**Archivos Latinoamericanos de Producción Animal** (Arch. Latinoam. Prod. Anim.) www.alpa.org.ve/ojs.index/php

# Valoración de anticuerpos IgG asimétricos en suero sanguíneo y extractos placentarios porcinos

A. del C. Garro<sup>1</sup>, M.T. Gentile y M.A. Koncurat

Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam, Argentina Recibido Agosto 06, 2013. Aceptado Mayo 24, 2014.

# Valuation of asymmetric IgG antibodies in serum and in swine placental extracts

**Abstract.** The swine placenta is epitheliochorial and non-invasive. The immune system plays a role in reproduction that is not yet fully understood. The objective was to determine the percentage of asymmetric IgG antibodies in serum and porcine placental extracts in different gestational periods. The presence of asymmetric IgG by differential ELISA was determined. Samples (n= 45) from serum and maternal (HoPM) and fetal placental extracts (HoPF) from non-pregnant and pregnant sows at 30 (n=17), 65-70 (n=9) y 95-114 (n=6) d of gestation were processed. No significant differences were found in serum concentrations between non-pregnant and pregnant sows (38 $\pm$ 3 vs. 37 $\pm$ 2; P<0.74), but significant differences appear between 30 and 95-114 d of gestation (32 $\pm$ 3 vs. 43 $\pm$ 3, P<0.01). Only at 65-70 d of gestation (45 $\pm$ 2) were found asymmetric antibodies in HoPM. High values at constant concentrations in HoPF were found throughout pregnancy. In conclusion, it is postulated that the presence of asymmetric IgG antibodies allows a successful porcine pregnancy.

Key words: asymmetric IgG antibodies - swine - placenta.

**Resumen.** La placenta porcina es epiteliocorial y no invasiva. El sistema inmune juega un papel durante la gestación que aún no se comprende. El objetivo del trabajo fue valorar el porcentaje de anticuerpos (Ac) IgG asimétricos en extractos placentarios y suero porcino de diferentes períodos de gestación. Se determinó la presencia de Ac IgG asimétricos por ELISA diferencial. Fueron procesados 45 muestras de suero sanguíneo, extractos placentarios maternos (HoPM) y fetales (HoPF), de cerdas gestantes de 30 (n=17), 65-70 (n=9) y 95-114 (n:=6) d de gestación, así como 13 úteros de cerdas vacías (HoU). No se encontraron diferencias significativas en suero, entre cerdas vacías y cerdas gestantes en los porcentajes de Ac IgG asimétricos, (38±3 vs. 37±2, P<0,74), aunque sí aparecen diferencias significativas entre cerdas de 30 y 95 d de gestación (32±3 vs. 43±3, P<0,01). Solamente a los 65-70 d de gestación se encontró anticuerpos asimétricos (45±2) en HoPM. Se hallaron valores altos de Ac IgG asimétricos en HoPF durante toda la preñez, a los 30 d (52±5), a los 65-70 d (44±3) y a los 95-114 d (47±4). En conclusión, se postula que la presencia de Ac IgG asimétricos posibilita una preñez exitosa en porcinos.

Palabras clave: Anticuerpos IgG asimétricos - cerdos - placenta.

### Introducción

La placenta porcina es epiteliocorial, difusa, adecidua, plegada y no invasiva (Wooding y Burton, 2008). La morfogénesis del sistema inmune abarca el período fetal de la embriogénesis y comprende desde el día 32 al día 114, se caracteriza por el crecimiento fetal, la formación del sistema linfático, la actividad

hematopoyética de la médula ósea y la expansión de los ganglios linfáticos periféricos, que se producen entre los días 60 y 90 de gestación (Šinkora y Butler, 2009).

En la reproducción, el sistema inmunológico con sus mecanismos celulares y moleculares, juega un

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Autor para la correspondencia, e-mail: adgarro4@hotmail.com

98 Garro et al.

rol que aún no se comprende en su totalidad (Barrientos et al., 2009). La IgG es el principal isotipo en el cerdo, constituyendo entre el 80 al 85% de las inmunoglobulinas en el suero y en el calostro porcino. En la década de 1970 se postuló, en distintas especies animales, que toda respuesta inmune cursa con una población de anticuerpos (Ac), del isotipo IgG, que poseen un comportamiento inmunoquímico y biológico diferente, denominados Ac IgG asimétricos (Margni y Binaghi, 1972). Estos Ac IgG asimétricos no forman agregados con el antígeno y como consecuencia no activan mecanismos biológicos efectores como lisis por complemento, fagocitosis y depuración antigénica in vivo. No precipitan el antígeno porque en solo una de las dos regiones de unión al antígeno, en los fragmentos Fab, existe un resto hidrocarbonado rico en manosa, que crea un impedimento estérico y una marcada disminución de la afinidad al antígeno (Margni, 1989; Margni y Malan Borel, 1998).

Según Gentile *et al*. (1998), los Ac IgG asimétricos se incrementan en suero y en extractos placentarios durante la gestación en humanos y murinos. Por su parte, Margni y Malan Borel (1999), en murinos, plantean que la placenta secreta moléculas o factores que regulan la síntesis de estos Ac IgG asimétricos, siendo su función la protección fetal. Zencluseen *et al*.

(2001) detectaron que durante el segundo trimestre de gestación el porcentaje de Ac IgG asimétricos se incrementa marcadamente. Por otro lado, Barrientos et al. (2009) investigaron, en la mujer, la producción de Ac IgG asimétricos como marcadores de fallos en la gestación temprana.

A pesar de los numerosos estudios realizados para comprender los fenómenos involucrados que permiten una gestación exitosa, aún no se conocen los mecanismos moleculares y celulares que participan. Múltiples antígenos tisulares que difieren entre el feto y la madre son potencialmente aloantígenos de tejidos reconocibles por el sistema inmune materno (Ye et al., 2008). Por esta razón, surge el interrogante de por qué no se induce una respuesta por parte de las células inmunes maternas hacia esos aloantígenos y de cómo la madre se protege contra agentes microbianos, sin desencadenar una respuesta inmune letal contra los tejidos fetales.

Pocos estudios investigan la respuesta inmune humoral mediada por Ac durante la gestación porcina, por ello, el objetivo del presente trabajo fue valorar el porcentaje de anticuerpos IgG asimétricos en muestras de suero sanguíneo y de extractos placentarios porcinos en diferentes períodos de gestación a fin de comprender los mecanismos que posibilitan una gestación exitosa.

## Materiales y Métodos

**Animales**: Se obtuvieron tractos reproductivos (n=45) de cerdas mestizas en su segunda y tercera gestación, provenientes de la zona de General Pico, La Pampa, Argentina (35° 62′ y 63° 45′ de latitud sur y longitud oeste, respectivamente), durante la faena en un frigorífico regional, mediante un método de Sistema de Aturdimiento Eléctrico. Además, se extrajo sangre de cada cerda mediante flevopunción de la vena yugular antes del sacrificio. Inmediatamente después de recolectados, los tractos reproductivos se lavaron con solución salina de Hank's (SSH) conteniendo 10.000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina y 2,5 μg/mL de fungizona y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Se recogieron muestras de endometrio y placenta, porción fetal y materna, para obtención de extractos placentarios porcinos maternos y fetales de 17 hembras de ± 30 d, 9 de ± 65-70 d, 6 de ± 95-114 d y 13 úteros de cerdas vacías. Se determinó la edad gestacional de los embriones/fetos según tabla confeccionada por Marrable (1971).

Obtención de homogenatos placentarios maternos (HoPM), fetales (HoPF) y de útero no gestante (HoU): Mediante un mortero se homogeneizó una

parte de tejido placentario (o de útero vacío) con tres partes de solución fisiológica, se centrifugó 2 veces a (500g), durante 10 min cada vez. El sobrenadante se repartió en alícuotas y se almacenó a -20°C.

Determinación de Ac IgG asimétricos: La detección de IgG simétricas y asimétricas se realizó en las muestras de suero y de homogenatos placentarios maternos, fetales y de útero no gestante mediante cromatografía de afinidad - Elisa de captura según Margni (1989). Se utilizó la lectina concanavalina A (Con A) con alta afinidad por oligosacáridos tipo "high manose" presentes en el Fab de estos anticuerpos. Brevemente, se sensibilizó la placa con Ac anti Fc de IgG porcino elaborado en cabra (Bethyl, EEUU), a una dilución de 1:500. Las muestras por duplicado se diluyeron con buffer Con-A, diluido 1:200 y sin buffer Con-A, se incubaron en cámara húmeda. Posteriormente, se agregó el conjugado (Fc gama marcado con peroxidasa, Bethyl), se incubó, se lavó y se agregó ortofenildietilamina (OPD) hasta la aparición del color. Se leyó la densidad óptica (DO) en espectrofotómetro a 490 nm (BioTeK® Instruments, Inc. USA). El porcentaje de Ac IgG asimétricos se calculó de la siguiente manera: % de Ac IgG asimétricos unidos a Con A = 100 - (Ac IgG no fijados a la Con A / Ac IgG totales) x 100 (Leoni *et al.*, 1986).

**Análisis Estadístico**: Se utilizó el ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples mediante el test

de Tukey (P<0,05). Se utilizó el programa estadístico InfoStat, versión 2011e y para el análisis de los datos, en todos los casos, el nivel de significación que se consideró fue del 5% (Di Rienzo *et al.*, 2011).

#### Resultados

Se comparó los porcentajes de Ac IgG asimétricos en sueros sanguíneos entre cerdas vacías (vac) y gestantes (pre), hallándose concentraciones similares (38±3 vs. 37±2; F: 0,11 P< 0,74). Se hallaron diferencias significativas solo entre las cerdas de 30 d versus 95-114 d (32±3 vs. 43±3, P<0,01). Las cerdas de 65-70 d (36±3) no presentaron diferencias con los restantes grupos (Figura 1).

Solo se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de Ac IgG asimétricos en homogenatos de placenta materna (HoPM) entre cerdas de 65-70 dvs. los otros períodos gestacionales estudiados. No se halló diferencias significativas entre cerdas vacías (HoU) (20,50±6) vs. 30 d (27±2) (Figura 2).

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de Ac IgG asimétricos en homogenatos de placenta fetal (HoPF) entre los distintos períodos gestacionales estudiados (P<0,4153) 30 días (52±5), 65-70 días (44±3) y 95-114 días (47±4) (Figura 3).

### Discusión

Coincidimos con Chen *et al.* (2012) en que la interacción inmunológica entre el feto y la madre es una comunicación especial que estaría regulada por la presentación de antígenos del feto, presentes en la superficie del trofoblasto, y por el reconocimiento de esos antígenos por parte del sistema inmune materno. En trabajos anteriores, realizados en nuestro laboratorio, encontramos gran afinidad de la lectina Con-A por el tejido placentario fetal y materno, sobre todo en muestras de ± 55 d de gestación (Koncurat *et* 

al., 2004; Sanchis et al., 2009). Recientemente, se determinó la presencia de Ac IgG en la interfase feto materna porcina, por lo que continuamos con el estudio del papel de estas moléculas y del tipo de respuesta del sistema inmune que se organiza durante la preñez porcina (Garro et al., 2013).

No hemos encontrado bibliografía sobre el rol de los Ac IgG durante la preñez porcina, pero si en otras especies. Así, si bien en suero no hallamos diferencias significativas en el porcentaje de Ac IgG

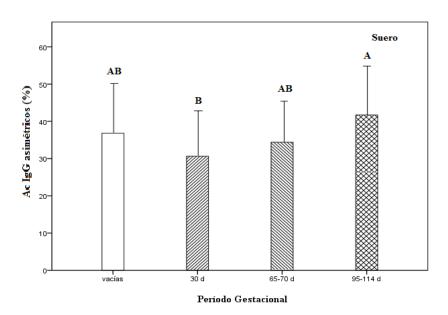


Figura 1. Porcentaje de Ac IgG asimétricos en muestras de suero en función de los períodos gestacionales estudiados (vacías, 30 d, 65-70 d, 95-114 d). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (Tukey, P<0,05).

Garro et al.

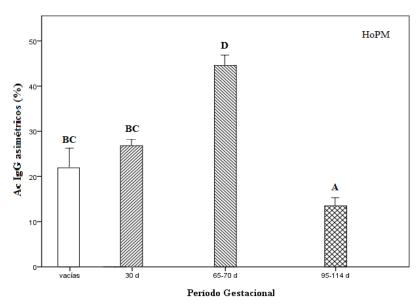


Figura 2. Porcentaje de Ac IgG asimétricos en muestras de homogenatos de úteros vacíos (HoU) y de homogenatos placentarios maternos (HoPM) en función de los períodos gestacionales estudiados (30 d, 65-70 d, 95-114 d). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (Tukey, P<0,05).

asimétricos entre cerdas vacías y gestantes, si los encontramos entre los diferentes períodos de gestación. Solo a los 30 d de preñez disminuyeron los Ac IgG asimétricos en los sueros porcinos, mientras que al final de la preñez, aumentaron, al igual que sucede en ratas, cuyos valores en sangre aumentan en el se-

gundo tercio de la gestación. (Gentile *et al.*, 1992). También, en gestaciones humanas fue descripto un aumento de la concentración de los Ac IgG asimétricos en sangre en el segundo trimestre de la gestación (Malan Borel *et al.*, 1991; Zenclussen *et al.*, 2001). Especulamos que, probablemente la disminución sérica

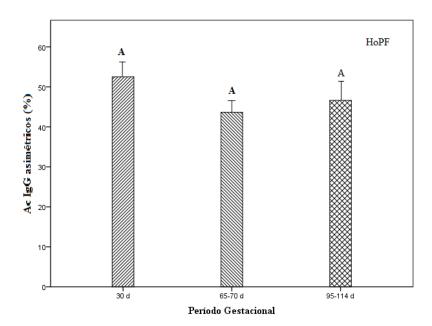


Figura 3. Porcentaje de Ac IgG asimétricos en muestras de homogenatos placentarios fetales (HoPF) en función de los períodos gestacionales (30 d, 65-70 d, 95-114 d). Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (Tukey, P<0,05).

detectada al inicio de la gestación porcina se deba al pasaje de dichos Ac IgG asimétricos a la interfase feto materna, a fin de preservar el aloinjerto fetal; mientras que el aumento de Ac IgG asimétricos séricos, al final de la preñez, reflejaría un mecanismo de compensación, a fin de subsanar la caída brusca de la concentración de IgG en suero, que se produce cuando la mayoría de las IgG se concentran en las glándulas mamarias para formar el calostro (Wagstrom et al., 2000).

Además, en concordancia con Malal Borel et al. (1991) y Gentile et al. (1992), quienes determinaron en eluídos de placenta de mujer y ratas aumento de Ac IgG asimétricos, nosotros también los hallamos en la placenta porcina en el segundo tercio de la gestación. Malal Borel et al. (1991) determinaron la presencia de Ac IgG fijados a las membranas celulares de las células de la placenta murina a través de dos mecanismos diferentes, uno a través del receptor Fc presente en las células y el otro mecanismo convencional fijándose a los antígenos paternos. El aumento de Ac IgG asimétricos a los 65-70 d de preñez en los HoPM, coincide con el período en que la placenta alcanza su meseta de crecimiento durante la preñez porcina (Wilson y Ford, 2001). Es el momento de gran remodelación celular de la estructura placentaria,

particularmente de las vellosidades que conforman la interfase a través de mecanismos apoptóticos, para sustentar el crecimiento de los fetos (Merkis *et al.*, 2010), por lo que pensamos que el aumento de Ac IgG asimétricos detectado se debería a la necesidad de proteger con dichos Ac a las nuevas células de las vellosidades expuestas en la interfase feto-materna, a fin de proteger al feto del sistema inmunológico materno.

Con respecto a los resultados hallados en los HoPF, llama la atención el alto porcentaje de Ac IgG asimétricos determinados en esos extractos en todos los períodos gestacionales estudiados, dado que el feto recién comienza a sintetizar sus primeros Ac a partir de los 50 d de preñez (Rothkötter, 2009; Butler et al., 2009). Por lo que pensamos que los Ac IgG asimétricos deben haber sido producidos por la madre a fin de proteger al aloinjerto fetal del sistema inmune materno como acontece en otras especies (Blois et al., 2004).

En conclusión, se postula que la presencia de Ac IgG asimétricos en suero y extractos placentarios maternos y fetales forma parte de la regulación de la respuesta inmune materna durante la gestación porcina, permitiendo una preñez exitosa.

## Literatura Citada

- Barrientos, G., D. Fuchs, K. Schrçcksnadel, M. Ruecke, M.G. García, B.F. Klapp, R. Raghupathy, S. Miranda, P.C. Arck and S.M. Blois. 2009. Low levels of serum asymmetric antibodies as a marker of threatened pregnancy. J Reprod Immunol. 79:201.
- Blois S., A.C. Zenclussen, M.E. Roux, S. Olmos, J. di Conza, P.C. Arck and R.A. Margni. 2004. Asymmetric antibodies (AAb) in the female reproductive tract. J Reprod Immunol. 64:31.
- Chen, S.J., Y.L. Liu and H.K. Sytwu. 2012. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. Clin. Dev. Immunol. Article ID 258391, 10 pages:10.1155/2012/2583912012:258391.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzales, E.M. Tablada y C.W. Robledo. 2011. InfoStat. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Córdoba. República Argentina. http://www.infostat.com.ar
- Garro, A., M.T. Gentile and M.A. Koncurat. 2013. Asymmetric IgG antibodies in serum and in swine placental extracts. SLIMP-Latin American Symposium on Maternal Fetal Interaction & Placenta. IV-LASRI-Latin American Symposium on Reprod. Immunol.
- Gentile, M.T., I. Malal Borel, J. Angelucci, S. Miranda and R.A. Margni. 1992. Preferential synthesis of asymmetric antibodies in rats immunized with paternal particulate antigens. Effect on pregnancy. J. Reprod. Immunol. 22:173.
- Gentile, M.T., P. Llambias, J. Dokmetjian and R.A. Margni. 1998. Effect of pregnancy and placental factors on the quality of humoral immune response. Immunol. Lett. 62:151.
- Koncurat, M.A., C. Merkis, D. Zubeldía, A. Chanique, A. Cristofolini, M. Franchino, L. Abate Cano, G. Sanchis, P.

- Falco and A. Vivas. 2004. Detection of glycoconjugates in the placenta porcine in different gestational periods. Int. J. Morphol. 22:35.
- Leoni, J., M. Labeta and R.A. Margni. 1986. The asymmetric IgG non-precipitating antibody. Localization of the oligosaccharide involved by Concanavalin A interaction. Mol. Immunol. 23:1397.
- Malal Borel, I., M.T. Gentile, J. Angelucci, J. Pividori, M.C. Guala, R.A. Binaghi and R.A. Margni. 1991. IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. J Reprod Immunol. 20:129.
- Margni, R.A. and R.A. Binaghi. 1972. Purification and properties of non-precipitating rabbit
- antibodies. Immunol. 22:55.
- Margni, R.A. 1989. Anticuerpos IgG asimétricos. Estudios estructurales, inmunoquímicos y biológicos. Medicina. 49:147.
- Margni R.A. and I. Malan Borel. 1998. Paradoxical behavior of asymmetric IgG antibodies. Immunol Rev. 163:77.
- Marrable, A.W. 1971. En: The embryonic pig: a chronological account. Great Britain, Ed. Exeter, Pitman Medical Publishing, p. 30-51.

  Merkis, C.I., A. Cristofolini, E. Sanchis and M. Koncurat. 2010.
- Merkis, C.I., A. Cristofolini, E. Sanchis and M. Koncurat. 2010. Expression of death cellular receptors FAS/CD95 and during porcine placentation. Int J Morphol. 28:829.
- Rothkçtter, H. 2009. Anatomical particularities of the porcine immune system a physician's view. Develop Comp Immunol. 33:267.
- Sanchis, E.G., C.I. Merkis y M.A. Koncurat. 2009. Detección de glicoconjugados en las vellosidades placentarias porcinas de diferentes períodos gestacionales. Red Vet. 10:1.
- Sinkora, J. and J.E. Butler. 2009. The ontogeny of the porcine immune system. Dev Comp Immunol. 33:273.

102 Garro et al.

- Wagstrom, E. A., K. J. Yoon, and J. J. Zimmerman. 2000. Immune components in porcine mammary secretions. Viral Immunol. 13:383.
- Wilson, M.E. and S.P. Ford. 2001. Comparative aspects of placental efficiency. Reprod. 58:223. Wooding, P. and G. Burton. 2008. Eutheria: Epitheliochorial
- placentation pig and horse. En: Comparative Placentation. Structures, Functions and Evolution. 1ra Edición. Berlin,
- Alemania, Ed. Springerp. p. 105-14. Ye L., W. Tuo, X. Liu, N. E. Simister and X. Zhu. 2008. Identification and characterization of an alternatively spliced variant of the MHC class I-related porcine neonatal Fc receptor for IgG. Dev Comp Immunol. 32:966. Zenclussen, A.C., M.T. Gentile, A. Kortebani, R. Mazzolli and
- R.A. Margni. 2001. Asymmetric antibodies and pregnancy. J Reprod Immunol. 45:289.