceptus* se aproxima y adhiere al endometrio materno. La implantación del blastocito porcino comienza alrededor de los 8-10 días de gestación (dg), período durante el cual se produce una marcada remodelación uterina y la diferenciación del *conceptus*, que consiste en una elongación rápida, que determina que el saco embrionario cambie desde una forma esférica (2 mm) a una tubular (10 mm) y luego filamentosa (20 cm). La elongación es consecuencia una reorganización y remodelación celular, de manera que los *concepti* tempranos cubran la amplia superficie uterina en la cerda. Luego de esta fase de elongación, el *conceptus* seguirá aumentando de largo y de diámetro como resultado de la hiperplasia celular, alcanzando su longitud, entre 80 y 100 cm, en el día 16 (Stroband y Van der Lende, 1990; Geisert y Yelich, 1996). Durante este proceso de elongación, el trofoblasto secreta estrógenos (E2), hormonas que actúan como señal en el reconocimiento de la preñez

(Bazer y Thatcher, 1977) y como marcador de elongación del trofoblasto (Spencer y *col.*, 2004).

Para que se produzca la aposición trofoblástica se requiere de un endometrio receptivo, de un embrión normal y funcional y de un diálogo o comunicación cruzada entre estos dos organismos, que son diferentes inmunológicamente y genéticamente (Pacheco, 1999). Una vez completada la aposición de los epitelios trofoblástico y endometrial, continua el desarrollo de la placenta y la gestación.

Placenta porcina

La placenta porcina cumple sus funciones a través de la adhesión entre las membranas fetales y el endometrio, lo que permite el intercambio fisiológico entre el feto y la madre. Dentro de las funciones que realiza se destaca el rol que presenta al inducir tolerancia inmunológica frente al *conceptus* en desarrollo, asegurando así su supervivencia. Es también un órgano endocrino, ya que sintetiza hormonas esteroides, peptídicas y diferentes factores de crecimiento que, actuando en conjunto, se encargarán de llevar una gestación a término. Regula la homeostasis de la unidad feto-placentaria permitiendo el intercambio constante de gases, nutrientes y desechos entre el feto y la madre. Además cumple una función protectora frente a traumatismos y a agentes infecciosos.

Según la especie, existen diversos tipos de placenta que varían por su constitución y por el número de capas celulares que se interponen entre la sangre de la madre y la sangre del embrión. En el caso de la especie porcina la placenta es de tipo epiteliocorial, no invasiva, adecidua, plegada y difusa (Amoroso, 1952; Dantzer, 1985). Es epiteliocorial y no invasiva debido a que permanecen todas las capas histológicas de la barrera placentaria durante la preñez; por eso también se la considera adecidua, ya que no hay pérdida de tejidos uterinos y por lo tanto son mínimas las hemorragias al momento del parto. Es de tipo plegada porque el

saco coriónico emite pliegues macroscópicos (pliegues primarios) que se interdigitán con estructuras complementarias del lado endometrial. De los pliegues primarios surgen pliegues secundarios que son las vellosidades. Es difusa porque las vellosidades se distribuyen regularmente en toda la superficie del corion, proporcionando una amplia área feto-materna de intercambio (Wooding y Burton, 2008).

Anatómicamente se pueden distinguir claramente en la placenta porcina tres regiones: una zona embrionaria, ubicada en el centro del corion y que contiene al embrión propiamente dicho rodeado por el saco amniótico, el alantoides y la membrana corio-alantoidea; una zona paraplacental, la cual incluye solamente membranas extraembrionarias y se encuentra a ambos lados de la región embrionaria; y los extremos avasculares o apéndices necróticos que carecen de vellosidades y vascularización, y cuya función es sellar la unidad feto-placentaria y separarla de las placentas adyacentes (Wooding y Burton, 2008).

Además, existen a lo largo de toda la superficie placentaria, distribuidas de manera bastante uniforme, alrededor de 8500 estructuras especializadas conocidas como aréolas. Éstas son prominencias proliferativas del trofoblasto que carecen de vellosidades y están enfrentadas a cavidades de las glándulas uterinas. Hay aréolas regulares e irregulares que son discernibles histológicamente a partir del día 15 de gestación (Dantzer, 1985; Koncurat, 2003). Por lo tanto, histológicamente, en la placenta porcina encontramos 2 zonas, entremezcladas: la zona areolar conformada por estas estructuras que permiten la nutrición histiotrófica a través del trofoblasto fetal; y la zona interareolar, en donde el epitelio endometrial y el trofoblasto se interdigitán por sus microvellosidades, esta es la zona de íntimo contacto feto-materno y la responsable de la nutrición hemotrófica (Wooding y Burton, 2008).

Para que la gestación se lleve a cabo, el diálogo que se establece entre el *conceptus* y el endometrio involucra a las moléculas de adhesión, que permitirán el anclaje de los epitelios

materno y fetal, al sistema inmunológico, que minimiza las posibilidades de rechazo del embrión, y a numerosas hormonas y factores de crecimiento que, actuando de manera sistematizada, llevarán al éxito de la gestación (Margni, 1996; Robertson, 2000; Bazer y *col.*, 2008; Bazer y *col.*, 2009a; Bazer y *col.*, 2009b; Tizard, 2009; Williamson, 2011).

Moléculas de adhesión y sus ligandos en la gestación

Para comprender el proceso de placentación, es necesario conocer la distribución y las funciones de las moléculas de adhesión. En cerdos, dado su tipo de placentación, las moléculas de adhesión en la interfase feto-materna, serían macromoléculas claves para el anclaje y la adhesión de ambos epitelios; porque, como su nombre lo indica, permiten a las células unirse entre sí y con la matriz extracelular. Comprenden una variedad de proteínas de membrana que han sido clasificadas en cuatro subfamilias: las integrinas, las selectinas, las cadherinas y las moléculas de la super familia de las inmunoglobulinas (Botella Llusiá, 2001; Reddy y Mangale, 2003). Esta tesis abordará el estudio de algunas de estas integrinas y de sus ligandos. Las integrinas aumentan la adherencia intercelular y actúan como receptores de proteínas de matriz extracelular (MEC), tales como la fibronectina (FN), el colágeno, la osteopontina (OPN), el fibrinógeno, la laminina, la vitronectina y el factor de von Willebrand, entre otras (Damsky y *col.*, 1992; Bowen y Burghardt, 2000; Plow y *col.*, 2000; Jimenez-Marín, 2002). Muchas integrinas se unen a más de un ligando, y más de uno de estos ligandos se unen a más de una integrina, usando el mismo o distintos sitios de reconocimiento (Hynes, 1992).

Integrinas

Las integrinas participan en la adhesión célula a célula y conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto de la célula. A través de su unión a la célula o a la matriz extracelular cumplen

funciones en la adhesión, la migración, la invasión tisular y el control de la fisiología celular, transmitiendo señales de activación metabólica. Conforman una familia de proteínas heterodiméricas que son receptores transmembrana, catión-dependientes, compuestas de subunidades α y β . En el humano han sido identificadas, 18 subunidades α y 8 subunidades β unidas no covalentemente, de cuya combinación resultan 24 heterodímeros conocidos, (Jimenez-Marin, 2002; Alberts y *col.*, 2016). Ambas subunidades se localizan en la membrana plasmática y presentan largos dominios extracelulares N-terminales y pequeñas colas intracelulares C-terminales. Los dominios extracelulares reconocen y se unen a secuencias concretas de aminoácidos de proteínas de la matriz extracelular; mientras que la región intracelular se une a un complejo formado por dos proteínas diferentes: la talina y la vinculina que, juntas, forman un enlace al citoesqueleto; porque unen al dímero de integrina a los filamentos de actina de la célula cuando la unión es célula-célula, y a filamentos intermedios de queratina, cuando la integrina participa en las uniones célula-MEC, como los hemidesmosomas (Alberts y *col.*, 2016). Participan en procesos como la embriogénesis, la hemostasis y la respuesta inmune, entre otros. El ligando específico para cada heterodímero está determinado por la combinación específica de las subunidades α y β . La mayoría de los tipos celulares expresan varias clases de integrinas (Bowen y Hunt, 2000; Alberts y *col.*, 2016).

El rol de las integrinas y sus ligandos en el endometrio no está claramente definido. Estudios recientes sobre implantación embrionaria en diferentes especies mostraron la participación de las integrinas en la complejidad de los acontecimientos involucrados en la implantación (Erikson y *col.*, 2009; Bazer y Johnson, 2014). Se han detectado integrinas en los sitios de fijación durante la implantación temprana en humanos (Damsky y *col.*, 1994; Kou y *col.*, 1997), murinos (Yang y *col.*, 1993; Wu y Santoro, 1994) y porcinos (Bowen y *col.*, 1996;

Bowen and Hunt, 2000; Jaeger *y col.*, 2001). Estudios en gestaciones de diferentes especies, demostraron que estas moléculas representan excelentes marcadores de estadios normales y anormales de receptividad uterina y pueden ser claves en la implantación y la regulación de la gestación. En ovinos, las integrinas juegan un rol predominante en las interacciones entre la MEC y sus receptores para traducir señales celulares entre el trofoectodermo y las células epiteliales uterinas (Burghardt *y col.*, 2002). En bovinos, se sugiere que la fusión de las células binucleadas con el epitelio materno es el fenómeno que inicia cambios en la expresión de las integrinas y las moléculas de la MEC en el estroma subepitelial uterino (Macintyre *y col.*, 2002). Estudios en humanos, ovinos y porcinos, demostraron que las interacciones iniciales entre las superficies apicales del epitelio luminal uterino (LE) y el trofoectodermo (Tr) requieren la pérdida de moléculas antiadhesivas en el glicocálix del LE, que se compone principalmente de mucinas que inhiben la fijación (Bowen *y col.*, 1996; Johnson *y col.*, 2001), así la exposición de moléculas como galectinas y selectinas facilitan la fijación inicial del *conceptus* al LE (Spencer *y col.*, 1999; Aplin *y col.*, 2001; Farmer *y col.*, 2008) pero, estos contactos iniciales de baja afinidad se sustituyen por un mosaico más estable y más amplio de interacciones entre las integrinas y las proteínas de matriz extracelular y otros correceptores, que serían los contribuyentes dominantes a la adhesión estable en la implantación (Johnson *y col.*, 2001; Aplin y Kimber, 2004; Burghardt *y col.*, 2002; Lessey, 2002; Erikson *y col.*, 2009).

Integrina $\alpha v\beta 3$

La integrina $\alpha v\beta 3$ está expresada en muchos tipos celulares, incluyendo células placentarias (Villa-Garcia *y col.*, 1994). Es un receptor promiscuo que reconoce y une varios ligandos diferentes de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, vitronectina, osteopontina y trombospondina, a través de la secuencia de tres aminoácidos arg-gly-asp (RGD). El péptido RGD, en humanos, desempeña un papel en la adhesión del trofoblasto al endometrio y su

crecimiento (Armant *y col.*, 1986) y en el ratón, se ha postulado que cumple un rol en la implantación (Sutherland *y col.*, 1993). Además, la integrina $\alpha v\beta 3$ participa en la angiogénesis en humanos (Friedlander *y col.*, 1995) y ha sido implicada en la invasión placentaria a la vasculatura materna que ocurre en humanos (Zhou *y col.*, 1997). En el conejo, la integrina $\alpha v\beta 3$ está presente en el trofoblasto y en el embrión, y podría estar involucrada en las interacciones materno-embriónarias tempranas (Illera *y col.*, 2003). Estudios realizados en monos *Rhesus*, sugieren que existe una correlación entre la expresión de las integrinas y sus ligandos en la MEC de la interfase feto-materna y que la señal producida cuando interactúan estas moléculas estaría involucrada en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, a fin de regular la invasión de las células trofoblásticas al comienzo de la gestación (Qin *y col.*, 2003). Específicamente, se ha observado la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el embrión y el endometrio durante el proceso de implantación en seres humanos (Lessey *y col.*, 1994; Aplin *y col.*, 1996; Zhou *y col.*, 1997), ratones (Sutherland *y col.*, 1993), conejos (Illera *y col.*, 2003), cerdos (Bowen *y col.*, 1996; Burghardt *y col.*, 2002), ovejas (Johnson *y col.*, 1999, 2001) y bovinos (MacLaren y Wildeman, 1995). No se hallaron registros acerca de la expresión de esta integrina en el trofoblasto y epitelio endometrial luminal en los períodos posteriores a la implantación, durante la gestación porcina.

Integrina $\alpha 5\beta 1$

La integrina $\alpha 5\beta 1$ es receptor de la FN que participaría en el control de la morfogénesis y la organogénesis en ratones (Jimenez-Marin, 2002). La interacción entre $\alpha 5\beta 1$ y FN es fundamental para el desarrollo de vertebrados, ya que estudios en ratones demostraron que la ausencia de $\alpha 5\beta 1$ o FN da como resultado una letalidad embrionaria temprana (Takagi *y col.*, 2003). Otros estudios, atribuyen a la integrina $\alpha 5\beta 1$ un rol crucial en la implantación de murinos (Sutherland *y col.*, 1993) y bovinos (MacLaren y Wildeman, 1995); la subunidad $\beta 1$, es-

taría involucrada en la migración de células binucleadas en bovinos en un mayor grado que en el proceso de adhesión. Específicamente en porcinos, algunos trabajos han demostrado que la expresión de esta integrina en la interfase placentaria durante la gestación temprana, sugiriendo que participaría en los eventos moleculares que generan una implantación y placentación exitosa (Rashev *y col.*, 2005). No se han hallado estudios de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la interfase feto-materna (IFM) durante la gestación porcina en los períodos posteriores a la implantación.

Ligandos

Los principales ligandos de las integrinas incluyen un gran número de proteínas extracelulares de la matriz, lo que se debe a la participación de las integrinas en la adhesión celular a la matriz extracelular (Plow *y col.*, 2000; Jiménez-Marín, 2002). En esta tesis se estudiará en particular la presencia de los siguientes ligandos de las integrinas: colágeno tipo V, fibronectina y laminina.

En 2002, Arenas y Zubaran, describieron cómo se distribuyen la fibronectina, la laminina y el colágeno en la placenta humana en el primer trimestre, y reportaron que éstas estarían involucradas en los procesos de receptividad uterina e implantación. Guillomot (1999) determinó la expresión de diferentes proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno y la laminina en el epitelio luminal uterino durante el proceso de adhesión en la implantación de caprinos. Tuo y Bazer (1996) y Rashev *y col.* (2005) detectaron la expresión de la fibronectina en la interfase placentaria en la especie porcina. En esta última especie, se han estudiado el papel de las integrinas y de sus ligandos de la MEC, comparando su expresión en útero no gestante con una preñez temprana a los 10-15 días (Bowen *y col.*, 1996; Bowen y Hunt, 2000; Jaeger *y col.*, 2001); pero no se realizaron estudios en estadios más avanzados de la preñez.

Fibronectina:

La fibronectina es una proteína adhesiva, que se encuentra libre en el plasma y, además, constituye uno de los principales componentes de la matriz extracelular. Entre sus principales funciones está la de intervenir en la remodelación de los tejidos durante la embriogénesis y participar en el proceso de cicatrización de una lesión vascular después de la formación de un coágulo de fibrina (Mosher, 1984). Se encuentra en forma soluble principalmente como un dímero y en forma insoluble formando multímeros de alto peso molecular mantenidos por enlaces covalentes y organizados como un componente fibrilar en la matriz extracelular (Hynes y Yamada, 1982; Ruoslahti y *col.*, 1982; Mosher y *col.*, 1991; Lucena y *col.*, 2007).

La fibronectina es una glicoproteína dimérica, formada por una molécula asimétrica que consiste de dos subunidades similares de 220 kDa, unidas por puentes disulfuro cerca del extremo carboxilo. Cada subunidad está formada por una serie de dominios funcionalmente distintos con diferentes especificidades de unión a moléculas. Uno de ellos, ubicado en la región central, es el dominio de unión celular y contiene la secuencia del tripeptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD); sitio que reconocerá la integrina para su adhesión. Entre sus receptores, se encuentran principalmente la integrina $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha IIb\beta 3$ (Jimenez-Marín, 2002). La fibronectina es esencial para la migración y diferenciación de muchos tipos celulares durante la embriogénesis (Lodish y *col.*, 2002); esto fue demostrado en embriones de ratón los cuales carecen de fibronectina (*fibronectin-null*) que mueren a los 8,5 días de gestación, con defectos en el desarrollo del mesodermo, tubo neural y vasos sanguíneos (Johansson y *col.*, 1997). Trabajos realizados en placenta humana (Kayisli y *col.*, 2005) y en placenta murina (Kaloglu y Onarlioglu, 2010) demostraron la presencia de fibronectina y

laminina tanto en endometrio como en placenta fetal, sugiriendo su participación en la decidualización, angiogénesis e implantación.

Laminina:

La laminina es un heterotrímero formado por tres cadenas polipeptídicas (α , β , γ) dispuestas en forma de cruz y unidas mediante puentes disulfuro. Su función es anclar las células epiteliales a la lámina basal porque tiene sitios de unión para moléculas de integrinas de la membrana celular. Forma principalmente la lámina basal en las primeras etapas del desarrollo embrionario donde prácticamente no hay colágeno. Su importancia queda de manifiesto por que los embriones de ratón que carecen de esta proteína, mueren en el útero, y son incapaces de formar una lámina basal (Alberts y *col.*, 2016). La laminina contiene regiones compatibles con receptores para integrinas ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$) y la interacción con ellos se da a través de varias secuencias de aminoácidos, localizados en diferentes dominios de las moléculas. En el trofoblasto humano, la laminina se localiza en la membrana basal y tiene un papel fundamental durante los procesos de implantación, migración, angiogénesis y en la diferenciación de las vellosidades placentarias (Charpin y *col.*, 1985; Church y *col.*, 1997; Arenas y Zubaran, 2002; Shan y *col.*, 2015). No se han encontrado registros acerca de la expresión de la laminina durante la gestación en la especie porcina.

Colágeno V:

Los colágenos forman una gran familia de proteínas fibrosas presentes en todos los animales pluricelulares. Son secretados en grandes cantidades por las células del tejido conectivo (fibroblastos principalmente) y en cantidades menores por muchos otros tipos celulares. Tienen por característica agruparse formando una estructura supramolecular, helicoidal,

trimérica, larga y rígida, en la que tres cadenas polipeptídicas de colágeno, denominadas cadena α , se enrollan sobre si mismas formando una superhélice filiforme. Actualmente se conocen en el humano aproximadamente 40 tipos de colágenos con diferentes localizaciones y funciones (Alberts y *col.*, 2016). Los colágenos han sido clasificados teniendo en cuenta la forma en que se agregan: colágenos fibrilares I, II, III, V y XI y colágenos no fibrilares VI, VII, VIII, X (Arenas y Zubarrán, 2002). El colágeno tipo V es un colágeno fibrilar presente en el tejido conectivo de la mayoría de los órganos como la piel, córnea, músculo esquelético, placenta, etc (Mizuno, 2001). Se asocia con el colágeno de tipo I para resistir fuerzas de tracción en los tejidos. El colágeno V interactúa en la membrana basal con integrinas, laminina y fibronectina, y participa en la adhesión del epitelio al tejido conectivo subyacente (Alberts y *col.*, 2016). En su molécula posee sitios que reconocen a las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, entre otras. Estudios en humanos sugieren que el colágeno V tendría un rol en la implantación, migración y el mantenimiento de la interfase durante la gestación, al regular el correcto desarrollo de la matriz extracelular de la decidua; Iwahashi y *col.* (1996; 1998) demostraron que un desbalance en la placenta del colágeno V perjudicaría la salud de la gestación humana. No hay trabajos que demuestren la presencia del colágeno V en la IFM durante la gestación porcina.

En la actualidad, hay pocos trabajos acerca de la expresión de estas moléculas de adhesión y sus ligandos durante el desarrollo de la gestación porcina en la IFM; y en particular con respecto a su relación con el sistema inmune (Ashworth y *col.*, 2010). En 2011 Williamson postuló que habría una interacción entre las integrinas y el sistema inmune en la interfase de la gestación porcina, ya que encontró coincidencias entre la expresión de integrinas en la IFM con determinadas citoquinas que podrían estar regulando al sistema inmune, tanto innato como adquirido.

Comprender los eventos moleculares que regulan la expresión de estas moléculas de adhesión y sus ligandos en la interfase feto-materna durante la gestación porcina, ayudaría a diagnosticar e identificar las causas de pérdida embrionaria/fetal y mejorar las tasas de preñez en esta especie.

Sistema inmunológico en la gestación

El sistema inmunológico consta de un conjunto de células y moléculas solubles que actúan coordinadamente para efectivizar la defensa del organismo ante la presencia de antígenos. En la gestación interviene tanto el sistema inmune materno innato como el adquirido. Particularmente se destaca la acción de las células natural killer (NK), los macrófagos, los linfocitos T (LT), los linfocitos B (LB), y numerosas citoquinas (Engelhardt *y col.*, 1997; Cristofolini, 2010; Williamson, 2011).

Con respecto a la respuesta natural, innata o inespecífica, ella constituye la primera barrera de defensa del sistema inmune, y está mediada por una serie de mecanismos celulares (activación de granulocitos, macrófagos y células NK) y factores solubles, como las citoquinas, que actuando de una manera coordinada brindan al organismo una respuesta rápida e inespecífica.

Las citoquinas son proteínas reguladoras críticas, responsables de determinar la naturaleza de la inmunorespuesta. Numerosos trabajos están centrados en el rol que desempeñan las citoquinas durante la gestación y en especial en la interfase feto-materna, analizando el tipo celular que las produce y la cadena de regulaciones que sufren (Zion y Orvieto, 1992; Clark, 1999; Modric *y col.*, 2000; Ashworth *y col.*, 2010; Tessier *y col.*, 2015). Las interleuquinas (IL) 1, IL-2, IL-6, IL-12, secretadas por neutrófilos, macrófagos, fibroblastos y células NK, entre otras células, intervienen en la respuesta natural y por una retroalimentación positiva estimulan a más células inespecíficas, para generar una amplificación de la respuesta.

Asimismo, estas citoquinas se encargan de estimular y activar tanto a linfocitos T (LT) como a linfocitos B (LB). A su vez, los macrófagos secretan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual inicia la respuesta inflamatoria, y contribuye al arribo de más células al endometrio.

El interferón gama (IFN- γ) es producido por las células NK y luego por los LT CD4+ y CD8+ activados, por lo que actuaría favoreciendo la diferenciación linfocitaria hacia células T, tipo Th1 citotóxicas. Sin embargo, se ha demostrado en porcinos, que su presencia en el período preimplantacional y en la preñez temprana, no generaría tal respuesta citotóxica (Williamson, 2011). Además, el trofoblasto porcino, a diferencia de lo que ocurre en otras especies como el ser humano, secreta gran cantidad de IFN- γ tipo II, durante el período de implantación (Lefevre *y col.*, 1998; Koncurat *y col.*, 2001) y a los 32 días de preñez (Koncurat *y col.*, 2010; Williamson, 2011); lo que hace suponer que cumpliría un rol diferente en la interfase feto-materna, no induciendo una respuesta citotóxica (Williamson, 2011).

Estudios en placenta humana, demostraron que uno de los mecanismos por el cual el trofoblasto puede evitar el ataque inespecífico de las células inmunes maternas, es mediante la inducción de la apoptosis en leucocitos, a través de la expresión en las células trofoblásticas de ligandos de apoptosis que se unirán a leucocitos maternos que posean su receptor para impedir una respuesta de tipo citotóxica (Baraño, 2010). Además, durante la implantación humana, se produce apoptosis en las células endometriales, lo que ocasiona remodelaciones uterinas que le permiten interdigitarse con el trofoblasto. Las células apoptóticas, producto de ambos procesos, serían eliminadas por los macrófagos, y promoverían en ellos la producción de citoquinas antiinflamatorias e inmunosupresoras como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), las cuales favorecerían la supervivencia del trofoblasto.

instalando la tolerancia inmune, ya que estas citoquinas bloquearían la actividad citotóxica de los LT y de las células NK (Mor y Koga, 2008; Barañao, 2010).

En cuanto a las células NK presentes en el endometrio, denominadas NK uterinas (NKu), son los leucocitos más abundantes del endometrio durante el período preimplantacional y en la preñez temprana en humanos y murinos. A diferencia de otras especies, en porcinos son pequeños linfocitos agranulados (Rodriguez-Martinez, 2010). Las células NK inmaduras o NK2 producen IL-4, IL-5 e IL-13. En presencia de IL-4, las NK2 se diferencian en NK0 y producen IL-13 e INF- γ . Se ha determinado en murinos y humanos, que en casos de gestaciones anormales o problemas en la implantación, estas últimas maduran a células NK1 que producen IFN- γ y son citotóxicas, provocando el aborto. Se observó que en embarazos normales predominan en decidua las células NK3 las cuales producen TGF- β y NKr1 (NK reguladoras de tipo 1) en sangre e inducen producción de IL-10. Se considera que en la mujer y el ratón estas células secretan citoquinas proangiogénicas que regulan el desarrollo placentario y el establecimiento de la preñez (Barañao, 2010). Estudios realizados en bovinos, ovinos y porcinos, especies con placenta no invasiva (Croy y *col.*, 1988; Yu y *col.*, 1993; Engelhardt y *col.*, 2002) en el período de implantación, han demostrado que las NKu serían los leucocitos más abundantes en el endometrio en los sitios de adhesión al trofoblasto, así como también en estroma y glándulas endometriales. Engelhardt y *col.* (2002) postulan que la producción de INF- γ vía NKu, sería responsable del éxito en la angiogénesis y neovascularización placentaria porcina, proceso crucial para el desarrollo de una placenta exitosa y la supervivencia embrionaria.

La respuesta inmune adquirida o específica en el endometrio se pone en marcha luego de la secreción de citoquinas por las células inespecíficas, que activarán a los diferentes grupos celulares efectores del sistema inmune específico. En consecuencia la respuesta inmune se

inclinará hacia una respuesta de tipo citotóxica o de tipo humorar dependiendo de la predominancia de citoquinas presentes en el endometrio. Particularmente, se destaca la acción de algunas citoquinas de actividad inmunosupresora, tales como el TGF- β , el factor estimulante de colonias granulo-monocitarias (GM-CSF), la IL-4, la IL-6, la IL-10 y la IL-13, que actuarían inhibiendo la secreción de otras citoquinas que pueden activar a las células NK, a los macrófagos y a las células T tipo Th1, citotóxicas, consideradas peligrosas para una gestación exitosa (Clark, 1999; Margni, 1996; Koncurat y *col.*, 2010; Williamson y *col.*, 2015). La presencia de IL-4 en la interfase feto materna humana, activará a los LT CD4+ y LB, que responderán desarrollando una respuesta de tipo humorar generando anticuerpos. Por el contrario la predominancia en el medio de IL-2, activará a los linfocitos T CD8+, los cuales responderán mediante citotoxicidad (Tizard, 2009).

Estudios en humanos, murinos y porcinos (Engelhardt y *col*, 2002; Croy y *col*, 2009), demostraron que, en la gestación temprana, habría un reclutamiento linfocitario subepitelial en el endometrio, que establecería un ambiente inmunológico adecuado en la interfase, para instalar inmunotolerancia y, a su vez, proteger tanto a la madre como al embrión de agentes infecciosos. A partir de estos estudios se estableció que una de las subpoblaciones leucocíticas más abundantes que se encuentra en el endometrio en la gestación temprana son los linfocitos T auxiliares (Th: helper). Esta subpoblación especial de linfocitos T CD4+, tienen la capacidad de diferenciarse de linfocito Th0 (prolinfocito virgen) a linfocitos Th1 o Th2, capaces de desencadenar una respuesta inmune celular o humorar respectivamente; o se pueden diferenciar en células con otros patrones de secreción de citoquinas como las células Th3, productoras de TGF- β y los linfocitos T reguladores de Tipo 1 o adaptativos (Tr1) que producen IL-10 (Baraño, 2010). Se demostró, en humanos, que la presencia de IL-4 favorece la diferenciación de linfocitos Th0 hacia linfocitos Th2, anulando la respuesta inmune citotóxica, y esto

podría ser perpetuado por la presencia de IL-6 e IL-10. La IL-10 lo que es esencial no sólo para que se produzca la supresión de las células citotóxicas por parte de las Tr1, sino también para que los linfocitos Tr1 puedan diferenciarse (Lim y *col*, 2000; De los santos y *col.*, 2005). Se postula que los Tr1 y los Th3 durante la gestación estarían regulando la respuesta inmune materna hacia la tolerancia embrionaria, y por lo tanto se considera que existe un tipo de regulación Th1/Th2/Th3/Tr1(Raghupathy, 2001).

Durante la gestación en humanos, esta predominancia de la respuesta Th2/Th3/Tr1 resulta en un aumento de la respuesta inmune humoral. Esto implica que se produzcan mayor cantidad de anticuerpos y, para que se produzca una gestación viable, muchos de éstos serían del tipo de anticuerpos bloqueantes o asimétricos. Estos anticuerpos se denominan así porque tienen un grupo glicosilado (predominantemente manosa) en uno de los fragmentos Fab de la molécula de inmunoglobulina G (IgG) (Margni, 1989); debido a esto se unen univalentemente al antígeno y lo bloquean, no desencadenando una respuesta inmune, por lo que estarían protegiendo al embrión del ataque inmunológico materno. En las respuestas inmunes normales, en sueros humanos y murinos se observa aproximadamente un 15% de moléculas IgG asimétricas funcionales sobre el total de IgG séricas; dichos valores aumentan a un 30% en sueros provenientes de la gestación (Malan Borel y *col.*, 1991). Recientemente, estudios realizados en la gestación porcina demuestran que, a pesar de no haber diferencias en las concentraciones séricas de Ac asimétricos en cerdas no gestantes comparadas con las que cursan una gestación, habría una predominancia de IgG asimétricos en la interfase fetomaterna durante la gestación, con mayor concentración en la placenta fetal (Gentile y *col*, 2004; Garro y *col*, 2014; Garro, 2015).

Con base a los antecedentes presentes, esta tesis abordará el estudio de citoquinas que podrían cumplir un rol fundamental durante la gestación porcina; como la IL-1 β y la IL-2, las cuales generarían un perfil de respuesta de tipo citotóxica; la IL-4, que permitiría evaluar el nivel de respuesta de tipo humorral; y la IL-10, citoquina inmunosupresora, que permitirá determinar la magnitud de la respuesta tipo Tr1 en los distintos períodos de gestación.

Citoquinas en la gestación porcina

Interleuquina 1 β (IL-1 β)

La familia de la IL-1, consiste en veintidós moléculas que incluyen citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-1 α , un antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA), un accesorio del receptor de IL-1 (IL-1RAP), un receptor IL-1 funcional (IL-1RI) y un receptor señuelo, el receptor IL-1 de tipo II (IL-1RII) (Sims y Smith, 2010; Garlanda y *col.*, 2013). Al igual que otras citoquinas, la IL-1 es pleiotrópica y puede influir en la biología de virtualmente todas las células y tejidos incluyendo aquellos involucrados en la reproducción de mamíferos (Simón y *col.*, 1998a; Garlanda y *col.*, 2013). Particularmente, la IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria, que actúa como mediador central de la inflamación y la inmunidad innata en los mamíferos (Dinarello y *col.*, 2010; Garlanda y *col.*, 2013). Liberada normalmente por las células hematopoyéticas tales como los monocitos de la sangre, los macrófagos, las células dendríticas de la piel y la microglía del cerebro, la IL-1 β es un pirogénico endógeno, que propicia, probablemente, la proliferación de los leucocitos y su migración durante la infección, induciendo fiebre (Sims y Smith, 2010; Garlanda y *col.*, 2013). La IL-1 β , proteína de 267 aminoácidos y 30 kDa, también participa en la gestación y juega un rol fundamental en el diálogo que se establece entre el útero y el *conceptus* durante la implantación en humanos, ratones y porcinos (Simón y *col.*, 1994a; 1997; 1998b; Tuo y Bazer, 1996; Ross y *col.*, 2003; Mathew, 2014). La IL-1 β en la placenta de mamíferos, influencia la implantación del

conceptus, la invasión y la inmunotolerancia feto-materna (Simón y *col.*, 1995, Paulesu y *col.*, 2005). La IL-1 β tiene un efecto directo en la receptividad uterina a través de la modulación de las subunidades alfa v (αv) y las subunidades beta 3 ($\beta 3$) de las integrinas en el epitelio uterino (Simón y *col.*, 1993, Barañao y *col.*, 1997, Krüssel y *col.*, 1998). Además de sus efectos sobre la receptividad uterina, la IL-1 puede promover la implantación invasiva en primates. Durante la invasión a la decidua materna, la IL-1 β puede detectarse dentro de las células del citotrofoblasto viloso, del trofoblasto extravílico intermedio y del sincitiotrofoblasto, así como en las células deciduales del estroma materno (Simón y *col.*, 1994b; Barañao y *col.*, 1997). Tuo y *col.* (1996) fueron los primeros en demostrar que el *conceptus* porcino regulaba la expresión de IL-1 β durante el desarrollo temprano y en el momento de la elongación. La expresión del IL-1 β en el *conceptus* aumenta rápidamente durante el corto período de elongación y luego disminuye drásticamente (2000 veces) a medida que el *conceptus* se adhiere a la superficie uterina, llegando a ser casi indetectable hacia el día 14 de la gestación (Ross y *col.*, 2003).

En cerdos, se sugiere que la IL-1 β es necesaria para promover el desarrollo temprano y el alargamiento rápido del *conceptus*, mejorar la receptividad uterina para la implantación y aumentar la permeabilidad de los vasos sanguíneos endometriales para promover el intercambio hemotrófico fetal-materno (Ross y *col.*, 2003; Waclawik, 2011; Mathew, 2014).

Se han reportado interacciones positivas entre las vías de señalización de receptor de estrógenos (ER) e IL-1 β en los tejidos reproductivos, particularmente, en líneas de células epiteliales endometriales humanas, lo que sugiere que los estrógenos y la IL-1 β pueden colaborar para promover la implantación en el cerdo (King y *col.*, 2010). Estudios realizados en placenta humana (Hanna y *col.*, 2000), demostraron que la IL-1 β , además de su rol en la gestación temprana, se eleva en la placenta a término, con el fin de generar un ambiente

proinflamatorio para preparar el parto y la expulsión de las placas. Sin embargo, no hay estudios acerca de la concentración tanto sérica como placentaria de la IL-1 β luego del período de implantación en la gestación porcina.

Interleuquina 2 (IL-2)

IL-2 es una citoquina pleiotrópica compuesta por 153 aminoácidos, de 15,5 kDa. Es producida principalmente por células T CD4 + estimuladas con antígeno, pero también es sintetizada en menor medida, por células CD8 +, células NK, células dendríticas activadas (DC), y mastocitos (Liao y *col.*, 2013). Además de ser un potente activador del factor de crecimiento de células T, la IL-2 induce la proliferación de células NK y aumenta su capacidad citolítica, promueve la producción de anticuerpos y la proliferación por células B, y es esencial para la muerte celular inducida por la activación (AICD). La IL-2 también impulsa el desarrollo de células T reguladoras (células Treg), que tienen función supresora y tolerancia mediata (Liao y *col.*, 2013).

Estudios en ratones revelaron que la sobreexpresión de la IL-2, inhibe la viabilidad de la gestación (Tezabwala y *col.*, 1989). También, se demostró que las mujeres cuyas concepciones terminan en aborto tienen niveles séricos de IL-2 significativamente altos (Marzi y *col.*, 1996) y que mujeres que durante el primer trimestre tuvieron concentraciones séricas elevadas de IL-2, posteriormente desarrollaron preeclampsia (Hamai y *col.*, 1997).

Romero-Adrián y *col.* (2002), hallaron, a través de estudios del receptor soluble de la IL-2 (la unión citoquina-receptor soluble inhibiría su actividad celular), que los niveles séricos del receptor en el embarazo normal de mujeres, fueron inferiores a los del grupo no embarazado, por lo tanto postularon que habría una activación celular baja por parte de la IL-2, compatible con mejores condiciones para el aloinjerto fetal. Estudios en el tercer trimestre demostraron que hubo un aumento de IL-2 en placenta humana (Romero-Adrián y *col.*, 1999) que podría

estar relacionado con el papel de las citocinas proinflamatorias en los eventos uterinos previos al parto (Romero-Adrián y *col.*, 2002). No se han hallado trabajos que describan la concentración sérica ni tisular de la IL-2 durante la gestación en otros mamíferos, incluida la especie porcina.

Interleuquina 4 (IL-4)

La IL-4, también conocida como factor estimulador de células B, es una citoquina Th2 que muestra efectos pleiotrópicos durante las respuestas inmunes. Es un polipéptido glicosilado compuesto por 153 aminoácidos que pesa unos 20 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/P05112>). Induce la expresión de antígenos clase II del complejo mayor de histocompatibilidad -MHC- en las células B, monocitos y macrófagos, y promueve la síntesis de inmunoglobulina E (O'Garra, 1989). Es una glicoproteína secretada por los linfocitos CD4 Th2, las células cebadas y algunas CD8. Tiene efecto antitumoral, es inhibidora de la liberación de citoquinas proinflamatorias por los monocitos activados y reguladora de los linfocitos CD8 citotóxicos (Molina Vilchez y *col.*, 2000).

Según Dealtry y *col.* (2000), las citoquinas asociadas a una respuesta Th2, contribuyen a la implantación del embrión, el desarrollo de la placenta y la supervivencia del feto hasta el término de la gestación. Se afirma que en el embarazo normal hay un predominio de las citoquinas Th2 sobre las Th1, a fin de crear cierto grado de inmunosupresión celular, que permita el desarrollo feto-placentario (Wegmann, 1993; Molina Vilchez y *col.*, 2000). De las citoquinas detectadas en la placenta en humanos, la IL-4 es la principal (Omu y *col.*, 1999), y junto con la IL-5, la IL-10 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), es beneficiosa para el crecimiento placentario (Raghupathy y Tangri, 1996; Gratacós y *col.*, 1998), lo que apoya la importancia de los productos Th2 en los mecanismos de protección de la viabilidad del embarazo contra la acción de los productos proinflamatorios

Th1. Es un potente inhibidor de los linfocitos Th1 ya que inhibe la producción de INF γ y de IL-12 y con ello el proceso de retroalimentación positivo que tiene lugar en la respuesta celular (el INF γ activa a los macrófagos, los macrófagos segregan IL-12 y la IL-12 favorece la diferenciación a Th1). Además, estimula la producción de progesterona en el cuerpo lúteo (Molina Vilchez y col., 2000). Omu y col. (1999) plantean que la IL-4 podría ser necesaria durante la invasión trofoblástica en humanos. Sin embargo, estudios de inmunohistoquímica e inmunoensayo de la IL-4 en la placenta humana (Hanna y col., 2000), sólo han hallado una débil expresión de IL-4 en el trofoblasto durante el primer trimestre y sus niveles son prácticamente indetectables a término. Los niveles en sangre periférica fueron equivalentes a los de la mujer no embarazada. A la fecha no se han documentado estudios acerca de los niveles de IL-4 durante la gestación en la especie porcina.

Interleuquina 10 (IL-10):

La IL-10 es una citoquina de 18 kDa producida por el subgrupo TH2 de las células cooperadoras CD4+. También es producida por algunas células B activadas y por algunas células no linfocíticas como macrófagos activados, queratinocitos y citotrofoblastos placentarios (Roth y col., 1996). Las dos actividades principales de la IL-10 son inhibir la producción de citoquinas por los macrófagos (TNF, IL-1 e IL-2) e inhibir las funciones accesorias de los macrófagos en la activación de la célula T. Además, la IL-10 tiene acciones estimuladoras sobre las células B (Abbas, 1995; Walter, 2014).

La IL-10, citoquina inmunosupresora, genera inmunotolerancia, evitando el rechazo del aloinjerto fetal por el sistema inmune materno (Barañao, 2010). En estudios en humanos y murinos, durante la gestación, se asumía que la fuente celular de IL-10 eran los linfocitos T o el trofoblasto. Sin embargo, una subpoblación de linfocitos B, las células B10 reguladoras, se

presentan como una fuente importante de IL-10 (DiLillo *y col.*, 2010). La principal función de la IL-10 producida por estas células B10, es poder mantener el fino balance inmunológico requerido en la gestación para generar la tolerancia del aloinjerto fetal. Se ha demostrado que la IL-10 producida por las células B10 mantiene a las células dendríticas en un estado de inmadurez, inhibiendo su capacidad de presentar antígenos y la consecuente activación de las células T (Jensen *y col.*, 2013).

En estudios realizados en placenta humana, se comprobó que la IL-10 se producía niveles significativos en el primer y segundo trimestre, pero su producción disminuía a término. Así mismo, la transcripción de ARNm para la IL-10 también se reducía con la edad gestacional, por lo que no se podía atribuir la disminución de IL-10 a la senescencia placentaria, mientras que cantidad de receptor es para la IL-10 se mantenía constante a lo largo de la gestación, lo que lleva a proponer que la producción de esta IL sería independiente de la expresión de su receptor. En sangre periférica de mujeres embarazadas, los niveles de IL-10 eran mayores en el primer trimestre, pero luego disminuían poco a poco hasta ser prácticamente iguales que en no gestantes al final del embarazo (Hanna *y col.*, 2000). Roth *y col.* (1996) postulan que la producción de IL-10 por la placenta sirve para proteger al feto de la respuesta celular mediada por Th1. Además, se ha identificado como una citoquina importante en el embarazo, ya que puede estar involucrada en la maduración y mantenimiento del cuerpo lúteo y en la producción de progesterona (Hashii *y col.*, 1998). Estudios en monos Rhesus (Sadowsky *y col.*, 2003) demostraron los efectos inhibitorios que posee la IL-10 sobre la motilidad uterina en gestación tardía, para evitar el parto prematuro. En bovinos, se ha determinado la concentración de IL-10 en tejido cervical momentos previos al parto, durante el mismo y luego del parto, postulándose que su alta concentración en estos estadios indica que estaría cumpliendo un rol inmunoregulador durante la gran inflamación que genera la maduración cervical, para así

prevenir el excesivo daño tisular generado por este proceso (Van Engelen y *col.*, 2009). No hay datos acerca de los niveles de la IL-10 durante la gestación porcina.

En base a los antecedentes presentes, esta tesis profundizó el estudio de la expresión de algunas integrinas y sus ligandos en la interfase feto-materna; como así también determinó la concentración de algunas de las citoquinas que regularían al sistema inmune durante la gestación porcina; tratando de dilucidar si habrían relaciones entre la expresión de las moléculas de adhesión y los niveles de las distintas citoquinas. A partir de los resultados generados, se espera comprender parte de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de las moléculas de adhesión para conformar una interfase feto-materna y una gestación exitosa en porcinos.

Objetivo General

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

Objetivos Específicos

- Determinar la expresión de integrinas y sus ligandos sobre preparados histológicos de placenta porcina de diferentes períodos de preñez.
- Determinar la concentración de IL-1 β , IL-2, IL-4 e IL-10 en suero y homogenatos de placenta porcina provenientes de diferentes períodos gestacionales.
- Establecer posibles relaciones entre la expresión tisular de integrinas y sus ligandos con los niveles de citoquinas hallados durante el desarrollo placentario de la preñez porcina.

Hipótesis

En el proceso de la placentación porcina existe una relación entre la expresión de integrinas placentarias y de sus ligandos y el sistema inmune materno.

MATERIALES y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 23 tractos reproductivos de cerdas destinadas a faena, entre segundo y tercer parto, mestizas (Landrace x Large White) con períodos gestacionales comprendidos entre los 30 y 114 días de gestación (dg) y 8 úteros de cerdas no gestantes (NG). Los tractos se obtuvieron de frigoríficos de la zona de General Pico, provincia de La Pampa, Argentina ($35^{\circ} 45'$ y $63^{\circ} 50'$ de latitud y longitud, respectivamente), excepto 8 muestras placentarias de cerdas a término que se tomaron en criaderos de la zona, durante el parto. 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=23) se obtuvieron de cerdas que se encontraban en diferentes períodos gestacionales: 30-35 dg (n=7), 60-63 dg (n=4), 70-78 dg (n=4) y 114 dg (n=8) (Figura 1). 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: 30-35 dg (en adelante 30 dg); 60-63 dg (en adelante 60 dg); 70-78 dg (en adelante 70 dg) y 114 dg. Se utilizaron esos períodos para el estudio ya que en ellos la

gestación cumple con etapas cruciales para su desarrollo exitoso. A los 30 dg comienza la osificación y el desarrollo del sistema inmunológico (a los 30 dg se detectan las primeras células CD3+, según Butler *y col.*, 2009 y Sinkora y Butler, 2009). En el período de 60 dg se alcanza el mayor crecimiento placentario y se terminan de formar las vellosidades secundarias y terciarias de la interfase feto-materna (Cristofolini, 2010). A los 70 dg las placetas 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). El período a término (114 dg), se escogió ya que indica el fin de los mecanismos moleculares involucrados en el mantenimiento de la gestación.



Figura 1: Placenta fetal de 70 dg.

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

En las cerdas gestantes de 30, 60 y 70 dg se realizó la palpación de los cuernos uterinos para detectar la ubicación de los embriones o fetos. Luego los cuernos uterinos se incidieron por la curvatura mayor para observar el sitio de implantación y recoger las muestras de tejido placentario. Primero se obtuvieron muestras de la interfase feto-materna e inmediatamente se las colocó en formol bufferado al 10% para su posterior tratamiento histológico (determinación de integrinas y sus ligandos mediante inmunohistoquímica). Seguidamente, dado el tipo de placenta, no invasiva, se separó fácilmente la placenta fetal de la materna para obtener muestras de cada estructura por separado.

Cada placenta fetal fue extraída y colocada en la mesada; se analizó su estructura anatómica, se la pesó, se midió su longitud y se procedió a la extracción de muestras tisulares de la porción embrionaria. El útero gestante se analizó macroscópicamente confirmando su estructura normal y se tomaron muestras de la porción central de cada unidad feto-materna.

Con las muestras extraídas de las placenas por separado se realizaron, inmediatamente, los extractos placentarios porcinos: Homogenatos de Placenta Materna (HoPM) y Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF) para la determinación de los niveles de interleuquinas durante la gestación.

Con respecto a las placenas de 114 dg, éstas fueron obtenidas en el momento del parto y llevadas refrigeradas al laboratorio. Se procedió a la toma de muestras de la placenta fetal con la misma técnica arriba mencionada.

También se trabajó con úteros de cerdas no gestantes para utilizarlos 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 no gestante porcino (No gestante Materno: NGM) para la determinación de las citoquinas.

Extracción de sangre

En el caso de las muestras provenientes de frigorífico, a cada animal se le extrajo sangre por corte de la vena yugular. En el caso de las cerdas con gestación a término se realizó la extracción sanguínea por el método de flevopunción. La vena de elección fue la vena medial de la oreja.

Obtención de Suero

Una vez extraída la sangre, se la mantuvo en baño maría 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 (500g) 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 (NGM)

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 las 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 500 g (1700 rpm) por 20 minutos y el sobrenadante se alicuotó y conservó a -20°C. Con este procedimiento se realizaron los denominados homogenatos de placenta porcina materna (HoPM) y homogenatos de placenta porcina fetal (HoPF) (Koncurat y col., 1999). Con respecto a los extractos de útero no gestante (NGM), se extrajo de cada cuerno

uterino, en la zona de la curvatura mayor, una muestra de 5 g de tejido. Luego, dichas muestras extraídas fueron procesadas con la misma técnica previamente descripta.

Análisis de la estructura de la placenta y útero

Realización de cortes histológicos para microscopía óptica: Se extrajeron muestras de 1 cm² de tejido placentario, tanto materno como fetal y se las fijó en formol tamponado con fosfato al 10% (Luna, 1968) durante 20 hs. Luego las muestras fueron lavadas con agua de grifo y deshidratadas de la siguiente manera: se las colocó en alcohol 70° por 1 hora; a continuación en alcohol 96° (Bialcohol®, Argentina) por una hora, nuevamente en alcohol 96° una hora, deshidratante histológico (Biopur®, Argentina) una hora, deshidratante histológico/xilol por partes iguales una hora y finalmente se las sumergió en xilol (Dorwil®, Argentina) una hora. 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 termostatizado a 40°C con agua y gelatina para que no se plieguen. Seguidamente se colorearon con Hematoxilina-Eosina (Luna, 1968), un preparado de cada placenta de cada período de gestación analizados y de útero no gestante. 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 megapixeles (Canon, Tokio Japón).

Determinación de integrinas y sus ligandos

Se determinó la expresión de las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ y sus ligandos fibronectina, laminina y colágeno V por inmunohistoquímica y sobre los resultados obtenidos se realizó la cuantificación de imágenes: determinación de la densidad óptica (DO) y del porcentaje de área inmunomarcada (% AIM).

Inmunohistoquímica

Dado que no existe en el mercado gran disponibilidad de anticuerpos anti-integrinas y ligandos específicos para porcinos, se trabajó con anticuerpos que reaccionan con la especie porcina y humana, ya utilizados por Bowen *y col.*, (1996), García *y col.*, (2004) y Rashev *y col.*, (2005). Sobre los cortes histológicos de cada período de gestación se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta LSAB (Labeled Streptavidin Biotin Method).

Integrinas:

Determinación de Integrina $\alpha v\beta 3$

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% (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 maría con buffer citrato 0,01 M, pH 6,0 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 colocó BSA (albúmina sérica bovina) al 3% por 15 min a fin de bloquear las uniones inespecíficas. Se agregó un anticuerpo de ratón anti-integrina $\alpha v\beta 3$ humana-porcina monoclonal conjugado con biotina, MAB1976B

(Chemicon, USA), dilución 1:500, 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). No se agregó un segundo anticuerpo biotilinado, ya que el primer anticuerpo utilizado estaba conjugado con biotina. Se colocó estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (streptavidina/HRP, Dako Cytomation, Dinamarca), se incubó durante 20 min y se lavó con PBS (2x5). A continuación se cubrió con solución cromógena diaminobencidina (DAB) durante 20 min, se lavó con agua destilada (un pasaje) y se contrastó con hematoxilina activada por 1 min (Biopur, Argentina). A las muestras se las deshidrató (usando una batería de alcoholes de graduación creciente, 3 min cada baño: dos veces en alcohol 96°, dos veces en alcohol 100° y dos veces en xilol) y se las montó con un cubreobjetos utilizando bálsamo de Canadá (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 Integrina $\alpha 5\beta 1$

Para la determinación de $\alpha 5\beta 1$ se utilizó un anticuerpo de ratón anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ humana-mono monoclonal, MAB1969 (Chemicon, USA), dilución 1:1500. Hasta la incubación del anticuerpo primario, se utilizó la misma técnica descripta para la determinación de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$; sólo que luego de la incubación del anticuerpo primario, se agregó el segundo anticuerpo biotilinado (inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra, Dako Cytomation, Dinamarca) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, ya que el anticuerpo primario no era biotilinado. Luego se procedió con la misma técnica descripta para la integrina $\alpha v\beta 3$. El control negativo se trató igual que las muestras, sólo que no se agregó el anticuerpo primario sino PBS. Se utilizó piel de ratón como control positivo.

Ligandos

Determinación de Fibronectina, Laminina y Colágeno

Para la determinación de Fibronectina se agregó el anticuerpo de conejo policlonal anti-fibronectina porcina (ab23751, Abcam, Cambridge, Reino Unido), dilución 1:200; para la determinación de Laminina se utilizó un anticuerpo de conejo anti-laminina murina-porcina policlonal, ab11575 (Abcam, USA), dilución 1:500; y para la determinación de Colágeno V se utilizó se utilizó un anticuerpo de ratón anti-Colágeno V humano-porcino monoclonal, NBP1-05118 (Novus Biologicals, USA), dilución 1:300.

Hasta la incubación del anticuerpo primario, se utilizó la misma técnica descripta para la determinación de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$; sólo que luego de la incubación del anticuerpo primario, se agregó el segundo anticuerpo biotilinado (inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra, Dako Cytomation, Dinamarca) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, ya que los anticuerpos primarios no eran biotilinados. Luego se procedió con la misma técnica descripta para la integrina $\alpha v\beta 3$. Los controles negativos se trajeron igual que las muestras, sólo que no se agregó el anticuerpo primario, se agregó PBS. Se utilizó piel de ratón como control positivo.

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, trofoblasto, glándulas y tejido conectivo), de todas las muestras. Los resultados de la determinación de la expresión de las integrinas y sus ligandos fueron expresados en forma semicuantitativa (Rashev y col., 2005). Se tomó como coloración positiva, la observación de un desarrollo de coloración marrón dentro de las estructuras analizadas, con una escala elegida en función de la coloración detectada, determinando que: (-)= negativo, (+)= positividad leve (marrón claro), (++)= positividad moderada (marrón tono medio) y (+++)= positividad fuerte (marrón oscuro).

Técnica de Cuantificación de imágenes

A fin de poder evaluar cuantitativamente la expresión de las moléculas de adhesión y sus ligandos 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 y densitométrico. 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-integrina $\alpha v\beta 3$, anti-integrina $\alpha 5\beta 1$, anti-fibronectina, anti-laminina y anti-colágeno V.

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 extrajo imágenes del epitelio endometrial luminal del útero no gestante (NG), de la placenta materna se observó el epitelio luminal endometrial (gestante materno: GM); y de la placenta fetal, el trofoblasto (gestante fetal: GF). 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 de este trabajo, en relación con el área total, tanto del epitelio endometrial 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 2).

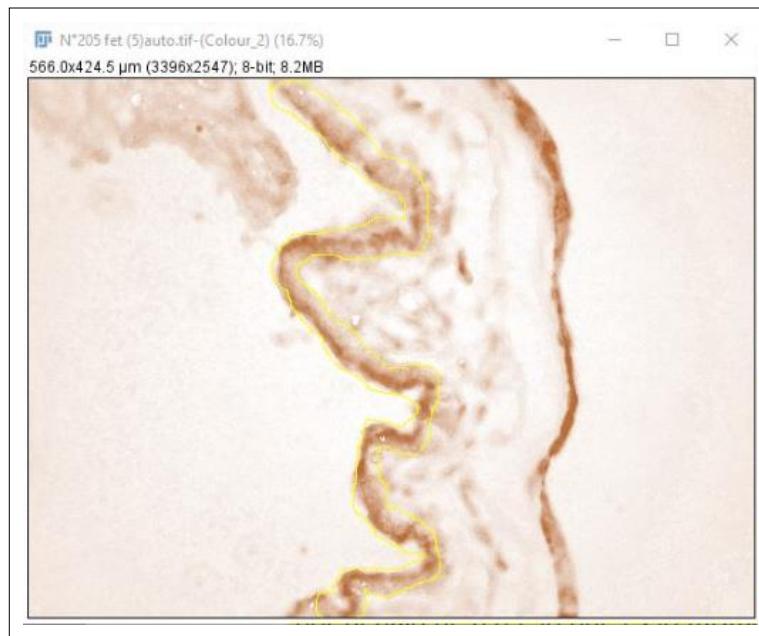


Figura 2: Trofoblasto de 30 días de gestación (Imagen de 8-bit DAB; 400x). Se observa la delimitación del epitelio (línea amarilla) para la posterior medición del %AIM.

Con las imágenes de 8-bit DAB se procedió a delimitar el área a analizar; en el caso del presente trabajo fue el epitelio luminal 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 3).

Mediante esta selección se pudo seleccionar las áreas que presentaron inmunotinción, y distinguirlas de aquellas con tinción negativa; así, entonces, se procedió a cuantificar el área correspondiente a la superficie total del epitelio en la imagen y el área de la inmunoexpresión tanto de las integrinas como de los ligandos. El resultado se expresó como la proporción entre el área específicamente marcada y el área total del epitelio de cada imagen: porcentaje de área inmunomarcada (%AIM; Figura 3) y se los colocó en una planilla de Excel. Los resultados

finales del porcentaje de área inmunomarcada de cada estructura, de cada período de gestación, se expresaron como el promedio de los datos obtenidos de las 20 fotos analizadas.

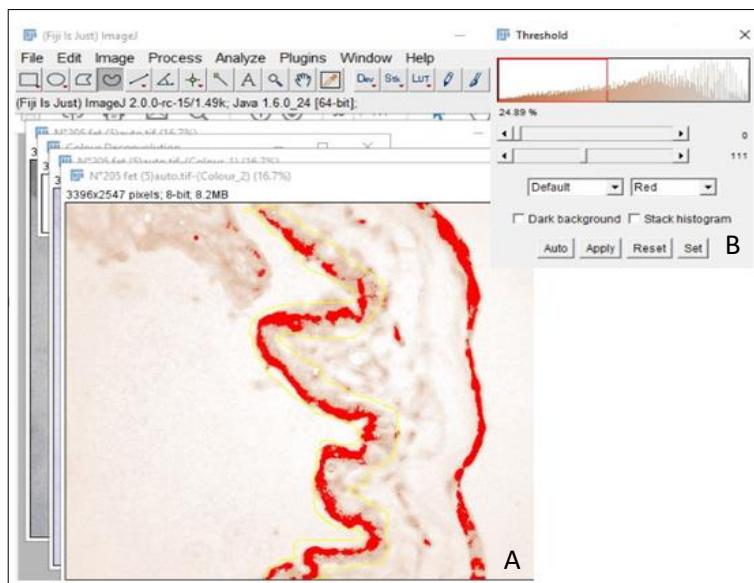


Figura 3: Trofoblasto de 30 días de gestación (Imagen de 8-bit; 400x). A. Marcación en rojo del área inmunomarcada. B. Ventana donde se observa el porcentaje de marrón que ocupó el área previamente establecida (epitelio).

Determinación de la densidad óptica (DO)

Para la determinación de la DO de la expresión de las integrinas y los ligandos, se procedió a delimitar sólo el área inmunomarcada sobre cada estructura a evaluar (en este caso el epitelio materno o fetal) de la misma imagen de 8-bit DAB. Luego con la herramienta “Analyze/Measure” se obtiene una nueva ventana con los resultados de la medición. En dicha ventana se observa el área delimitada (en pixeles), el nivel de intensidad de marrón medio (*Mean*), intensidad de marrón mínimo (*Min*) y el máximo (*Max*) dentro del área inmunomarcada que se delimitó (Figura 4). Para determinar la densidad óptica de esta intensidad de tinción calculada se cargaron los resultados a una hoja de Excel y se utilizó la

siguiente fórmula: Densidad Óptica (DO)= Log (max/mean), donde: max= 255 para una imagen de 8-bit. Esto cuantificó la inmunotinción promedio del área analizada de la imagen debido a la señal del DAB. Los resultados de la DO se expresaron como el promedio de los datos obtenidos de las 20 fotos de cada estructura estudiada.

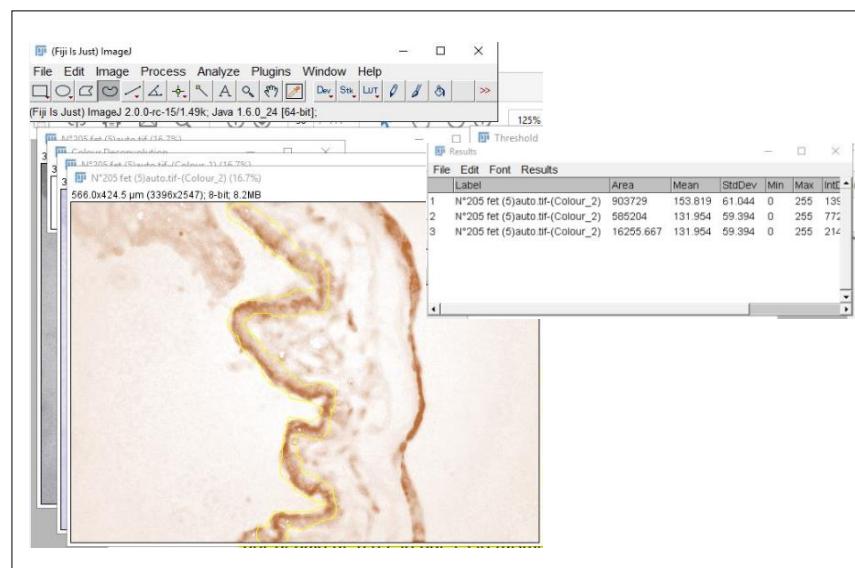


Figura 4: Trofoblasto de 30 días de gestación (Imagen de 8-bit; 400x). Se observa la delimitación sólo de la inmunomarcación, para determinar la media de la intensidad de tinción marrón. En la ventana de resultados se observa cómo se expresan los mismos.

Determinación de la concentración de interleuquinas (ILs) en NGM, HoPM, HoPF y Sueros de cerdas gestantes y no gestantes.

Se realizó mediante enzimoinmunoanálisis (ELISA) (Margni, 1996), la determinación de las siguientes citoquinas: IL-1 β , IL-2, IL-4 e IL-10, en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS), en homogenatos de útero porcino no gestante (NGM), homogenatos de placenta porcina materna (HoPM) y fetal (HoPF) provenientes de los diferentes períodos de gestación estudiados. El procedimiento realizado para dichas determinaciones se describe a continuación:

Determinación de IL-1 β

En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura anti-IL-1 beta porcino (ab100754, Abcam, USA) se adicionaron 100 μ l por pocillo de cada estándar y cada muestra a determinar. Se cubrió la placa y se la incubó toda la noche en heladera (4°C). Luego de la incubación se descartó la solución y se lavó la placa 4 veces con solución de lavado. Se adicionaron 100 μ l de anticuerpo anti-IL-1b porcino biotilinado a cada pocillo. Se incubó la placa por una hora a temperatura ambiente en un agitador horizontal de microplaca a 200 rpm (DPC, USA). Se descartó la solución y se lavó 4 veces con solución de lavado. Se adicionaron 100 μ l de solución estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Streptavidina-HRP) a cada pocillo. Se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente con una suave agitación. Se descartó la solución y se lavó la placa 4 veces. Se colocaron 100 μ l de sustrato tetrametilbencidina (TMB) en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 μ l/pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK® Instruments, Inc. USA). La concentración de interleuquinas presentes en cada una de las muestras se determinó utilizando una curva estándar (Margni, 1996).

Determinación de IL-2

En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura monoclonal anti-IL-2 porcino (IL251-K01, Eagle Biosciences, USA) se adicionaron 100 μ l por pocillo de cada estándar y muestra en los pocillos determinados. Luego, se adicionaron, 50 μ l de anticuerpo anti-IL-2 porcino biotilinado a cada pocillo. Se cubrió la placa y se la incubó toda la noche en heladera (4°C). Luego de la incubación se descartó la solución y se lavó la placa 4 veces con solución de lavado. Se adicionaron 100 μ l de solución estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Streptavidina-HRP) a cada pocillo. Se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente con una suave agitación (agitador de microplacas DPC, USA) y al resguardo de la luz directa. Se descartó la solución y se lavó la placa 4 veces. Se colocaron 100 μ l de sustrato tetrametilbencidina (TMB) en oscuridad a temperatura ambiente durante 10-20 minutos con agitación suave. Posteriormente, se detuvo la reacción con 100 μ l/pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK® Instruments, Inc. USA). La concentración de interleuquinas presentes en cada una de las muestras se determinó utilizando una curva estándar (Margni, 1996)

Determinación de IL-4

En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura anti-IL-4 porcino (IL451-K01, Eagle Biosciences, USA), se adicionaron 100 μ l por pocillo de cada estándar y muestra en los pocillos determinados. Seguidamente se procedió con la misma técnica descripta para la determinación de la IL-2.

Determinación de IL-10

En la placa de ELISA que posee el anticuerpo monoclonal anti-IL-10 porcino (P-1000, R&D Systems, USA) se agregaron 100 μ l de diluyente de ensayo RD1W a cada pocillo. Luego se

adicionaron 100 μ l por pocillo de control, estándar y muestra en los pocillos determinados. Se cubrió la placa y se la incubó por 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal de microplaca a 200 rpm (DPC, USA). Luego de la incubación se descartó la solución y se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se adicionaron 200 μ l de anticuerpo anti-IL-10 porcino conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo. Se incubó la placa por 2 horas a temperatura ambiente con suave agitación. Se descartó la solución y se lavó 5 veces con solución de lavado. Se colocaron 120 μ l por pocillo de sustrato tetrametilbencidina (TMB) en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción con 120 μ l por pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK® Instruments, Inc. USA).

Análisis de los resultados – Estadística

Integrinas y ligandos

A la observación de los resultados de la expresión de las integrinas y sus ligandos, primero se realizó un análisis semicuantitativo, tal como fue expresado por Rashev y *col.* (2005) y Conrad y *col* (2016), con una escala elegida en función de la coloración detectada, determinando que: (-)= negativo, (+)= positividad leve, (++)= positividad moderada y (+++)= positividad fuerte.

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; López-Poveda, 2015; Reparaz Asencio, 2015). Se determinó sobre la interfase placentaria (epitelio luminal endometrial y trofoblasto), la densidad óptica (DO) y el porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de la integrina $\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, de la fibronectina, la laminina y del colágeno V. 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.

Interleuquinas

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos de la determinación de citoquinas en sueros, extractos placentarios y extractos de útero no gestante, éstos fueron ordenados en los 4 períodos de gestación elegidos: 30 dg, 60 dg, 70 dg y 114 dg; y cerdas no gestantes (NG). Las diferencias entre las concentraciones de las citoquinas 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.

DETERMINACION DE LA EXPRESIÓN DE INTEGRINAS Y SUS LIGANDOS MEDIANTE EL USO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

Integrina $\alpha v\beta 3$

Los resultados de la inmunohistoquímica para la determinación de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ realizada sobre cortes desparafinados de diferentes períodos de gestación, se detallan en la Tabla 1.

Días Gestación (dg)	Epitelio endometrial	Epitelio Glandular	Trofoblasto
NG	-	-	
30 dg	++	-	+++ **
60 dg	+++	-	+++ *
70 dg	++	-	++ *
114 dg	ND	ND	+ *

Tabla 1: Expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ sobre epitelio endometrial, glándulas endometriales y trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. ND: no determinado. +, ++, +++: Diferentes grados de positividad. -: Negativo. *: Tinción en porción apical del trofoblasto. **: Tinción en porción apical-basal del trofoblasto.

En el epitelio endometrial luminal del útero no gestante no se observó inmunotinción para $\alpha v\beta 3$ (Figura 5).

Resultados

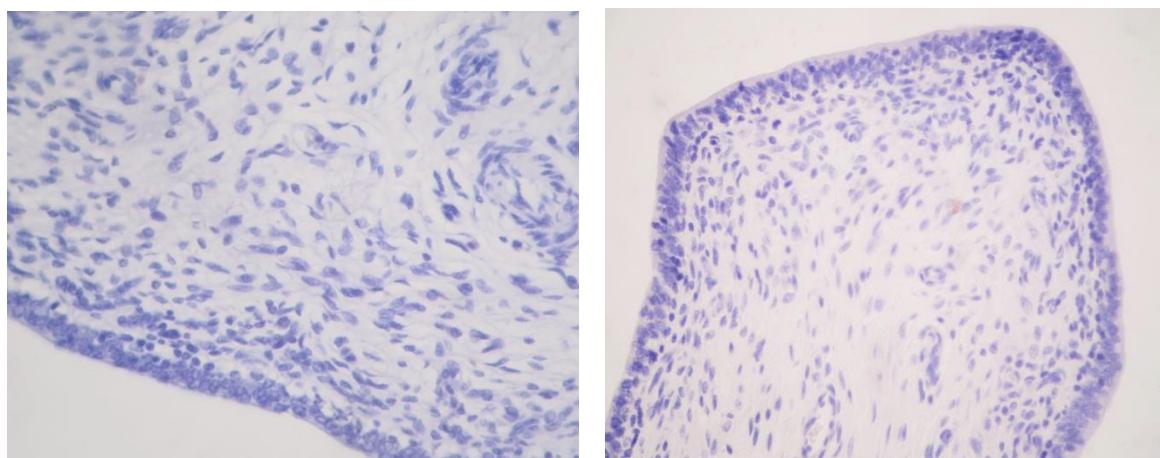


Figura 5: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal negativo a integrina $\alpha v \beta 3$ (400x).

A los 30 dg se halló inmunotinción moderada (++) de $\alpha v \beta 3$ en el epitelio luminal endometrial. El epitelio glandular fue negativo. Se observó fuerte (+++) expresión continua de $\alpha v \beta 3$ en la porción apical y porción basal de las células del trofoblasto (Figura 6).

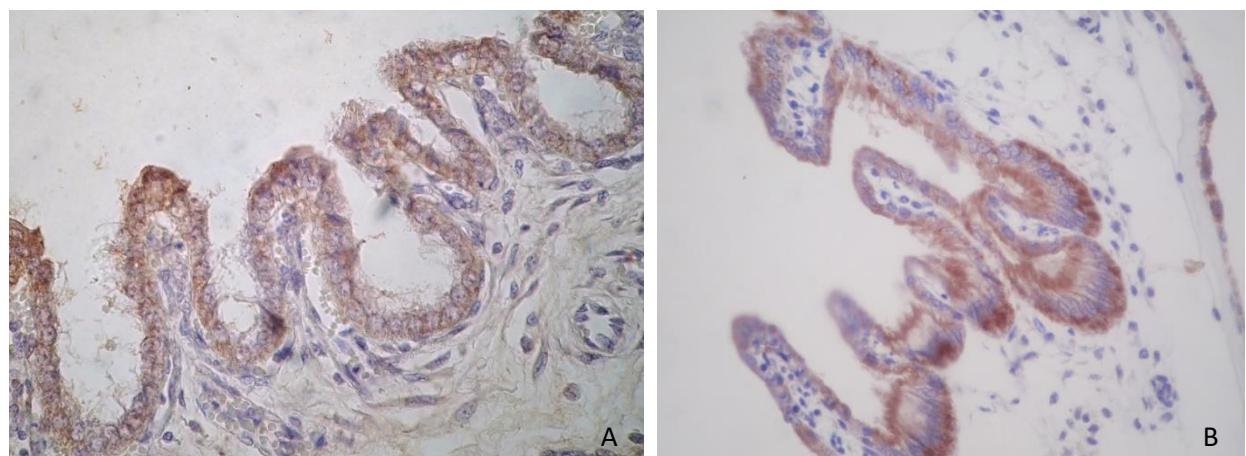


Figura 6: Placenta porcina de 30 días de gestación. A. Moderada expresión citoplasmática de $\alpha v \beta 3$ (++) en las células epiteliales del endometrio. B. Fuerte expresión citoplasmática de $\alpha v \beta 3$ (+++) en las células trofoblásticas (400x).

A los 60 dg se halló positividad fuerte (++) a $\alpha v \beta 3$ en las células del epitelio luminal endometrial (Figura 7). Las glándulas fueron negativas en este período de gestación. Se

observó fuerte (++) expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en la porción media-apical de las células del trofoblasto.

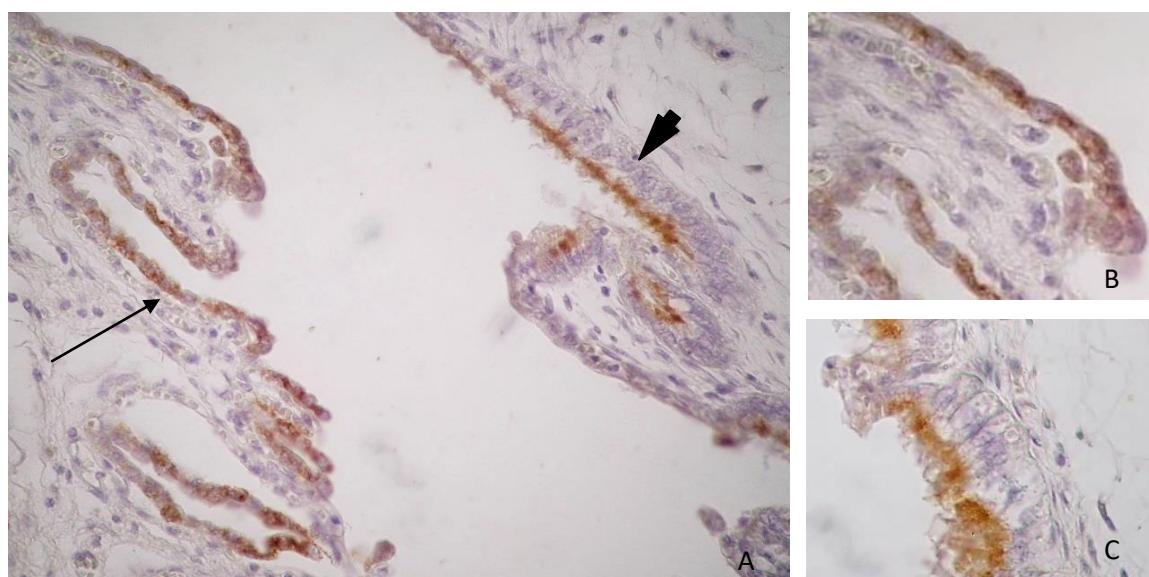


Figura 7: Interfase placentaria porcina de 60 días de gestación. A. Fuerte expresión citoplasmática de $\alpha v\beta 3$ (++) en las células epiteliales endometriales (flecha) y en la zona apical de las células trofoblásticas (cabeza de flecha) (400x). B. y C. Microfotografías del epitelio luminal materno (B) y del trofoblasto (C) donde se aprecia con detalle la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ (400x).

A los 70 dg se halló marcación moderada citoplasmática en el epitelio endometrial de la integrina $\alpha v\beta 3$. Las células glandulares no expresaron esta integrina. Con respecto al trofoblasto, la inmunotinción de $\alpha v\beta 3$ desciende a un patrón moderado (++) en parches, en la zona apical de dichas células (Figura 8).

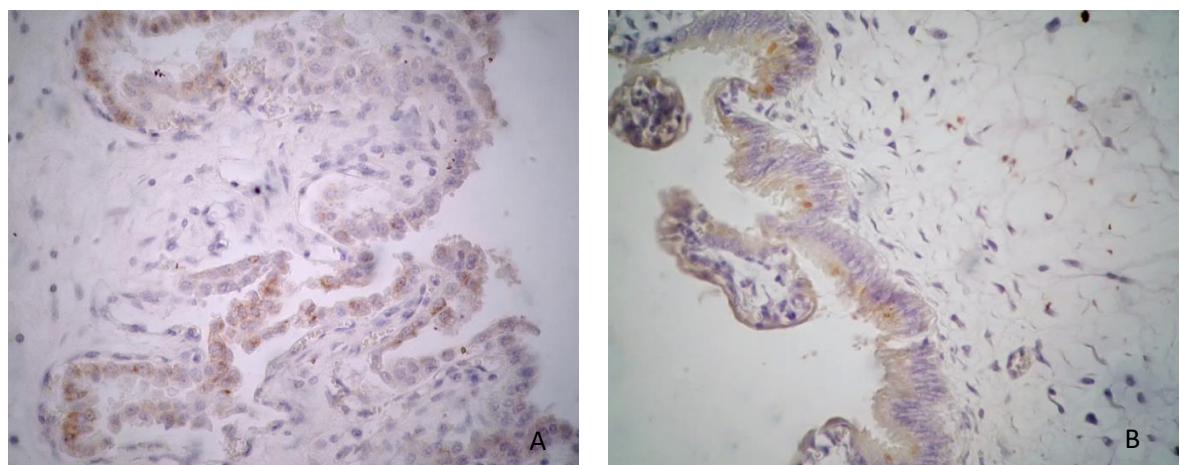


Figura 8: Placenta porcina de 70 dg. A: Moderada expresión de integrina $\alpha v\beta 3$ (++) en las células epiteliales endometriales. B: Moderada expresión de integrina $\alpha v\beta 3$ (++) en la zona apical de las células trofoblásticas (400x).

En el período a término (114 dg), al contarse solo con la porción fetal de la placenta, no se pudo determinar la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio endometrial luminal y glandular. En el trofoblasto la marcación para esta molécula descendió a leve (Figura 9).

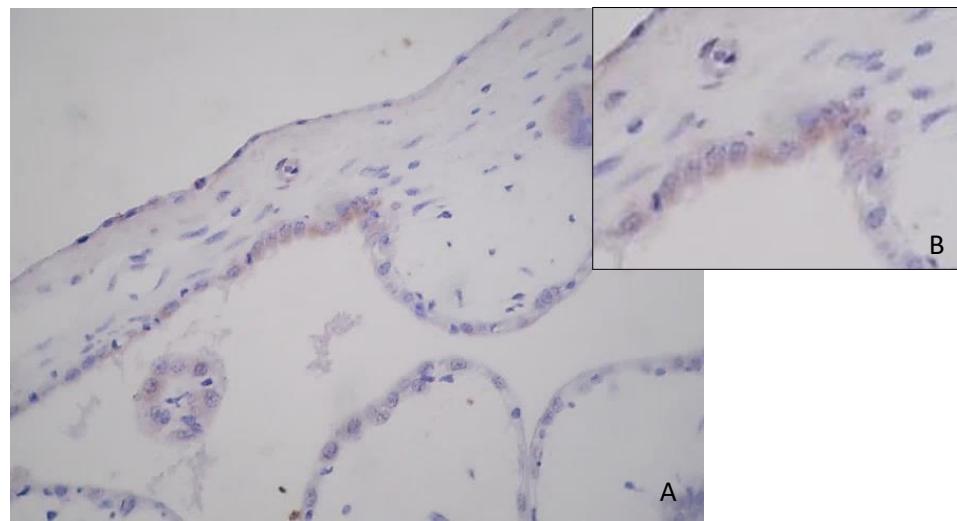


Figura 9: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Leve expresión de $\alpha v\beta 3$ (A) en las células trofoblásticas. En el inserto (B) se observa con mayor detalle la inmunotinción apical de la integrina $\alpha v\beta 3$ en las células trofoblásticas (400x).

Integrina $\alpha 5\beta 1$

Los resultados de la inmunohistoquímica para la determinación de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ realizada sobre cortes desparafinados de diferentes períodos de gestación, se detallan en la Tabla 2.

Días Gestación (dg)	Epitelio endometrial	Epitelio Glandular	Trofoblasto
NG	-	-	
30 dg	+	-	++
60 dg	-	-	+
70 dg	-	-	-
114 dg	ND	ND	++*

Tabla 2: Expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre epitelio endometrial, glándulas endometriales y trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. ND: no determinado. +, ++, +++: Diferentes grados de positividad. -: Negativo. *: Tinción en porción apical del trofoblasto.

En el epitelio endometrial luminal del útero no gestante no se observó inmunotinción para $\alpha 5\beta 1$ (Figura 10).

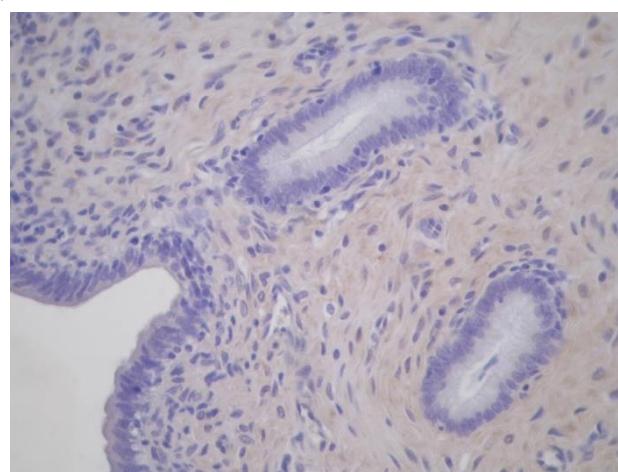


Figura 10: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal negativo a integrina $\alpha 5\beta 1$ (400x).

A los 30 dg se halló inmunotinción leve (+) de integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial. El epitelio glandular fue negativo. En las células del trofoblasto se observó expresión citoplasmática moderada (++) continua de integrina $\alpha 5\beta 1$ (Figura 11).

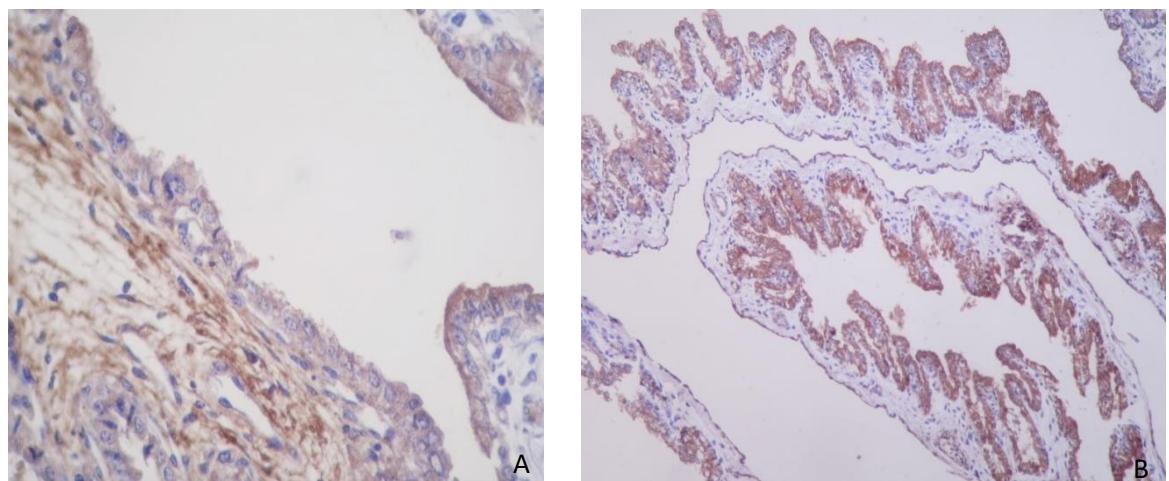


Figura 11: Placenta porcina de 30 días de gestación. A. Leve expresión citoplasmática de integrina $\alpha 5\beta 1$ (+) en las células epiteliales del endometrio (400x). B. Moderada expresión citoplasmática de integrina $\alpha 5\beta 1$ (++) en las células trofoblásticas (100x).

A los 60 dg la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ fue negativa (-) en las células del epitelio luminal endometrial. Las glándulas fueron negativas en este período de gestación. Se observó leve (+) expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la porción media-apical de las células del trofoblasto (Figura 12).

Resultados

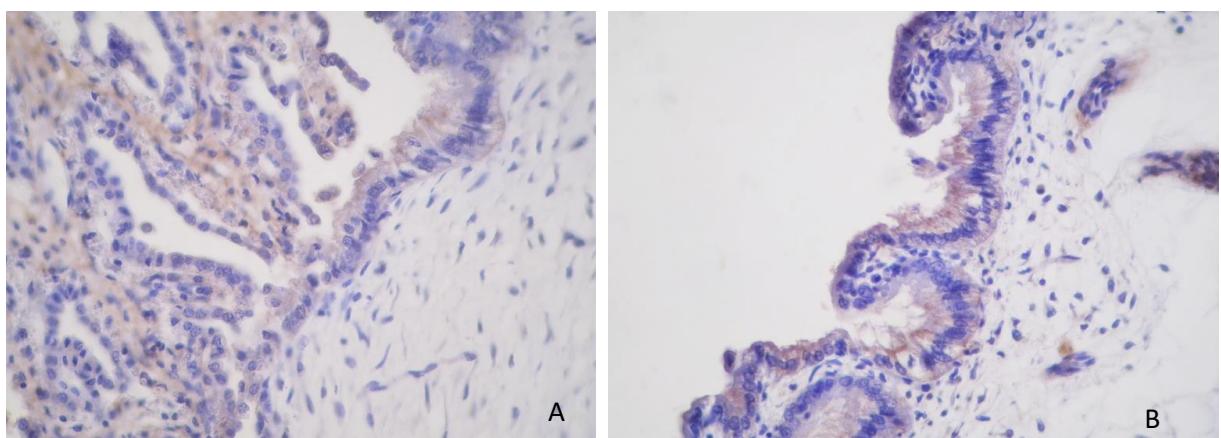


Figura 12: A. Interfase placentaria porcina de 60 días de gestación. Integrina $\alpha 5\beta 1$ negativa en las células epiteliales endometriales y leve positividad en las células trofoblásticas (400x). B. Microfotografía del trofoblasto donde se aprecia con detalle la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (400x).

A los 70 dg en las células epiteliales endometriales no se halló marcación de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Las células glandulares no expresaron esta integrina. Con respecto al trofoblasto, la inmunotinción para $\alpha 5\beta 1$ tampoco se encontró en dichas células (Figura 13).

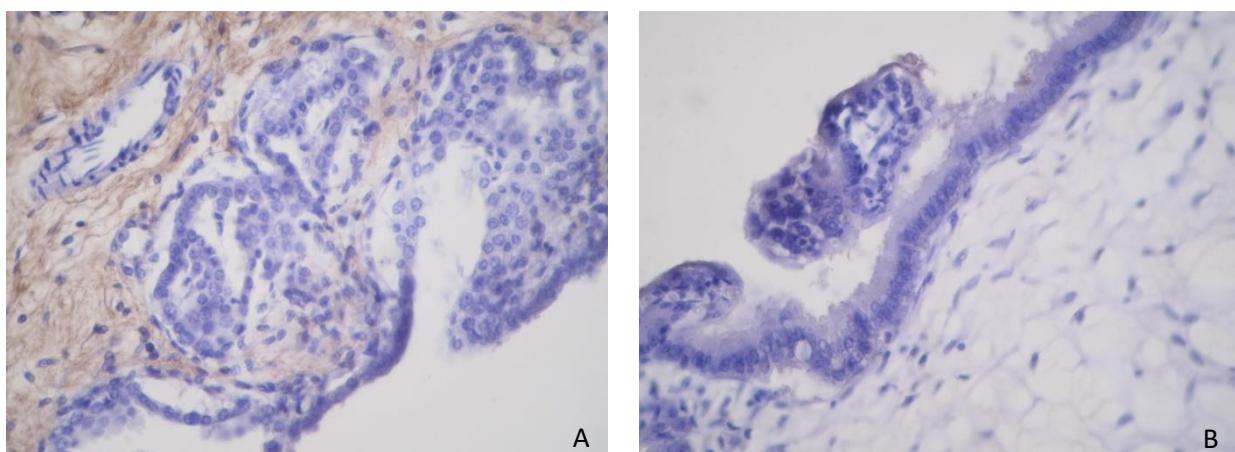


Figura 13: Placenta porcina de 70 dg. A: Negatividad de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en las células epiteliales endometriales. B: Negatividad de integrina $\alpha 5\beta 1$ en las células trofoblásticas (400x).

En el período a término (114 dg), al contarse solo con la porción fetal de la placenta, no se pudo determinar la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio endometrial luminal y glandular. En el trofoblasto esta molécula mostró marcación leve (Figura 14).

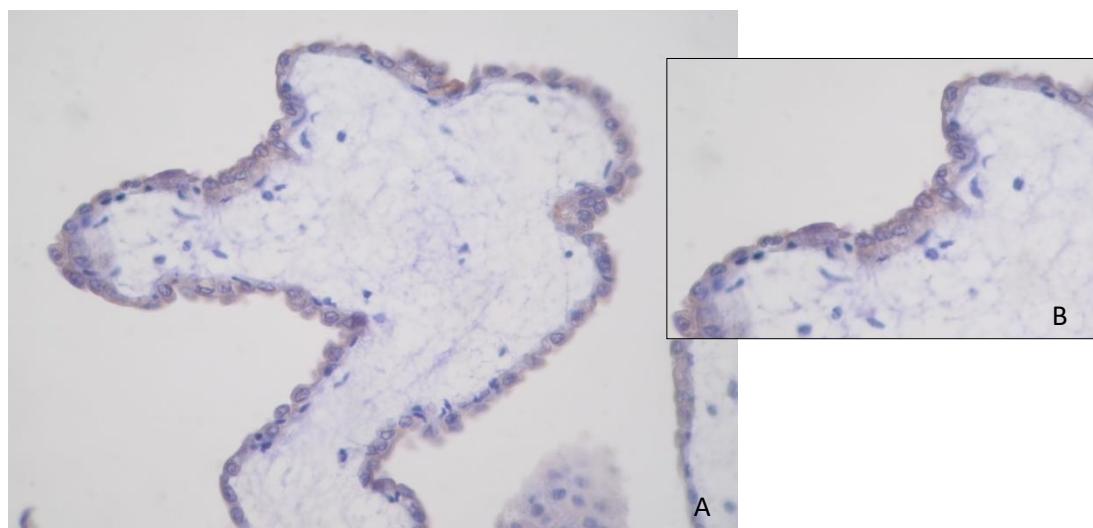


Figura 14: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Leve expresión de $\alpha 5\beta 1$ (A) en las células trofoblásticas. En el inserto (B) se observa con mayor detalle la inmunotinción apical de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en las células trofoblásticas (400x).

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE LAS INTEGRINAS.

Fibronectina

Los resultados de la determinación de la expresión de FN realizada por inmunohistoquímica sobre cortes desparafinados en los diferentes períodos de gestación, se detallan en la Tabla 3.

Días Gestación (dg)	Epitelio endometrial	Epitelio Glandular	Trofoblasto
NG	-	-	
30 dg	++*	-	+++*
60 dg	++*	-	+++*
70 dg	+	-	+*
114 dg	ND	ND	+++*

Tabla 3: Expresión de FN sobre epitelio endometrial, glándulas endometriales y trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. ND: no determinado. +, ++, +++: Diferentes grados de positividad. -: Negativo. *: Tinción en porción apical del trofoblasto.

En el epitelio endometrial luminal del útero no gestante no se observó inmunotinción de la FN (Figura 15).

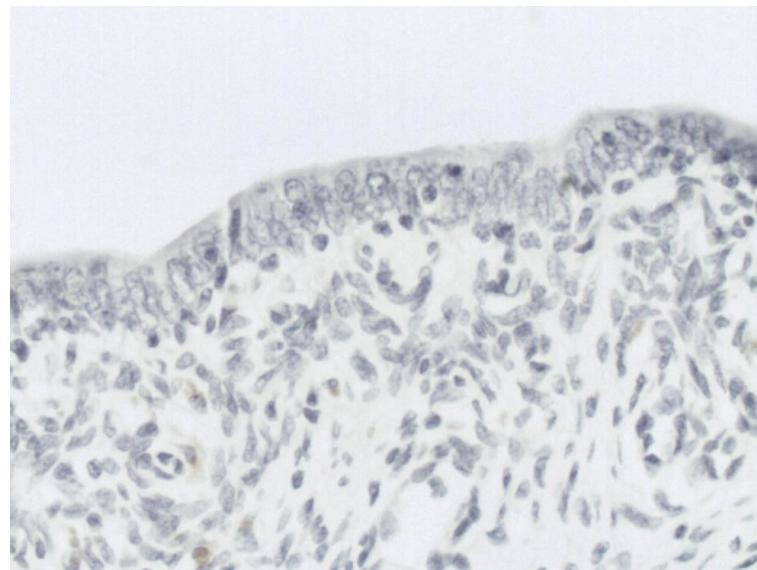


Figura 15: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal negativo a FN (400x).

A los 30 dg se halló expresión moderada (++) de FN en el epitelio luminal endometrial. El epitelio glandular fue negativo. Se observó expresión continua y fuerte (+++) de FN en la porción apical y la porción basal de las células del trofoblasto (Figura 16).

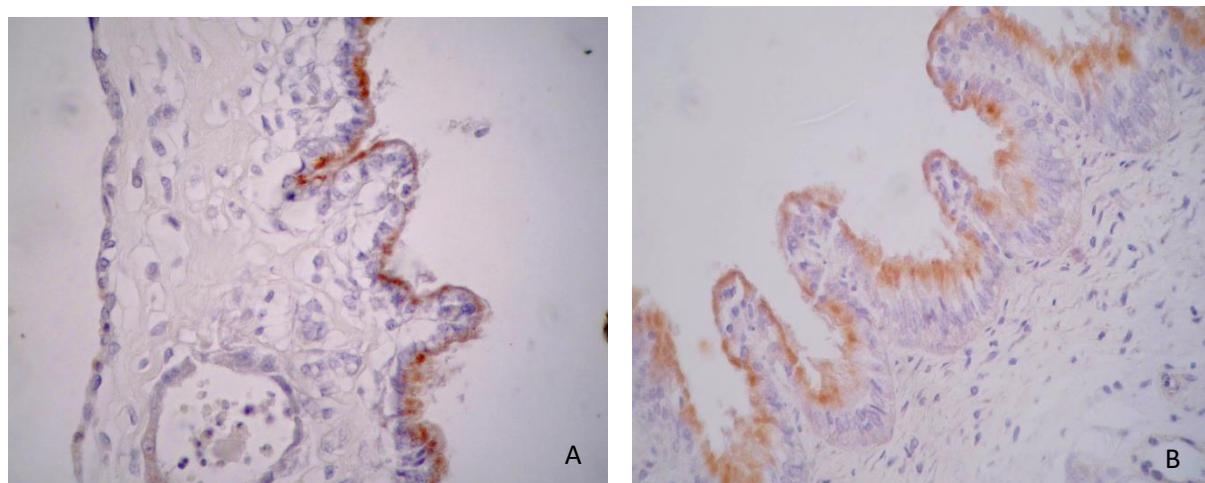


Figura 16: Placenta porcina de 30 días de gestación. A y B. Expresión citoplasmática fuerte de FN (++) en las células trofoblásticas (400x).

A los 60 dg se halló positividad moderada (++) a FN en las células del epitelio luminal endometrial. Las glándulas fueron negativas en este período de gestación. Se observó fuerte (+++) expresión de FN en la porción media-apical de las células del trofoblasto (Figura 17).

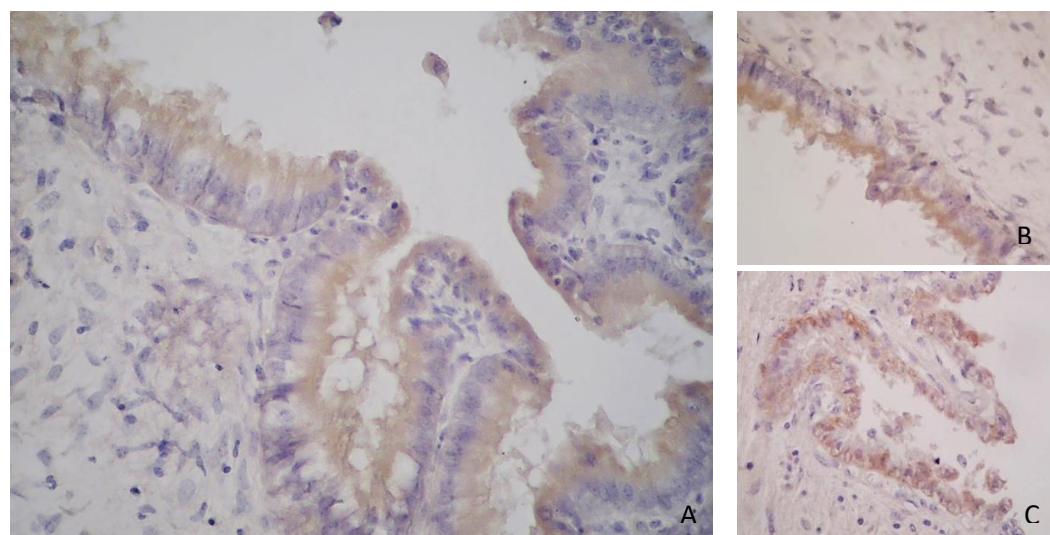


Figura 17: Placenta porcina de 60 días de gestación. A. Expresión citoplasmática fuerte de FN (++) en las células trofoblásticas (400x). Microfotografías (B) del trofoblasto y del epitelio luminal materno (C) donde se aprecia con detalle la expresión de la FN (400x).

A los 70 dg la FN se expresó leve (+) en el epitelio endometrial luminal. En las células glandulares no se observó expresión de FN. Con respecto al trofoblasto, la inmunotinción de FN descendió a un patrón leve (+), en parches, en la zona apical de dichas células (Figura 18).

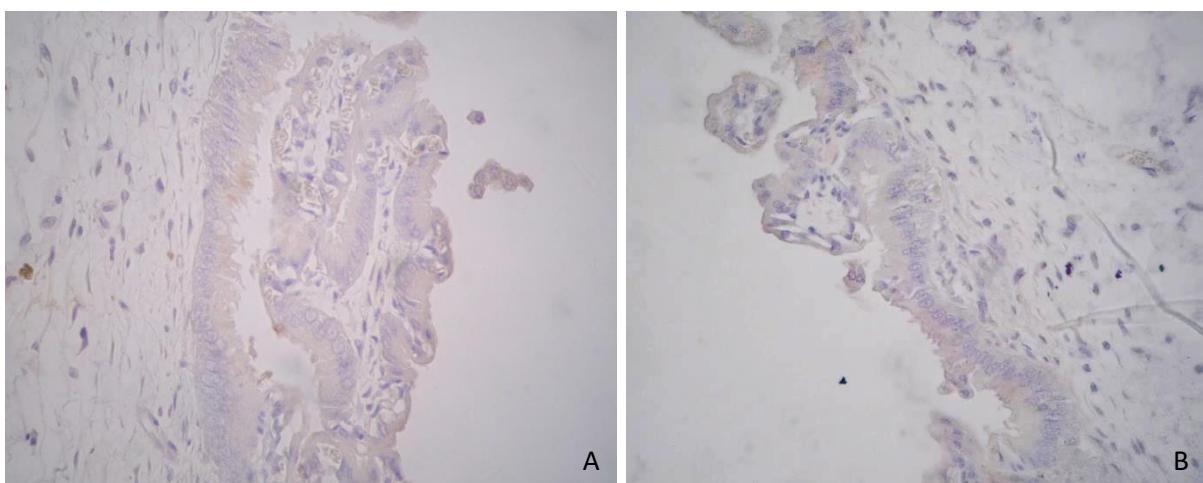
Resultados

Figura 18: Placenta porcina de 70 dg. A y B. Expresión leve de FN en las células trofoblásticas (400x).

En el período a término (114 dg), al contarse solo con la porción fetal de la placenta, no se pudo determinar la expresión de FN en el epitelio endometrial luminal y glandular. En el trofoblasto esta molécula mostró marcación fuerte (Figura 19).

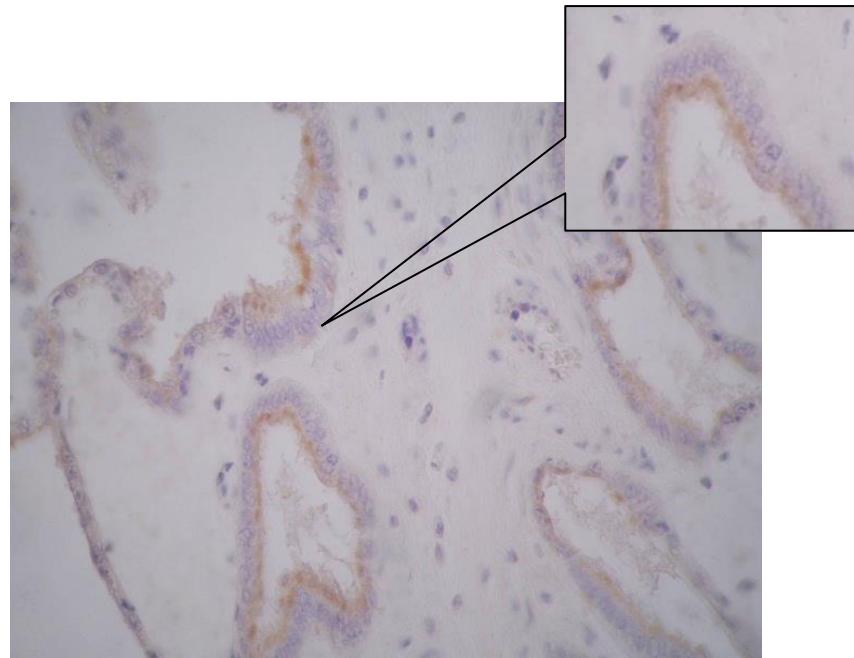


Figura 19: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Expresión fuerte de FN (inserto) en las células trofoblásticas (400x).

Laminina

Los resultados de la inmunohistoquímica para la determinación de la expresión de laminina realizada en cortes desparafinados de diferentes períodos de gestación, se detallan en la Tabla 4.

Días Gestación (dg)	Epitelio endometrial	Epitelio Glandular	Trofoblasto
NG	-	-	
30 dg	+ ^Δ	-	++ ^Δ
60 dg	+	-	++
70 dg	-	-	-
114 dg	ND	ND	++ ^Δ

Tabla 4: Expresión de laminina sobre epitelio endometrial, glándulas endometriales y trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. +, ++, +++: diferentes grados de positividad. -: Negativo. ND: no determinado. Δ: en parches.

No se observó inmunotinción para laminina ni en el epitelio endometrial luminal, ni en el epitelio glandular del útero no gestante (Figura 20).

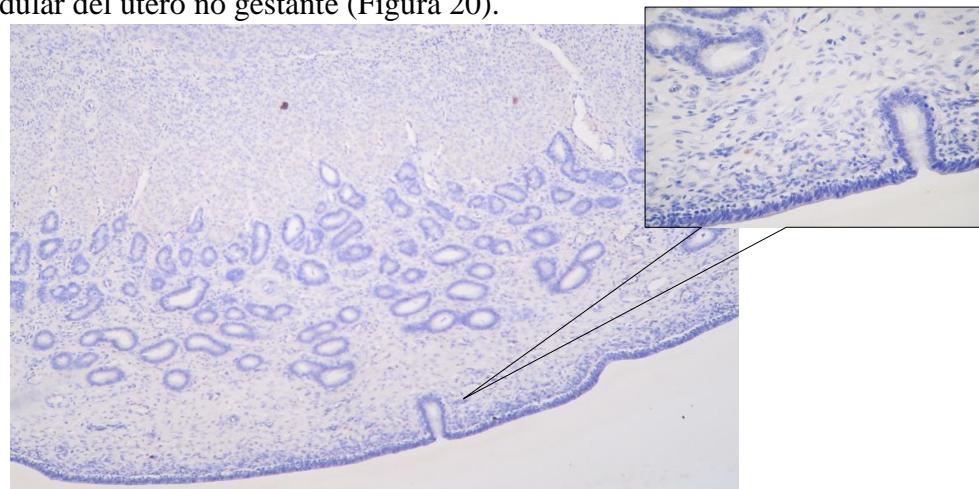


Figura 20: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal y glandular negativo a laminina (400x).

A los 30 dg se halló inmunotinción leve (+), en parches, para laminina en el epitelio luminal endometrial. El epitelio glandular fue negativo. Se observó expresión moderada, en parches, de laminina en la porción apical de las células del trofoblasto (Figura 21).

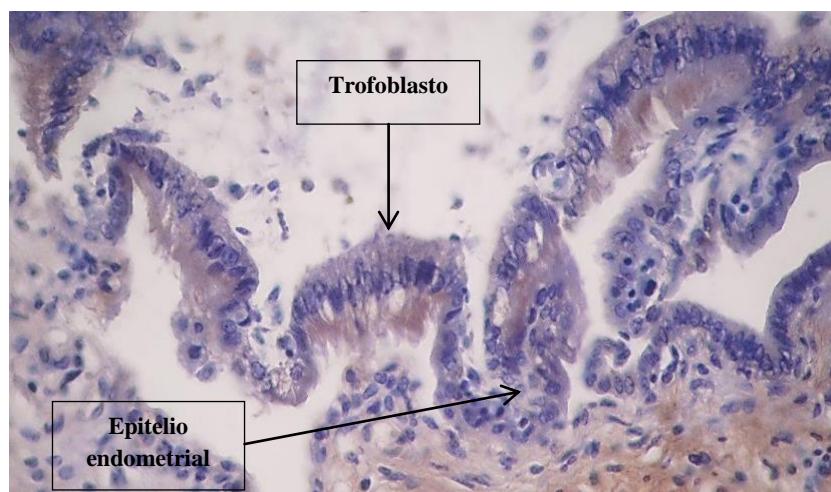


Figura 21: Placenta porcina de 30 días de gestación. A. expresión leve de laminina (+) en las células epiteliales del endometrio (400x). B. Expresión moderada citoplasmática de laminina (++) en las células trofoblásticas (400x).

A los 60 dg se observó expresión leve (+) en las células epiteliales endometriales. No se halló expresión para laminina en las glándulas. En el trofoblasto la laminina se expresó moderadamente (++) tanto a nivel apical como basal de las vellosidades (Figura 22).

Resultados

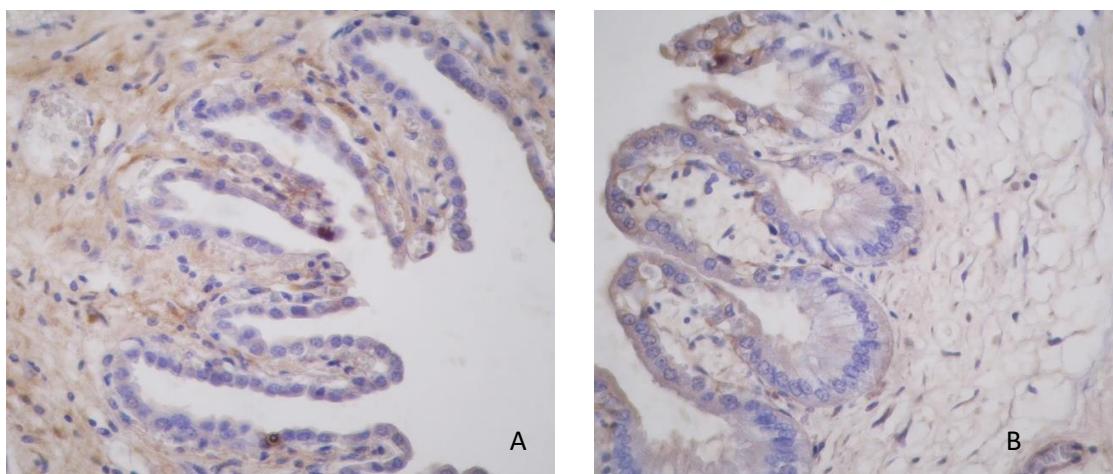


Figura 22: Interfase placentaria porcina de 60 días de gestación. A. Expresión leve (+) para laminina en las células epiteliales endometriales. B. Microfotografía del trofoblasto donde se aprecia con detalle la expresión de laminina tanto a nivel apical como basal de las vellosidades (400x).

A los 70 dg en las células epiteliales endometriales no se halló marcación citoplasmática para laminina. Las células glandulares no expresaron esta molécula. Con respecto al trofoblasto, no se registró expresión de laminina en este período de gestación (Figura 23).

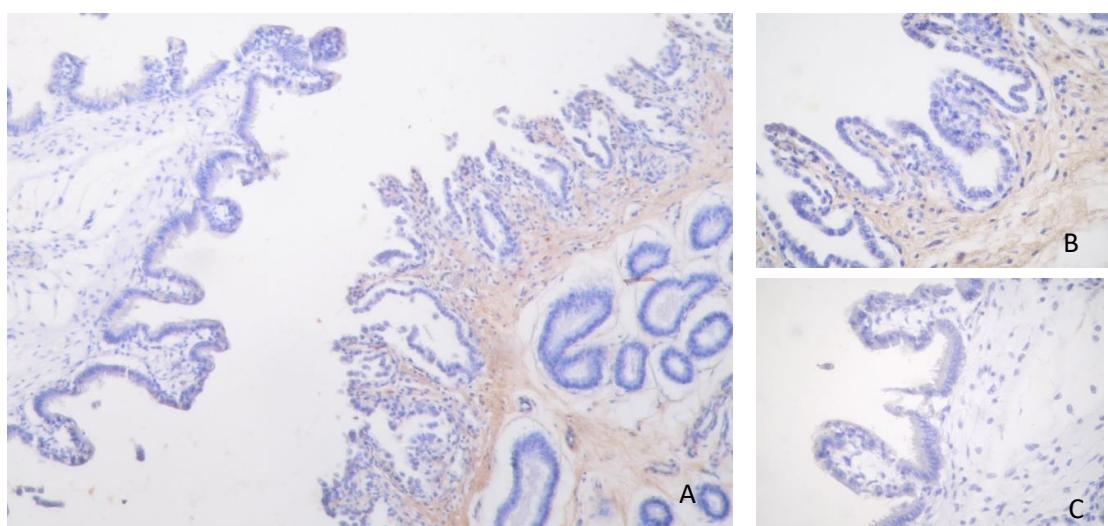


Figura 23: Interfase placentaria porcina de 70 días de gestación. A. Negatividad a laminina en las células epiteliales endometriales y en las células trofoblásticas (100x). B y C. Microfotografía del endometrio y el trofoblasto donde se aprecia con detalle la estructura (400x).

En el período a término (114 dg), al contarse sólo con la porción fetal de la placenta, no se pudo determinar la expresión de laminina ni en el epitelio endometrial luminal ni en el glandular. En el trofoblasto se observó expresión moderada de laminina en las vellosidades coriônicas. Se observó que en la base de las vellosidades, la laminina se expresó en la membrana basal del epitelio, y en los extremos apicales de las vellosidades se expresó sobre la porción apical del epitelio (Figura 24).

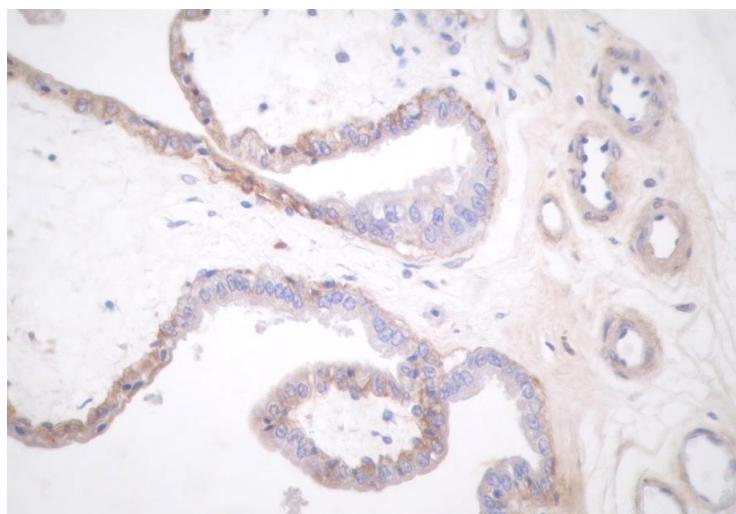


Figura 24: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Moderada expresión de laminina en la porción basal de las células trofoblásticas en la base de las vellosidades y citoplasmática en la punta de las vellosidades. 400x.

Colágeno V

Los resultados de la inmunohistoquímica para la determinación de la expresión del colágeno V (ColV) realizada sobre cortes desparafinados de diferentes períodos de gestación, se detallan en la Tabla 5.

Días Gestación (dg)	Epitelio endometrial	Epitelio Glandular	Trofoblasto
NG	-	-	
30 dg	+	-	+
60 dg	+	-	++
70 dg	-	-	-
114 dg	ND	ND	+

Tabla 5: Expresión de ColV en el epitelio endometrial, las glándulas endometriales, y el trofoblasto; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. +, ++, +++: Diferentes grados de positividad. -: Negativo. ND: no determinado.

En el epitelio endometrial luminal y glandular del útero no gestante no se observó inmunotinción para ColV (Figura 25).

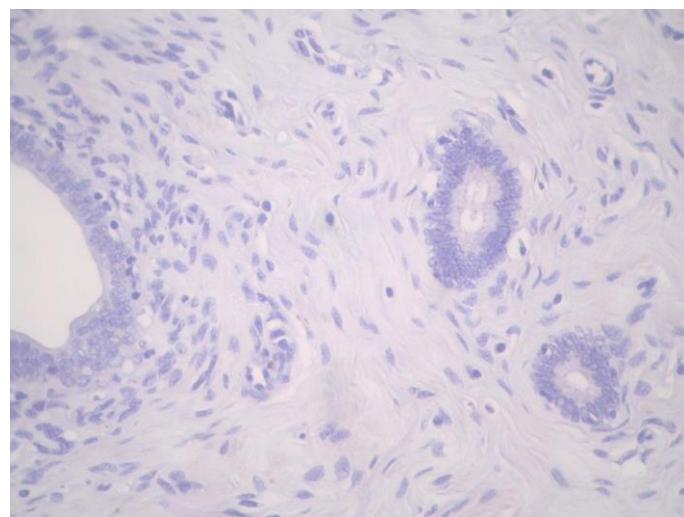


Figura 25: Útero porcino no gestante. Epitelio endometrial luminal y glandular negativo a ColV (400x).

A los 30 dg se halló inmunotinción leve (+) para ColV en el epitelio luminal endometrial. El epitelio glandular fue negativo. Se observó expresión citoplasmática continua leve (+) de ColV en las células del trofoblasto (Figura 26).

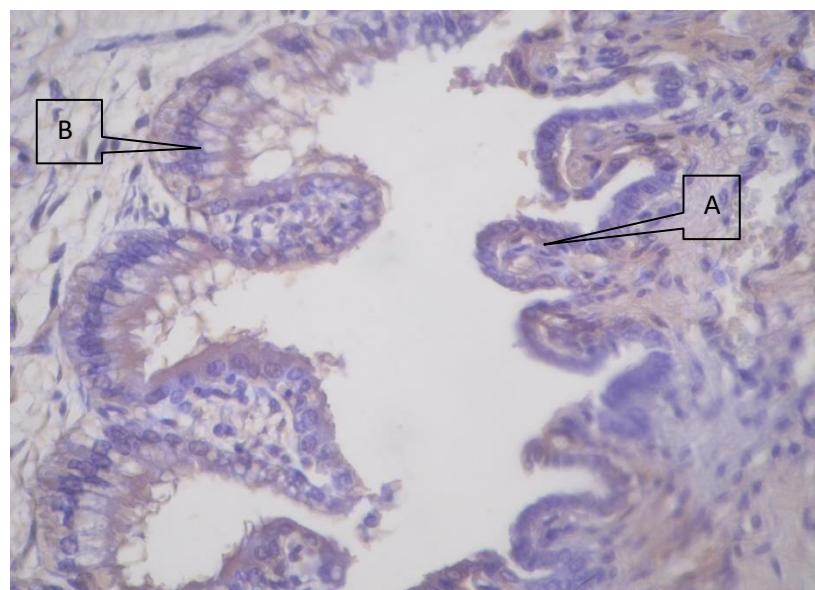


Figura 26: Placenta porcina de 30 días de gestación. A. Leve expresión citoplasmática de ColV (+) en las células epiteliales del endometrio (400x). B. Expresión leve citoplasmática de ColV (+) en las células trofoblásticas (400x).

A los 60 dg se halló inmunotinción leve (+) para ColV en el epitelio luminal endometrial. El epitelio glandular fue negativo. Se observó expresión citoplasmática continua y moderada (++) para ColV en las células del trofoblasto (Figura 27).

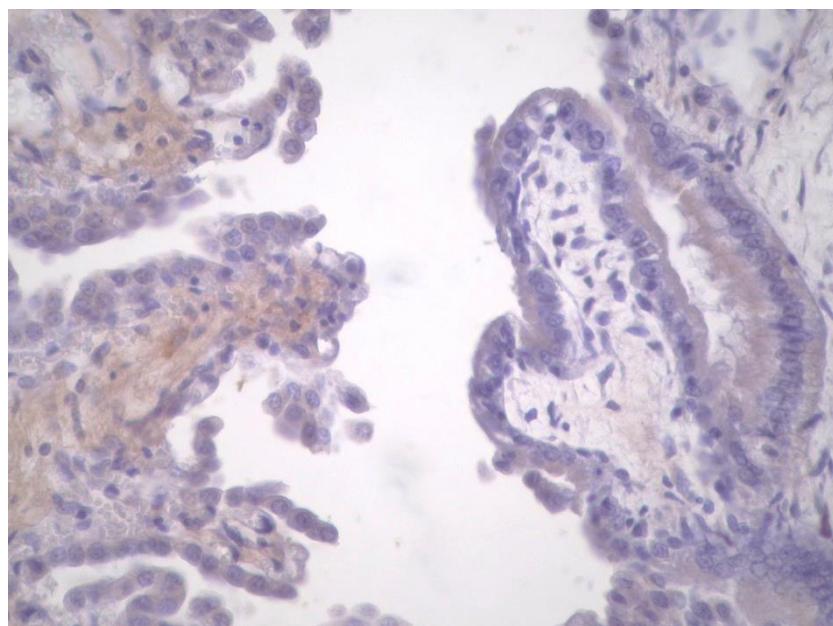


Figura 27: Interfase placentaria porcina de 60 días de gestación. Leve expresión citoplasmática de ColV (+) en las células epiteliales del endometrio y moderada (++) en las células trofoblásticas (400x).

A los 70 dg la inmunotinción de ColV fue negativa tanto para el tejido materno como para el fetal (Figura 28).

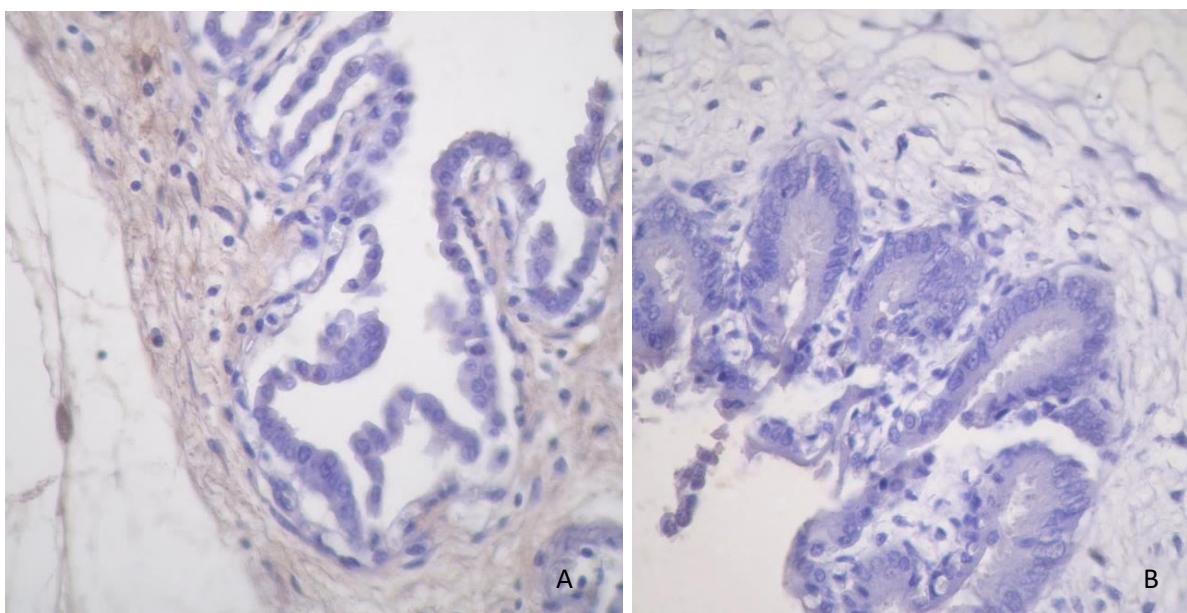
Resultados

Figura 28: Placenta porcina de 70 dg. A y B negatividad en epitelio endometrial y trofoblasto para ColV (400x).

En la preñez a término (114 dg), la expresión de ColV en el trofoblasto fue leve (+) (Figura 29).

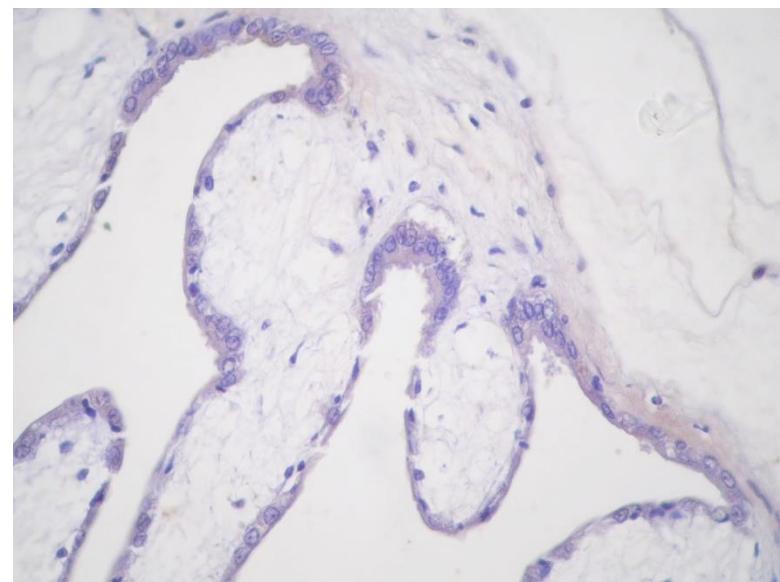


Figura 29: Placenta fetal porcina de 114 dg (a término). Leve expresión de ColV en las células trofoblásticas (400x).

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE INTEGRINAS Y SUS LIGANDOS MEDIANTE CUANTIFICACION DE IMÁGENES: DENSIDAD ÓPTICA Y PORCENTAJE DE ÁREA INMUNOMARCADA EN INTERFASE PLACENTARIA.

El análisis tanto de la densidad óptica (DO) como del porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ y sus ligandos: laminina, fibronectina y colágeno V, se realizó en el epitelio luminal endometrial de útero porcino no gestante (NG) y sobre la interfase placentaria porcina: epitelio luminal endometrial de placenta materna (gestante materno: GM) y trofoblasto de la placenta fetal (gestante fetal: GF).

Densidad óptica (DO) de la integrina $\alpha v\beta 3$

Se determinó la presencia de integrina $\alpha v\beta 3$ 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 determinó la DO.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las DO de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en muestras de útero no gestante y gestante. Se observó que la integrina $\alpha v\beta 3$ aumenta significativamente en la interfase placentaria en relación al útero no gestante (Valor DO: 0,03 vs. 0,355, $p<0,0001$). En los períodos de gestación estudiados, la integrina $\alpha v\beta 3$ se expresó de modo similar tanto en placenta porcina materna (GM; DO: 0,36) como en placenta porcina fetal (GF; DO: 0,35) ($p=0,6747$; Figura 30; Tabla 1a, Anexo).

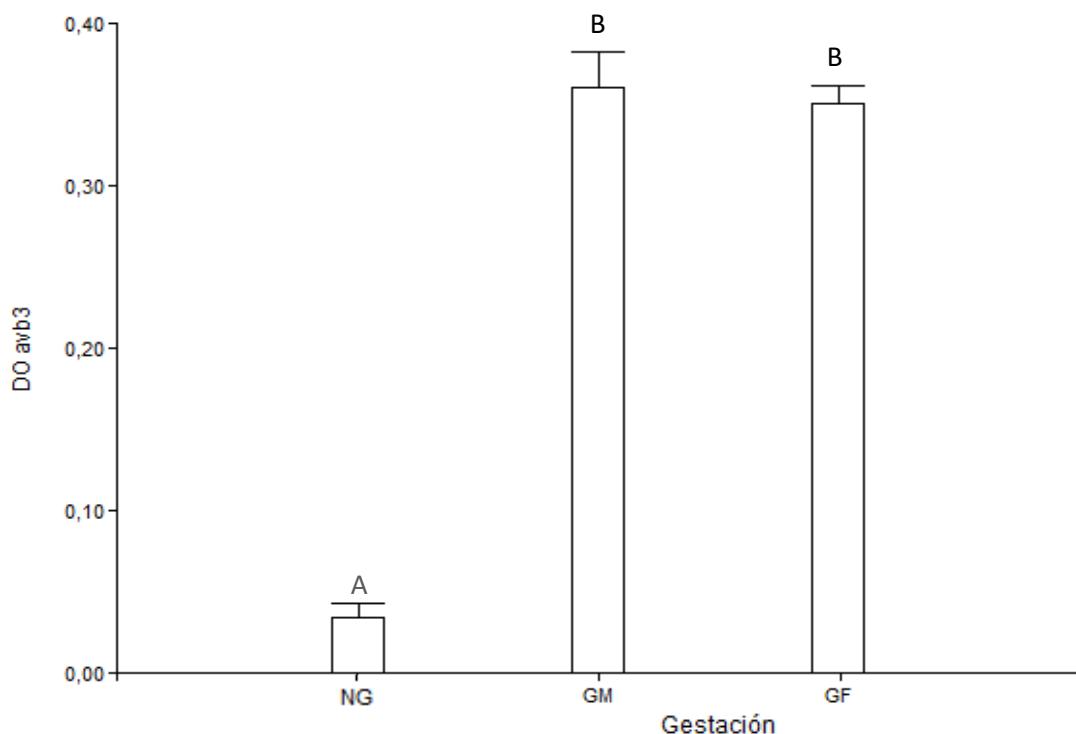


Figura 30: Determinación de la DO de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de la integrina $\alpha v\beta 3$ en placenta materna

En placenta materna, esta integrina aumentó su concentración significativamente a los 30 dg, comparada con útero no gestante (DO: 0,03; NG). A los 60 dg, la expresión de $\alpha v\beta 3$ es significativamente mayor que en el resto de los períodos (DO: 0,6), disminuyendo significativamente su expresión a los 70 dg (DO: 0,24; $p=<0,0001$) (Tabla 2b, Figura 31; Anexo).

Resultados

Expresión de integrina $\alpha v\beta 3$ en útero no gestante (NG) y placenta porcina materna en diferentes períodos de gestación.

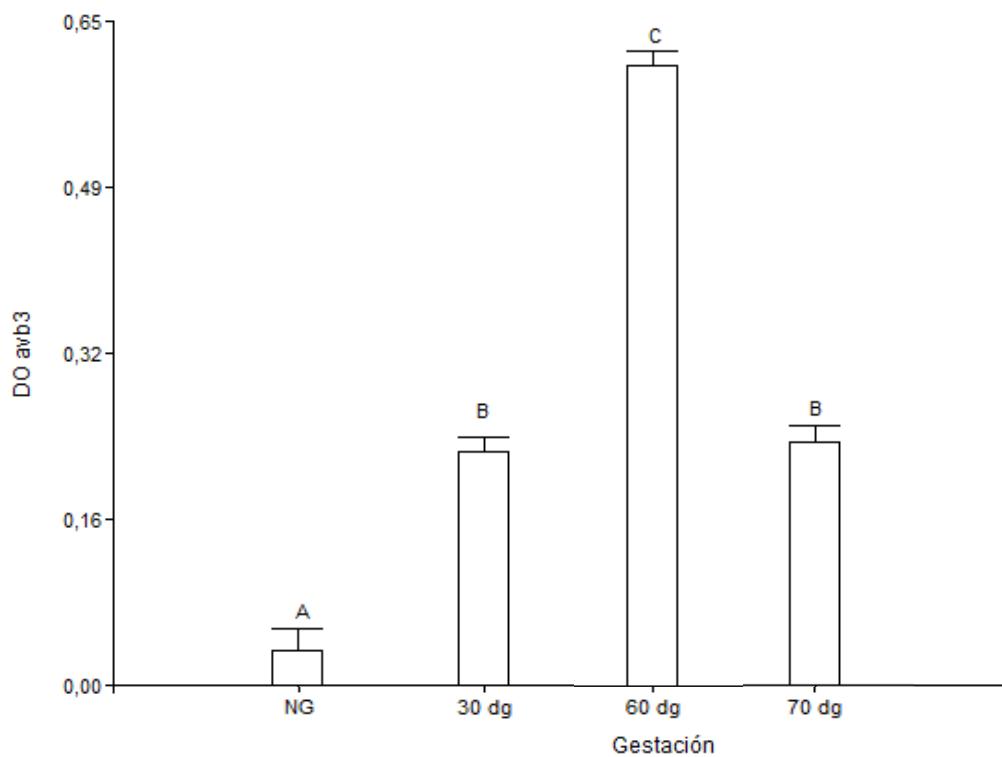


Figura 31: Determinación de la DO de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de la integrina $\alpha v\beta 3$ en placenta fetal

En placenta fetal, el estudio de la DO de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ mostró diferencias significativas entre los distintos períodos gestacionales estudiados (Tabla 2b, Anexo). La expresión de $\alpha v\beta 3$ en el trofoblasto fue significativamente mayor a los 30 dg (DO: 0,34) y 60 dg (DO: 0,49) y disminuyó significativamente a los 70 dg (DO: 0,24), y 114 dg (DO: 0,14) ($p=<0,0001$; Figura 32).

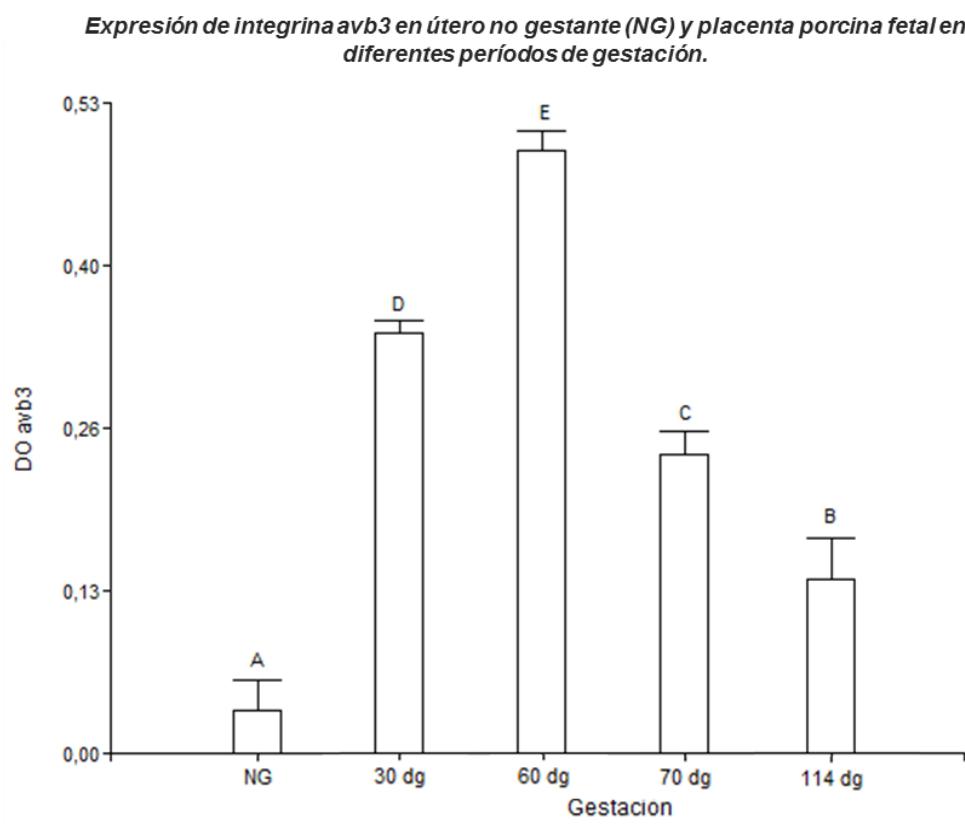


Figura 32: Determinación de la DO de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$

Se determinó la presencia de integrina $\alpha v\beta 3$ 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 determinó su %AIM.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias del %AIM de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en muestras de útero no gestante y gestante. La integrina $\alpha v\beta 3$ aumentó significativamente en la interfase placentaria (GM+GF, 32,27%; Tabla 2a, Anexo) cuando se la compara con su expresión en el tejido endometrial no gestante (NG, 0,30%) (Figura 33; $p<0,0001$). El %AIM en placenta materna (GM) de la integrina $\alpha v\beta 3$, fue significativamente mayor que en placenta fetal (GF) ($p<0,0001$; Figura 33; Tabla 2a, Anexo).

Porcentaje de área inmunomarcada de la integrina $\alpha v\beta 3$ en útero no gestante (NG), placenta porcina materna (GM) y placenta porcina fetal (GF).

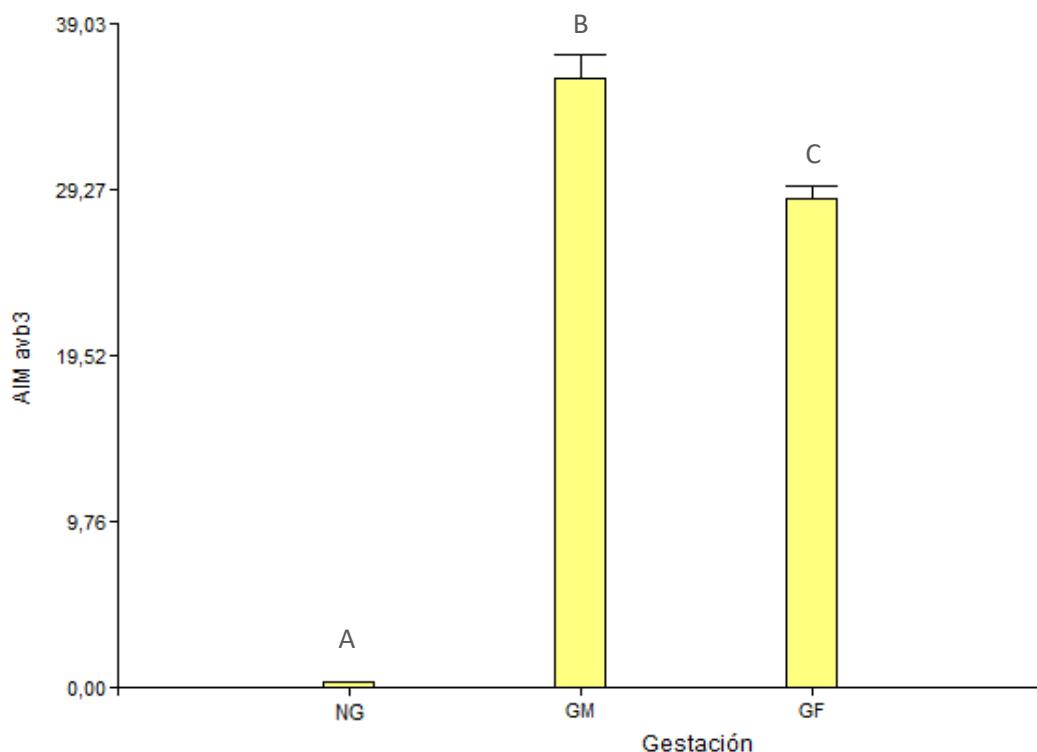


Figura 33: Determinación del %AIM de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), placenta materna (GM) y placenta fetal (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$ en placenta materna

En placenta materna, la integrina aumentó significativamente su %AIM a los 30 dg (33,76%) con respecto al útero no gestante, y luego realizó un pico, ocupando mayor área a los 60 dg (47,66%; $p=<0,0001$). A los 70 dg desciende significativamente su área de inmunomarcación (24,01%; Figura 34; Tabla 2b, Anexo).

Porcentaje de área inmunomarcada de la integrina $\alpha v\beta 3$ en útero no gestante (NG) y placenta porcina materna en diferentes períodos de gestación.

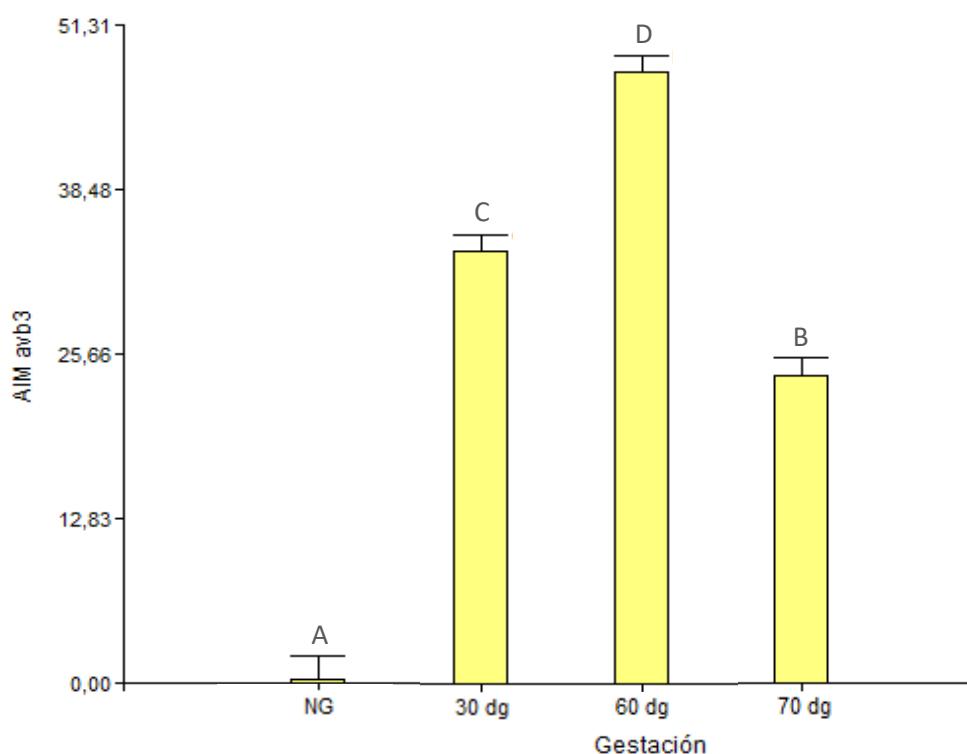


Figura 34: Determinación del %AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$ en placenta fetal

Se observaron diferencias significativas en el %AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$ en placenta fetal entre los distintos períodos gestacionales estudiados. Abarcó mayor área a los 30 y 60 dg, y disminuyó significativamente su área de inmunomarcación a los 70 dg (12,41%) y a término (114 dg; 10,54%) ($p<0,0001$; Figura 35; Tabla 2b, Anexo).

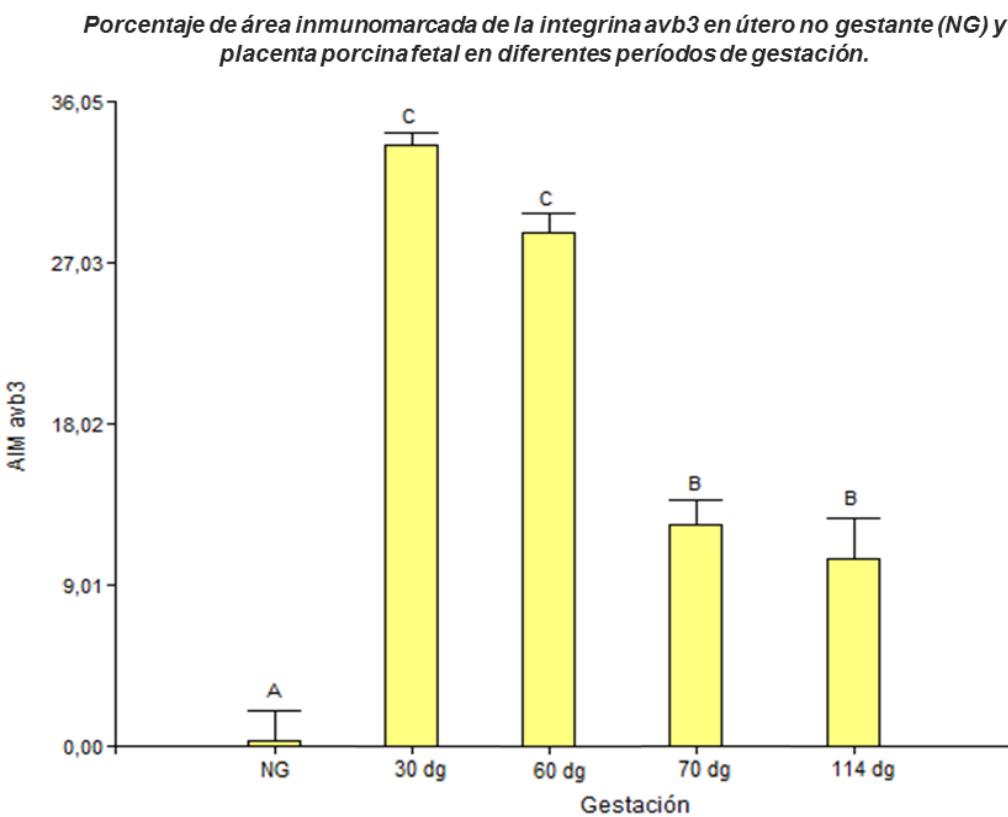


Figura 35: Determinación del %AIM de la integrina $\alpha v\beta 3$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Densidad óptica (DO) de la integrina $\alpha 5\beta 1$

Se determinó la presencia de integrina $\alpha 5\beta 1$ 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 determinó la DO.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las DO de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en muestras de útero no gestante y gestante. Se observó que la integrina $\alpha 5\beta 1$ se expresó de un modo similar tanto en útero no gestante (NG; DO: 0,07) como en placenta materna (GM; DO: 0,09). Durante la gestación, la integrina $\alpha 5\beta 1$ aumentó significativamente en la placenta fetal en relación a la placenta porcina materna (GF; DO: 0,13; $p<0,0001$) (Figura 36; Tabla 3a, Anexo).

Resultados

Expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en útero no gestante (NG), placenta porcina materna (GM) y placenta porcina fetal (GF).

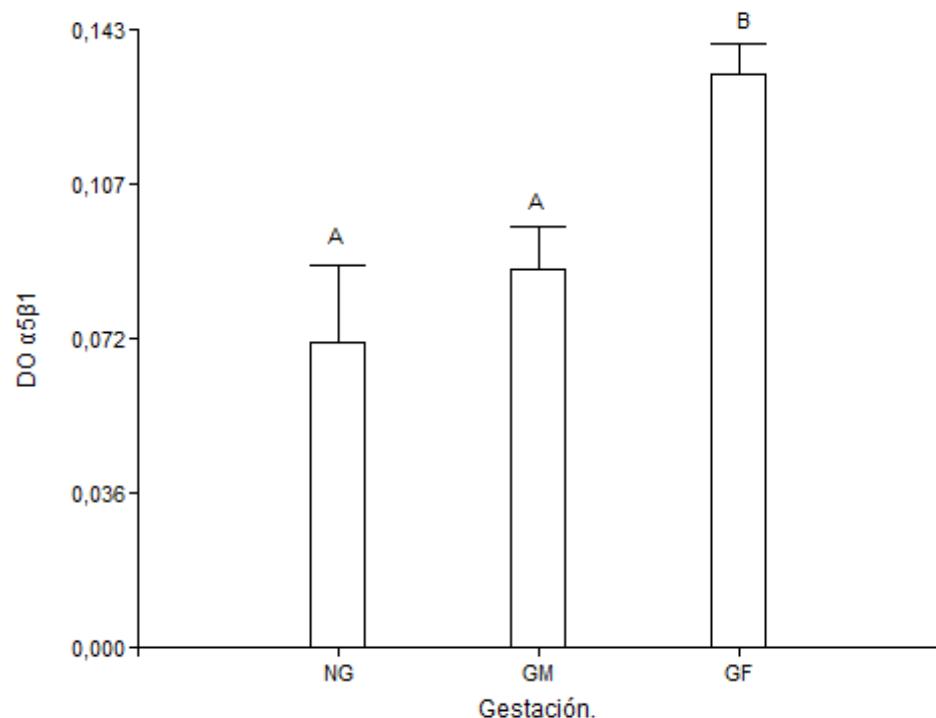


Figura 36: Determinación de la DO de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en placenta materna

En placenta materna, esta integrina aumentó su concentración significativamente a los 30 dg, comparada con útero no gestante (DO: 0,15 y 0,07; respectivamente). A los 60 dg la expresión de $\alpha 5\beta 1$ disminuyó significativamente, a los 70 dg se intensificó el descenso (DO: 0,06 y 0,02; $p=<0,0001$) (Figura 37; Tabla 3b, Anexo).

Expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en útero no gestante (NG) y placenta porcina materna en diferentes períodos de gestación.

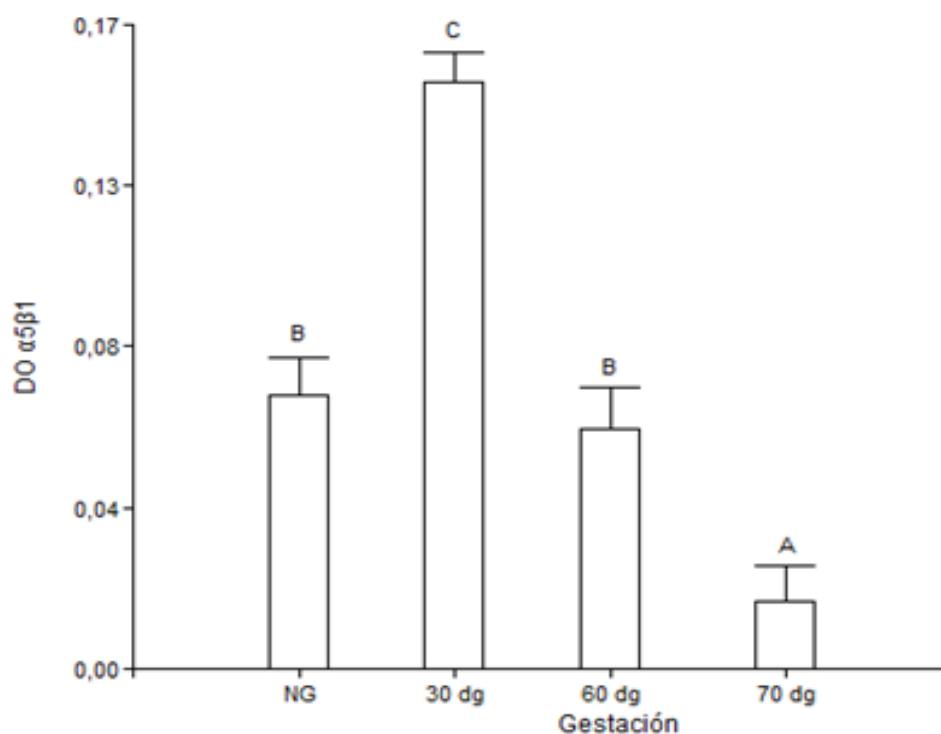


Figura 37: Determinación de la DO de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en placenta fetal

En placenta fetal, el estudio de la DO de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ mostró diferencias significativas entre los distintos períodos gestacionales estudiados (Tabla 3b, Anexo). La expresión de $\alpha 5\beta 1$ en el trofoblasto fue significativamente mayor a los 30 dg (DO: 0,19) disminuyendo significativamente a los 60 y 70 dg (DO: 0,11 y 0,04; respectivamente) ($p=<0,0001$; Figura 38). En la placenta a término los valores fueron similares a los hallados al día 60 de gestación.

Expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en útero no gestante (NG) y placenta porcina fetal en diferentes períodos de gestación.

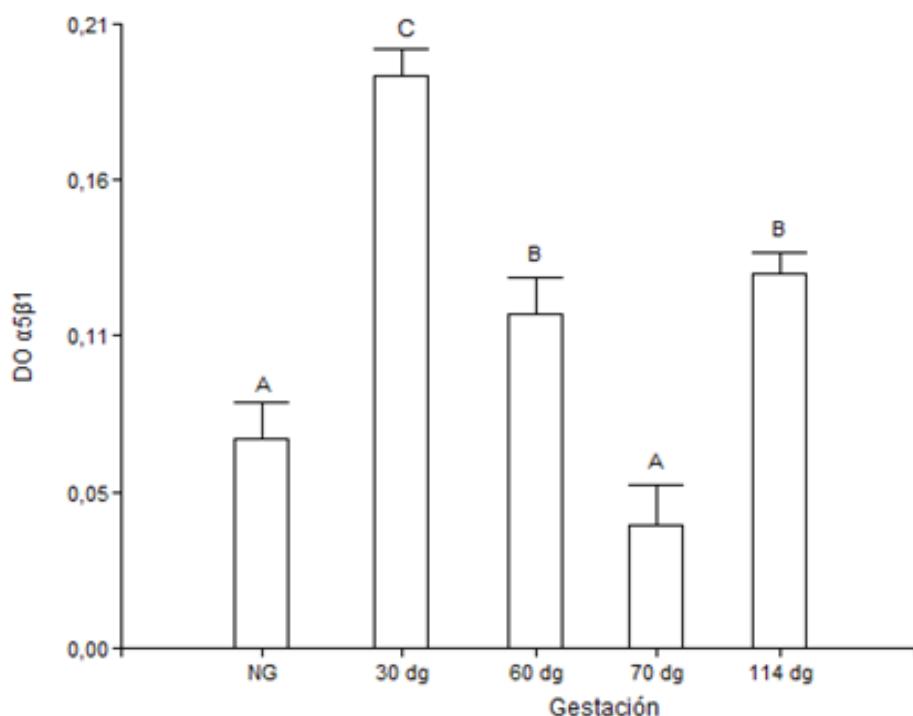


Figura 38: Determinación de la DO de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de integrina $\alpha 5\beta 1$

Se determinó la presencia de integrina $\alpha 5\beta 1$ 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 determinó su %AIM.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias del %AIM de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en muestras de útero no gestante y gestante. La integrina $\alpha 5\beta 1$ aumentó significativamente en la interfase placentaria (GM+GF, 22%; Tabla 4a, Anexo) cuando se la compara con su expresión en tejido endometrial no gestante (NG, 6,11%) (Figura 39; $p<0,0001$). El %AIM en placenta fetal (GF) de la integrina $\alpha 5\beta 1$, fue significativamente mayor que en placenta materna (GM) (%AIM: 26,33 vs 17,68; respectivamente; $p<0,0001$; Figura 39; Tabla 4a, Anexo).

Porcentaje de área immunomarcada de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en útero no gestante (NG), placenta porcina materna (GM) y placenta porcina fetal (GF).

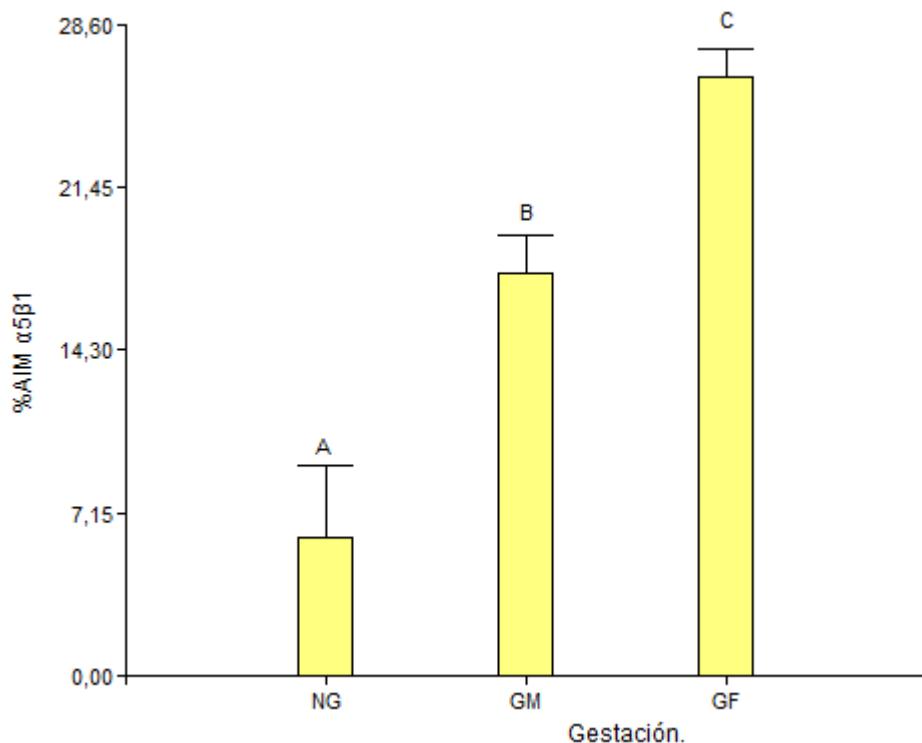


Figura 39: Determinación del %AIM de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), placenta materna (GM) y placenta fetal (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en placenta materna

En placenta materna, la integrina aumentó significativamente su %AIM a los 30 dg (30,06%; p=<0,0001). A los 60 y 70 dg descendió significativamente su área de expresión (%AIM: 17,01 y 1,07; respectivamente; Figura 40; Tabla 4b, Anexo).

Porcentaje de área inmunomarcada de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en útero no gestante (NG) y placenta porcina materna en diferentes períodos de gestación.

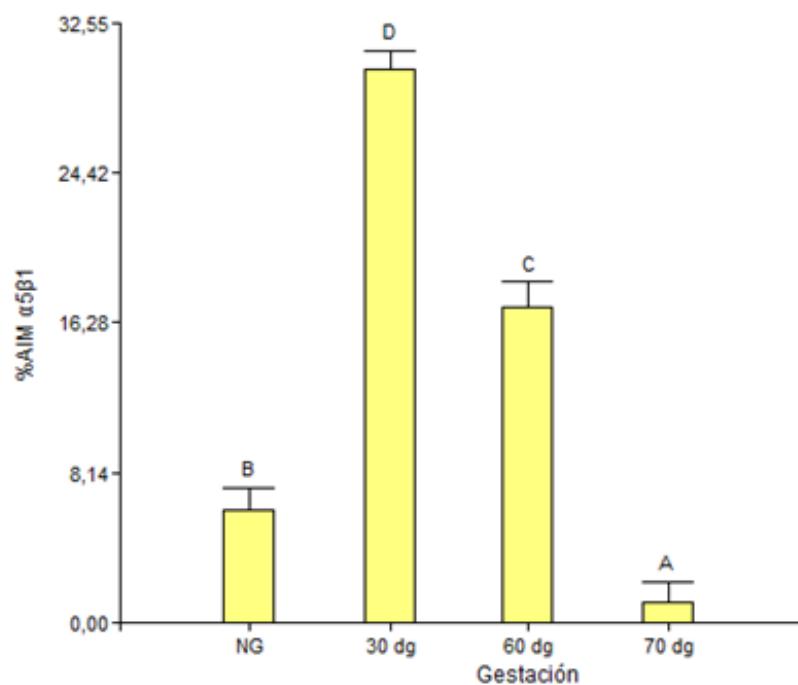


Figura 40: Determinación del %AIM de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).

%AIM de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en placenta fetal

Se observaron diferencias significativas en el %AIM de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en placenta fetal entre los distintos períodos gestacionales estudiados. Abarcó mayor área a los 30dg (37,28%, p<0,0001), a los 60 y 114 dg disminuyó significativamente su área de inmunomarcación (22,56% y 27,16%, respectivamente). A los 70 dg el área de expresión tuvo valores muy bajos (%AIM: 3,87) (Figura 41; Tabla 4b, Anexo).

Porcentaje de área inmunomarcada de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en útero no gestante (NG) y placenta porcina fetal en diferentes períodos de gestación.

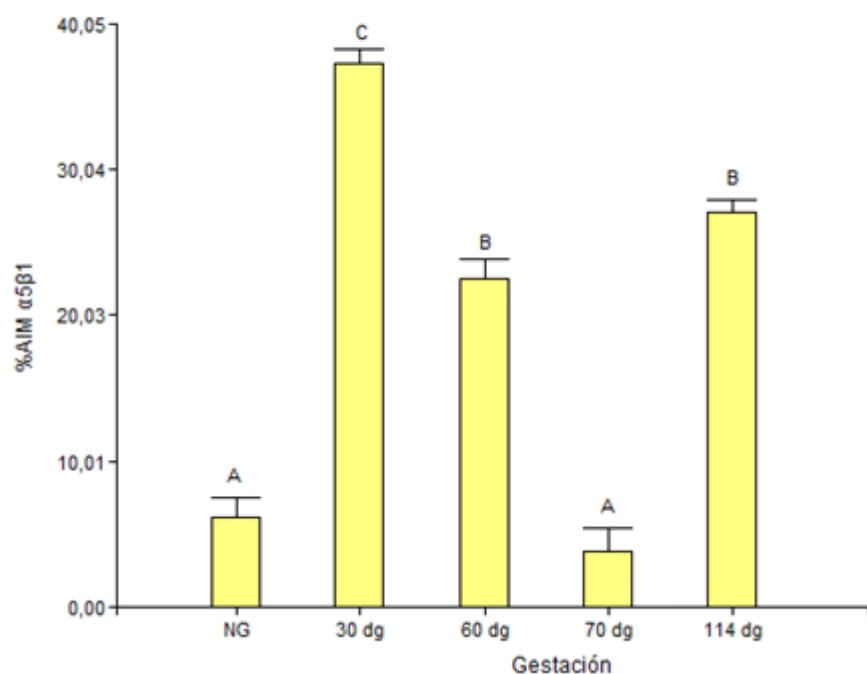


Figura 41: Determinación del %AIM de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).

Densidad Óptica (DO) de fibronectina (FN)

Se determinó la presencia de la FN 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 determinó su DO.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las DO de la expresión de FN en muestras de útero no gestante y gestante. Se observó que la FN aumenta significativamente en la interfase placentaria en relación con su expresión en tejido endometrial no gestante (DO: 0,08 vs. 0,295; $p<0,0001$). En los períodos de gestación estudiados, la expresión de FN fue significativamente más fuerte en el trofoblasto que en el endometrio (DO: 0,37 vs 0,22; $p<0,0001$) (Figura 42; Tabla 5a, Anexo).

Expresión de Fibronectina en útero no gestante (NG), placenta porcina materna (GM) y placenta porcina fetal (GF).

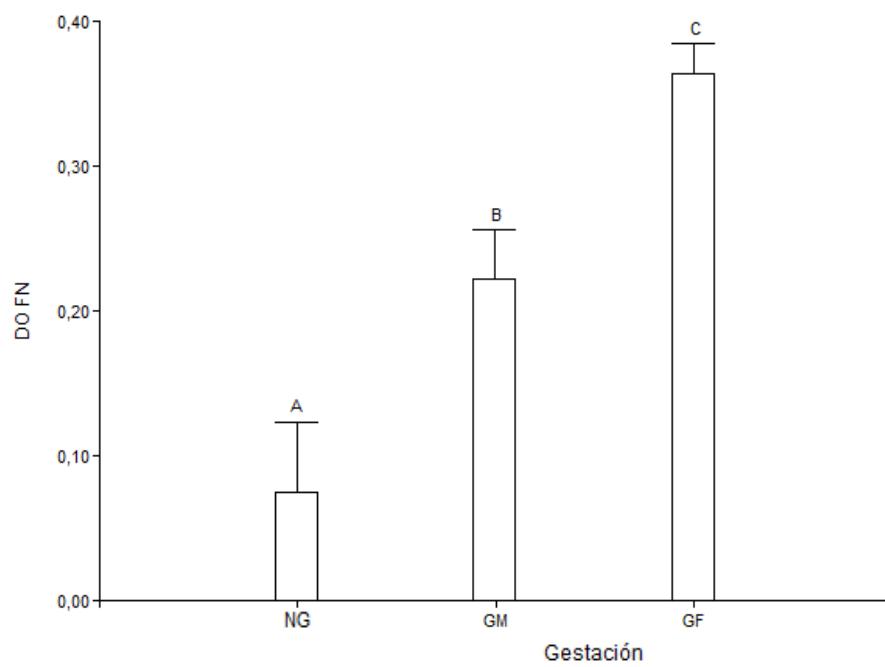


Figura 42: Determinación de la DO de la FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de la FN en placenta materna

En placenta materna, esta molécula aumentó su concentración significativamente a los 30 dg, comparada con útero no gestante (DO: 0,08; NG). A los 60 dg, la expresión de FN es significativamente mayor que en útero NG (DO: 0,26), disminuyendo significativamente su expresión a los 70 dg comparada con los valores de los 60 dg (DO: 0,16; $p=<0,0001$) (Figura 43; Tabla 5b, Anexo).

• *Expresión de Fibronectina en útero no gestante (NG) y placenta porcina materna en diferentes períodos de gestación.*

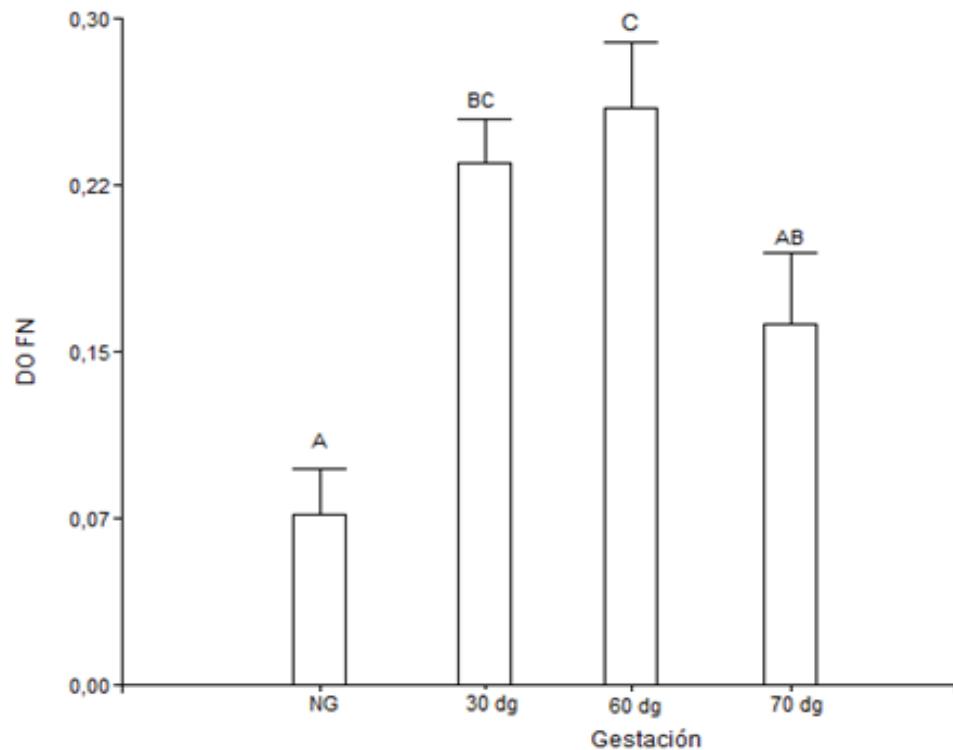


Figura 43: Determinación de la DO de FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de la FN en placenta fetal

Se observaron diferencias significativas en la expresión de la FN en placenta fetal entre los distintos períodos gestacionales estudiados (Tabla 5b, Anexo). En trofoblasto, la expresión de $\alpha v\beta 3$ fue significativamente mayor a los 30 dg (DO: 0,3), 60 dg (DO: 0,54) y 114 dg (DO: 0,35), disminuyendo significativamente a los 70 dg (DO: 0,18) ($p=<0,0001$; Figura 44).

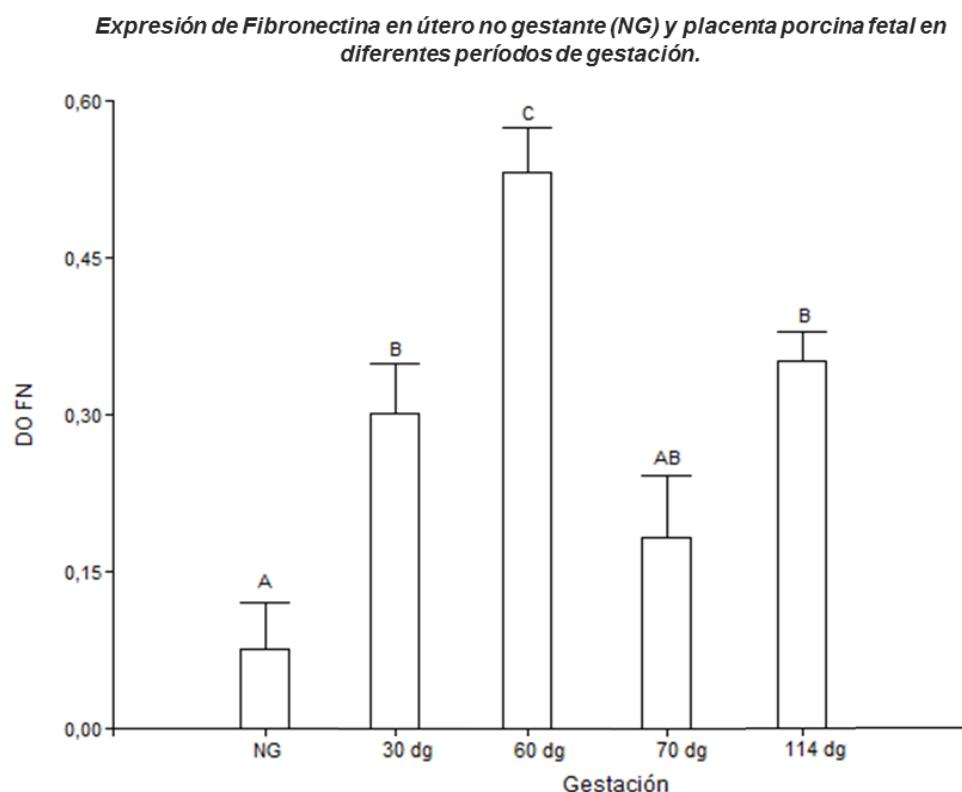


Figura 44: Determinación de la DO de FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de fibronectina (FN)

Se determinó la presencia de FN 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 determinó el %AIM.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias del %AIM de la expresión de FN en muestras de útero no gestante y gestante. Se observó que la FN aumentó significativamente en la interfase placentaria (GM+GF, 28,53%; Tabla 6a, Anexo) cuando se la compara con su expresión en tejido endometrial no gestante (NG, 0,22%) (Figura 45; $p<0,0001$). El comportamiento en placenta materna de la FN, con respecto a su área de inmunomarcación, durante la gestación fue similar con respecto a lo observado en placenta fetal ($p=0,2824$);

Figura 45; Tabla 6a, Anexo).

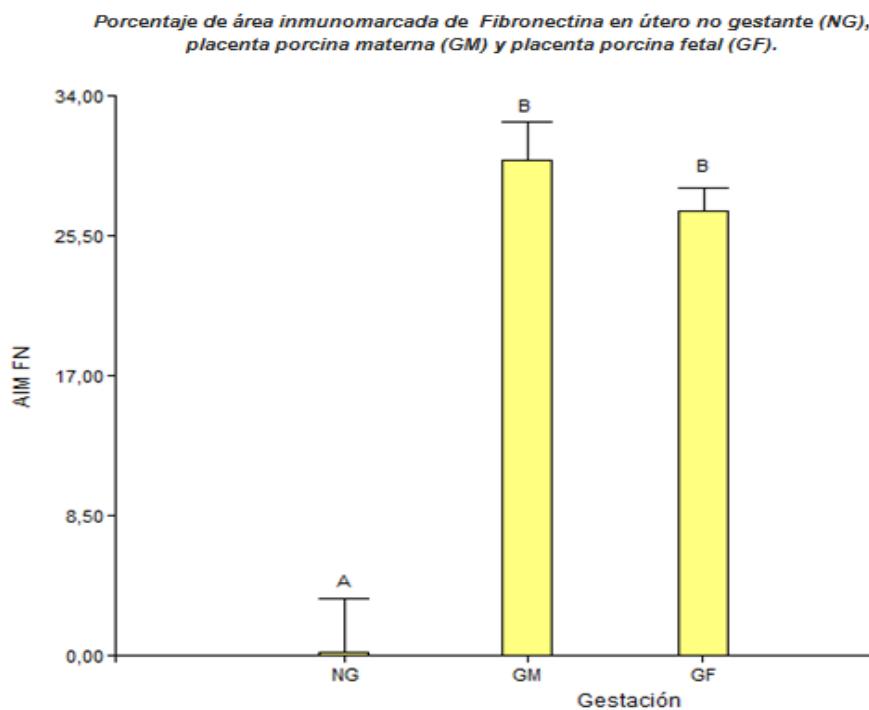


Figura 45: Determinación del %AIM de FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de FN en placenta materna

En placenta materna, la FN aumentó significativamente su %AIM a los 30 (33,02%) y 60 dg (36,43%; $p=<0,0001$), con respecto al útero no gestante. A los 70 dg descendió significativamente su área de expresión (14,85%; Figura 42; Tabla 6b, Anexo).

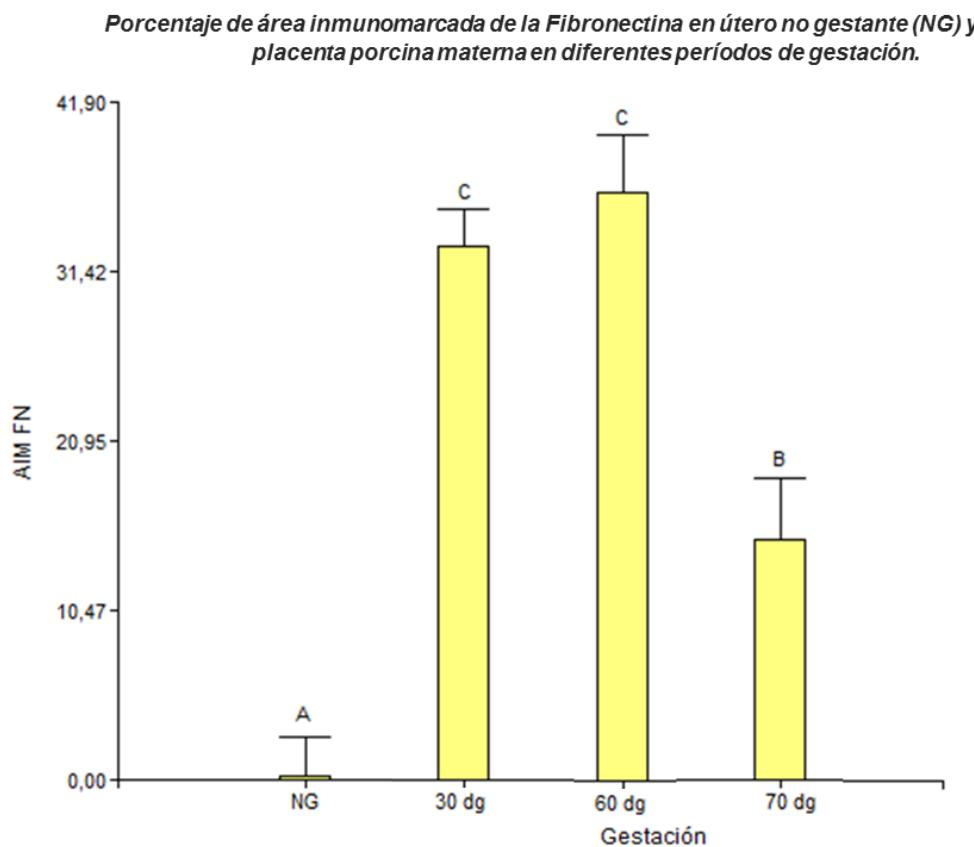


Figura 46: Determinación del %AIM de FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de FN en placenta fetal

Se observaron diferencias significativas en el %AIM de FN en placenta fetal entre los distintos períodos gestacionales estudiados. Abarcó mayor área a los 60 dg (40,07%), y disminuyó significativamente a los 70 dg (9,17%). En el período a término (114 dg), la FN aumentó nuevamente su área de inmunomarcación, con un patrón similar que a los 30dg (30,13% y 24,16%, respectivamente) ($p<0,0001$; Figura 47; Tabla 6b, Anexo).

Porcentaje de área inmunomarcada de la Fibronectina en útero no gestante (NG) y placenta porcina fetal en diferentes períodos de gestación.

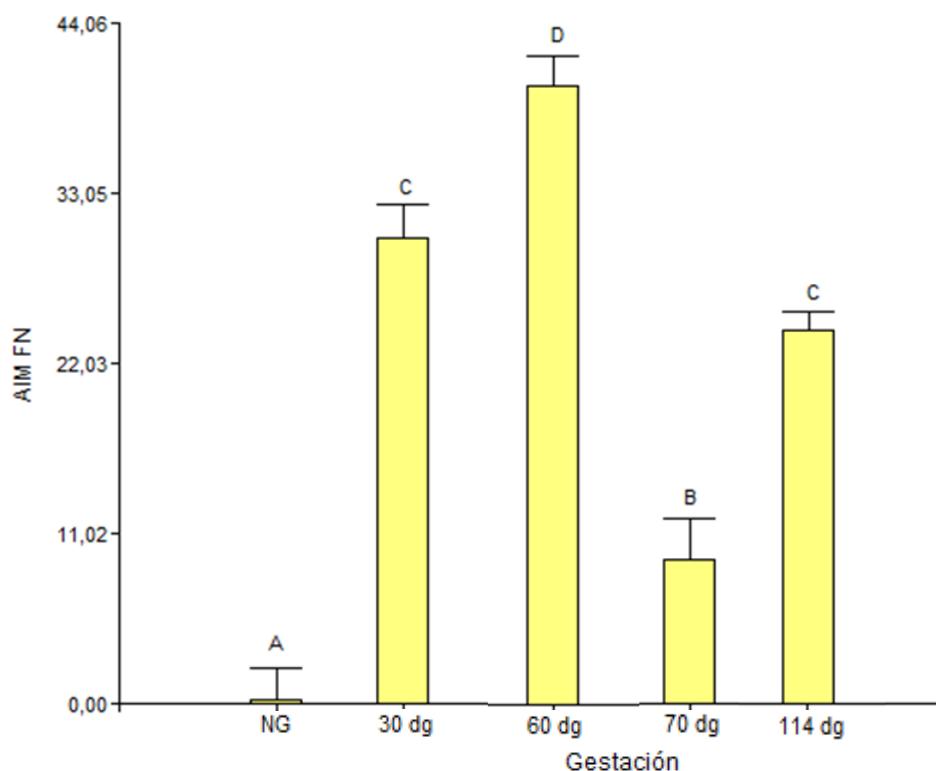


Figura 47: Determinación del %AIM de la FN en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto (GF) de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Densidad óptica (DO) de laminina (LAM)

Se determinó la presencia de laminina (LAM) 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 determinó la DO.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las DO de la expresión de LAM en muestras de útero no gestante y gestante. Se determinó que LAM se expresó en niveles basales en útero no gestante (NG; DO: 0,01) y aumentó significativamente su expresión en útero porcino gestante (GM; DO: 0,08). Durante la gestación, en la interfase, la expresión de laminina fue significativamente mayor en la placenta fetal que en la placenta materna (GF; DO: 0,16; $p<0,0001$) (Figura 48; Tabla 7a, Anexo).

Expresión de Laminina en útero no gestante (NG), placenta porcina materna (GM) y placenta porcina fetal (GF).

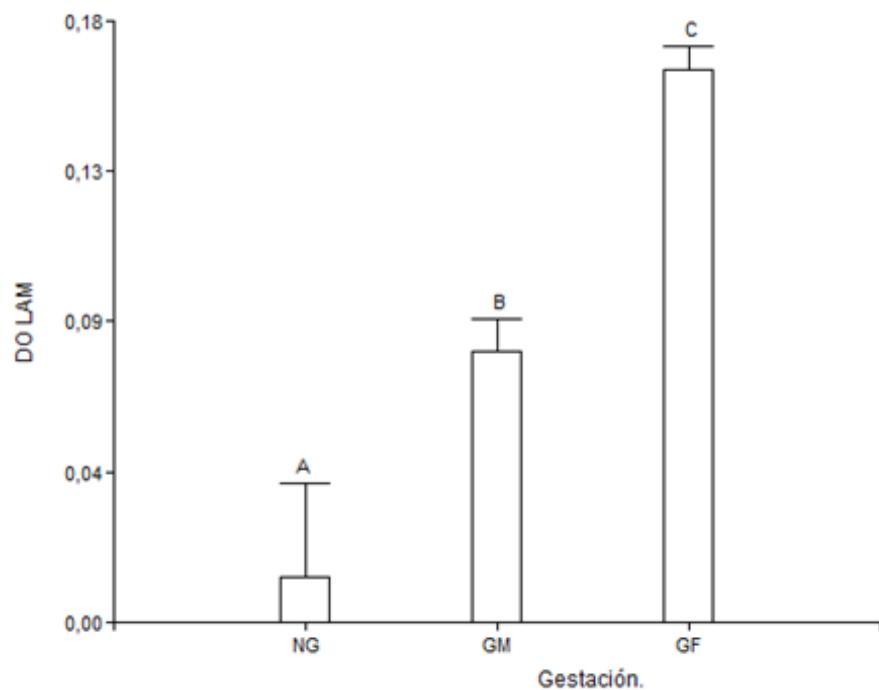


Figura 48: Determinación de la DO de la expresión de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de laminina en placenta materna

En placenta materna, la laminina aumentó su concentración significativamente a los 30 dg, comparada con útero no gestante (DO: 0,08 y 0,01; respectivamente). A los 60 dg, la expresión de LAM fue significativamente mayor que en el resto de los períodos (DO: 0,13), disminuyendo significativamente su expresión a los 70 dg (DO: 0,03; $p=<0,0001$) (Figura 49; Tabla 7b, Anexo).

Expresión de Laminina en útero no gestante (NG) y placenta porcina materna en diferentes períodos de gestación.

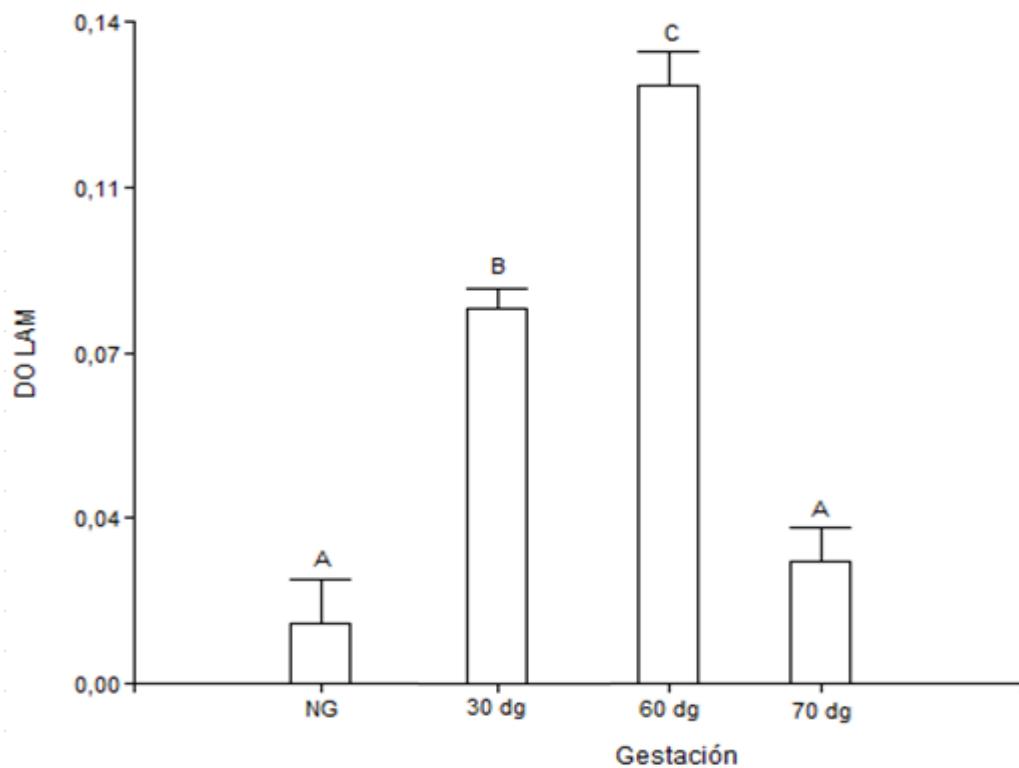


Figura 49: Determinación de la DO de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de laminina en placenta fetal

En placenta fetal, el estudio de la DO de la expresión de LAM mostró diferencias significativas entre los distintos períodos gestacionales estudiados (Tabla 7b, Anexo). La expresión de la laminina en el trofoblasto fue significativamente mayor a los 30, 60 y 114 dg (DO: 0,16; 0,22 y 0,2; respectivamente), que a los 70 dg (DO: 0,05) ($p=<0,0001$; Figura 50).

Expresión de Laminina en útero no gestante (NG) y placenta porcina fetal en diferentes períodos de gestación.

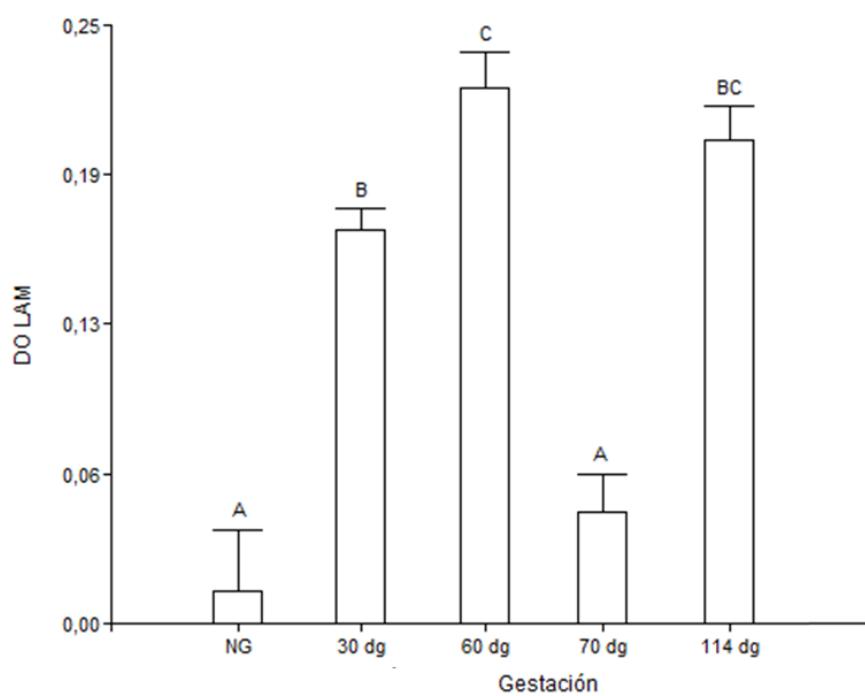


Figura 50: Determinación de la DO de la integrina LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de laminina (LAM)

Se determinó la presencia de laminina 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 determinó su %AIM.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias del %AIM de la expresión de LAM en muestras de útero no gestante y gestante. El %AIM de laminina fue significativamente mayor en la interfase placentaria (GM+GF, 16,71%; Tabla 7b, Anexo) que en el tejido endometrial no gestante (NG, 1,29%) (Figura 51; $p<0,0001$). El %AIM de LAM en placenta fetal (GF), fue significativamente mayor que en placenta materna (GM) (%AIM: 26,36 vs 7,06; respectivamente; $p<0,0001$; Figura 51; Tabla 8a, Anexo).

Resultados

Porcentaje de área immunomarcada de Laminina (LAM) en útero no gestante (NG), placenta porcina materna (GM) y placenta porcina fetal (GF).

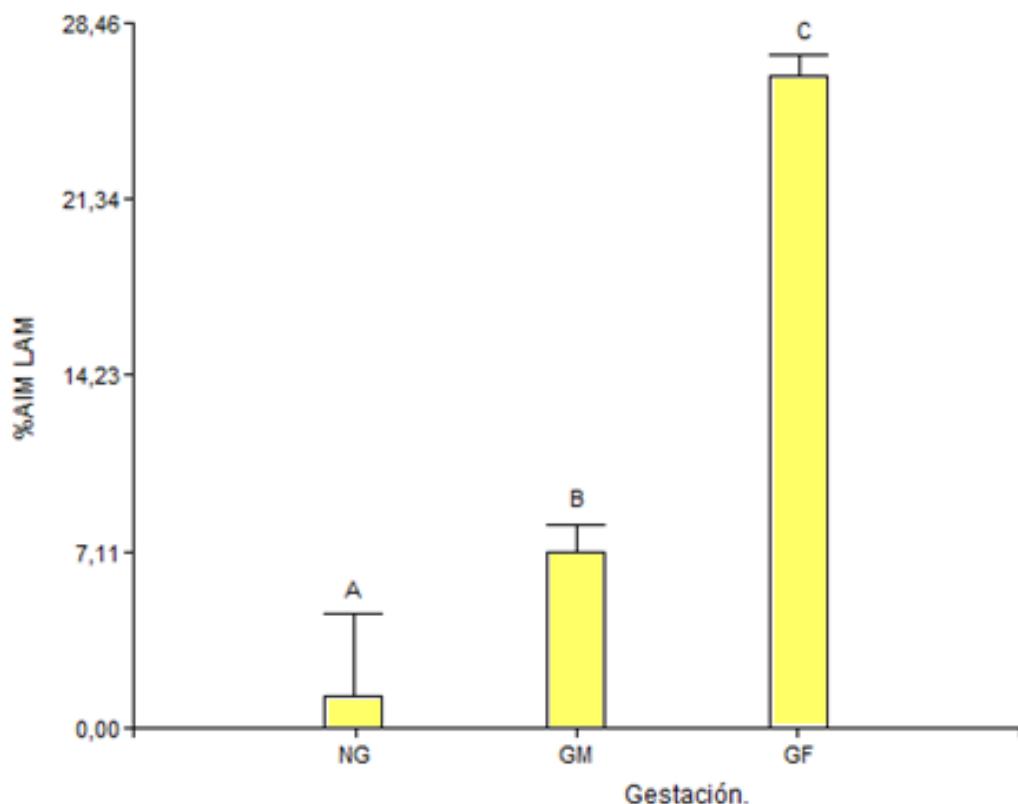


Figura 51: Determinación del %AIM de la expresión de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), placenta materna (GM) y placenta fetal (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de laminina en placenta materna

En placenta materna, la laminina aumentó significativamente su %AIM a los 60 dg (15,53%; p=<0,0001). A los 30 y 70 dg su área de expresión fue significativamente menor (%AIM: 5,9 y 2,68; respectivamente; Figura 52; Tabla 8b, Anexo).

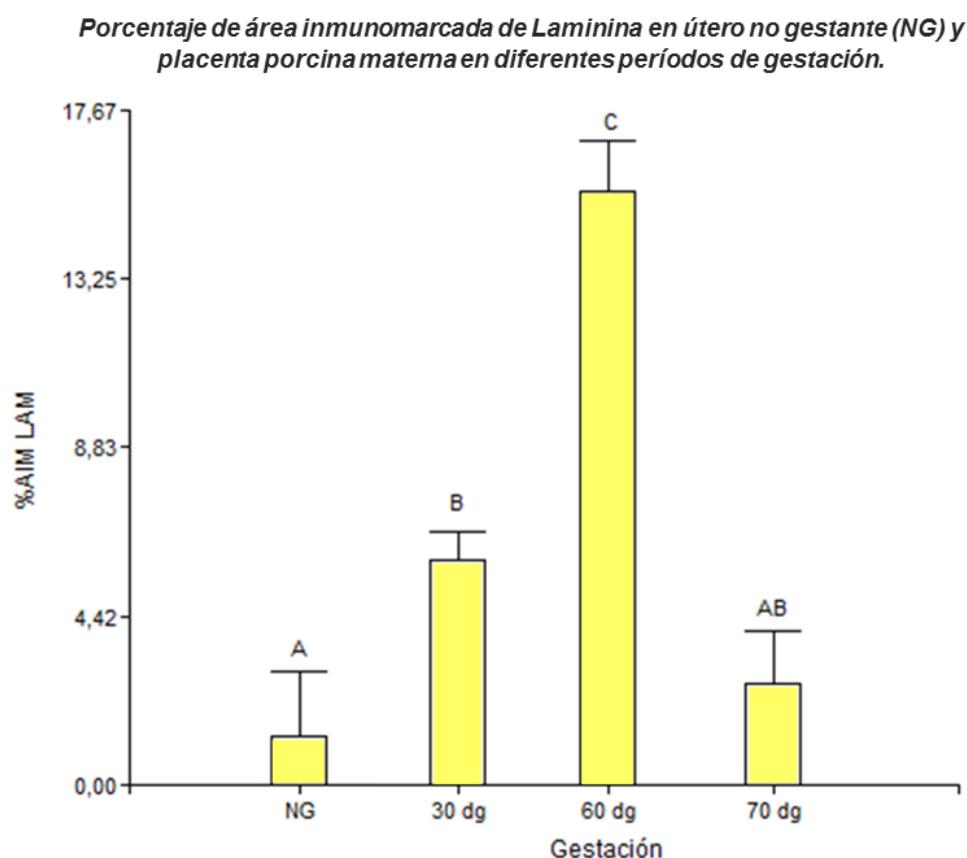


Figura 52: Determinación del %AIM de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).

%AIM de laminina en placenta fetal

Se observaron diferencias significativas en el %AIM de LAM en placenta fetal entre los distintos períodos gestacionales estudiados. Los valores más elevados se encontraron a los 30, 60 y 114 dg (27,43%; 31% y 33,43%; respectivamente, $p<0,0001$). A los 70 dg el área de expresión fue significativamente menor (8,66%) (Figura 53; Tabla 8b, Anexo).

Porcentaje de área inmunomarcada de Laminina en útero no gestante (NG) y placenta porcina fetal en diferentes períodos de gestación.

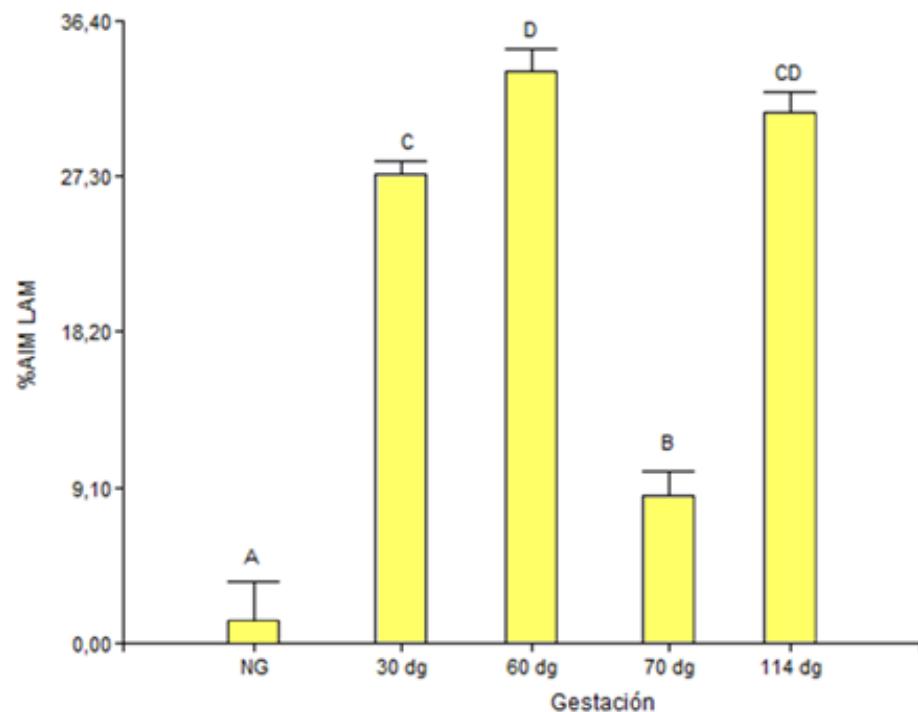


Figura 53: Determinación del %AIM de LAM en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Densidad óptica (DO) del colágeno V (COLV)

Se determinó la presencia de colágeno V (COLV) mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta en 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 determinó la DO.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las DO de la expresión de COLV en muestras de útero no gestante y gestante. Se determinó que COLV se expresa en niveles basales en útero no gestante (NG; DO: 0,05) y aumentó significativamente su expresión en la interfase placentaria (DO GM+GF: 0,14; $p<0,0001$; Tabla 9a, Anexo). Durante la gestación, el colágeno V tuvo un similar patrón de expresión tanto en el epitelio endometrial como en el trofoblasto (GM: 0,14 y GF: 0,14) (Figura 54; Tabla 9a, Anexo).

Resultados

Expresión de Colágeno V en útero no gestante (NG), placenta porcina materna (GM) y placenta porcina fetal (GF).

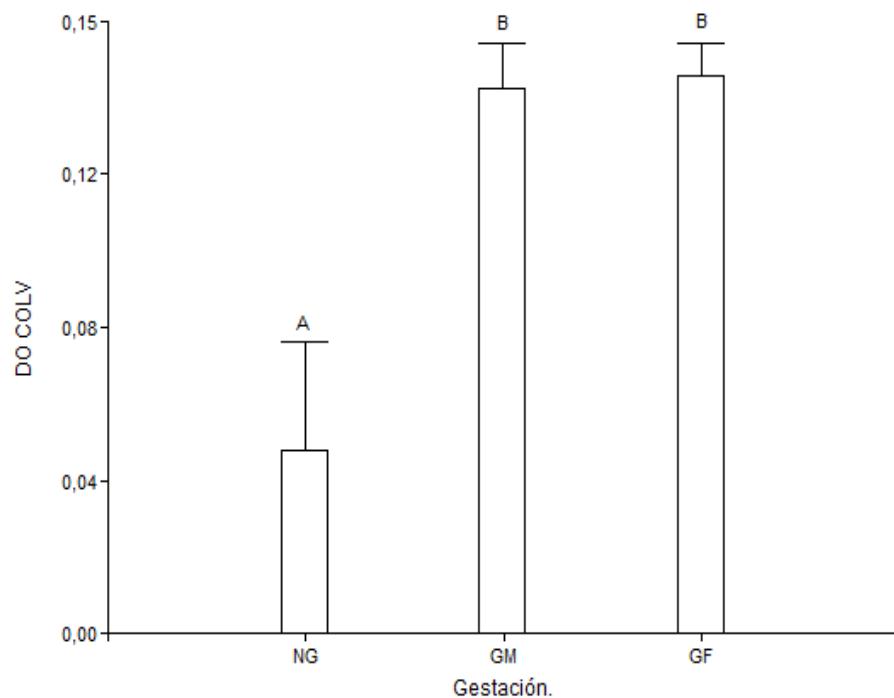


Figura 54: Determinación de la DO de la expresión de COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), epitelio luminal endometrial gestante (GM) y trofoblasto (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de colágeno V en placenta materna

En placenta materna, el COLV aumentó su concentración significativamente a los 30 y 60 dg, comparada con útero no gestante (DO: 0,18; 0,13 y 0,05; respectivamente). A los 70 dg, la expresión de COLV disminuyó significativamente (DO: 0,07; $p=<0,0001$) (Figura 55; Tabla 9b, Anexo).

Expresión de Colágeno V en útero no gestante (NG) y placenta porcina materna en diferentes períodos de gestación.

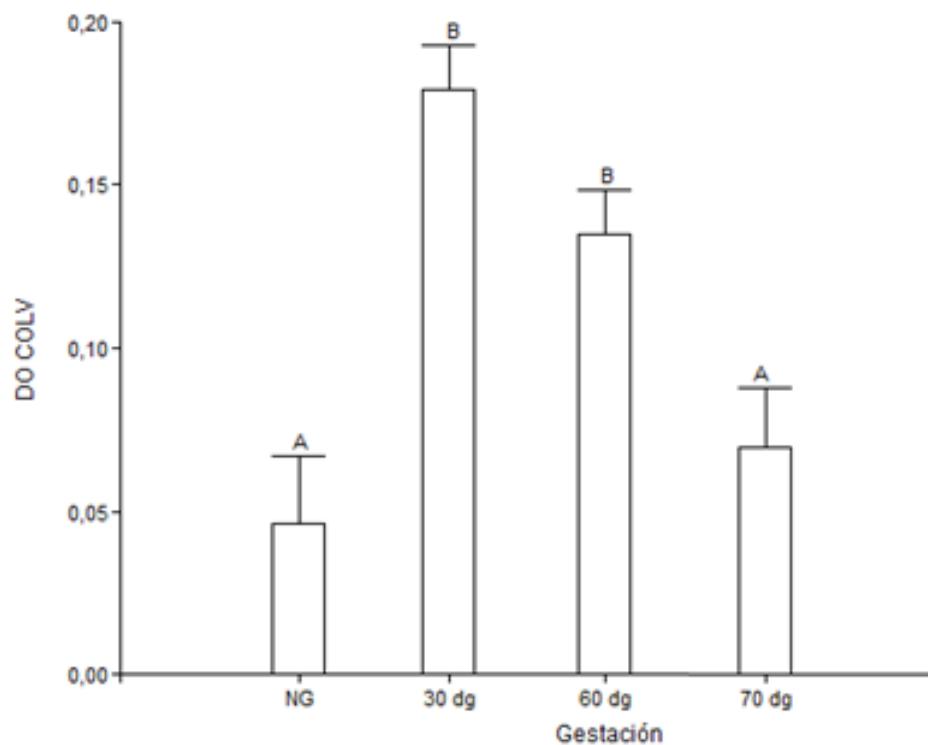


Figura 55: Determinación de la DO de colágeno V en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30dg, 60 dg, 70 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DO de colágeno V en placenta fetal

En placenta fetal, el estudio de la DO de la expresión de COLV mostró diferencias significativas entre los distintos períodos gestacionales estudiados (Tabla 9b, Anexo). La expresión de COLV en el trofoblasto fue significativamente mayor a los 30, 60 y 114 dg (DO: 0,15; 0,22 y 0,16; respectivamente) y disminuyó significativamente a los 70 dg (DO: 0,06) ($p=<0,0001$; Figura 56).

Expresión de Colágeno V en útero no gestante (NG) y placenta porcina fetal en diferentes períodos de gestación.

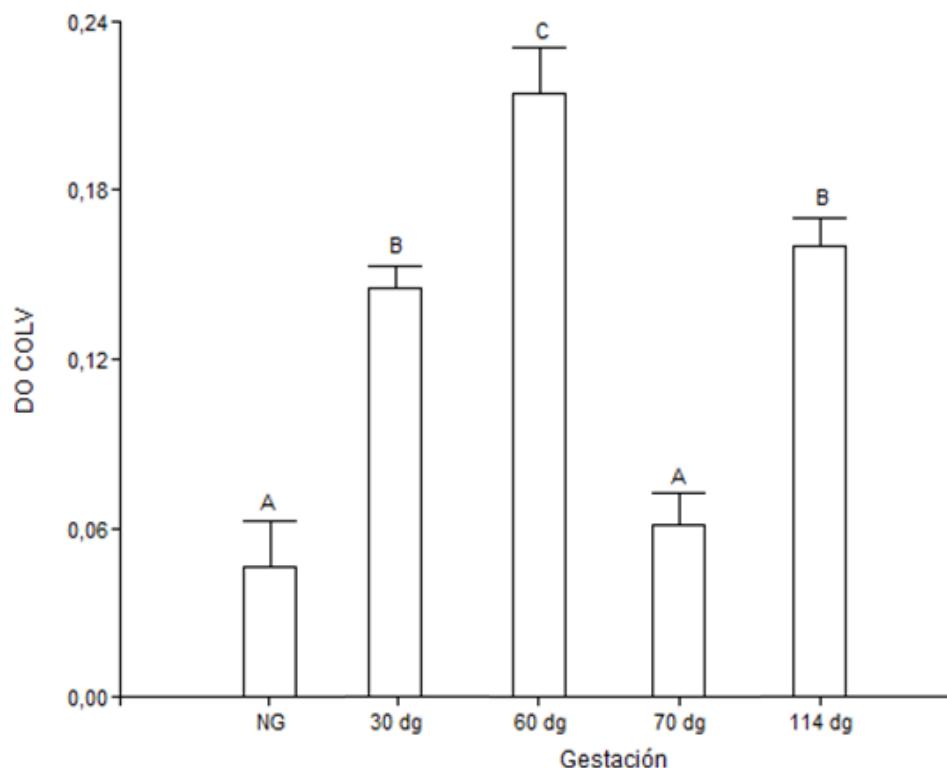


Figura 56: Determinación de la DO del COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de colágeno V (COLV)

Se determinó la presencia de colágeno V mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta en 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 determinó su %AIM.

Se realizó un análisis de varianza entre las medias del %AIM de la expresión de COLV en muestras de útero no gestante y gestante. El Colágeno V aumentó significativamente su área de expresión en la interfase placentaria (%AIM GM+GF: 22,16%; Tabla 10a, Anexo) cuando se la compara con su expresión en tejido endometrial no gestante (NG: 6,88%) (Figura 57; $p<0,0001$). El colágeno V en placenta materna (GM), presentó similar área de expresión que en placenta fetal (GF) (%AIM: 20,71 vs 23,62; respectivamente; $p<0,0001$; Figura 57; Tabla 10a, Anexo).

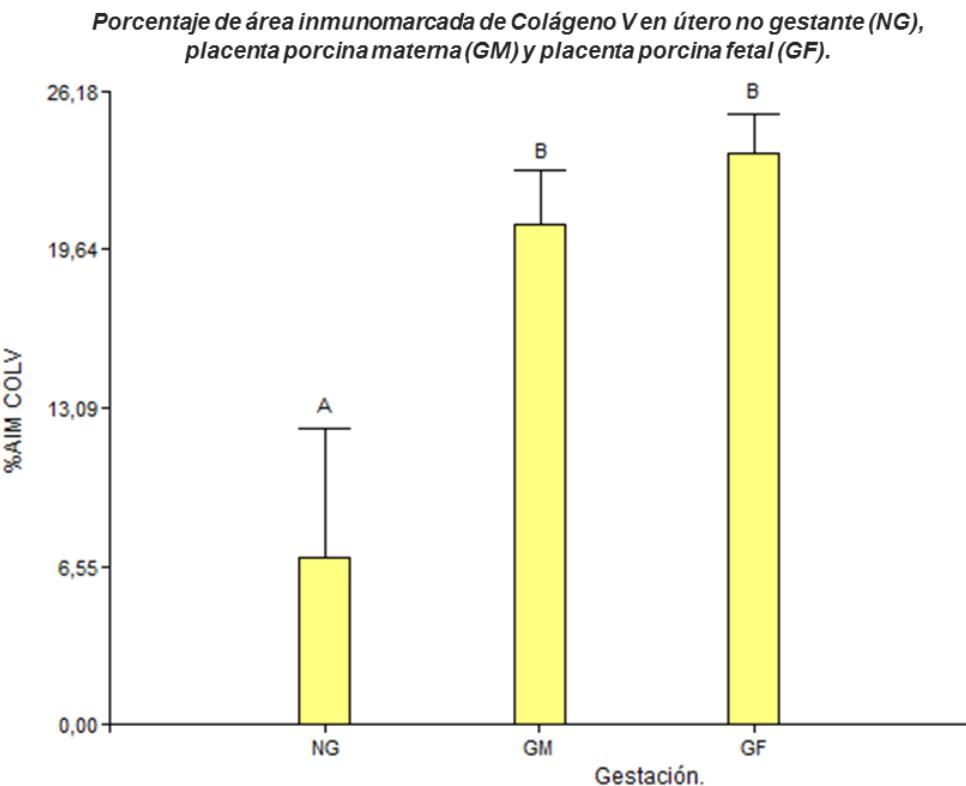


Figura 57: Determinación del %AIM de la expresión de COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG), placenta materna (GM) y placenta fetal (GF). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

%AIM de colágeno V en placenta materna

En placenta materna, el colágeno aumentó significativamente su %AIM a los 30 dg (32,53%; $p < 0,0001$). A los 60 dg su área de expresión disminuyó significativamente (%AIM: 18,32) y a los 70 dg disminuyó aún más (3,73%) (Figura 58; Tabla 10b, Anexo).

Porcentaje de área inmunomarcada de Colágeno V en útero no gestante (NG) y placenta porcina materna en diferentes períodos de gestación.

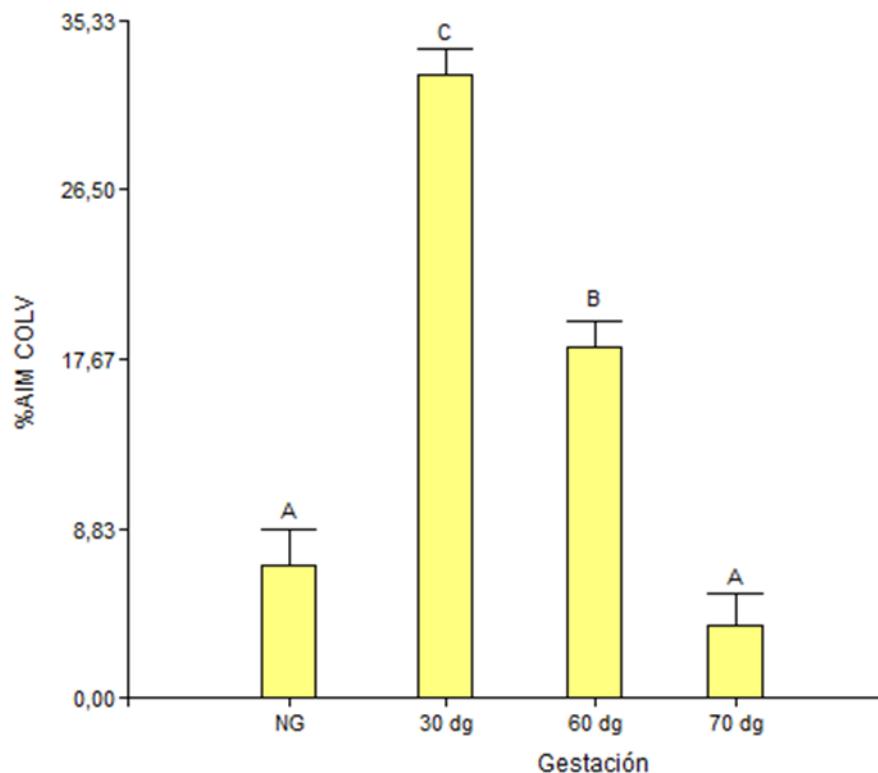


Figura 58: Determinación del %AIM de COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el epitelio luminal endometrial de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

%AIM de colágeno V en placenta fetal

Se observaron diferencias significativas en el %AIM de COLV en placenta fetal entre los distintos períodos gestacionales estudiados. El Colágeno V ocupó mayor área a los 30, 60 y 114dg (28,65%; 33,22% y 24,51%; respectivamente, $p<0,0001$). A los 70 dg el área de expresión fue significativamente menor (5,58%) (Figura 59; Tabla 10b, Anexo).

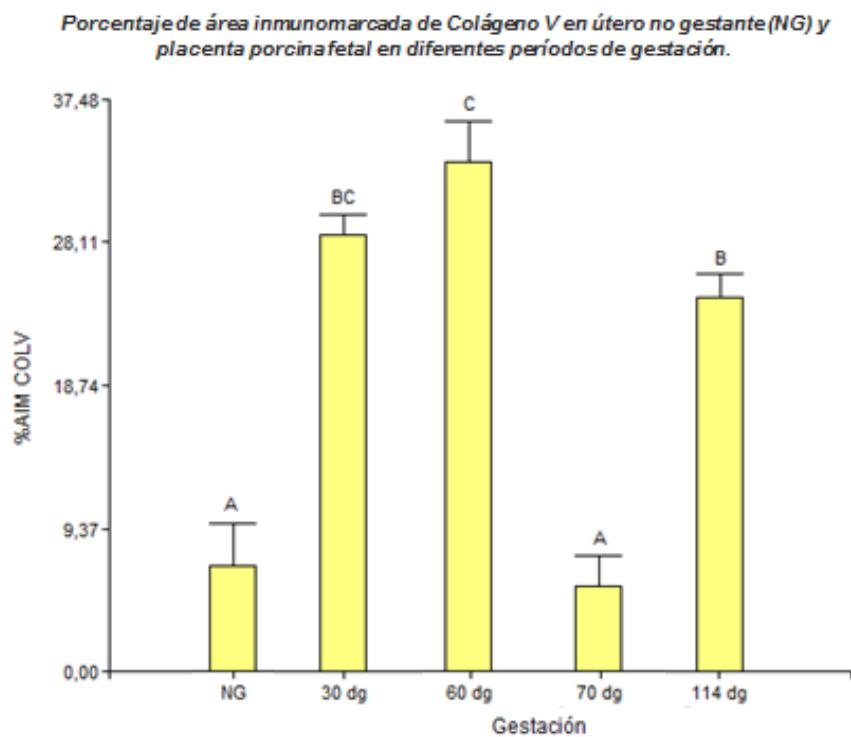


Figura 59: Determinación del %AIM del COLV en el epitelio luminal endometrial no gestante (NG) y el trofoblasto de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DETERMINACIÓN DE INTERLEUQUINAS

Determinación de Interleuquina 1 beta (IL-1 β)

Se determinó la presencia de IL-1 β en sueros, en homogenatos de úteros de cerdas no gestantes (NGM) y en homogenatos de extractos placentarios maternos (HoPM) y fetales (HoPF) de los distintos períodos gestacionales seleccionados.

Determinación de IL-1 β en suero

En la Tabla 11a (Anexo) se compararon los valores de IL-1 β en suero entre cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS). Debido a la gran variabilidad entre los valores de esta citoquina durante la gestación, no se hallaron diferencias significativas entre ambos estadios (1 vs. 76,5 \pm 49,1; p= 0,5). (Figura 60; Tabla 11a, Anexo).

Concentración de IL-1 β en suero de cerdas no gestantes (NGS) y suero de cerdas gestantes (GS).

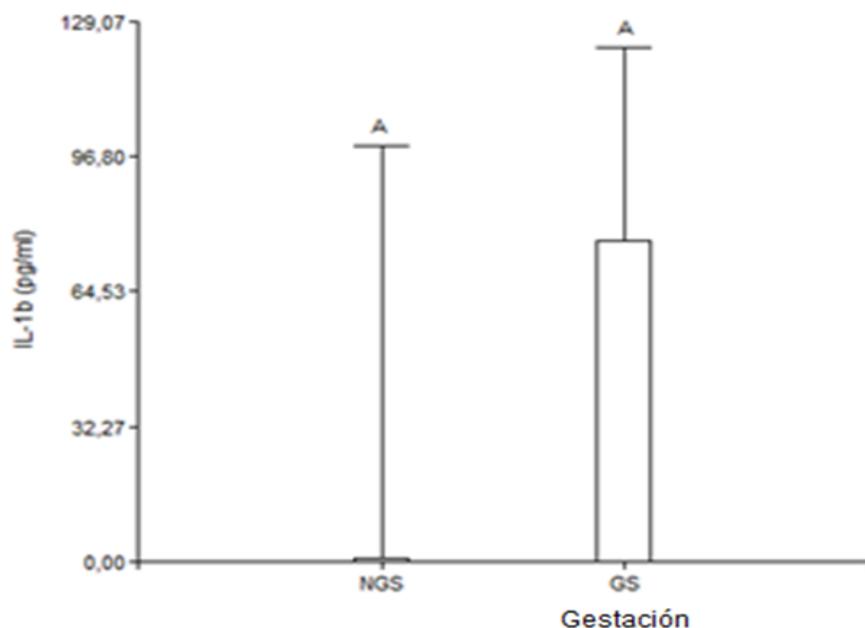


Figura 60: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGS) y suero de cerdas gestantes (GS). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).

Se realizó un análisis de la varianza y un test de Tukey de las concentraciones de IL-1 β en muestras de suero de cerdas no gestantes y gestantes en los diferentes períodos de gestación (Tabla 11b, Anexo). Las concentraciones séricas de IL-1 β fueron basales tanto en las cerdas no gestantes como de 30 y 70 días de gestación (1 pg/ml). A los 114 dg, el valor de esta citoquina se incrementó significativamente en relación al resto de la gestación ($306,25 \pm 53,55$ pg/ml; $p = 0,0227$) (Figura 64; Tabla 11b, Anexo).

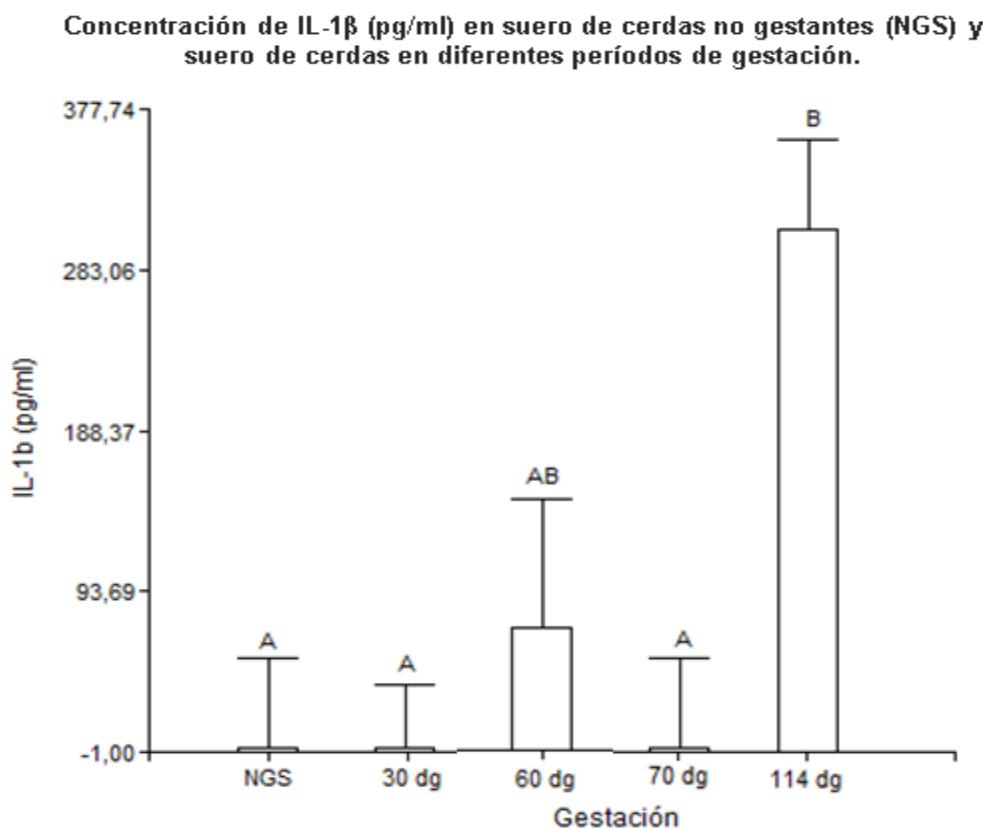


Figura 61: Concentración sérica de IL-1 β (pg/ml) entre cerdas no gestantes (NGS) y diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Determinación de IL-1 β en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM)

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las concentraciones de IL-1 β en extractos de útero no gestante (NGM) y gestante (HoPM). No se hallaron diferencias significativas en los valores de IL-1 β cuando se comparó el útero no gestante con la placenta gestante, considerando la gestación completa (19,82 vs. 149,48 pg/ml, $p=0,3556$) (Figura 62; Tabla 11a, Anexo). Esto se debe a que a los 114 dg esta citoquina disminuyó significativamente en placenta materna y su concentración fue menor que en tejido uterino no gestante.

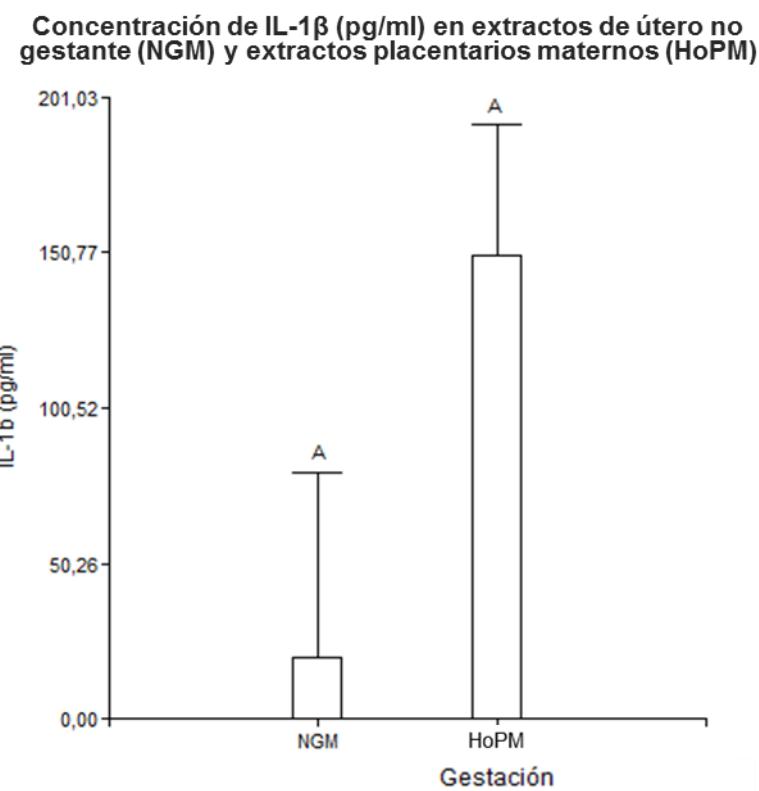


Figura 62: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y gestante (HoPM) tomando la gestación en bloque. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Se realizó un análisis de varianza de las concentraciones de IL-1 β en extractos de útero no gestante y gestante en distintos períodos de gestación. Se hallaron diferencias significativas en la concentración de IL-1 β en homogenatos de placenta materna entre los diferentes períodos gestacionales. La concentración de IL-1 β en HoPM se halló significativamente más elevada a los 70 dg comparada con el período a término (114 dg) y útero no gestante (254,16 vs. 1 y 19,82 pg/ml; p=0,0284) (Figura 63; Tabla 11b, Anexo).

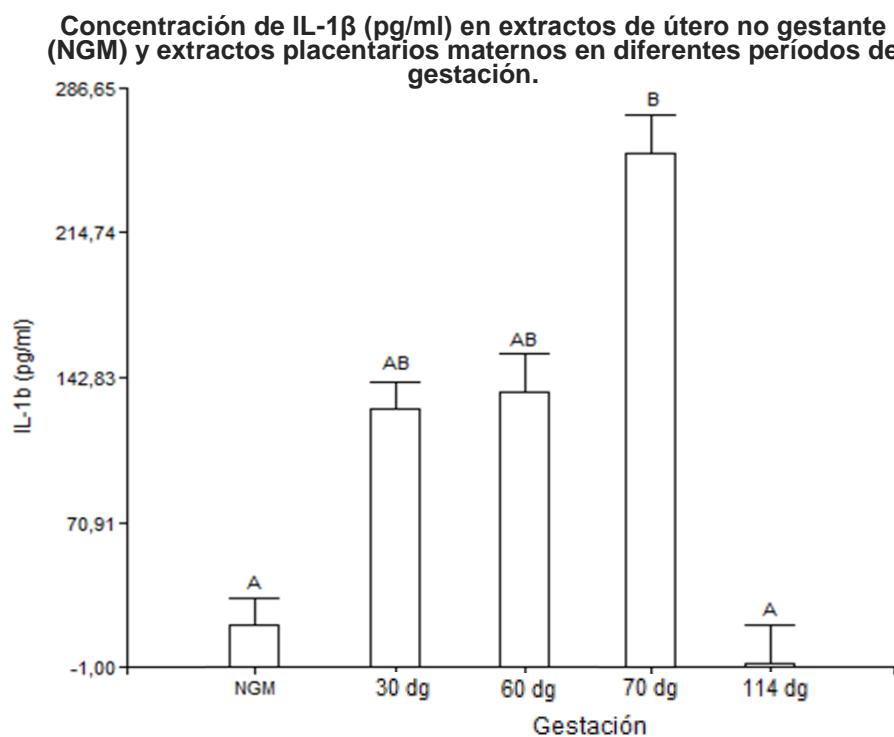


Figura 63: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (p<0,05).

Determinación de IL-1 β en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF)

La concentración de IL-1 β en placenta fetal realizó un pico en su concentración a los 60 dg (261,06 pg/ml), luego su concentración bajó a los 70 dg (138,48 pg/ml) y descendió significativamente a los 114 dg comparado con los 60 dg (1 pg/ml; $p= 0,0012$) (Figura 64; Tabla 3b, Anexo).

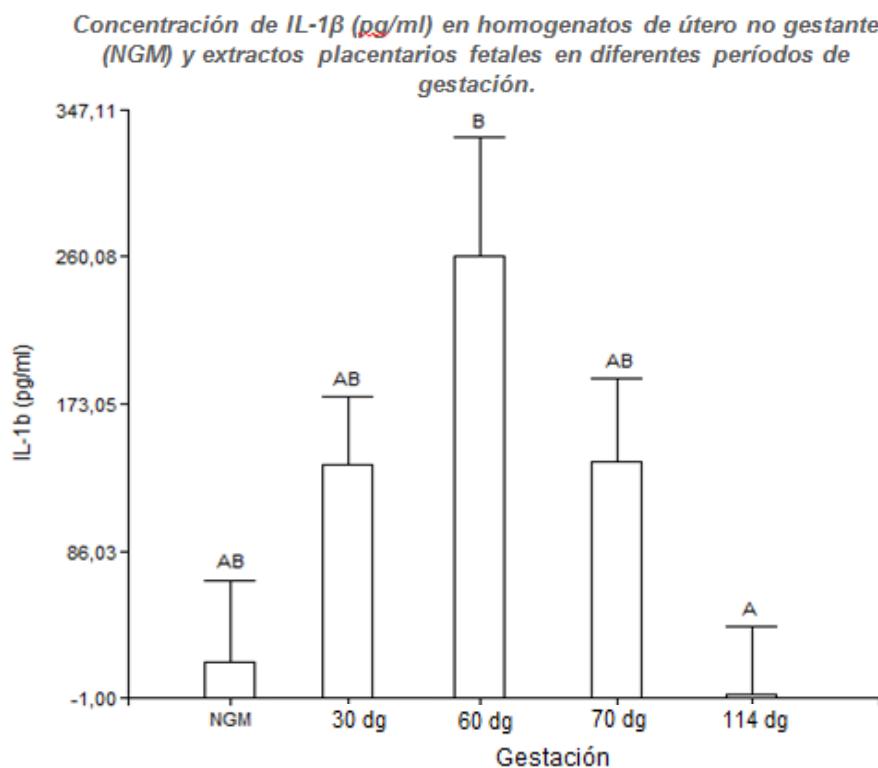


Figura 64: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPF en los diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de Interleuquina 2 (IL-2)

Se determinó la presencia de IL-2 en sueros, en homogenatos de úteros de cerdas no gestantes (NGM) y en homogenatos de extractos placentarios maternos (HoPM) y fetales (HoPF) de los distintos períodos gestacionales seleccionados.

Determinación de IL-2 en suero

Se realizó un análisis de varianza y un test de Tukey con los valores de IL-2 en suero entre cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS). Debido a la gran variabilidad entre los valores de esta citoquina durante la gestación, no se hallaron diferencias significativas entre el suero de cerdas no gestantes y el suero de cerdas gestantes, considerando la gestación completa (72 vs. 816,78; $p= 0,12$; Figura 65; Tabla 12a, Anexo).

Concentración de IL-2 en suero de cerdas no gestantes (NGS) y suero de cerdas gestantes (GS).

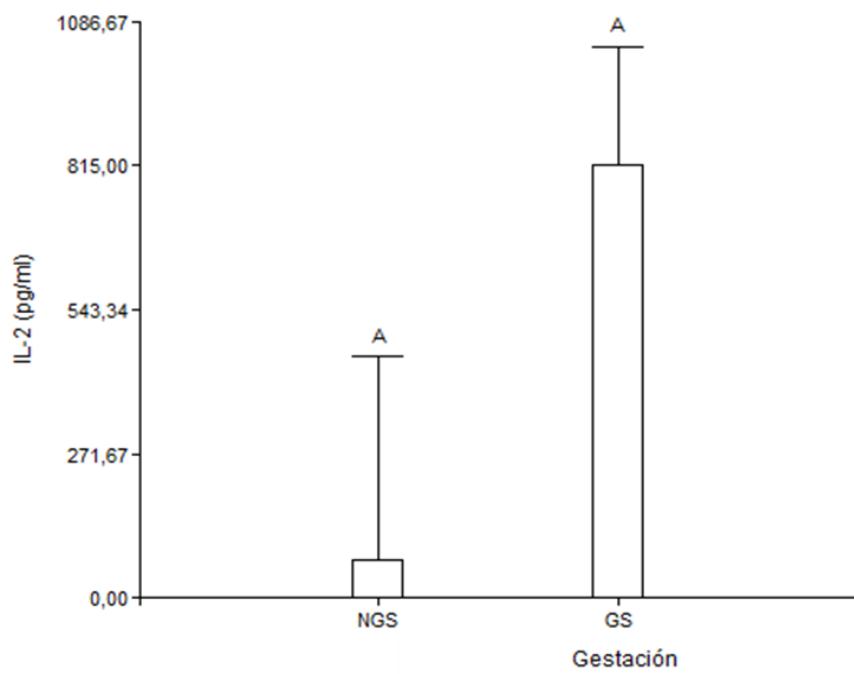


Figura 65: Concentración de IL-2 (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGS) y suero de cerdas gestantes (GS). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Se realizó un análisis de la varianza y un test de Tukey de las concentraciones de IL-2 en muestras de suero de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS) en los diferentes períodos de gestación (Tabla 12b, Anexo). Se observó un aumento de la IL-2 tanto a los 30 dg (461 pg/ml) como a los 70 dg (711 pg/ml), pero las diferencias no fueron significativas con respecto a los 60 dg (249 pg/ml) y suero de cerdas no gestantes (72 pg/ml). La concentración de IL-2 en suero de cerdas gestantes a los 114 dg (período a término) fue significativamente más elevada (2024 pg/ml), que en el resto de los períodos de gestación y los sueros de cerdas no gestantes ($p=0,0006$) (Figura 66).

Concentración de IL-2 (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGS) y suero de cerdas en diferentes períodos de gestación.

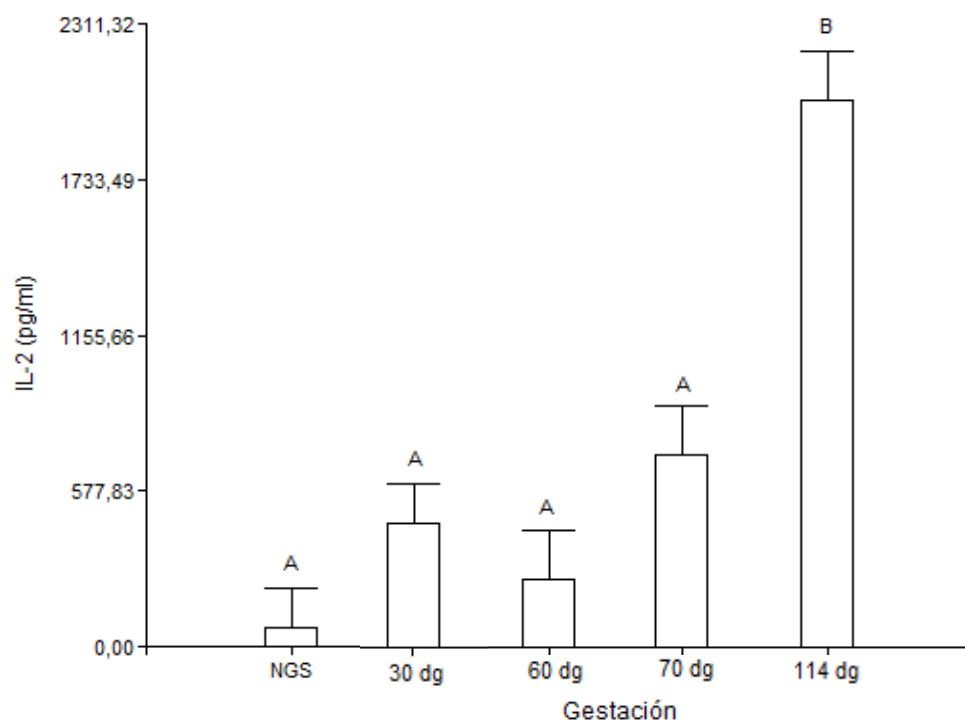


Figura 66: Concentración sérica de IL-2 (pg/ml) entre cerdas no gestantes (NGS) y diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de IL-2 en Homogenatos de Placenta Materna

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las concentraciones de IL-2 en extractos de útero no gestante (NGM) y gestante (HoPM). Debido a la gran variabilidad entre los valores de esta citoquina durante la gestación, no se hallaron diferencias significativas entre los valores basales de IL-2 del útero no gestante (0 pg/ml) y la media de la concentración en extractos de placenta materna (139,5 pg/ml, $p=0,1051$), considerando la gestación completa (Figura 67, Tabla 12a, Anexo).

Concentración de IL-2 en extractos de útero no gestante (NGM) y extractos de placenta materna (HoPM)

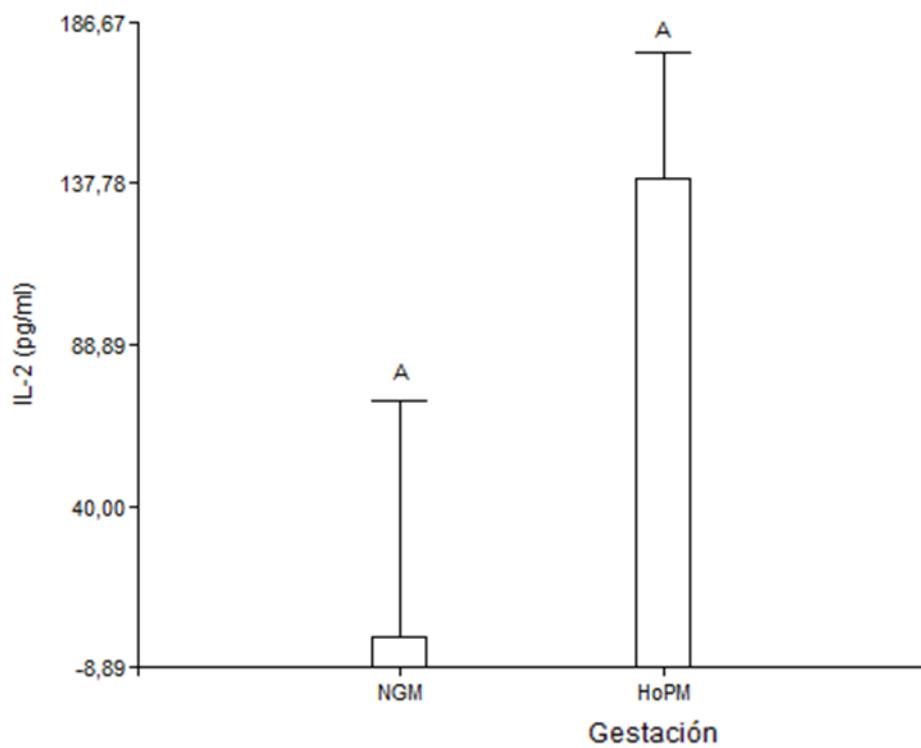


Figura 67: Concentración de IL-2 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM tomando la gestación en bloque. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las concentraciones de IL-2 en extractos de útero no gestante (NGM) y gestante (HoPM) en diferentes períodos de gestación. La concentración de IL-2 en HoPM se halló significativamente más elevada a los 70 dg con respecto al fin de la gestación (114 dg) y útero no gestante (367,5 vs. 30 y 0 pg/ml, respectivamente; $p=0,0382$) (Figura 68; Tabla 12b, Anexo).

Concentración de IL-2 (pg/ml) en homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos placentarios maternos en diferentes períodos de gestación.

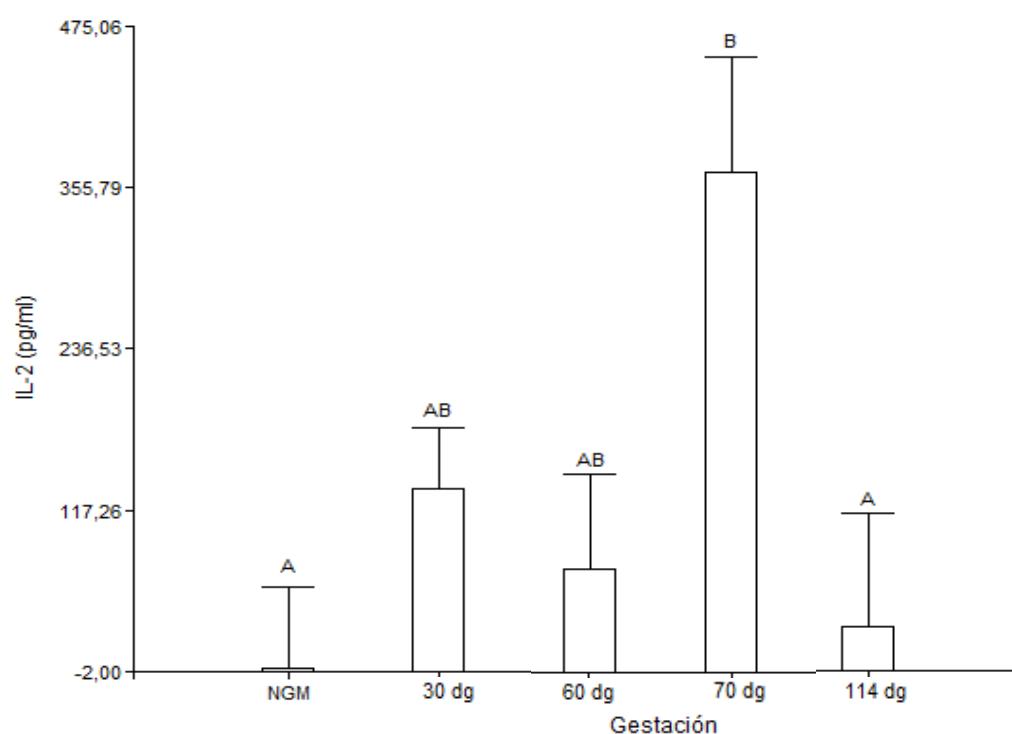


Figura 68: Concentración de IL-2 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de IL-2 en Homogenatos de Placenta Fetal

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las concentraciones de IL-2 en extractos de útero no gestante y placenta fetal en diferentes períodos de gestación. Se observaron diferencias significativas en la concentración de IL-2 en HoPF entre los distintos períodos gestacionales estudiados. La concentración de IL-2 en placenta fetal realizó dos picos, a los 30 (915 pg/ml) y 70 dg (2298 pg/ml). Los niveles de IL-2 disminuyeron significativamente en el período a término (114 dg; 163,2 pg/ml) ($p=<0,0001$; Figura 65; Tabla 12b, Anexo).

Concentración de IL-2 (pg/ml) en homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos placentarios fetales de cerdas en diferentes períodos de gestación.

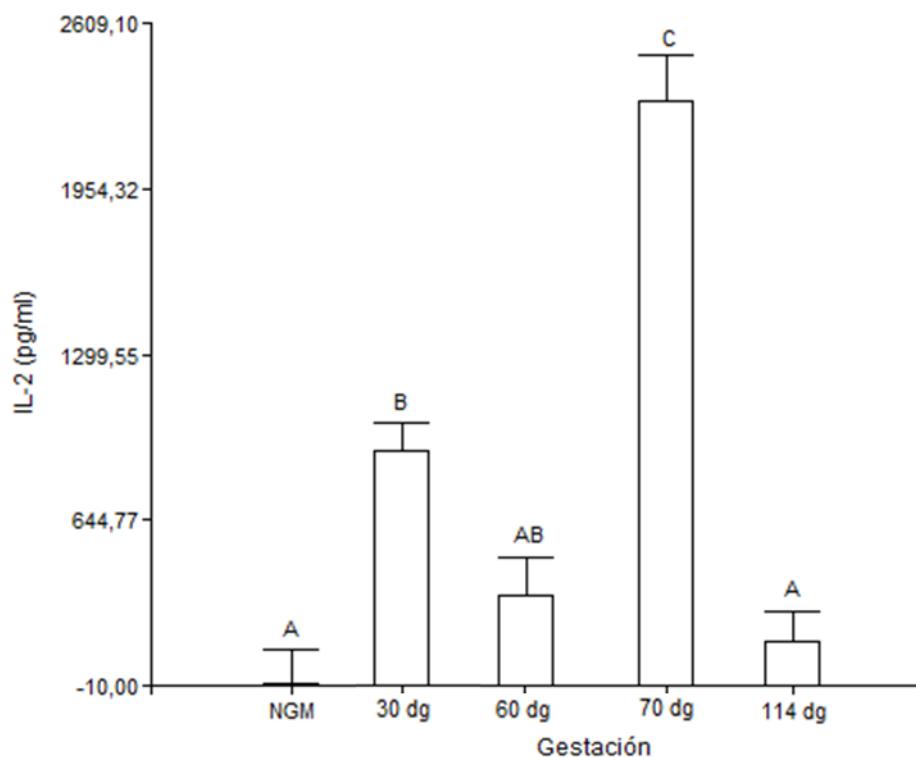


Figura 69: Concentración de IL-2 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPF en función de los diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de Interleuquina 4 (IL-4)

Se determinó la presencia de IL-4 en sueros, en homogenatos de úteros de cerdas no gestantes (NGM) y en homogenatos de extractos placentarios maternos (HoPM) y fetales (HoPF) de los distintos períodos gestacionales seleccionados.

Determinación de IL-4 en suero

Se realizó un análisis de varianza y un test de Tukey con los valores de IL-4 en suero entre cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS). Debido a la gran variabilidad entre los valores de esta citoquina durante la gestación, no se observaron diferencias significativas entre el suero de cerdas no gestantes y el suero de cerdas gestantes (232 vs. 2441,45 respectivamente; $p=0,1634$; Figura 70, Tabla 13a, Anexo).

Concentración de IL-2 (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGS) y suero de cerdas gestantes (GS).

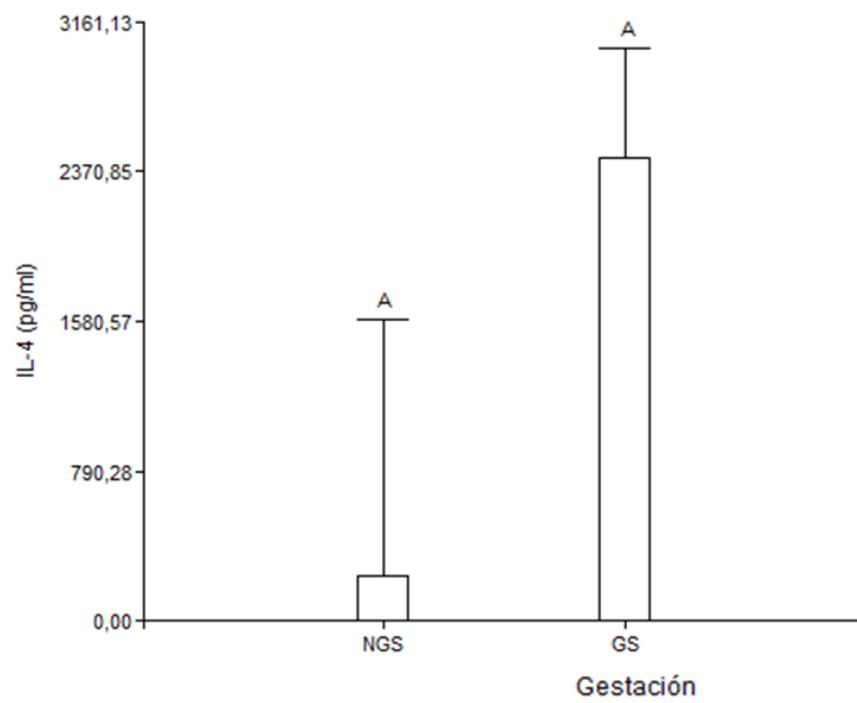


Figura 70: Concentración de IL-4 (pg/ml) en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Debido a que los valores séricos de las cerdas en distintos períodos de gestación, no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianzas y normalidad, se realizó un análisis de la varianza no paramétrica, Kruskal Wallis, analizando las concentraciones de IL-4 en muestras de suero de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes en los diferentes períodos de gestación. Se observó un aumento significativo en la concentración de la IL-4 a los 30 (2229,67 pg/ml), 70 (2319,33 pg/ml) y 114 dg (3929,67 pg/ml) con respecto a su concentración en suero de cerdas no gestantes (NGS) (232 pg/ml; $p=0,0347$) (Figura 71; Tabla 13b, Anexo).

Concentración de IL-4 (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGS) y sueros de cerdas de diferentes períodos de gestación.

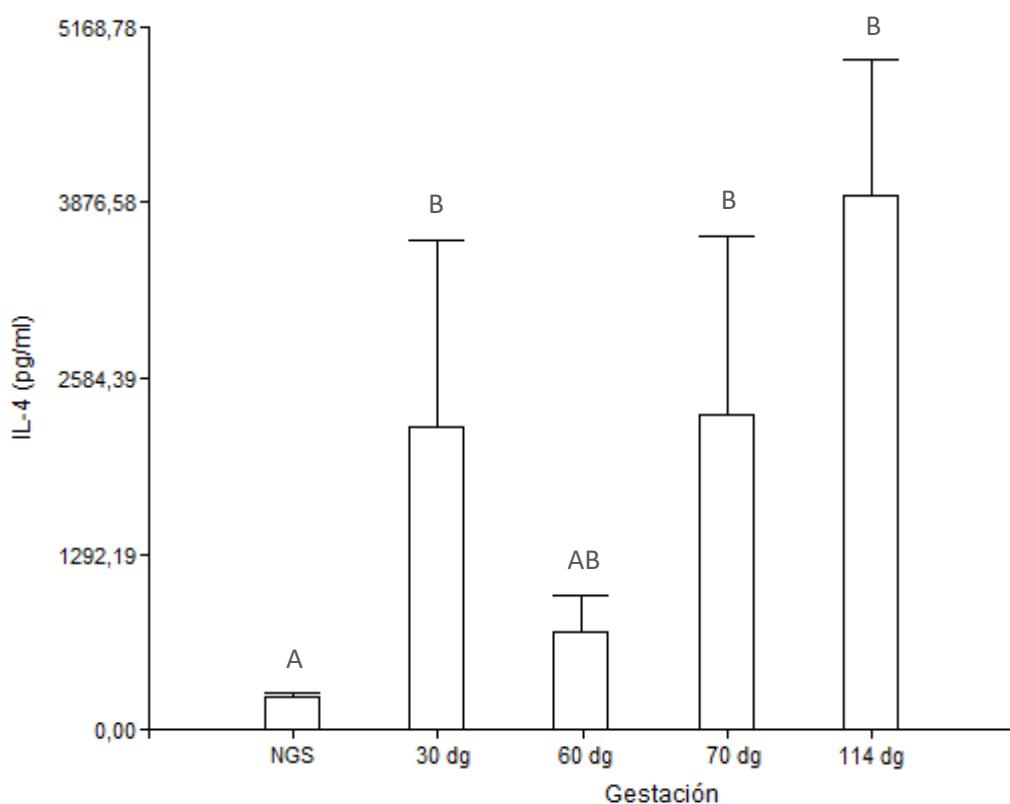


Figura 71: Concentración sérica de IL-4 (pg/ml) entre cerdas no gestantes (NGS) y diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de IL-4 en Homogenatos de Placenta Materna

En el análisis del comportamiento de la IL-4 en tejido placentario materno, se observó que su concentración se mantuvo con valores similares durante el transcurso de la gestación ($p=0,32$) (Figura 72; Tabla 13b, Anexo).

Concentración de IL-4 (pg/ml) en homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos placentarios porcinos maternos en diferentes períodos de gestación.

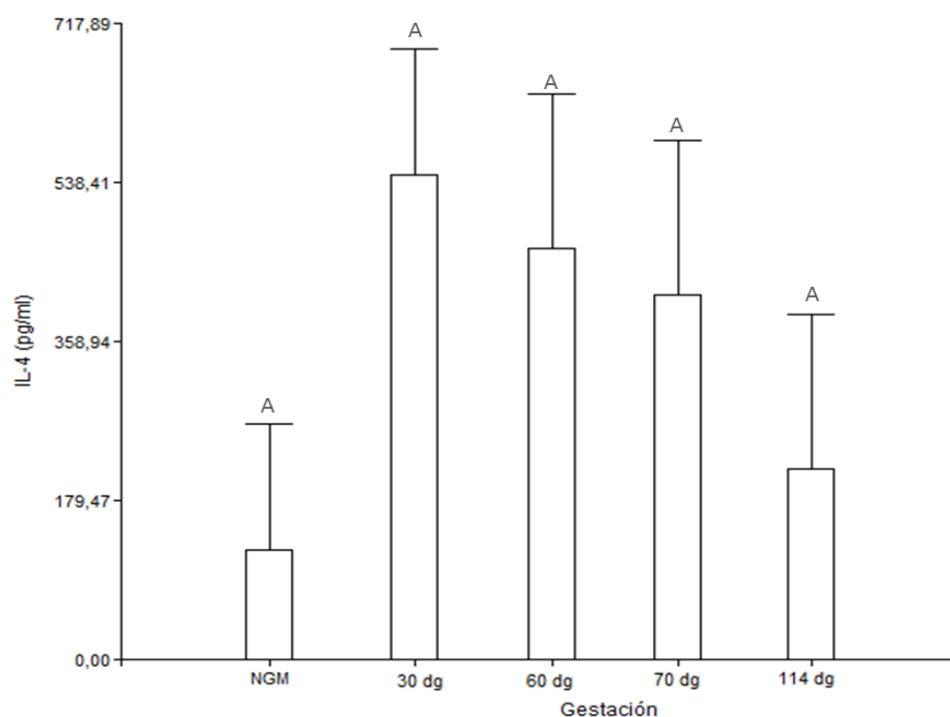


Figura 72: Concentración de IL-4 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Al separar los períodos, sólo se observó un aumento significativo a los 30 dg, comparado con los niveles de IL-4 en útero no gestante (547 vs. 123 pg/ml, respectivamente; $p=0,0211$; Figura 73; Tabla 13b, Anexo).

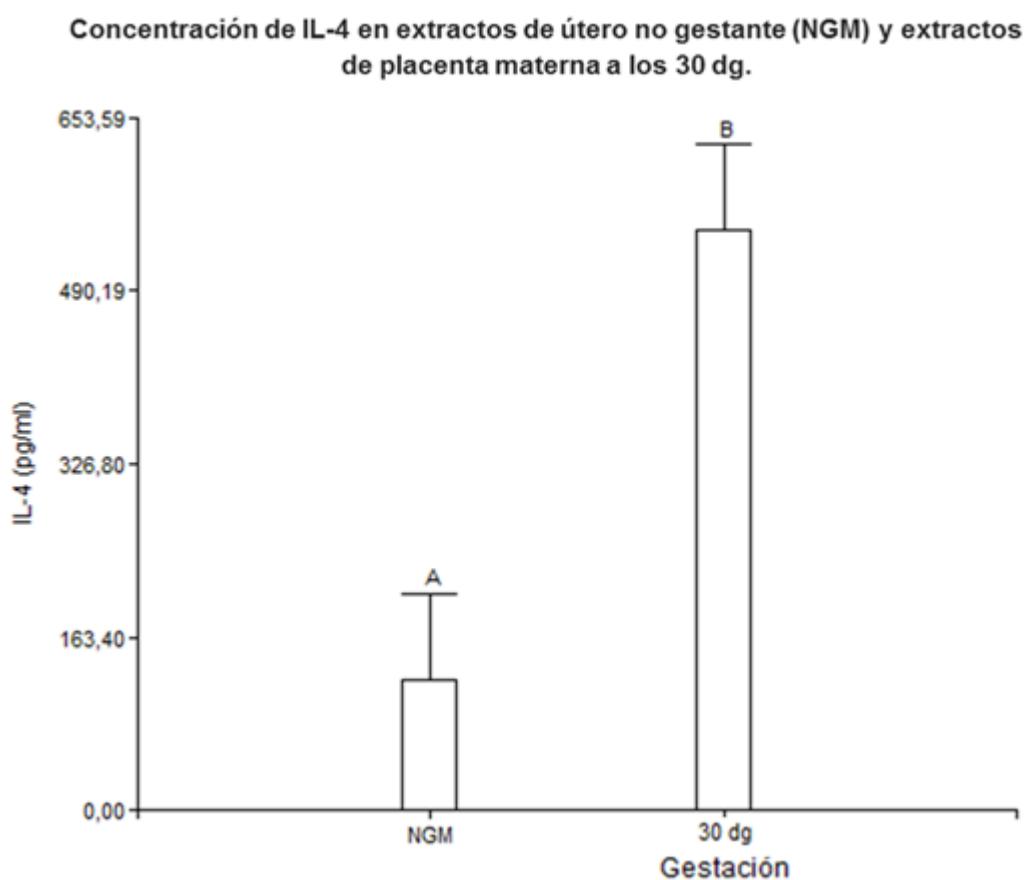


Figura 73: Concentración de IL-4 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM a los 30dg. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de IL-4 en Homogenatos de Placenta Fetal

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las concentraciones de IL-4 en extractos de placenta fetal en diferentes períodos de gestación. Se observó un aumento significativo a los 70 dg (5260,5pg/ml). Los niveles de IL-4 disminuyeron significativamente a los 60 dg (969 pg/ml) y en el período a término (114 dg; 803 pg/ml) ($p=<0,0001$; Figura 74; Tabla 13b, Anexo).

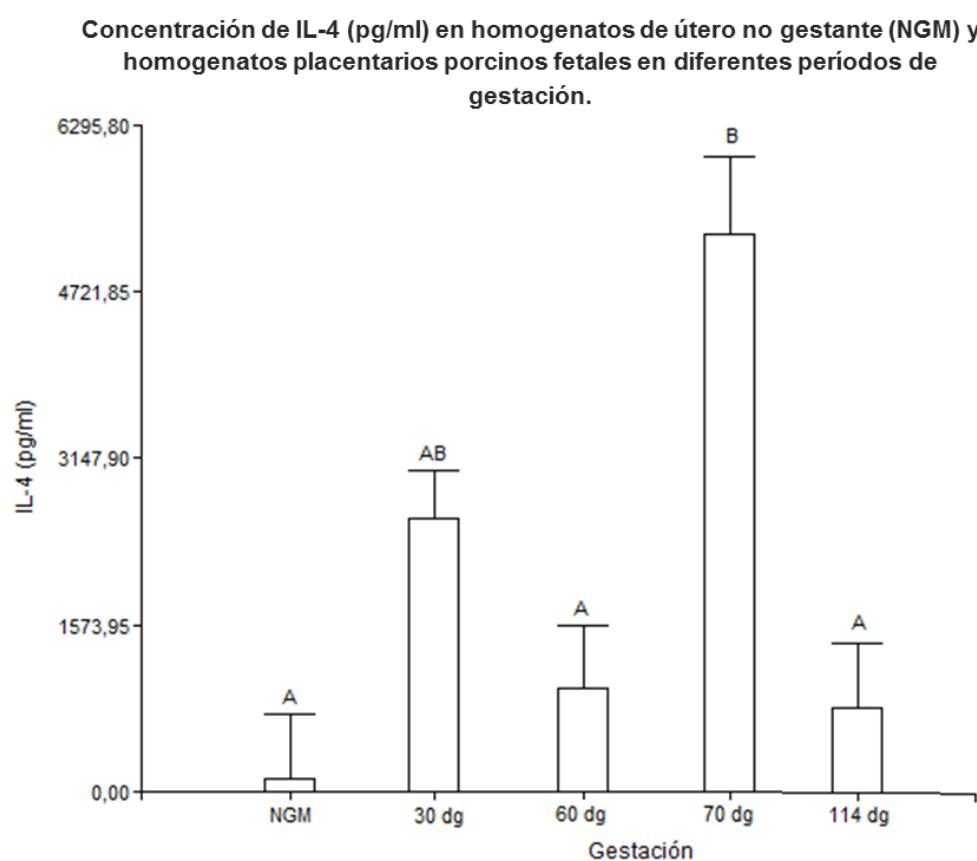


Figura 74: Concentración de IL-4 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPF en función de los diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de Interleuquina 10 (IL-10)

Se determinó la presencia de IL-10 en sueros, en homogenatos de úteros de cerdas no gestantes (NGM) y en homogenatos de extractos placentarios maternos (HoPM) y fetales (HoPF) de los distintos períodos gestacionales seleccionados.

Determinación de IL-10 en suero

Se compararon los valores de IL-10 en suero entre cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS). Se observaron diferencias significativas entre los valores de ambos estadios (0,3 vs. 8,01; $p= 0,0006$) (Figura 75; Tabla 14a, Anexo).

Concentración de IL-10 (pg/ml) en suero de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS).

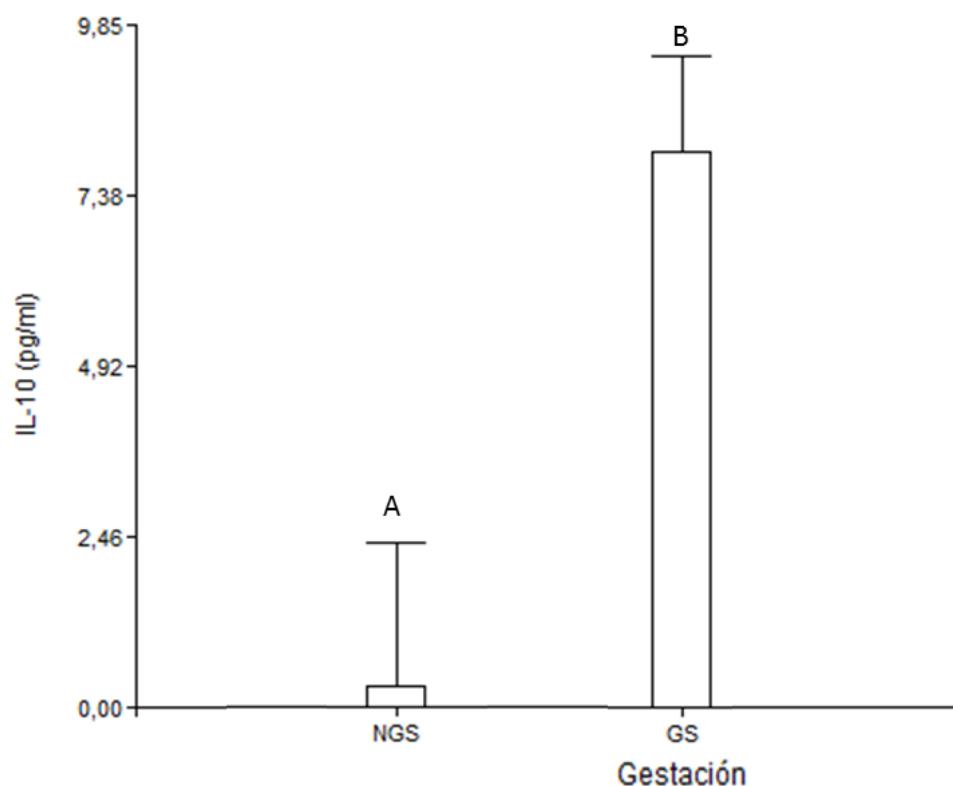


Figura 75: Concentración de IL-10 (pg/ml) en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Se realizó un análisis de la varianza y un test de Tukey de las concentraciones de IL-10 en muestras de suero de cerdas no gestantes y gestantes en los diferentes períodos de gestación (Tabla 14b, Anexo). La concentración sérica de IL-10 fue significativamente más elevada a los 60 (15,53 pg/ml) y 114 dg (19,44 pg/ml), comparada con suero de cerdas no gestantes (0,3 pg/ml) y cerdas que cursaban los otros períodos de gestación ($p<0,0001$) (Figura 76).

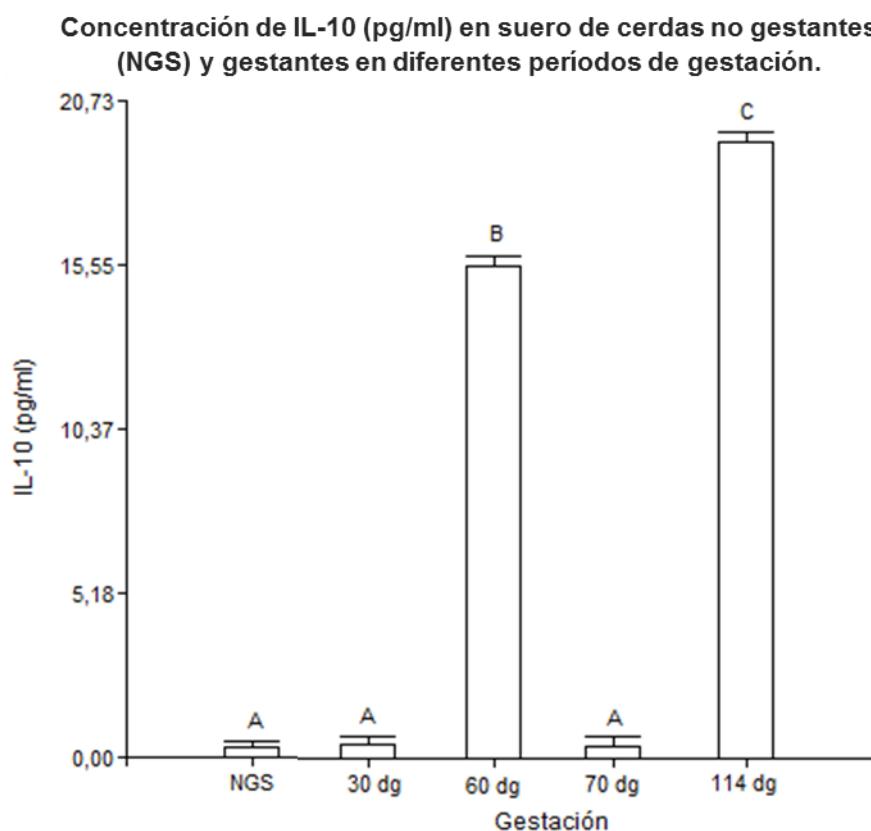


Figura 76: Concentración sérica de IL-10 (pg/ml) entre cerdas no gestantes (NGS) y diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de IL-10 en Homogenatos de Placenta Materna

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las concentraciones de IL-10 en extractos de útero no gestante (NGM) y placenta materna (HoPM). No se hallaron diferencias significativas en los valores de IL-10 tisulares comparando cerdas no gestantes con cerdas gestantes tomando la gestación en conjunto (0,22 vs. 0,29 pg/ml, respectivamente; $p=0,4311$) (Figura 77; Tabla 14b, Anexo).

Concentración de IL-10 en extractos de útero no gestante (NGM) y extractos de placenta materna (HoPM)

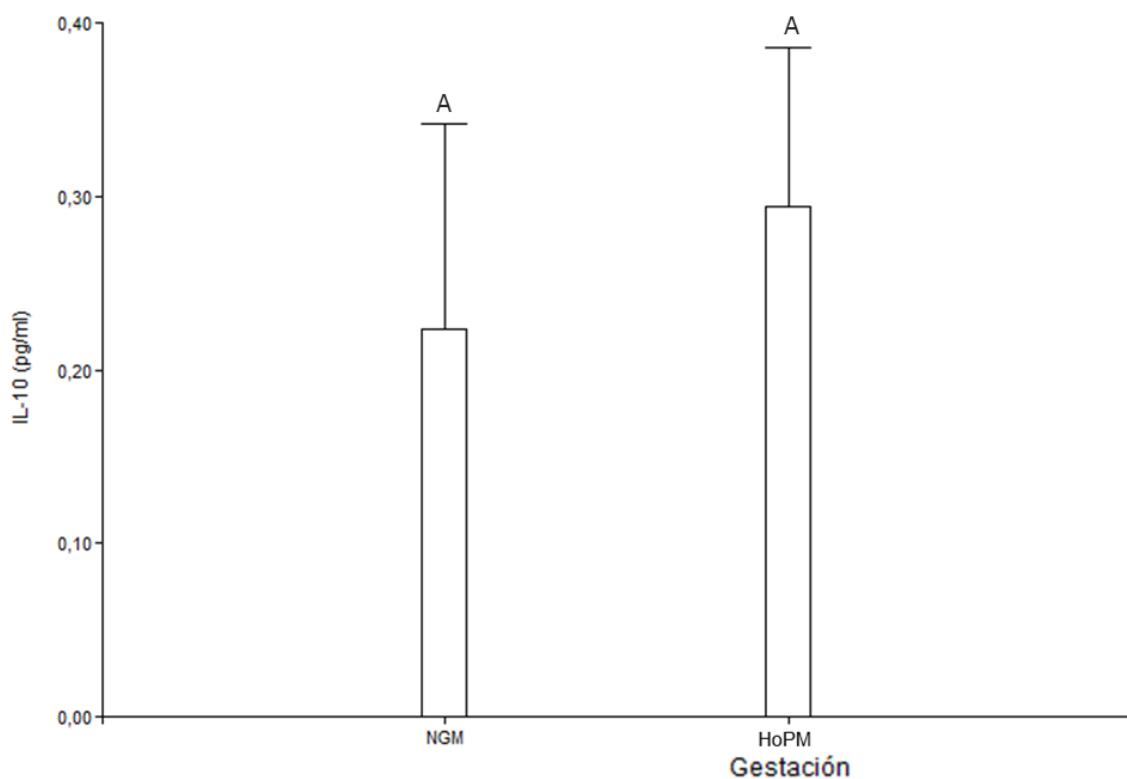


Figura 77: Concentración de IL-10 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM tomando la gestación en conjunto. Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Se realizó un análisis de varianza entre las medias de las concentraciones de IL-10 en extractos de útero no gestante (NGM) y placenta materna (HoPM) en diferentes períodos de gestación. La concentración local endometrial de IL-10 fue similar entre las cerdas no gestantes (0,22 pg/ml) y las cerdas que cursaban los diferentes períodos de gestación estudiados ($p=0,9$) (Figura 78; Tabla 14b, Anexo).

Concentración de IL-10 (pg/ml) en homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos de placenta materna de cerdas en diferentes períodos de gestación.

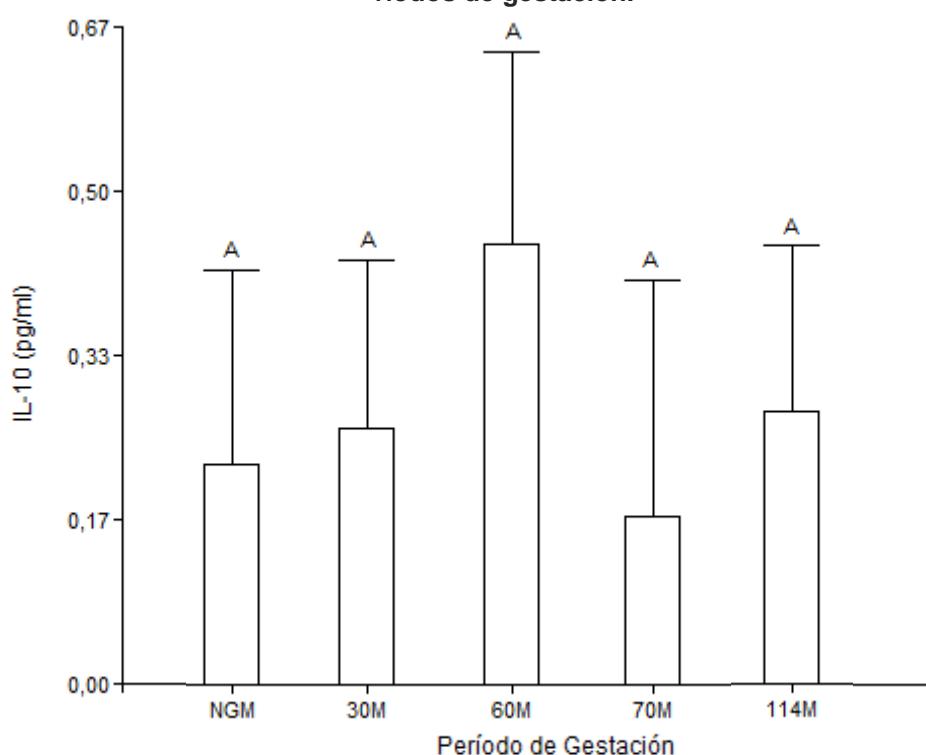


Figura 78: Concentración de IL-10 (pg/ml) en muestras de útero no gestante (NGM) y HoPM de los períodos gestacionales seleccionados (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

Determinación de IL-10 en Homogenatos de Placenta Fetal

Se realizó un análisis de varianza y un test de Tukey con los valores de IL-10 en extractos de placenta fetal. No se observaron diferencias significativas en la concentración de IL-10 en HoPF entre los distintos períodos gestacionales estudiados (30 dg: 0,5 pg/ml; 60 dg: 0,33 pg/ml; 70 dg: 0,34 pg/ml y 114 dg: 0,51 pg/ml; $p= 0,68$; Figura 79; Tabla 14b, Anexo).

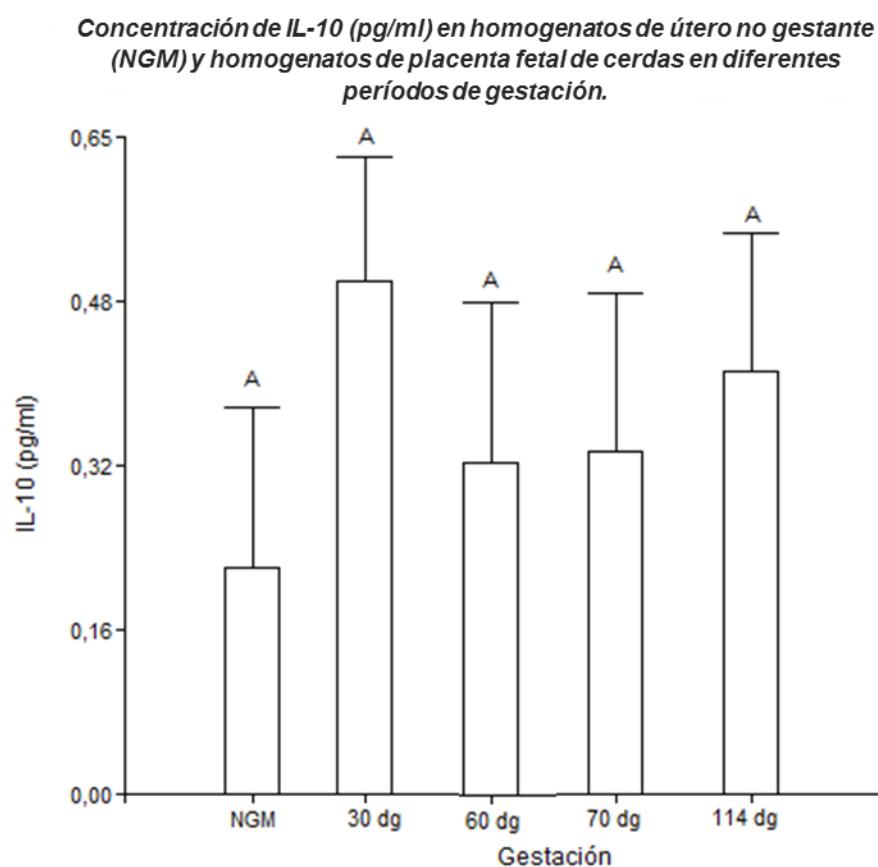


Figura 79: Concentración de IL-10 (pg/ml) en muestras de HoPF en los diferentes períodos gestacionales (30 dg, 60 dg, 70 dg, 114 dg). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p<0,05$).

DISCUSIÓN

Son numerosos los estudios realizados durante la gestación en distintas especies, a fin de comprender los mecanismos celulares y moleculares que permiten en la hembra gestante la aceptación, nutrición, desarrollo y sostén de un individuo genéticamente diferente, y de ese modo llevar a cabo el éxito de la gestación.

Este trabajo de tesis se realizó con el fin de aportar conocimientos acerca de la fisiología molecular reproductiva en la especie porcina. Pocos estudios evalúan la eficiencia placentaria a través de diferentes parámetros reproductivos, tales como la expresión de las integrinas y sus ligandos en la interfase placentaria y la concentración de interleuquinas placentarias y sistémicas durante el desarrollo de la gestación porcina.

Aún no se conocen indicadores que permitan diagnosticar a tiempo una futura posible reabsorción o pérdida embrionaria/fetal, y así poder proporcionar un tratamiento adecuado para generar un medio ambiente uterino favorable y aumentar la tasa de sobrevida prenatal en esta especie.

Para que la gestación progrese, es necesario que se establezca una interacción entre el *conceptus* y el endometrio, que involucra, entre otras moléculas, a las integrinas y sus ligandos, que serían responsables del reconocimiento y anclaje de los epitelios materno y fetal en la interfase placentaria porcina (Williamson y Koncurat, 2009; Vélez y col., 2014).

Pacheco (1999), define a las células citotrofoblásticas humanas (CTB) como invasivas, a través de la expresión de ciertas integrinas en su membrana ($\alpha 6\beta 4$), luego, el CTB localizado más profundamente en el endometrio decidualizado pierde su capacidad de expresar integrina

$\alpha 6\beta 4$, pero expresa la integrina $\alpha 5\beta 1$, generando que la célula secrete fibronectina, para adherirse y anclarse finalmente en el endometrio. Nuestro trabajo, realizado en una especie con una placenta muy diferente, apoya esta teoría ya que hemos hallado en el trofoblasto de la especie porcina la expresión de las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ durante la gestación media y tardía. Por su parte, Rashev *y col.* (2005), proponen que tanto la presencia de estas integrinas como la de FN en la interfase feto-materna porcina temprana, detendrían la invasión del trofoblasto al endometrio generando la placenta de tipo epiteliocorial. De acuerdo con Damsky *y col.* (1994), este mecanismo de *switch* en la expresión de integrinas y ligandos que lleva a la adhesión de los tejidos a fin de evitar la invasión, sugiere que está en gran medida bajo el control autocrino, con el endometrio desempeñando un papel modulador; debido a que estudios *in vitro* demostraron que cuando el trofoblasto porcino se cultiva en tejido renal tiene un comportamiento invasivo (Perry y Rowlands, 1962).

No se hallaron trabajos que describan la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en la interfase placentaria durante la gestación porcina luego del período de implantación. En nuestro laboratorio Williamson y Koncurat (2009) determinaron, de un modo semicuantitativo, la presencia de esta molécula en la placenta porcina, en distintos períodos de gestación. En el presente trabajo también se calculó su expresión de un modo cuantitativo, determinando la densidad óptica de la inmunotinción y el porcentaje de área inmunomarcada. A diferencia de lo hallado por Williamson (2011), la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ se encontró elevada a los 30dg, tanto en su intensidad (reconocida por la DO), como en su extensión (evaluada por el %AIM), especialmente en el trofoblasto. Sin embargo, a los 60 dg la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ se elevó aún más, tanto en intensidad como en extensión, y se halló especialmente en el epitelio luminal endometrial. Es sólo hacia el final de la gestación, a partir de los 70 dg, que la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ disminuyó significativamente. La discordancia entre nuestros

hallazgos y los resultados previos se debería a que en la presente tesis hemos trabajado con anticuerpos monoclonales específicos de especie, mientras que los trabajos anteriormente publicados determinaron la integrina con anticuerpos humanos. Esta integrina se halla presente en las interacciones materno-embriónarias tempranas en numerosas especies: coneja (Illera *y col.*, 2003), ratón (Lessey y Arnold, 1998), mono Rhesus (Qin *y col.*, 2003), ovinos (Wan *y col.*, 2011) y caprinos (García *y col.*, 2004), lo que sugeriría su rol en la placentación de especies de mamíferos euterios filogenéticamente muy distintas y con variados tipos de placentación.

La integrina $\alpha 5\beta 1$ es un receptor promiscuo, tanto de fibronectina, fibrinógeno e invasina como de colágeno, de ahí su participación en la formación de la arquitectura tisular, la vasculogénesis y la angiogénesis (Francis *y col.*, 2002; Jimenez-Marin, 2002). En la gestación porcina Rashev *y col* (2005), hallaron esta integrina en la interfase feto-materna hasta el día 35 dg, con una fuerte expresión en los epitelios que conforman la interfase. Coincidente con ese estudio, en la presente tesis hemos hallado que la integrina $\alpha 5\beta 1$ se expresó con mayor intensidad en la interfase placentaria, a los 30 dg; tanto en placenta materna como en la fetal, siendo más intensa en trofoblasto. No se han encontrado estudios de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la IFM durante la gestación porcina en los períodos posteriores a la implantación. En la presente tesis, se observó que, la integrina $\alpha 5\beta 1$ disminuyó, tanto en su intensidad de expresión como en su extensión, en los epitelios que conforman la interfase, a partir de los 60 dg hasta el período a término. Probablemente se deba a que a partir de los 70 dg la placenta cesa su crecimiento para permitir el aumento de peso de los fetos (Wilson y Ford, 2001).

La fibronectina es considerada en la gestación humana y murina como una de las moléculas claves que participa en la decidualización, angiogénesis e implantación (Kayisli y *col.*, 2005; Kaloglu y Onarlioglu, 2010). En la especie porcina, se observó su expresión en la interfase feto-materna durante la gestación temprana hasta los 35 dg (Rashev y *col.*, 2005). En la presente tesis, encontramos que la expresión prosigue luego del período de implantación y se encuentra presente en la IFM, con predominio en el trofoblasto, a los 30 y 60 dg, disminuyendo significativamente a los 70 dg. Tanto la densidad óptica de la immunotinción a fibronectina, como el porcentaje de área inmunomarcada, fueron mayores a los 60 dg. Postulamos, al igual que Rashev y *col* (2005), que la fibronectina estaría formando parte de los eventos involucrados en la adhesión de los epitelios trofoblástico y endometrial, participando de la interdigitación de las vellosidades placentarias, y permitiendo, de este modo, la placenta epiteliocorial. Estos resultados apoyan los trabajos de Johansson y *col* (1997) y nos permite postular que ésta sería una molécula que, participa en la angiogénesis y vasculogénesis.

La laminina es el principal componente de la membrana basal durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario humano momento en que promueve la adhesión celular y la angiogénesis; también se la ha observado en las membranas basales de las vellosidades placentarias a término (Shan y *col.*, 2015). Estudios realizados en placenta humana y murina en gestación temprana (Church, 1997; Kayisli y *col.*, 2005; Kaloglu y Onarlioglu, 2010) demostraron que el rol principal de la laminina es el de adhesión de las células epiteliales a la lámina basal, ya que la encontraron ubicada en el estroma decidual y lámina basal de las

vellosidades placentarias, cordón umbilical, glándulas endometriales y vasos sanguíneos. En la presente tesis encontramos que la laminina se expresó en la interfase feto-materna porcina, a los 30, 60 y 114 dg de forma leve. Además, en concordancia con los resultados de los autores mencionados, se halló expresión fuerte en estroma endometrial, glándulas endometriales, vasos sanguíneos y membrana basal de las vellosidades placentarias tanto maternas como fetales. Postulamos que en la placentación porcina, la laminina se destaca por cumplir su rol en la angiogénesis y en la adhesión de las células epiteliales de las vellosidades a la lámina basal. Además participaría en la adhesión de los epitelios materno y fetal durante la formación y desarrollo de la interfase placentaria porcina a partir de los 30 dg.

Estudios realizados en humanos sugieren que el colágeno V tendría un rol en la implantación, migración y mantenimiento de la interfase durante la gestación, al regular el correcto desarrollo de la matriz extracelular de la decidua (Iwahashi *y col.*, 1996; 1998). Sin embargo, en nuestro trabajo observamos que el colágeno V se expresó levemente en la interfase feto-materna, pero se halló fuertemente expresado en la MEC, formando parte de las vellosidades en la placenta materna, y alrededor de los vasos en placenta fetal y materna (datos no mostrados), por lo que postulamos que en la especie porcina el colágeno V también cumple un rol en el mantenimiento de la MEC materna durante la gestación.

Mediante la determinación cuantitativa de las integrinas y sus ligandos, tanto en intensidad de expresión como en extensión, en los epitelios maternos y fetales, se observó que sólo dos de las moléculas estudiadas, la integrina $\alpha v\beta 3$ y la FN, tuvieron una fuerte expresión en dichas estructuras.

En trabajos anteriores postulamos que la integrina $\alpha v\beta 3$, receptor de osteopontina, vitronectina, fibronectina, entre otras moléculas, participaría en el desarrollo de la arquitectura de la interfase feto-materna (Williamson, 2011; Vélez y *col.*, 2014). Según Erikson y *col.* (2009), la osteopontina, uno de sus ligandos, es secretada por el endometrio porcino luego de la liberación de estrógenos como señal de reconocimiento de la preñez, y quedaría ubicada en la interfase uniéndose a la integrina $\alpha v\beta 3$, expresada por el endometrio, y a la integrina $\alpha v\beta 6$ expresada por el trofoblasto. Asimismo, estudios llevados a cabo también en placenta porcina por Sanchis y *col.* (2011) demostraron que la OPN se expresaba en endometrio en el periodo de implantación y hasta los 30 dg, luego se negativiza. En discordancia con estos estudios, en este trabajo, hemos hallado que la integrina $\alpha v\beta 3$ se encuentra fuertemente expresada en ambos epitelios de la interfase feto-materna porcina y lo mismo ocurre con otro de sus ligandos, la fibronectina; lo que nos lleva a postular que sería la FN el ligando que completa la unión con su receptor, la integrina $\alpha v\beta 3$, luego de los 30 dg cuando no habría OPN en la interfase.

Los estudios hallados sobre la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ y la FN durante la placentación temprana porcina ofrecen resultados controversiales. Tuo y Bazer (1996) halló una fuerte expresión en los epitelios de la interfase feto-materna y también en el epitelio glandular del endometrio, estos hallazgos fueron similares a los encontrados por Rashev y *col.* (2005) y Bowen y *col.* (1996) quienes estudiaron estas moléculas hasta los 15 dg, y sólo hallaron expresión de FN en el trofoblasto y de la integrina $\alpha v\beta 3$ en la interfase. En nuestro laboratorio, tanto la integrina $\alpha v\beta 3$ como la FN fueron detectadas a los 30 dg sólo en las células del trofoblasto y en las epiteliales luminales endometriales y no se observó inmunotinción en las células epiteliales glandulares en ningún estadio. Quizás la discrepancia con dichos autores se debe a que ellos trabajaron con anticuerpos de otra especie, además,

Bowen y col. (1996) realizaron la técnica de inmunofluorescencia indirecta, técnica que en el tejido porcino genera cierto error ya que la placenta porcina autofluorece (Keys y col., 1989; Williamson, 2011).

No se encontró documentación acerca de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ y FN en la interfase feto-materna durante el desarrollo posterior de la gestación porcina, y a pesar de la diferencia en algunos de los resultados, en general coincidimos con Tuo y Bazer (1996), Bowen y col. (1996) y Rashev y col. (2005) cuando postulan que la integrina $\alpha v\beta 3$ y la FN funcionarían como “moléculas puente” entre el epitelio endometrial luminal y el trofoblasto durante la gestación porcina, lo que permitiría a estos dos tejidos anclarse y mantenerse unidos para establecer una interfase exitosa, proceso que no sólo acontece durante estas etapas tempranas de la preñez, sino que se mantiene hasta los 60 dg. Según Singh y col. (2001) esta integrina participa en la angiogénesis de los *concepti*, lo que explicaría su presencia en la placenta porcina a los 30 y 60 dg. Además, se ha comprobado que genera supresión de la apoptosis, lo que coincide con los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio por Cristofolini (2010) que demostró que la mayor remodelación placentaria por apoptosis ocurre a los 70 dg. Coinciendo con esos resultados, nosotros hallamos a los 70 días de gestación una disminución notable en la expresión de la integrina y su ligando, tanto en trofoblasto como células epiteliales luminales del endometrio.

La presente tesis incluye, por primera vez, el análisis de la expresión de las integrinas y sus ligandos, durante diferentes etapas de la gestación porcina, en base a dos modos diferentes: semicuantitativo, calificando su expresión según la intensidad de la coloración marrón generada por el revelador utilizado; y de un modo cuantitativo, utilizando sobre las imágenes tomadas, un software que determinó tanto la intensidad de tinción (calculada por la DO) como la extensión de la expresión de dichas moléculas (calculada por el %AIM). Cabe destacar que

esta observación de los resultados de un modo cuantitativo, permitió el análisis estadístico de los resultados y se pudieron analizar las moléculas más objetivamente. Se pudo observar también, que si bien el modo semicuantitativo es subjetivo, hubo relación respecto al valor de la DO con las variables leve-moderado-fuerte. También tenemos que destacar que el análisis del patrón de expresión sería un método complementario al cuantitativo, ya que nos permite observar de qué modo se encuentran expresadas las moléculas. Más allá de la evaluación en intensidad y extensión fue importante el análisis cualitativo que permitió saber reconocer la localización y el patrón de la expresión, por ejemplo: en parches, en apical o en basal de las células.

Se sabe que la placenta es un órgano transitorio integrado por estructuras de origen fetal y materno, y que participan en su adhesión las integrinas y sus ligandos. Sin embargo, existen más moléculas involucradas en el mantenimiento de la arquitectura y placentación exitosa, ya que, particularmente el trofoblasto porcino se halla en íntimo contacto con el epitelio uterino, donde se encuentran los antígenos fetales en contacto con los tejidos maternos, lo que genera que durante la gestación, el sistema inmune materno sea regulado hacia un tipo de respuesta inmunosupresora, tipo Th2-Th3-Tr1 generando así la tolerancia materna (Barañoa, 2010). En concordancia con lo revisado por Barañoa (2010), en la presente tesis hemos hallado en el estudio de las citoquinas, tanto séricas como placentarias, un patrón proinflamatorio-antinflamatorio que seguiría el modelo postulado por Raghupathy (2001). Tampoco se han encontrado trabajos que expresen los niveles de IL-1 β , IL-2, IL-4 e IL-10 en distintas etapas de la gestación porcina.

Es conocido el rol de la IL-1 β en el período de implantación; específicamente en porcinos numerosos trabajos en dejan en claro su participación en el desarrollo del trofoblasto en la gestación temprana y en su comunicación con el endometrio, procesos necesarios para una correcta implantación (Ross y *col.*, 2003; Mathew, 2014). Sin embargo, pocos estudios analizan los niveles fisiológicos de la IL-1 β en cerdas durante el resto de la gestación. Con respecto a los niveles locales placentarios de la IL-1 β durante la gestación porcina; Tuo y *col.* (1996) hallaron expresión de ARNm en *conceptus* y placenta fetal, desde los 11 dg hasta los 45 dg, luego sus niveles bajaron significativamente. Sin embargo, en este trabajo de tesis, se encontró que la IL-1 β presentó un pico en su concentración en placenta fetal a los 60 dg y en placenta materna a los 70 dg; luego su concentración disminuyó a los 114 dg. El periodo comprendido entre los 60 y los 70 días es un momento de cambios importantes en la gestación porcina. A los 60 dg la placenta finaliza su crecimiento exponencial, con generación de vellosidades secundarias y terciarias, para poder sostener el peso de los fetos, que pronto comenzarán su etapa de crecimiento exponencial. Además entre los 60 dg y los 70 dg, se produce la etapa de mayor remodelación placentaria (Cristofolini, 2010). El pico de IL-1 β , tanto en placenta fetal a los 60 dg como en placenta materna a los 70 dg, sugiere que se necesitaría en la interfase feto-materna un ambiente de tipo proinflamatorio, para regular la apoptosis y la proliferación celular tan necesarias en este momento de la placentación porcina.

En humanos y bovinos, se ha demostrado que durante el parto normal o prematuro existe un aumento de citoquinas como IL-1 β , IL-2, TNF α , IFN γ , IL-8 e IL-12 en tejido cervical; hecho que favorecería la activación de macrófagos, neutrófilos y células NK. Estas citoquinas producirían un aumento de prostaglandinas que facilitarían las contracciones uterinas y de metaloproteasas que facilitarían el desgarro y dilatación cervical (Sennström y *col.*, 2000; Winkler y *col.*, 1999a, 1999b; Van Engelen y *col.*, 2009; Young y *col.*, 2002). Nosotros hemos

observado, en el presente trabajo, que los niveles séricos de IL-1 β permanecen basales durante la gestación pero que aumentan significativamente al final de la misma, probablemente, con el único objetivo de activar el sistema inmune pro-inflamatorio a fin de preparar la expulsión de las placentas en el parto. Estos resultados demuestran que, independientemente del tipo de placenta y de la invasividad del trofoblasto durante la gestación, para que se genere el parto en los mamíferos euterios, se genera un ambiente útero-placentario proinflamatorio al final de la gestación.

Considerando a la IL-2 una potente citoquina tipo Th1, estudios en ratones revelaron que la sobreexpresión de la IL-2, inhibe la viabilidad de la gestación (Tezabwala *y col.*, 1989). En placenta humana, la IL-2 no se detecta en los sitios de implantación (Verma, 2000), y las mujeres cuyas concepciones terminan en aborto tienen niveles séricos y endometriales de IL-2 significativamente más elevados (Marzi *y col.*, 1996; Lim *y col.*, 2000). También se demostró que las mujeres con concentraciones séricas elevadas de IL-2 durante el primer trimestre de la gestación posteriormente desarrollaron preeclampsia (Hamai *y col.*, 1997). No se han hallado trabajos acerca del comportamiento de esta citoquina en otras especies. A diferencia de lo encontrado en la especie humana, en placenta porcina fetal se generan dos picos de concentración de IL-2, uno menor, a los 30 dg y uno mayor a los 70 dg. Este hallazgo apoya la hipótesis de que a los 30 dg se debe generar un ambiente proinflamatorio local controlado en la interfase feto-materna, debido a la necesaria remodelación placentaria coincidente con un momento de gran desarrollo de sus vellosidades (Wooding y Burton, 2008) y con el inicio de la osificación embrionaria. Como ya postulamos en párrafos previos, a los 70 dg en placenta porcina también se necesitaría un ambiente proinflamatorio, controlado y local, que

permite la remodelación placentaria necesaria para el sostenimiento del posterior crecimiento exponencial de los fetos.

Con respecto a los niveles séricos y endometriales, contrariamente a lo que ocurre en la gestación humana y murina, se observó que durante la gestación porcina la concentración de IL-2 acompaña al patrón expresado por la placenta fetal, aunque con valores menores. Cabe destacar que en el período a término, las concentraciones locales y sistémicas se invierten, es decir que tanto en placenta materna como en la fetal, los valores disminuyen a niveles basales, mientras que en suero la IL-2 aumenta significativamente. En base a estos resultados se sugiere que los elevados niveles séricos de esta citoquina a los 114 dg serían necesarios para generar los eventos moleculares que desencadenan el parto y la expulsión de las placenas, tal como se ha observado en la revisión en humanos con respecto a la presencia de distintas citoquinas proinflamatorias en el momento del parto (revisado en Barañao 2010).

No hemos hallado trabajos que reporten la presencia de la IL-4 durante la gestación porcina. Las citoquinas asociadas a una respuesta Th2, como la IL-4, contribuyen a la implantación del embrión, desarrollo de la placenta y supervivencia del feto hasta el término de la gestación en humanos y murinos (Dealtry *y col.*, 2000). Se afirma que en la mayor parte de la gestación normal hay un predominio de las citoquinas Th2 sobre las Th1, a fin de crear cierto grado de inmunosupresión celular, que permita el desarrollo feto-placentario (Wegmann, 1993; revisado por Barañao, 2010). De acuerdo con lo propuesto por dichos autores, en porcinos, la IL-4 está presente en la interfase feto-materna durante la gestación. Sus niveles en placenta materna fueron bajos y constantes a lo largo de la preñez, pero en placenta fetal fueron elevados, especialmente a los 30 dg y 70 dg. Estudios en placenta

humana, plantean que la IL-4 podría ser necesaria durante la invasión trofoblástica (Omu y *col.*, 1999), ya que sólo se ha hallado una débil expresión de IL-4 en el trofoblasto durante el primer trimestre y sus niveles son prácticamente indetectables a término (Hanna y *col.*, 2000).

Si bien no hemos determinado los niveles placentarios de IL-4 en el periodo de implantación porcina, en la presente tesis, encontramos que tanto a los 30 dg como a los 70 dg en placenta fetal, la presencia de IL-4 sería necesaria, ya que sus niveles fueron elevados; y en el período a término disminuyeron significativamente, esta última observación estaría relacionada con el ya mencionado cambio hacia una respuesta proinflamatoria que ocurre alrededor del momento del parto. También en concordancia con lo observado por Hanna y *col.* (2000) en placenta materna humana; en placenta materna porcina tampoco se detectaron niveles de IL-4. Lo que indicaría que la placenta fetal sería la fuente principal de la IL-4 hallada en la placenta durante la gestación.

Los resultados encontrados por distintos autores sobre la concentración de esta interleuquina en sangre periférica son variables. Hanna y *col.*, (2000) hallaron que las concentraciones séricas de IL-4 durante la gestación, fueron equivalentes a los de la mujer no gestante. Contrariamente a ese resultado, Molina Vilchez y *col.* (2000) hallaron que la IL-4 se elevó en el suero de mujeres con embarazo normal durante el segundo y tercer trimestre. Nuestros resultados en porcino también muestran incrementos de los niveles séricos de IL-4 durante la preñez que en este caso acompañaron el patrón generado por la placenta fetal, haciendo picos en su concentración a los 30 y 70 dg.

Cabe destacar, que al igual que ocurría con la IL-2 en el período a término, la concentración de IL-4 en placenta y en suero se invirtió, es decir, disminuyó a niveles basales en placenta y se elevó significativamente en suero. Se sabe que la IL-4 es un potente inhibidor de los linfocitos Th1, ya que impide la liberación de citocinas proinflamatorias por los

monocitos activados, y es reguladora de los linfocitos CD8 citotóxicos (Molina Vilchez y *col.*, 2000). Con base a los resultados analizados en este trabajo respecto a la IL-4, sugerimos que esta citoquina tiene que estar presente en la IFM, a fin de regular el ambiente proinflamatorio instalado por las citoquinas anteriormente analizadas, en los períodos de mayor remodelaje placentario. Su presencia elevada en suero a término, también sería necesaria para regular la respuesta inmunológica de tipo Th1 al momento del parto, tal como lo planteado por Molina Vilchez y *col.* (2000) en su investigación con mujeres gestantes.

No hemos encontrado estudios que evalúen la presencia y el rol de la IL-10 durante el transcurso de la gestación porcina. La IL-10, ha sido ampliamente estudiada en humanos y ratón (Rinehart y *col.*, 1999; Barrera y *col.*, 2007; Makris y *col.*, 2006; Kalkunte y *col.*, 2011), determinando su rol en la gestación y su importancia dentro los mecanismos moleculares que interviene en la regulación de la inmunotolerancia embrionaria. Se sabe que en las especies humana y murina juega un papel vital en el mantenimiento del equilibrio de la respuesta inmune antiinflamatoria y pro-inflamatoria en la interfase feto-materna (Rinehart y *col.*, 1999), pudiendo reestablecer la inmunotolerancia en una gestación bajo un ambiente proinflamatorio (Jensen y *col.*, 2013), y se demostró que puede atenuar experimentalmente la restricción del crecimiento fetal y la posterior muerte (Rivera y *col.*, 1998). A diferencia de lo hallado en placenta humana, en que se encontraron elevadas concentraciones de IL10 durante la gestación (Hanna y *col.*, 2000), en placenta porcina, tanto materna como fetal, los niveles de esta citoquina fueron casi indetectables. Sin embargo, en suero se hallaron dos picos significativos en su concentración, a los 60 dg y a los 114 dg. Apoyando la teoría planteada por Jensen y *col.* (2013) en su trabajo con ratones, la elevada concentración sérica de IL-10 hallada en la especie porcina a los 60 dg, en comparación a los valores dosados en tejido

placentario, probablemente se explica en su rol regulador del accionar de las células del sistema inmune innato y adquirido materno a fin de proteger el aloinjerto fetal; como así también proteger a la madre a nivel sistémico del perfil proinflamatorio local que se generará entre los 60 y 70 dg.

En coincidencia con lo encontrado por Makris *y col* (2006), quienes en humanos no hallaron relación entre los niveles placentarios de IL-10 y los séricos; nosotros tampoco vimos relación entre ambas concentraciones; esto parece demostrar que la placenta no sería la fuente principal de la IL-10 circulante.

Las distintas citoquinas se producen en diferente cuantía según el momento de la gestación en el que las analicemos. En porcinos, al igual que se encontró en humanos (Hanna *y col.*, 2000) hallamos que tanto las citoquinas pro como las antinflamatorias son expresadas tanto en sangre periférica materna como en placenta; por lo que no parece que, como se pensaba anteriormente, el sistema inmune materno esté comprometido durante el embarazo. Así, en nuestro laboratorio, Williamson (2011) demostró altos niveles de INF- γ , IL-6, IL-12 e IL-15 a los 32 dg en placenta fetal porcina. Coincidiendo, y a la vez complementando el trabajo de Williamson, hallamos que las IL-1b, IL-2 e IL-4 se elevaron a los 30 dg en la interfase placentaria. También observamos que la concentración de estas moléculas se elevó en el tejido a los 60 y 70 dg y disminuyeron significativamente a término; período en el cual aumentaron significativamente en suero. A los 60-70 dg se producen profundos cambios estructurales placentarios que permiten el crecimiento exponencial de los fetos (Cristofolini, 2010), por lo que estas citoquinas serían necesarias durante esta etapa en la interfase, para favorecer los mecanismos moleculares y celulares que permiten la remodelación placentaria.

La IL-10, citoquina inmunomoduladora, se elevó significativamente en suero a los 60 dg y a término (114 dg), etapas en la gestación porcina donde predomina un perfil inmunológico proinflamatorio.

Cabe destacar que, con base a los resultados obtenidos en este trabajo, hallamos relación entre el sistema inmunológico y el patrón de expresión de la integrina $\alpha\beta3$ y su ligando, la fibronectina en la interfase feto-materna.

En una gestación exitosa, los 30 dg es una etapa en que la placenta se encuentra en pleno desarrollo de sus vellosidades y es considerada como el inicio de la osificación y del desarrollo del sistema inmunológico fetal (Butler y *col.*, 2009). Por otro lado, a los 60 dg se alcanza el mayor crecimiento placentario y desarrollo de las vellosidades placentarias secundarias y terciarias (Wooding y Burton, 2008). A partir de ese momento, son los fetos los que comienzan a crecer de manera exponencial con respecto al desarrollo de la placenta. En nuestro laboratorio, estudiando apoptosis, hemos podido demostrar que las mayores remodelaciones celulares placentarias se presentan hacia el día 70 de gestación (Cristofolini, 2010). Así, la integrina $\alpha\beta3$ y la fibronectina, estudiadas en este trabajo de tesis muestran, en general, un patrón de expresión que acompaña a dichas etapas cruciales en la gestación porcina, presentando una expresión fuerte en la interfase feto-materna, a los 30 y 60 dg; este resultado sugiere que estas moléculas estarían involucradas en la adhesión de la interfase feto-materna hasta ese período. La disminución de su expresión a los 70 dg, coincide con el momento en la gestación porcina donde ocurre la mayor tasa de apoptosis y proliferación celular a modo de reestructuración placentaria. Para que ocurra apoptosis deben romperse las uniones entre las células y entre éstas y la matriz (entre ellas los contactos focales, desmosomas, hemidesmosomas, etc), lo que requiere la disminución de las moléculas de adhesión (Alberts y *col.*, 2016).

En trabajos realizados en nuestro laboratorio (Vélez y col, 2017), en cuanto al comportamiento de la integrina $\alpha v\beta 3$ y la FN respecto a las hormonas de la gestación, hemos hallado que durante la gestación porcina, a los 60 dg se mantiene una fuerte expresión de la integrina y su ligando en la interfase placentaria, esto coincide con la baja concentración sérica y tisular de E2 y los altos niveles de P4. A partir de los 70 dg hasta los 114 dg el aumento significativo de E2 y la disminución de P4, coincidió con la disminución en la expresión de $\alpha v\beta 3$ y FN tanto en células del epitelio luminal endometrial como en el trofoblasto. Asimismo a partir de los 70 dg el aumento significativo de E2 sérico y en extractos placentarios se relacionó con la disminución de expresión de $\alpha v\beta 3$ y de FN tanto en el endometrio como en el trofoblasto. En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, postulamos que los elevados niveles de P4 encontrados previamente en el transcurso de la gestación porcina, regularían la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ y la FN en la interfase placentaria, permitiendo que ambas estructuras se mantengan unidas hasta los 70 dg, por estas moléculas. Se postula que al final de la preñez, la saturación de E2 inhibiría la expresión de la integrina y su ligando en el epitelio endometrial a fin de preparar la expulsión de las placas.

Con respecto a la IL-1 β no solo estaría presente en la interfase placentaria porcina por su comportamiento proinflamatorio a los 30 dg, sino que estaría participando en su rol de regulador de las moléculas de adhesión, tal como lo describe Mathew (2014). En esta etapa es donde se observa la mayor densidad óptica tanto de la integrina $\alpha v\beta 3$, como de su ligando, la fibronectina; este resultado sugiere que éstas serían fundamentales para el sostenimiento de la estructura placentaria y necesitarían a la IL-1 β como regulador de la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$, y de la FN, así como también serían reguladas por la P4 (Vélez y col. 2017).

Además, encontramos que a los 60 dg la IL-1 β presenta un pico de concentración en la placenta al igual que ocurre con la integrina $\alpha\beta 3$, lo que nos permite postular que la elevada expresión de $\alpha\beta 3$ a los 60 dg también estaría regulada por la IL-1 β . Por otra parte, Yaful (2009) demostró que la placenta fetal es una fuente de progesterona durante este período gestacional, por lo que proponemos, al menos, una doble dependencia de la integrina $\alpha\beta 3$ y la FN, tanto de la IL-1 β como de la progesterona, también en este período de gestación. La fuerte presencia de IL-2 y 4 en placenta fetal a los 70 dg, regularía negativamente a estas moléculas de adhesión, ya que predomina un ambiente pro-apoptótico.

Es necesario continuar con los estudios de las moléculas de adhesión y sus ligandos que participen en la construcción de la interfase feto-materna no invasiva de la especie porcina, ya que hemos encontrado etapas en donde las moléculas estudiadas en este trabajo de tesis no están presentes, y serían otras moléculas las que tomen el rol fundamental de adhesión de ambos epitelios. También cabe destacar que sería necesario seguir investigando su regulación, con el objetivo final de poder crear estrategias que permitan reestablecer el balance inmunológico en cerdas con tasa de reabsorción embrionaria temprana o pérdida fetal muy elevada, producto de una incompleta tolerancia inmunológica, tal como lo postularon Jensen y *col.* (2013) en ratones.

Conclusiones

Dentro de las integrinas y ligandos estudiadas en esta tesis, sólo la integrina $\alpha v\beta 3$ y la fibronectina presentaron una expresión fuerte en la interfase feto-materna.

La integrina $\alpha 5\beta 1$, la laminina y el colágeno tipo V, se expresaron mayormente en la matriz extracelular del endometrio, la membrana basal, alrededor de los vasos y en el tejido conectivo que conforma la vellosidades, por lo que postulamos que estas moléculas estarían cumpliendo un rol crucial en el desarrollo y mantenimiento de la arquitectura placentaria y angiogénesis.

La integrina $\alpha v\beta 3$ y su ligando, la fibronectina, estarían involucrados en los mecanismos moleculares que participan en la adhesión y fijación de los epitelios que conforman la interfase feto materna en la gestación porcina, hasta los 60 dg.

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

En la especie porcina, la IL-2 parecería cumplir un rol fundamental durante la gestación; ya que se observó que en placenta fetal hubo niveles elevados de esta citoquina proinflamatoria.

Las IL-2 e IL-4 se hallan presentes en la placenta fetal principalmente a los 70 dg, período en el cual se produce la mayor remodelación placentaria; y en suero a término, probablemente para intervenir en la expulsión de las placenas durante el parto.

La elevada concentración de IL-2 e IL-4 en placenta fetal a los 70 dg, sugiere que estas moléculas estarían siendo sintetizadas de novo por parte del trofoblasto durante la apoptosis.

La presencia sistémica de la IL-10 permitiría la regulación de la respuesta inmune durante la gestación porcina.

Este trabajo muestra algunas de las relaciones entre las moléculas de adhesión y las citoquinas durante la gestación porcina. Se necesitan más estudios que analicen otras sustancias, para comprender mejor, en la especie porcina, cuáles son las moléculas de adhesión y sus ligandos que están involucradas, de qué manera participan en el mantenimiento de la interfase placentaria en la etapa de gestación tardía y quien las regula.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK. Inmunología celular y molecular. España. Ed McGraw-Hill. 1995. 540 p.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts KWP. Biología molecular de la célula. España. 6ta edición. Ed Omega. 2016.
3. Alonso Pesado F, Rodríguez de Jesús E. La Carne de Cerdo en el Mundo y las Importaciones y Exportaciones del Producto por México. Los Porcicultores y su entorno. 2016;18(110):64–74. [online] <http://bmeditores.mx/carne-cerdo-en-mundo-las-importaciones-exportaciones-del-producto-por-mexico/>
4. Amoroso, E.C. Placentation. In: Parkes, A.S., Ed., Marshall's Physiology of Reproduction, Longmans Green, London. 1952. p. 127–311.
5. Anderson LL. Growth, protein content and distribution of early pig embryos. The Anat Rec. 1978;190(1):143–153.
6. Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. Reprod Biol Endocrinol. 2004;2(1):48.
7. Aplin JD, Spanswick C, Behzad F, Kimber SJ, Vićovac L. Integrins beta 5, beta 3 and alpha v are apically distributed in endometrial epithelium. Mol Hum Reprod. 1996;2(7):527–534.
8. Aplin JD, Meseguer M, Simón C, Ortíz ME, Croxatto HJC. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. Biochem Soc Trans. 2001;29(2):153–6.
9. Arenas LAS, Zurbarán CB. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. Salud Uninorte. 2002;16:9–18.
10. Armant DR, Kaplan HA, Mover H, Lennarz WJ. The effect of hexapeptides on attachment and outgrowth of mouse blastocysts cultured in vitro: evidence for the involvement

- of the cell recognition tripeptide Arg-Gly-Asp. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(18):6751–6755.
11. Ashworth MD, Ross JW, Stein DR, White FJ, Desilva UW, Geisert RD. Endometrial caspase 1 and interleukin-18 expression during the estrous cycle and peri-implantation period of porcine pregnancy and response to early exogenous estrogen administration. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:33.
 12. Barañao RI, Piazza A, Rumi LS, Polak de Fried E. Determination of IL-1 and IL-6 levels in human embryo culture-conditioned media. *Am J Reprod Immunol.* 1997;37(2):191–194.
 13. Barañao RI. Inmunología de la gestación. *Reproducción.* 2010;25:168–184.
 14. Barrera D, Avila E, Díaz L. Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo. *Rev Investig Clin.* 2007;59(2):139–145.
 15. Bazer F, Burghardt R, Johnson G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Biol Reprod.* 2008;8(3):179-211.
 16. Bazer FW, Johnson GA. Pig blastocyst–uterine interactions. *Differentiation.* 2014;87:52–65.
 17. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction.* 2009a;138(2):195–209.
 18. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA. Interferons and uterine receptivity. *Seminars in reproductive medicine.* *Semin Reprod Med* 2009b;27(1):90-102.
 19. 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(2):397–400.

20. Bosch RA, Alanis GA, Allende RA, Blanch MS, Bosch P, Callejas S. Mortalidad embrionaria basal en las especies domésticas de interés productivo. En: Actualización en temas de reproducción animal. 1ra Edición. Compilador, Bosch RA. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto. 2001; 150-152.
21. Botella Llusiá J. Integrins and reproduction. *An R Acad Nac Med.* 2001;118(1):173-185.
22. Bowen J, Bazer F, Burghardt R. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vivo. *Biol Reprod.* 1996;55:1098-1106.
23. Bowen J, Burghardt R. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Semin Cell Dev Biol.* 2000;11:93-104.
24. Bowen J, Hunt J. The role of integrins in reproduction. *Pro Soc Exp Biol Med.* 2000;223:331-343.
25. Brunori J. Producción de cerdos en Argentina. EEA Marcos Juárez. 2013. [online] <http://inta.gob.ar/documentos/produccion-de-cerdos-en-argentina-situacion-oportunidades-desafios>.
26. Burghardt R, Johnson G, Jaeger L. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells, Tissues, Organs* 2002;172(3):202-217.
27. Busellini L. Informes de cadenas de valor: Cárnia-Porcina. Minist Hacienda y Finanz Pùblicas. 2016;9(1):1-35.
28. Butler JE, Lager KM, Splichal I, Francis D, Kacskovics I, Sinkora M, Wertza N, Sunf J, Zhaog Y, Brownh WR, DeWaldi R, Dierksh S, Muyldermansj S, Lunneyk JK, McCrayl PB, Rogersm CS, Welshm MJ, Navarron P, Klobasao F, Habe F, Ramsoondar J. The piglet

- as a model for B cell and immune system development. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128(1–3):147–170.
29. Charpin C, Kopp F, Pourreau-Schneider N, Lissitzky JC, Lavauta MN, Martin PM, Toga M. Laminin distribution in human decidua and immature placenta: An immunoelectron microscopic study (Avidin-biotin-peroxidase complex method). *Am J Obstet Gynecol.* 1985;151(6):822–826.
30. Choi I, Collante WR, Simmen RC, Simmen FA. A development switch in expression from blastocyst to endometrial placental type cytochrome P450 aromatase genes in the pig and horse. *Biol Reprod* 1997;56:688-696.
31. Church HJ, Richards AJ, Aplin JD. Laminins in decidua, placenta and choriocarcinoma cells. *Placenta.* 1997;18:143–162.
32. Clark D. Signaling at the Fetomaternal Interface. *Am J Reprod Immunol.* 1999;41:169–173.
33. Cohan L. El potencial de desarrollo de Clusters Porcinos en la Argentina. Universo Porcino, el portal del cerdo. 2008. [online] http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/actualidad_porcina_el_potencial_de_desarrollo_de_clusters_porcinos_en_la_argentina.html
34. Conrad M, Freitag N, Diessler M, Hernandez R, Barrientos G, Rose M, Casas L, Barbeito C, Blois S. Differential spatiotemporal patterns of galectin expression are a hallmark of endotheliochorial placentation. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75:317–325.
35. Cristofolini A. Estudio de la Remodelación Celular Durante la Placentación Porcina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. 2010.

36. Croy BA, Wessels J, Linton N, Tayade C. Comparison of immune cell recruitment and function in endometrium during development of epitheliochorial (pig) and hemochorial (mouse and human) placentas. *Placenta*. 2009;30:26-31.
37. Croy BA, Waterfield A, Wood W, King GJ. Normal murine and porcine embryos recruit NK cells to the uterus. *Cell Immunol*. 1988;115(2):471-480.
38. Damsky C, Fitzgerald ML, Fisher S. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, *in vivo*. *J. Clin. Invest*. 1992;89, 210-222.
39. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*. 1994;120(12):3657-3666.
40. Dantzer V. Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat Embryol*. 1985;172(3):281-293.
41. De los santos J, De los santos M, Remohí J, Pellicer A, Serra V. Mecanismos inmuno-lógicos de la gestación. *Rev Iberoamer Fertil*. 2005;22:213-223.
42. Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N. The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123(2):107-119.
43. Dilillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:38-57.
44. Dinarello C, Arend W, Sims J, Smith D. IL-1 family nomenclature. *Nature*. 2010;11(11):973.
45. Edwards A, Wessels J, Kerr A, Tayade C. An overview of molecular and cellular mechanisms associated with porcine pregnancy success or failure. *Reprod Domest Anim*. 2012;47(4):394-401.

46. Engelhardt H, Croy BA, King GJ. Role of uterine immune cells in early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil.* 1997;52:115–131.
47. Engelhardt H, Croy BA, King GJ. Conceptus influences the distribution of uterine leukocytes during early porcine pregnancy. *Biol Reprod.* 2002;66(6):1875–1880.
48. Erikson DW, Burghardt RC, Bayless KJ, Johnson GA. Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1, Osteopontin) Binds to Integrin Alphavbeta6 on Porcine Trophectoderm Cells and Integrin Alphavbeta3 on Uterine Luminal Epithelial Cells, and Promotes Trophectoderm Cell Adhesion and Migration. *Biol Reprod.* 2009;81(5):814–825.
49. Farmer JL, Burghardt RC, Jousan FD, Hansen PJ, Bazer FW, Spencer TE. Galectin 15 (LGALS15) functions in trophectoderm migration and attachment. *FASEB J.* 2008;22:548–560.
50. Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide. Ed. IJ 1. 46r. 2012. p. 1–198.
51. Ford SP, Christenson LK. Direct effects of oestradiol-17 b and prostaglandin E-2 in protecting pig corpora lutea from a luteolytic dose of prostaglandin F-2a. *J. Reprod. Fert.* 1991;93:203-209.
52. Francis SE, Goh KL, Hodivala-dilke K, Bader BL, Stark M, Davidson D. Central Roles of a5b1 Integrin and Fibronectin in Vascular Development in Mouse Embryos and Embryoid Bodies. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2002;22:927–933.
53. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science.* 1995;270:1500–1502.
54. García P, Nieto A, Sánchez M A, Pizarro M, Flores JM. Expression of alphav, alpha4, alpha5 and beta3 integrin subunits, fibronectin and vitronectin in goat peri-implantation. *Anim Reprod Sci.* 2004;80:91–100.

55. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1–29.
56. Garro A, Gentile M, Koncurat M. Valoración de Anticuerpos IgG asimétricos en suero sanguíneo y extractos placentarios porcinos. *Arch Latinoam Prod Anim*. 2014;22(3-4):87–92.
57. Garro A. Estudio de la respuesta inmune humoral en la gestación porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2015.
58. Geisert R, Yelich J. Regulation of conceptus development and attachment in pigs. *J Reprod Fert*. 1996;52:133-149.
59. Geisert RD, Schmitt RAM. Early embryonic survival in the pig: Can it be improved? *J Anim Sci*. 2002;80(1):54–65.
60. Gentile M, Margni R, Williamson D, Garro A, Alonso G, Bruni M, Riesco O, Yaful GN y Koncurat MA. Presencia de IgG asimétricos en sueros porcinos. Estudio preliminar. Jorn Cienc y Técnica, Fac Ciencias Vet Univ Nac La Pampa. 2004.
61. Guillomot M. Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation. *Placenta*. 1999;20:339–345.
62. Gratacós E, Filella X, Palacio M, Cararach V, Alonso PL, Fortuny A. Interleukin-4, interleukin-10, and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in second-trimester serum from women with preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 1998;92(5):849–853.
63. Hafez E, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma Edición, Ed McGraw-Hill, México; 2003, p. 85.
64. Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Nishina H, Kozuma S, Mikami YTY. Evidence for an elevation in serum interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha levels before the clinical manifestations of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 1997;38(2):89–93.

65. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S. Gestational Age-Dependent Expression of IL-10 and Its Receptor in Human Placental Tissues and Isolated Cytotrophoblasts. *J Immunol.* 2000;164(11):5721–5728.
66. Hashii K, Fujiwara H, Yoshioka S, Kataoka N, Yamada S, Hirano T, Mori T, Fujii SMM. Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells. *Hum Reprod.* 1998;13(10):2738–2744.
67. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69(1):11–25.
68. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol.* 1982;95(2):369–377.
69. Illera MJ, Lorenzo PL, Gui Y, Beyler SA, Apparao KBC, Lessey BA. A role for alphavbeta3 integrin during implantation in the rabbit model. *Biol Reprod.* 2003;68:766–771.
70. Iwahashi M, Nakano R. Decreased type V collagen expression in human decidua tissues of spontaneous abortion during early pregnancy. *Clin Pathol.* 1998;51:44–46.
71. Iwahashi M, Ooshima A, Nakano R. Increase in the relative level of type V collagen during development and ageing of the placenta. *J Clin Pathol.* 1996;49(11):916–919.
72. Jaeger LA, Johnson GA, Ka H, Garlow JG, Burghardt RC, Spencer TE, Bazer FW. Functional analysis of autocrine and paracrine signalling at the uterine-conceptus interface in pigs. *Reprod Suppl*, 2001;58:191-207.
73. Jensen F, Muzzio D, Soldati R, Fest S, Zenclussen AC. Regulatory B10 Cells Restore Pregnancy Tolerance in a Mouse Model1. *Biol Reprod.* 2013;89(4):1–7.

74. Jimenez-Marín. Caracterización Molecular de las Integrinas Beta-1 (Cd29) y Beta-3 (Cd61) Porcinas. Obtención de Anticuerpos contra dominios específicos de ambas moléculas. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, 2002.
75. Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L. Fibronectin-Integrin Interactions. *Frontiers in Bioscience*. 1997;2:126-146.
76. Johnson GA, Bazer FW, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Pfarrer C, et al. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol Reprod*. 2001;65:820–828.
77. Johnson GA, Burghardt RC, Spencer TE, Newton GR, Ott TL, Bazer FW. Ovine osteopontin: II. Osteopontin and alpha(v)beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biol Reprod*. 1999;61(4):892–899.
78. Kalkunte S, Nevers T, Norris WE, Sharma S. Vascular IL-10: a protective role in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2011;88(2):165–169.
79. Kaloglu C, Onarlioglu B. Extracellular matrix remodelling in rat endometrium during early pregnancy : The role of fibronectin and laminin. *Tissue Cell*. 2010;42(5):301–306.
80. Kayisli UA, Korgun ET, Akkoyunlu G, Arici A, Demir R. Expression of integrin alpha5 and integrin beta4 and their extracellular ligands fibronectin and laminin in human decidua during early pregnancy and its sex steroid-mediated regulation. *Acta Histochem*. 2005;107(3):173–185.
81. Keys JL, King GJ, LaForest JP. Autofluorescence of the porcine endometrium during early pregnancy. *Biol Reprod*. 1989;40(2):220–222.
82. King AE, Collins F, Klonisch T, Sallenave J-M, Critchley HOD, Saunders PTK. An additive interaction between the NF B and estrogen receptor signalling pathways in human endometrial epithelial cells. *Hum Reprod*. 2010;25(2):510–518.

83. Knauer M, Hostetler C. US swine industry productivity analysis, 2005 to 2010. *J Swine Heal Prod.* 2013;23:248–252.
84. Koncurat M, Greco C, Vivas A. Hallazgo del factor precoz de preñez (EPF) en extractos placentarios porcinos. *Rev Bras Reprod Anim.* 1999;3:193–195.
85. Koncurat M, Martinez R, Escribano C, Vivas A. IFN- γ concentration in serum and porcine placental extracts from different gestation ages. *Biocell.* 2001;25(3).
86. Koncurat M, Williamson D, Vélez C, Riesco O. Concentration of IL-6, IL-12 and IFNg in serum and placental extracts during porcine gestation. In: First French-Argentine Immunology Congress LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 2010.
87. Koncurat M. Estudio inmunoendocrino de la preñez porcina. Papel de la placenta. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. 2003.
88. Kou S, Naoaki K, Shigetatsu S, Mamoru T, Toyohiko M. Integrins and reproductive physiology: Expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. *Fertil Steril.* 1997;67(5):799–811.
89. Kridli RT, Khalaj K, Bidarimath M, Tayade C. Placentation, maternal–fetal interface , and conceptus loss in swine. *Theriogenology* 2016;85(1):135–144.
90. Krüssel JS, Simón C, Rubio MC, Pape AR, Wen Y, Huang HY, Bielfeld P, Polan ML. Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. *Human Reproduction.* 1998;13(8):2206–2211.
91. Lefevre F, Martinat-Botte F, Locatelli A, De Niu P, Terqui M, La Bonnardiere C. Intrauterine infusion of high doses of pig trophoblast interferons has no antiluteolytic effect in cyclic gilts. *Biol Reprod.* 1998;58(4):1026–1031.

92. Lessey B, Castelbaum J, Buck C, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertility and sterility*. 1994;62(3):497–506.
93. Lessey BA, Arnold J. Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the establishment of uterine receptivity. *J Reprod Immunol*. 1998;39(1–2):105–116.
94. Lessey BA. Adhesion molecules and implantation. *J Reprod Immunol*. 2002;55:101–112.
95. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*. 2013;38(1):13–25.
96. Lim KJH, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril*. 2000;73(1):136–142.
97. Lodish H, Berk A, Zipulsk L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología celular y molecular. 4º edición. Ed Panamericana. Buenos Aires; 2002.
98. López-Poveda EA. Las técnicas de análisis de imagen tienen aplicaciones en astronomía, teledetección, y también en neurociencias. Universidad de Salamanca. 2015. p. 1–52. [online] <http://audiolab.usal.es/Documentos/Docencia/Master Neurociencias.pdf>
99. Lucena S, Arocha CLP, Guerrero B. Fibronectina. Estructura y funciones asociadas a la hemostasia. *Invest clín*. 2007;48(2):249-262.
100. Luna L. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces. New York. Toronto. McGraw-Hill. 1968. 40 p.
101. MacIntyre DM, Lim HC, Ryan K, Kimmens S, Small JA, MacLaren LA. Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. *Biol Reprod*. 2002;66(5):1430–1436.

102. MacLaren LA, Wildeman AG. Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of the alpha 5 and beta 1 integrin subunits in bovine trophoblast. *Biol Reprod.* 1995;53(1):153–165.
103. Makris A, Xu B, Yu B, Thornton C, Hennessy A. Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to an IL10 promoter polymorphism. *Placenta.* 2006;27(4–5):445–451.
104. Malan Borel I., Gentile T., Angelucci J., Pividori J., Margni R. IgG asymmetric molecules with anti-paternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. *J Reprod Immunol.* 1991;20:129–140.
105. Margni R. Anticuerpos IgG asimétricos. Estudios estructurales, inmunoquímicos y biológicos. *Medicina.* 1989;49:147–154.
106. Margni R. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5th ed. Panamericana EM, editor. Buenos Aires. 1996. p. 799-851.
107. Marrable AW. The Embryonic Pig: A Chronological Account. Ed. Pitman Medical Exeter. London. 1971.
108. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(1):127–133.
109. Mathew DJ. Characterization of Interleukin-1 Beta 2, a Novel Interleukin-1 Expressed By the Early Pig Conceptus during Establishment of Pregnancy. Tesis doctoral. University of Missouri-Columbia. 2014.
110. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiol Rev.* 1999;79(2):263–324.

111. Miazzo D, Pisani Claro N. Mercado internacional de las carnes. Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina FADA. 2015 [online] <http://www.elsitioporcino.com/articles/2678/el-mercado-mundial-de-las-carnes/>
112. Mizuno K, Adachi E, Imamura Y, Katsumata O, Hayashi T. The fibril structure of type V collagen triple-helical domain. *Micron*. 2001;32(3):317–323.
113. Modric T, Kowalski AA, Green ML, Simmen RCM, Simmen FA. Pregnancy-dependent Expression of Leukemia Inhibitory Factor (LIF), LIF Receptor- and Interleukin-6 (IL-6) Messenger Ribonucleic Acids in the Porcine Female Reproductive Tract. 2000;6:345–353.
114. Molina Vílchez R, Adrián TR, Ruiz A, Heredia W, Atencio R, Taborda JL. Interleucina 4 en el suero de embarazadas normales y preeclámpicas. *Rev Obs Ginecol Venez*. 2000;60(2):77–80.
115. Mor G, Koga K. Macrophages and pregnancy. *Reprod Sci*. 2008;15(5):435–436.
116. Mosher DF, Fogerty FJ, Chernousov MA, Barry E. Assembly of fibronectin into extracellular matrix. *Ann NY Acad Sci*. 1991;614:167-180.
117. Mosher D. Physiology of Fibronectin. *Ann Rev Med*. 1984;35:571–575.
118. Mueller A, Siemer J, Schereiner S, Koesztner H, Hoffmann J, Binder H, Beckmann MW, Dittrich R. Role of estrogen and progesterone in the regulation of uterine peristalsis: results from perfused non-pregnant swine uteri. *Hum Reprod*. 2006;21:1863-1868.
119. O'Garra A. Interleukins and the Immune System 2. *Lancet*. 1989;333(8645):1003–1005.
120. Omu AE, Al-Qattan F, Diejomaoh ME, Al-Yatama M. Differential levels of T helper cytokines in preeclampsia: pregnancy, labor and puerperium. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1999;78(8):675–680.
121. Pacheco J. Inmunología de la implantación. *Ginecol Obs*. 1999;45(1):14–22.

122. Paulesu L, Romagnoli R, Bigliardi E. Materno-fetal immunotolerance: is Interleukin-1 a fundamental mediator in placental viviparity? *Dev Comp Immunol.* 2005;29:409–415.
123. Perry JS, Rowlands IW. Early pregnancy in the pig. *J Reprod Fertil.* 1962;4:175–188.
124. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand Binding to Integrins. *J Biol Chem.* 2000;275(29):21785–21788.
125. Pope W. Embryonic mortality in swine. In: Zavy MT, Geisert RD, editors. *Embryonic mortality in domestic species.* Florida: CRC Press; 1994. p. 53–78.
126. Qin L, Yan-LingW, Bai S-X, Ji S-H, Qiu W, Tang S. Temporal and Spatial Expression of Integrins and Their Extracellular Matrix Ligands at the Maternal-Fetal Interface in the Rhesus Monkey During Pregnancy. *Biol Reprod.* 2003;69(2):563–571.
127. Qsuires E J. *Endocrinología animal aplicada.* Editorial Acribia S.A. 2006.
128. Raghupathy R, Tangri S. Immunodystrophism, T Cells, Cytokines, and Pregnancy Failure. *Am J Reprod Immunol.* 1996;35(4):291–296.
129. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Se-
min Immunol.* 2001;13(4):219–227.
130. Rashev P, Georgieva R, Rees D. Expression of alpha5beta1 integrin and fibronectin during early pregnancy in pigs. *Folia Biol Praha.* 2005;51(5):121-125.
131. Reddy KVR, Mangale SS. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. *Tissue & Cell.* 2003;35:260–273.
132. Reparaz Asensio LM. *Estudio Inmunohistoquímico y Morfométrico de las Lesiones Iniciales de la Formación de Varices en la Vena Safena Interna.* Tesis doctoral. Facultad De Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. 2015.111p.
133. Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin JN, Bennett WA. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin

- 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181(4):915–920.
134. Rivera DL, Olister SM, Liu X, Thompson JH, Zhang XJ, Pennline K, Azuero R, Clark DA, Miller MJS. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. *FASEB J*. 1998;12:189–97.
135. Robertson SA. Control of the immunological environment of the uterus. *Reviews of Reproduction*. 2000;5:164–174.
136. Rodriguez-Martinez. *Control of Pig Reproduction VIII*. Nottingham University Press, England, 2010. p. 237.
137. Romero-Adrian T; Molina-Vilchez R; González E; Taborda J; Estévez J; Ruíz A. Concentraciones séricas de interleucina-2 en el embarazo normal. *Rev Obs Ginecol Venez*. 1999;59(1):3–6.
138. Romero-Adrian T, Ruiz A, Molina-Vilchez R, Estevez J, Atencio R. Interleukin-2 receptor serum concentrations in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Invest Clin*. 2002;43(2):73–78.
139. Ross JW, Ashworth MD, Stein DR, Couture OP, Tuggle CK, Geisert RD. Identification of differential gene expression during porcine conceptus rapid trophoblastic elongation and attachment to uterine luminal epithelium. *Physiol Genomics*. 2009;36:140–148.
140. Ross JW, Malayer JR, Ritchey JW, Geisert RD. Characterization of the Interleukin-1 System during Porcine Trophoblastic Elongation and Early Placental Attachment. *Biol Reprod*. 2003;69(4):1251–1259.
141. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med*. 1996;184(2):539–548.

142. Ruoslahti E, Hayman E, Pierschbacher M, Engvall E. Fibronectin: Purification, immunological properties, and biological activities. *Methods Enzym.* 1982;82:803–831.
143. Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG. Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1beta-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(1):252–263.
144. Sanchis EG, Cristofolini AL, Taglialeagna A, Merkis CI. Porcine uterine and placental extracellular matrix molecules throughout pregnancy. *Int. J. Morphol.* 2011;29(4):1438–1443.
145. Sennström MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, Malmström A, Byström B, Endréßen U, Mlambo N, Norman M, Ståbi B, Brauner A. Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(4):375–381.
146. Shan N, Zhang X, Xiao X, Zhang H, Tong C, Luo X, Chen Y, Liu X, Yin N, Deng Q, Qi H. Laminin $\alpha 4$ (LAMA4) expression promotes trophoblast cell invasion, migration, and angiogenesis, and is lowered in preeclamptic placentas. *Placenta.* 2015;4:1–12.
147. Simón C, Frances A, Piquette G, Hendrickson M, Milki A, Polan ML. Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994a;78(4):847–854.
148. Simón C, Frances A, Piquette GN, Danasouri I El, Zurawski G, Dang W. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology.* 1994b;134(2):521–528.
149. Simón C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A. The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol.* 1997;37(1):64–72.
150. Simón C, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol.* 1998a;39:117–131.

151. Simón C, Pellicer A, Polan ML. Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. *Hum Reprod.* 1995;10(2):43–54.
152. Simón C, Piquette GN, Frances A, Polan ML. Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(2):549–555.
153. Simón C, Valbuena D, Krüssel J, Bernal A, Murphy CR, Shaw T, Pellicer A, Polan ML. Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil Steril.* 1998b;70(5):896–906.
154. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immuno* 2010; 10:89–102
155. Singh B, Rawlings N, Kaur A. Expression of integrin avb3 in pig, dog and cattle. *Histol Histophatol.* 2001;16:1037–1046.
156. Sinkora M, Butler JE. The ontogeny of the porcine immune system. *Dev Comp Immunol.* 2009;33(3):273–283.
157. Spencer TE, Bartol FF, Bazer FW, Johnson GA, Joyce MM. Identification and Characterization of Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule 1-Like Protein Expression in the Ovine Uterus. *Biol Reprod* 1999; 60:241–250.
158. Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2004;83:537–550.
159. Stroband HW, Van der Lende T. Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1990;40:261–277.
160. Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development.* 1993;119(4):1175–1186.

161. Takagi J, Strokovich K, Springer T, Walz T. Structure of integrin a5 b1 in complex with fibronectin. *EMBO J.* 2003;22(18):4607–4615.
162. Tessier DR, Raha S, Holloway AC, Yockell-Lelièvre J, Tayade C, Gruslin A. Characterization of immune cells and cytokine localization in the rat utero-placental unit mid- to late gestation. *J Reprod Immunol.* 2015;110:89–101.
163. Tezabwala BU, Johnson PM, Rees RC. Inhibition of pregnancy viability in mice following IL-2 administration. *Immunology.* 1989;67(1):115–119.
164. Tizard I. *Introducción a la Inmunología Veterinaria.* 8va. Edición. Barcelona, España, Ed Elsevier, 2009. p. 574.
165. Town SC, Patterson JL, Pereira CZ, Gourley G, Foxcroft GR. Embryonic and fetal development in a commercial dam-line genotype. *Anim Reprod Sci.* 2005;85(3–4):301–316.
166. Trolliet JC. Productividad numérica de la cerda factores y componentes que la afectan. *El Sitio de la Producción Animal.* 2005. p. 39 [online] www.produccion-animal.com.ar.
167. Tuo W, Bazer FW. Expression of oncofetal fibronectin in porcine conceptuses and uterus throughout gestation. *Reprod Fertil Dev.* 1996;8(8):1207–1213.
168. Tuo W, Harney JP, Bazer FW. Developmentally regulated expression of interleukin-1 β by peri-implantation conceptuses in swine. *J Reprod Immunol.* 1996;31(3):185–198.
169. Vallet JL, Freking BA, Miles JR. Effect of empty uterine space on birth intervals and fetal and placental development in pigs. *Anim Reprod Sci.* 2011;125(1–4):158–164.
170. Van Engelen E, De Groot MW, Breeveld-dwarkasing VNA, Everts ME, Van Der Weyden GC, Taverne MAM. Cervical Ripening and Parturition in Cows are driven by a Cascade of Pro-Inflammatory Cytokines. *Reprod Dom Anim.* 2009;44:834–841.

171. 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.
172. Vélez C, Barbeito C, Koncurat M. $\alpha\beta\beta 3$ Integrin and fibronectin expressions and their relation to estrogen and progesterone during placentation in swine. *Biotechnic & Histochimistry.* 2017. En prensa.
173. Vélez CL, Williamson D, Koncurat M. Detection of fibronectin during porcine placentation. *Arch Latinoam Prod Anim.* 2014;22(1):31–36.
174. Verma S, Hiby S, Loke YW, King A. Human Decidual Natural Killer Cells Express the Receptor for and Respond to the Cytokine Interleukin 15. *Biol Reprod.* 2000;62(4):959–968.
175. Villa-Garcia M, Li L, Riely G. Isolation and characterization of a TATA-less promoter for the human B3 integrin gene. *Blood.* 1994;83(3):668–676.
176. Vonnahme KA, Wilson ME, Foxcroft GR, Ford SP. Impacts on conceptus survival in a commercial swine herd. *J Anim Sci.* 2002;80:553–559.
177. Waclawik A. Novel insights into the mechanisms of pregnancy establishment: Regulation of prostaglandin synthesis and signaling in the pig. *Reproduction.* 2011;142(3):389–399.
178. Walter MR. Interleukin-10 in Health and Disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;380:1–21.
179. Wan P-C, Bao Z-J, Wu Y, Yang L, Hao Z-D, Yang Y-L, Shi G-Q, Liu Y, Zeng S-M. $\alpha\beta\beta 3$ Integrin may participate in Conceptus Attachment by Regulating Morphologic Changes in the Endometrium during Peri-implantation in Ovine. *Reprod Dom Anim.* 2011;46(5):840–847.

180. Wegmann TG. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993;14(7):353–356.
181. 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.
182. Williamson DM, Koncurat, MA. Expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ y de las subunidades de integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$ durante la gestación porcina. *InVet*. 2009;11(1):31–37.
183. Williamson DM, Riesco OF, Barbeito CG, Koncurat MA. Perfil y rol de citoquinas en suero, homogenatos placentarios maternos y fetales a través de la gestación porcina. *RED-VET*. 2015;16(8):1-14.
184. Wilson ME, Ford SP. Comparative aspects of placental efficiency. *Reprod Suppl*. 2001;(58):223-232.
185. Wilson ME, Biensen NJ, Ford SP. Novel Insight into the Control of Litter Size in Pigs, Using Placental Efficiency as a Selection Tool. *J Anim Sci*. 1999;77:1654–1658.
186. Winkler M, Fischer DC, Ruck P, Marx T, Kaiserling E, Oberpichler A, Tschesche H, Rath W. Parturition at term: parallel increases in interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. *Hum Reprod*. 1999a;14(4):1096-1100.
187. Winkler M, Oberpichler A, Tschesche H, Ruck P, Fischer DC, Rath W. Collagenolysis in the lower uterine segment during parturition at term: correlations with stage of cervical dilatation and duration of labor. *Am J Obstet Gynecol*. 1999b;181(1):153-158.
188. Wooding P, Burton G. Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution. Cambridge, United Kingdom, Ed. Springer, 2008, p. 105-114.

189. Wu JE, Santoro SA. Complex patterns of expression suggest extensive roles for the alpha 2 beta 1 integrin in murine development. *Dev Dyn.* 1994;199(4):292-314.
190. Wu MC, Hentzel MD, Dziuk PJ. Relationships between uterine length and number of fetuses and prenatal mortality in pigs. *J Anim Sci.* 1987;65(3):762-770.
191. Yaful G. Estudio de la placenta porcina: concentración de hormonas esteroideas y parámetros de eficiencia reproductiva. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2009.
192. Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development.* 1993;119(4):1093-1105.
193. Young A, Thomson AJ, Ledingham M, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod.* 2002;66(2):445-449.
194. Yu Z, Croy BA, Chapeau C, King GJ. Elevated endometrial natural killer cell activity during early porcine pregnancy is conceptus-mediated. *J Reprod Immunol.* 1993;24(2):153-164.
195. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest.* 1997;99(9):2139-2151.
196. Zion B, Orvieto R. Cytokines-involvement in reproduction. *Fertil Steril.* 1992;6:1093-1099.

ANEXO

Determinación de la integrina $\alpha v\beta 3$

Tabla 1a: Media de la densidad óptica (DO) de Integrina $\alpha v\beta 3$ en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	DO $\alpha v\beta 3$
NG	0,03
GM	0,36
GF	0,35

Tabla 1b: Media de la densidad óptica (DO) de la integrina $\alpha v\beta 3$ del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.

DO $\alpha v\beta 3$	Interfase Placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	0,03	
30 dg	0,23	0,34
60 dg	0,6	0,49
70 dg	0,24	0,24
114 dg		0,14

Tabla 2a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de Integrina $\alpha v\beta 3$ en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	%AIM $\alpha v\beta 3$
NG	0,3
GM	35,85
GF	28,69

Tabla 2b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de la integrina $\alpha v\beta 3$ del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.

%AIM $\alpha v\beta 3$	Interfase Placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	0,3	
30 dg	33,76	33,71
60 dg	47,66	28,85
70 dg	24,01	12,41
114 dg		10,54

Determinación de la integrina $\alpha 5\beta 1$

Tabla 3a: Media de la densidad óptica (DO) de Integrina $\alpha 5\beta 1$ en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	DO $\alpha 5\beta 1$
NG	0,07
GM	0,09
GF	0,13

Tabla 3b: Media de la densidad óptica (DO) de la integrina $\alpha 5\beta 1$ del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.

DO $\alpha 5\beta 1$	Interfase Placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	0,07	
30 dg	0,15	0,19
60 dg	0,06	0,11
70 dg	0,02	0,04
114 dg		0,13

Tabla 4a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de Integrina $\alpha 5\beta 1$ en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	%AIM $\alpha 5\beta 1$
NG	6,11
GM	17,68
GF	26,33

Tabla 4b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de la integrina $\alpha 5\beta 1$ del epitelio luminal endometrial y el trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.

%AIM $\alpha 5\beta 1$	Interfase Placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	6,11	
30 dg	30,06	37,28
60 dg	17,1	22,56
70 dg	1,07	3,87
114 dg		27,16

Determinación de la Fibronectina

Tabla 5a: Densidad Óptica (DO) de Fibronectina (FN) en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	DO FN
NG	0,08
GM	0,22
GF	0,37

Tabla 5b: Medias de densidad óptica (DO) de fibronectina (FN) analizadas en el epitelio luminal endometrial y el trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: No gestante. dg: días de gestación.

DO FN	Interfase Placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	0,08	
30 dg	0,23	0,3
60 dg	0,26	0,54
70 dg	0,16	0,18
114 dg		0,35

Tabla 6a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de FN en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	%AIM FN
NG	0,22
GM	30,08
GF	26,99

Tabla 6b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de fibronectina (FN) del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.

%AIM FN	Interfase Placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	0,22	
30 dg	33,02	30,13
60 dg	36,43	40,07
70 dg	14,85	9,27
114 dg		24,16

Determinación de la Laminina

Tabla 7a: Densidad Óptica (DO) de Laminina (LAM) en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	DO LAM
NG	0,01
GM	0,08
GF	0,16

Tabla 7b: Media de la densidad óptica (DO) de laminina (LAM) del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.

DO LAM	Interfase Placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	0,01	
30 dg	0,08	0,16
60 dg	0,13	0,22
70 dg	0,03	0,05
114 dg		0,2

Tabla 8a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de Laminina en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	%AIM LAM
NG	1,29
GM	7,06
GF	26,36

Tabla 8b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de LAM del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.

%AIM LAM	Interfase Placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	1,29	
30 dg	5,9	27,43
60 dg	15,53	33,43
70 dg	2,68	8,66
114 dg		31

Determinación de Colágeno V

Tabla 9a: Media de la densidad óptica (DO) de colágeno (COLV) en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	DO COLV
NG	0,05
GM	0,14
GF	0,14

Tabla 9b: Media de la densidad óptica (DO) de colágeno (COLV) del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.

DO COLV	Interfase Placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	0,05	
30 dg	0,18	0,15
60 dg	0,13	0,22
70 dg	0,07	0,06
114 dg		0,16

Tabla 10a: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de COLV en epitelio luminal endometrial de útero no gestante (NG), en epitelio luminal endometrial de placenta materna (GM) y el trofoblasto de la placenta fetal (GF).

Estado Fisiológico	%AIM COLV
NG	6,88
GM	20,71
GF	23,62

Tabla 10b: Porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de colágeno V (COLV) del epitelio luminal endometrial y trofoblasto en distintos períodos de gestación. NG: no gestante. dg: días de gestación.

%AIM COLV	Interfase placentaria	
	Epitelio luminal endometrial	Trofoblasto
NG	6,88	
30 dg	32,53	28,65
60 dg	18,32	33,22
70 dg	3,73	5,58
114 dg		24,51

Determinación de IL-1β

Tabla 11a: Concentración de IL-1β en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS); homogenatos de útero no gestante (NGM), homogenatos de útero gestante (HoPM) y homogenatos de placenta fetal (HoPF).

Concentración de IL-1β (pg/ml)				
Estado Fisiológico	Suero	NGM	HoPM	HoPF
No gestante	1	19,82		
Gestante	1		149,84	105,59

Tabla 11b: Concentración de IL-1β (pg/ml) en suero, homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Concentración de IL-1β (pg/ml)				
	Suero	NGM	HoPM	HoPF
NG	1	19,82		
30 dg	1		127,22	136,43
60 dg	70,85		135,27	261,06
70 dg	1		254,16	138,48
114 dg	306,25		1	1

Determinación de IL-2

Tabla 12a: Concentración de IL-2 en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS); homogenatos de útero no gestante (NGM), homogenatos de útero gestante (HoPM) y homogenatos de placenta fetal (HoPF).

Concentración de IL-2 (pg/ml)				
Estado Fisiológico	Suero	NGM	HoPM	HoPF
No gestante	72	0		
Gestante	816,78		139,5	746,25

Tabla 12b: Concentración de IL-2 (pg/ml) en suero, extractos de útero no gestante (NGM), homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) en distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Concentración de IL-2 (pg/ml)				
	Suero	NGM	HoPM	HoPF
NG	72	0		
30 dg	461		133,29	915
60 dg	249		75	346
70 dg	711		367,5	2298
114 dg	2024		30	163,2

Determinación de IL-4

Tabla 13a: Concentración de IL-4 en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS); homogenatos de útero no gestante (NGM), homogenatos de útero gestante (HoPM) y homogenatos de placenta fetal (HoPF).

Concentración de IL-4 (pg/ml)				
Estado Fisiológico	Suero	NGM	HoPM	HoPF
No gestante	232	123		
Gestante	2441,45		424,33	2208,23

Tabla 13b: Concentración IL-4 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Concentración de IL-4 (pg/ml)				
	Suero	NGM	HoPM	HoPF
NG	232	123		
30 dg	2229,67		547	2574
60 dg	710		463,5	969
70 dg	2319,33		411	5260,5
114 dg	3929,67		214,5	803

Determinación de IL-10

Tabla 14a: Concentración de IL-10 en sueros de cerdas no gestantes (NGS) y gestantes (GS); homogenatos de útero no gestante (NGM), homogenatos de útero gestante (HoPM) y homogenatos de placenta fetal (HoPF).

Concentración de IL-10 (pg/ml)				
Estado Fisiológico	Suero	NGM	HoPM	HoPF
No gestante	0,3	0,22		
Gestante	8,01		0,29	0,41

Tabla 14b: Concentración IL-10 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero no gestante (NGM) y homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) de distintos períodos de gestación. dg: días de gestación.

Concentración de IL-10 (pg/ml)				
	Suero	NGM	HoPM	HoPF
NG	0,3	0,22		
30 dg	0,47		0,26	0,5
60 dg	15,53		0,45	0,33
70 dg	0,38		0,17	0,34
114 dg	19,44		0,28	0,41