

SECCIÓN ARTÍCULOS TÉCNICOS

Análisis histológico y expresión de receptores de estrógenos y progesterona en úteros y placentas porcinas durante la gestación temprana

Marrón Y.M.; Viglierchio M.C.; García M.; Williamson D.; Clazure M. y Vélez C.

Pp. 16-27

Análisis histológico y expresión de receptores de estrógenos y progesterona en úteros y placentas porcinas durante la gestación temprana

Marrón Y.M.¹; Viglierchio M.C.¹; García M.¹; Williamson D.¹; Clazure M.¹ y Vélez C.¹

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

El trabajo se realizó en el marco de una Beca Estímulo a las Vocaciones Científicas del Consejo Interuniversitario Nacional

yolandamabelmarron@gmail.com

RESUMEN

En este artículo técnico se describen las características histológicas y la expresión de receptores de estrógenos β y de progesterona isoforma A, en úteros de cerdas no gestantes en fase folicular y en placentas porcinas en etapa de implantación. Se analizó tejido uterino usando la tinción de hematoxilina eosina, y se evaluó cualitativamente la expresión de receptores de estrógenos β y de progesterona isoforma A por medio de la técnica de inmunohistoquímica. Los resultados se expresaron en función de la coloración marrón detectada en núcleos de las muestras analizadas. En cerdas no gestantes se halló expresión de ambos receptores en endometrio. A los 17 días de gestación se halló expresión de receptor de estrógeno β en glándulas y en trofoblasto. En relación con el receptor de progesterona isoforma A, la inmunomarcación se observó en glándulas, tejido conectivo y miometrio. Los resultados obtenidos sugieren que los receptores de estrógenos fetales y los receptores de progesterona endometriales son imprescindibles para establecer las señales de comunicación entre el útero receptivo y los embriones en la fase de implantación en la cerda.

Palabras claves: Cerda; Úteros; Hormonas; Receptores.

Histological analysis and expression of estrogen and progesterone receptors in uteri and placentas of sows during the early gestation.

ABSTRACT

In this technical article the histological characteristics and the expression of estrogen receptors β and progesterone isoform A are described in the uteri of non-pregnant sows in the follicular phase and porcine placentas at implantation stage. The uterine tissue was analysed using hematoxylin eosin staining and the expression of estrogen receptors β and progesterone isoform A were qualitatively evaluated with immunohistochemical technique. The results were expressed based on brown color detected in nucleus from endometrial samples. In non-pregnant sows, it was found expression of both receptors in endometrium. At 17 days of gestation, it was found



estrogen receptor β in glands and in trophoblast. Regarding the progesterone receptor isoform A, immunostaining was observed in glands, connective tissue and myometrium. The results obtained suggest that fetal estrogen receptors and endometrial progesterone receptors are essential to establish signal pathways between receptive uteri and embryos in the porcine implantation stage.

Key Words: Sow; Uterus; Hormones; Receptors.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la porcicultura es la principal actividad pecuaria y fuente de proteína animal, la carne de cerdo es mayoritariamente elegida por los consumidores, ya que representa el 35,3% del total de carne consumida (Braun, 2015); y en los últimos años en Argentina ha crecido su producción (Iglesias and Ghezan, 2013). Esto sucede porque los cerdos poseen mayor eficiencia biológica en la transformación de los alimentos en carne a diferencia de otra especie como la bovina. Además, tienen un periodo de gestación más corto (114 días), alta prolificidad (24-30 lechones por hembra por año) y corta edad para llegar a faena (4-5 meses) (Barrales *et al.*, 2004); siendo estas características claves en la disminución de los costos de producción en comparación con otras carnes.

La eficiencia reproductiva dentro de una granja puede ser medida de varias maneras dependiendo la fase del ciclo que se quiera evaluar, cómo ser: tasa de parto, peso al nacimiento y destete, cantidad de lechones nacidos totales, vivos, muertos y destetados. Existen numerosas evidencias científicas sobre la pérdida embrionaria en porcinos, y también son variados los parámetros que utilizan los distintos autores en el análisis de este tema, dado que las pérdidas prenatales limitan la rentabilidad económica en la industria porcina (Freking *et al.*, 2007). La implantación embrionaria es una acción clave de la fisiología reproductiva en los mamíferos y es resultado de una serie de procesos tisulares complejos que se inicia con la fijación del blastocito en el útero y termina con la formación definitiva de una placenta (Betancourt Alonso *et al.*, 2006). Después del contacto inicial entre embrión y endometrio, a los 12 días de gestación (dg), el trofoblasto comienza a proliferar muy rápidamente, empieza a extenderse dentro de la luz uterina y toma contacto con el endometrio (Wooding and Burton, 2008). Estudios sugieren que el trofoblasto se pliega como resultado de su rápida expansión sin alterar la captación de líquido dentro del blastócele. Desde la implantación y hasta la aparición de la función placentaria, el embrión depende para su nutrición de la captación de "leche uterina" o nutrición histiotrófica (Hafez and Hafez, 2003). Es importante investigar a través de técnicas histológicas e inmunohistoquímicas sobre las características de los tejidos en este período, ya que puede darnos pautas necesarias para tomar las decisiones más adecuadas en el manejo de la cerda durante su gestación temprana. En esta etapa, en el diálogo entre el embrión y el útero se encuentran involucrados varios factores, como las prostaglandinas, leucotrienos, factores del crecimiento, citoquinas y hormonas esteroides ováricas (Betancourt Alonso *et al.*, 2006). Es imprescindible la presencia de un blastocito con capacidad para implantarse y al mismo tiempo el desarrollo de un endometrio receptivo (Wooding and Burton, 2008). En este periodo, se generan interacciones recíprocas entre el *conceptus* (embrión y anexos embrionarios) y el endometrio donde las hormonas esteroideas, estrógenos (Es) y progesterona (P4), cumplen un papel importante. Estas hormonas secretadas por los ovarios, pertenecen

al grupo de las hormonas esteroideas caracterizadas químicamente por poseer un núcleo tetracíclico, el ciclo pentano perhidrofenantreno, que bajo condiciones fisiológicas ejercen múltiples efectos en la cerda gestante (Hafez and Hafez, 2003). Estas moléculas liposolubles, difunden de manera pasiva a través de la membrana plasmática, se fijan a receptores nucleares específicos, y actúan regulando la transcripción de un número definido de genes (Murray *et al.*, 2019). Esto determina la síntesis de ARNm el cual es transportado al citoplasma donde estimula la síntesis de proteínas para regular los eventos moleculares que se desarrollan durante la implantación, al generar acciones específicas sobre los tejidos uterinos y el trofoblasto (Bazer and Johnson, 2014). Las hormonas esteroideas y sus genes regulados promueven los cambios en el desarrollo del útero que son necesarios para una implantación exitosa y la placentación (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004; Sukjumlong *et al.*, 2005; Sukjumlong *et al.*, 2009; Steinhäuser *et al.*, 2017).

Los estrógenos desempeñan un rol imprescindible en la proliferación y expansión de la placenta, en el movimiento de agua y electrolitos, en la permeabilidad celular y en la regulación del flujo de sangre uterina. Además, intervienen en el transporte del embrión hacia los cuernos uterinos, en la migración y en el espaciamiento equidistante en el interior de los cuernos uterinos antes de la elongación rápida y adhesión a la superficie endometrial (Meyer *et al.*, 2019). La función de los estrógenos esta mediada a través de la unión de sus receptores nucleares y citoplasmáticos (Miller *et al.*, 2017) y que en el cerdo cumplen un rol fundamental los estrógenos fetales. Los estrógenos secretados por el *conceptus* (estrógenos fetales) permiten un ambiente uterino receptivo para la implantación del embrión y el reconocimiento materno fetal (Velez, 2017).

Los receptores nucleares para estrógenos β (RE β), son proteínas sintetizadas a partir de genes específicos que corresponden a un subtipo de receptor de estrógeno (RE) no funcional, con efecto anti-proliferativo y que promueven la diferenciación celular en presencia de ligando (Koehler *et al.*, 2005).

Además, el epitelio uterino se expone a la acción de la progesterona, hormona de la gestación. La respuesta biológica a la P4 está mediada por dos isoformas del receptor de P4 isoforma A (RPA) e isoforma B (RPB). Los RPA y RPB son transcriptos a partir de dos promotores diferentes de un mismo gen, que son inducidos por los Es, los cuales poseen efectos fisiológicos diferentes (Mulac-Jericevic and Conneely, 2004; Durlej *et al.*, 2010). Mulac-Jericevic and Conneely (2004), utilizando al ratón como modelo, estudiaron los efectos de los dos tipos de receptores, encontrando que RPA disminuye severamente la ovulación, perjudica la implantación y la deciduización, generando infertilidad. En ratón se sabe que RPA actúa como un represor dominante de RPB y además disminuye la respuesta a otras hormonas esteroideas tales como andrógenos y Es. No se han encontrado estudios de RPA en la especie porcina.

Los eventos moleculares posteriores, a la fijación del embrión, comienzan con un proceso de señalización entre el blastocito y el útero para iniciar la formación de la placenta. Este período involucra la presencia de varias moléculas en la etapa de implantación (15-17 dg), generando el diálogo entre el trofoblasto y el útero receptivo que afecta la tasa de gestación y posterior tamaño de camada, visualizándose en los índices reproductivos de esta especie. Por esta razón, este mecanismo de señalización deja varios interrogantes sobre la expresión del RE β y RPA en diferentes estructuras del útero, tanto de cerdas no gestantes (NG) en fase folicular como cerdas gestantes (G) en el período de 15-17 dg.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de tractos reproductivos

Se utilizaron 8 tractos reproductivos de cerdas entre segundo y tercer parto destinadas a faena. Cuatro de las mismas provenían de cerdas gestantes (G) que se encontraban entre los 15 y 17 dg (n=4), y cuatro pertenecientes a cerdas no gestantes (NG) (n=4). Se determinó la edad gestacional de acuerdo a los registros de su historia clínica y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Los tractos reproductivos, se obtuvieron de animales que fueron a faena comercial en frigoríficos de la zona de General Pico, provincia de La Pampa, Argentina. 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. En el período gestacional estudiado, los embriones no son identificados por palpación en los tractos reproductivos, por lo cual se seccionaron los cuernos uterinos por su curvatura mayor para visualizar la posición de los filamentos. Luego se tomaron muestras de úteros de cerdas no gestantes, cerdas gestantes y filamento embrionario (trofoblasto: Tr). Se realizó técnica histológica para la tinción de hematoxilina eosina (H-E) para observar morfología del tejido. Se realizó inmunohistoquímica, para la determinación de RE β y RPA.

Análisis microscópico de la estructura de la placenta y útero

Técnica Histológica: Se realizaron cortes histológicos para microscopía óptica. Se extrajeron muestras de 1 cm³ de útero no gestante y de tejido placentario, tanto materno como fetal y se las fijó en formol tamponado con fosfato al 10% durante 12 a 24 hs. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua de grifo, durante una a dos horas (Celani *et al.*, 1984), para luego ser deshidratadas a través de pasajes de alcohol con el siguiente orden: se las colocó en alcohol 70° por 10 horas; a continuación en alcohol 96° (Bialcohol®, Argentina) por 4 horas, nuevamente en alcohol 96° 4 horas, luego se las colocó en alcohol 100° dos horas, dos veces. A continuación, se colocaron en benzoato de bencilo durante toda la noche, finalmente se las sumergió dos veces 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 μ m, montando dos o tres cortes en cada portaobjetos positivado (Genex, USA); previamente al montaje se colocaron los cortes en un baño termostatzado a 40°C con agua. Se realizaron cuatro preparados de cada etapa fisiológica (NG y G), a modo de obtener una muestra para cada tinción (H-E, RPA y RE β) y un control negativo.

Tinción con Hematoxilina-Eosina

Para colorear los cortes histológicos, se realizó la técnica convencional según Luna (1968). Brevemente, se desparafinaron los cortes mediante 3 baños con xilol (Dorwil®, Argentina) durante 10 minutos cada baño, luego se sumergieron 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 minutos). Posteriormente, se procede a la tinción con hematoxilina, luego en agua destilada para que precipite y por último se realizó la tinción con eosina. Los preparados teñidos con H-E se deshidrataron para montarlos con un cubreobjetos, utilizando un medio de montaje no acuoso.

Determinación de receptores de hormonas esteroideas en tejidos placentarios y endometrio porcino por inmunohistoquímica

Se determinó la expresión RE β y RPA por inmunohistoquímica y se observaron los preparados para establecer de modo cualitativo la expresión de los receptores. Debido a la escasa disponibilidad de anticuerpos anti-receptores hormonales específicos para porcinos, se trabajó con anticuerpos que reaccionan con la especie humana, porcina y murina, ya utilizados por Durlej *et al.* (2010) y Tang *et al.* (2018). Sobre los cortes histológicos de cerdas NG y G del período de 15-17 dg se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta LSAB (Labeled Streptavidin Biotin Method) utilizando el anticuerpo de ratón anti-receptor de estrógenos β humana-babuino monoclonal, [14C8] ab288 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y anticuerpo de ratón monoclonal anti-receptor de progesterona isoforma A, clon 16, NCL-L-PGR-312 (Leica Biosystems, Novocastra Lab, Newcastle, United Kingdom). Brevemente, se desparafinaron los preparados sumergiéndolos en xilol, para luego rehidratar los tejidos mediante el uso de una serie de alcoholes de concentración decreciente, utilizando la técnica arriba mencionada. Seguidamente, se lavó el tejido con solución salina tamponada (PBS) sumergiendo los cortes dos veces durante 10 min, se agregó peróxido de hidrógeno al 5% en PBS (para bloquear la peroxidasa endógena) durante 20 min y se lavó con PBS (dos baños de 5 min cada uno, en adelante: 2x5). Se realizó tratamiento de recuperación antigénica, con este fin se utilizó un microondas de uso doméstico, en el que se sometió los cortes, en baño térmico con *buffer* citrato 0.01 M, pH 6.0 (Durlej *et al.*, 2010) por 3 min a 100% de potencia y 9 min al 50% de potencia; posteriormente las muestras se dejaron enfriar 20 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS (2x5). Se colocó bloqueante de biotina endógena (Avidin-biotin-blocking-reagents, Cell Marque, USA): primero se incubó por 10 min con avidina y luego de un baño de 5 min con PBS se incubó por 10 min con biotina. Se lavó el tejido con PBS (2x5). Se utilizó Tritón X-100 al 0.1% en PBS, durante 5 minutos para permeabilizar las membranas celulares. Se lavó el tejido con PBS (1x5). Se utilizó suero de caballo al 1% en PBS por 30 min a fin de bloquear las uniones inespecíficas (Durlej *et al.*, 2010). Para la determinación de RE β se utilizó un anticuerpo de ratón anti-receptor de estrógenos β humana-babuino monoclonal, [14C8] ab288 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (Tang *et al.*, 2018), dilución 1:250, incubando aproximadamente 20 horas a 4°C. Luego de la incubación, se dejaron los cortes a temperatura ambiente por 10 min y se los lavó con PBS (2x5). Se agregó un segundo anticuerpo biotilado, inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra (Cytoscan Biotinylated Link, Cell Marque, USA), se incubó durante 30 min y se lavó con PBS (2x5). Se colocó estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Cytoscan TM HRP Detection System, Cell Marque, USA), se incubó durante 30 min y se lavó con PBS (2x5). A continuación, se cubrió con solución cromógena diaminobencidina (DAB Substrate Kit, Cell Marque, USA), durante 15 min (bajo control de microscopio óptico), se cortó la coloración con un pasaje de agua corriente, luego se lavó con agua destilada (un pasaje), y se contrastó con hematoxilina activada por 1 min (Biopur, Argentina). Finalmente, se sumergió en agua de grifo 5 min para viraje. A las muestras se las deshidrató (usando una batería de alcoholes de graduación creciente, 1 min en alcohol 70°, y un pasaje por cada siguiente baño: dos veces en alcohol 96°, dos veces en alcohol 100° y dos veces en xilol), y se las montó con un cubreobjetos utilizando un medio de montaje sintético (Canadax®, Biopur, Argentina). El control negativo de la reacción se trató igual que las muestras, sólo que no se agregó el anticuerpo primario, en su reemplazo se utilizó PBS.

Para la determinación del RPA se utilizó la misma técnica descrita para la determinación de la expresión del RE β con la diferencia que se agregó el anticuerpo de ratón monoclonal anti-receptor de progesterona isoforma A, clon 16, NCL-L-PGR-312 (Leica Biosystems, Novocastra Lab, Newcastle, United Kingdom), dilución 1:100 (Durllej *et al.*, 2010). En todos los períodos analizados se observó inmunoexpresión de RPA en el núcleo de las células miometriales y se consideró un control positivo en las experiencias de IHQ porque en el miometrio gestante, el RPA es imprescindible para disminuir la motilidad uterina que conduce a un mantenimiento de la gestación exitoso. Se utilizó miometrio de cada muestra como control positivo.

Observaciones microscópicas

Se observaron cortes histológicos correspondientes a úteros de cerdas NG y G. Cada corte se visualizó a bajo aumento (4x) y luego se realizaron microfotografías a 10x con el fin de demostrar homogeneidad de tinción y las estructuras placentarias en general. A continuación, se tomaron microfotografías a 40x, de cada estructura estudiada (epitelio luminal endometrial, glándulas, tejido conectivo y trofoblasto) de todas las muestras.

En la evaluación de la estructura se observó la continuidad del epitelio, la definición de las glándulas y núcleos del estroma en preparados con tinción de H-E.

Los resultados de la determinación de la expresión de los receptores fueron expresados en forma cualitativa, como positivos (+) o negativos (-). Se consideró inmunomarcación positiva, la observación de color marrón en los núcleos celulares, dentro de las estructuras analizadas. A fin de poder evaluar cualitativamente la expresión de los RE y RP en la interfase placentaria porcina en el período de gestación seleccionado, fueron tomadas imágenes de los resultados de la inmunohistoquímica para su posterior análisis morfológico.

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* Axiovisión (AxioVision 4.8, Carl Zeiss). Todas las fotografías para el análisis de la inmunomarcación, fueron realizadas con el objetivo de 40x. A fin de describir la expresión de receptores nucleares de estrógenos y progesterona en útero no gestante, útero gestante y trofoblasto para cada preparado se extrajeron imágenes del epitelio luminal (EL) y glandular (EG) y estroma endometrial (TC) del útero materno y el trofoblasto (Tr).

RESULTADOS

Visualización de cortes histológicos de tejido uterino por H-E

Se observan en los preparados histológicos teñidos por H-E la morfología de los tejidos uterinos de cerdas NG en fase folicular (Foto 1) y cerdas G (Foto 2) en el periodo de 15-17 dg.

Foto N° 1: Microfotografía de útero de cerdas no gestantes.

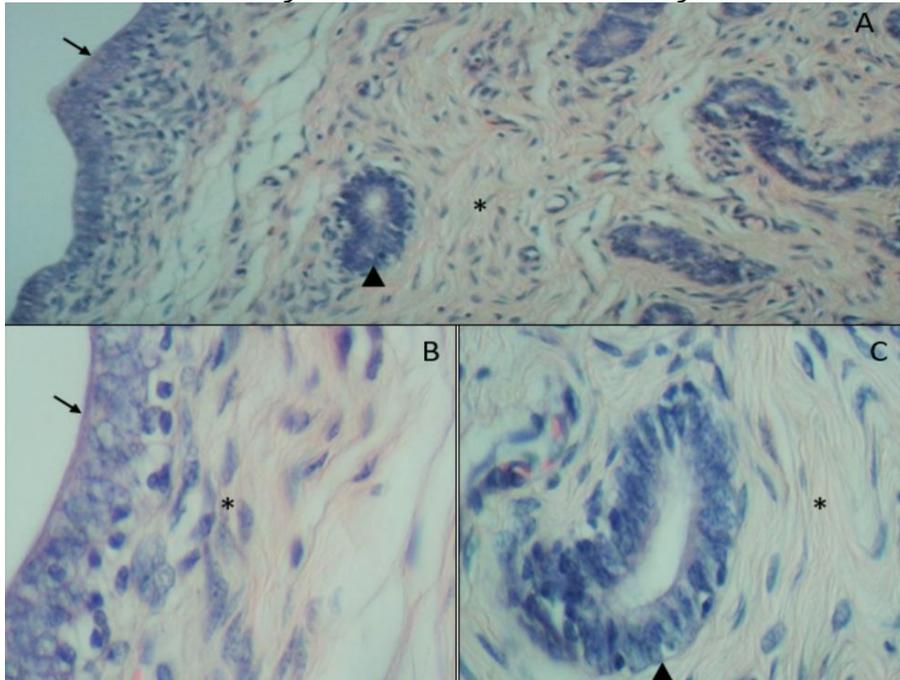


Foto N°1: A-Útero de cerda no gestante en fase folicular. H-E; 10 x. Se visualiza EL (Flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B- Se observa EL y TC a 40x. C-Se observa EG y TC a 40x.

Foto N° 2: Microfotografía de útero de cerdas gestantes.

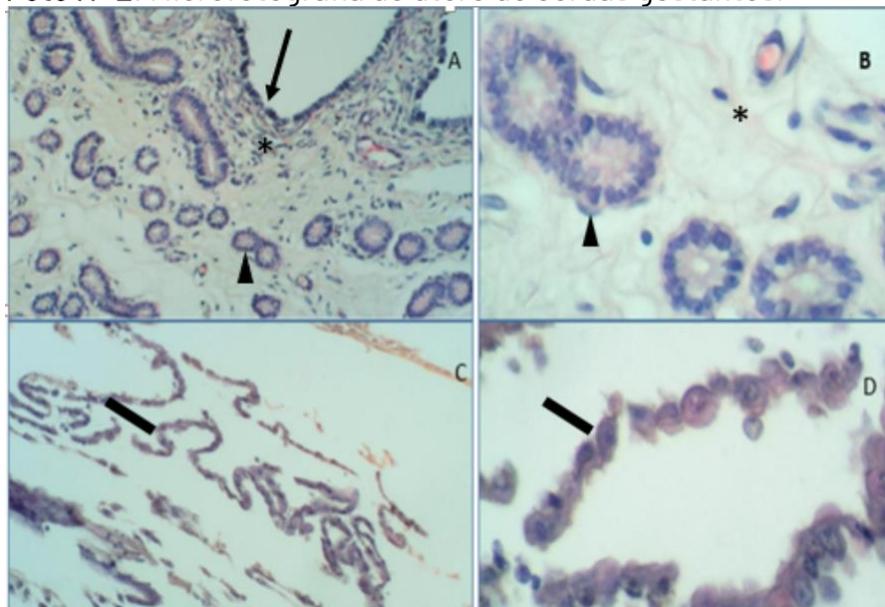


Foto N°2: A-Útero de cerdas gestantes a los 15-17 dg. H-E; 10x. Se observa EL (Flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B-Se observa EG y TC a 40x. C-Se observa el filamento embrionario (línea llena) a 10x. D-Se observa filamento embrionario a 40x.

Al analizar estas imágenes, se observó el endometrio (Figura 1.A) revestido con un epitelio cilíndrico simple (Foto 1.B), y el estroma endometrial compuesto de tejido conectivo laxo con presencia de glándulas (Foto 1.A y 1.C). Respecto al útero gestante, la mucosa del endometrio consta de múltiples pliegues (Foto 2.A), y se observan múltiples glándulas endometriales que tienen epitelio cúbico simple con vacuolas en el

citoplasma (Foto 2.B). En el trofoblasto (Foto1.C), se observan células trofoblásticas cilíndricas y grandes (Foto 2.D).

Estudio de la expresión de los receptores en la estructura del tejido uterino

Se determinó la presencia del RE β y RPA en placentas porcinas en etapa de implantación (15 -17 dg) y úteros de cerdas no gestantes en fase folicular.

Foto N°3: Microfotografías de útero de cerdas gestantes.

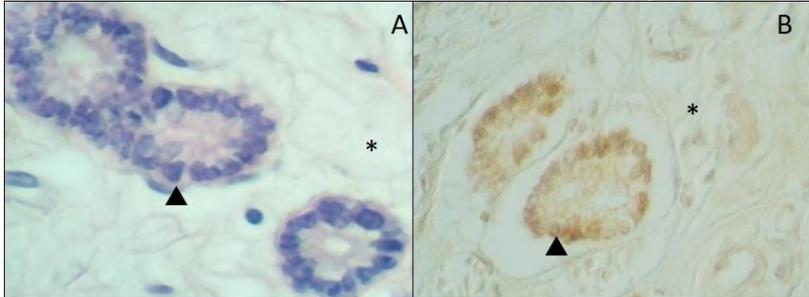


Foto N° 3: A- Útero con tinción de H-E de cerda de 15-17 dg a 40x se observa EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B-Expresión del RE β en EG a 40x.

Foto N°4: Microfotografías de filamento embrionario

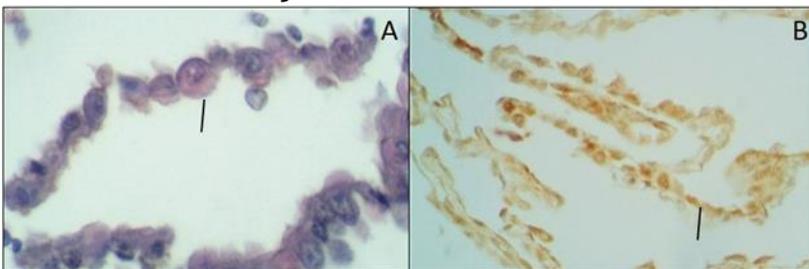


Foto N° 4: A- Tr (línea llena) de 15-17 dg con tinción de H-E a 40x. B-trofoblasto de 15-17 dg con expresión del RE β a 40x.

Se observa que el RE β se expresó en el trofoblasto a los 17 dg (Foto 4.B) y en las glándulas endometriales uterinas (Foto 3.B). Los núcleos de las células se observan de color marrón.

Foto N°5: Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerdas NG

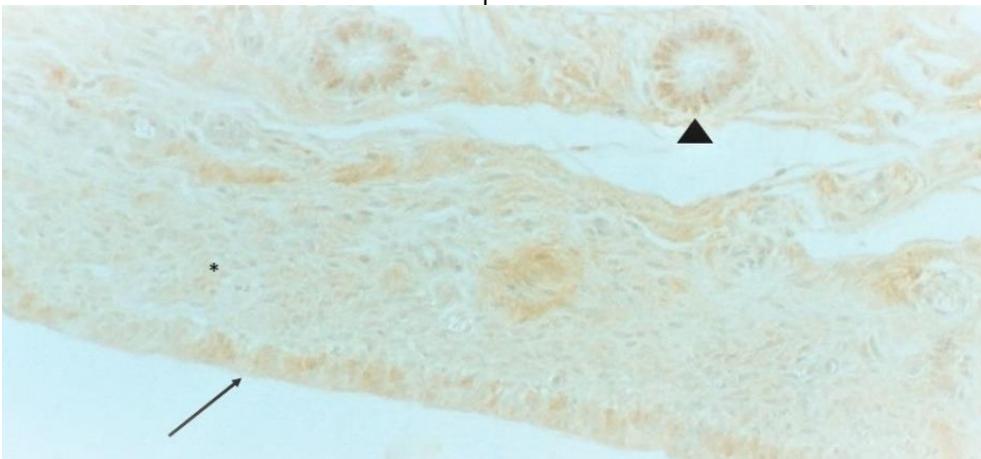


Foto N° 5: Expresión del RE β a 10x en EL (Flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco)

Foto N°6: Tinción de H-E y técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerdas NG en fase folicular

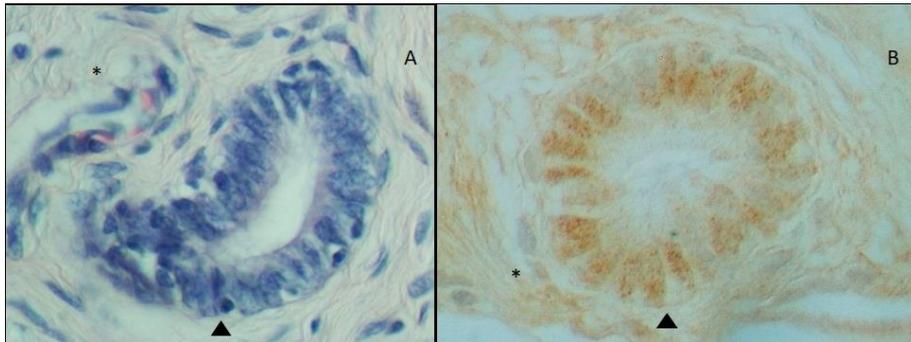


Foto N°6: A- Tinción con H-E se observa, EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B-Expresión del REβ en EG a 40x.

En útero de cerda NG en fase folicular se observa expresión del REβ en epitelio (Foto 5), estroma (Foto 5) y glándulas uterinas (Foto 6.B). La expresión del REβ se observa en todas las estructuras del útero de la cerda NG (Foto 5).

Foto N°7: Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda NG

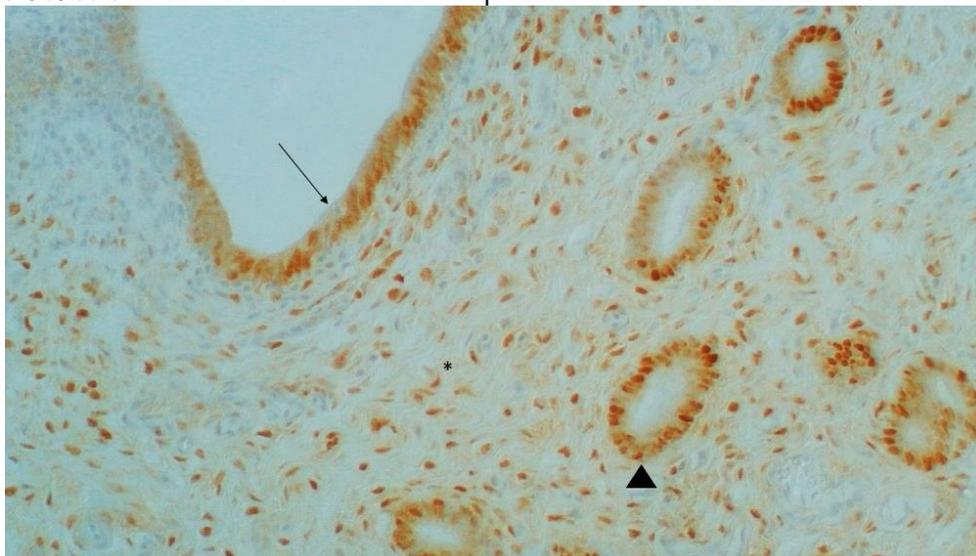


Foto N° 7: Expresión del RPA en cerdas NG en fase folicular por inmunohistoquímica. A- Expresión de RPA a 10x se observan expresión en EL (Flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco)

Foto N°8: Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda NG

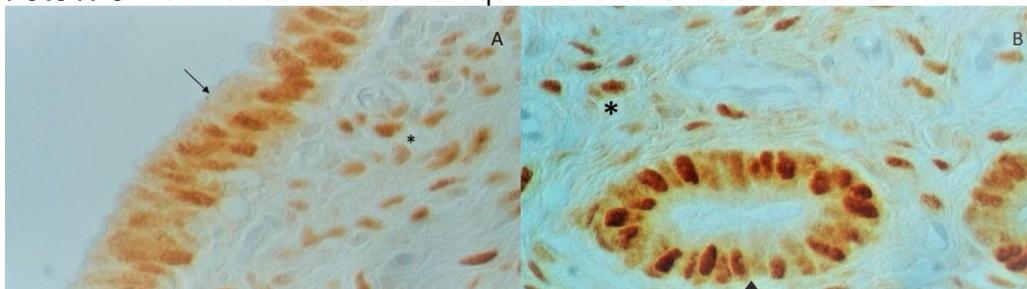


Foto N° 8: Expresión del RPA en cerdas NG en fase folicular por inmunohistoquímica A- Expresión de RPA a 40x se observan expresión en EL (Flecha) y TC (asterisco). B-Expresión del RPA en EG a 40x (punta de flecha) y TC.

Foto N°9: Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda NG

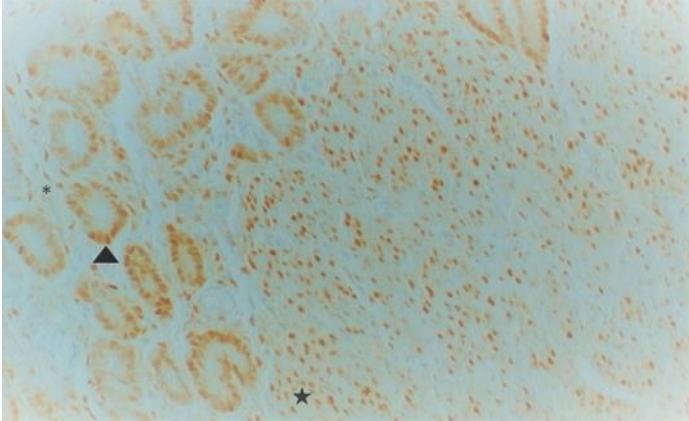


Foto N° 9: Expresión del RPA en cerdas NG en fase folicular por inmunohistoquímica. Se observa inmunomarcación de RPA en células musculares del miometrio (estrella), se usó como control positivo a 10x.

En cerdas NG en fase folicular se observa expresión del RPA en núcleos de células de EL (Foto 8.A). También se expresa en los núcleos de glándulas endometriales y células del tejido conectivo (Foto 8.B). La expresión de RPA en células musculares (Foto 9) se consideró como un control positivo. La expresión de este receptor se observa en todas las estructuras del útero de la cerda NG (Foto 7 y 9).

Foto N° 10: Tinción H-E y Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda G

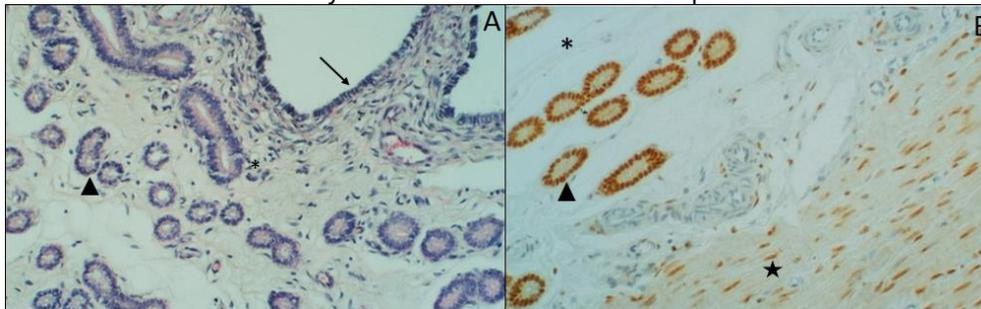


Foto N° 10: A- Tinción de H-E a 10x se observa EL (flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B- Expresión del RPA en útero de cerda G de 15-17 dg a 10x en EG y miometrio (estrella).

Foto N°11: Tinción H-E y Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda G

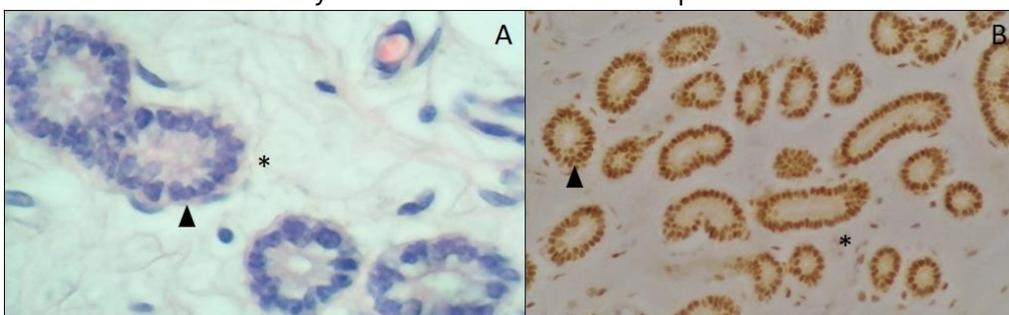


Foto N° 11: A-Tinción de H-E en útero se visualiza EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B- Expresión de RPA en EG y TC.

Se observó la inmunoexpresión de RPA en el núcleo de las células miometriales (Foto 10.B). Se lo definió como un control positivo en las experiencias de IHQ ya que, en el miometrio gestante, el RPA disminuye la motilidad uterina favoreciendo la gestación.

En las hembras porcinas de 15-17 dg se halló expresión nuclear del RPA en epitelio glandular y tejido conectivo (Foto 11. B).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En acuerdo con Santos Vidal (2017), la técnica histológica convencional, con tinción de hematoxilina-eosina permite una descripción de las características del tejido uterino no gestante y gestante y, además, la evaluación de tejidos que no estén cursando ninguna patología subclínica. Mientras que la técnica de inmunohistoquímica permite localizar las moléculas que se propongan a analizar; en el caso particular de este trabajo los receptores nucleares esteroideos. La importancia de la identificación de la localización del receptor se basa en que permite analizar el establecimiento de las condiciones más relevantes para una implantación exitosa y qué estructuras participan en ello.

La progesterona y los estrógenos son hormonas que regulan los eventos moleculares que ocurren en un útero receptivo, ya que favorecen la fijación del embrión y aumentan la tasa de sobrevivencia prenatal en la especie porcina. Por lo tanto, la observación de la expresión de estas moléculas en el presente artículo técnico permitió conocer la ubicación de los receptores en diferentes tejidos uterinos endometriales y trofoblástico. Se identificó la expresión de los receptores en los tejidos blanco por acción de ligando, quienes, a través de su interacción, promueven respuestas celulares específicas permitiendo así una correcta implantación. Se sabe que las hormonas esteroideas y sus receptores están involucradas en eventos sucesivos como la elongación del *conceptus*, la implantación y la placentación a través de un diálogo molecular espacio - temporal específico y promueven la remodelación del endometrio y el trofoblasto (Vigliherchio M., 2020).

Respecto a la P4, ésta ejercería su acción sobre los RPA de glándulas y tejido conectivo del útero gestante. Mientras que los Es, además de regular la expresión de sus propios receptores RE β encontrados en trofoblasto, serían necesarios para el reconocimiento materno fetal durante la preñez temprana, como fue reportado por Bazer y Johnson (2014). Se sabe que P4 es la hormona de la gestación y que los Es son indispensables en el reconocimiento materno-fetal (Wooding and Burton, 2008). Sin embargo, no hemos encontrado expresión RPA en el epitelio uterino durante la implantación, esto sugiere que el útero receptivo permitiría la expresión de moléculas que intervienen en el anclaje y posterior adhesión e implantación de los *conceptus*.

En este período de gestación analizado se observó inmunomarcación nuclear del RE β en glándulas uterinas y células trofoblásticas, RPA en epitelio glandular y tejido conectivo. Respecto a cerdas NG se halló expresión de RE β y RPA en epitelio, estroma y glándulas del endometrio uterino. Estos resultados coinciden con Ka *et al* (2018) que encontraron expresión de RE β en epitelio luminal y glandular en el endometrio durante el ciclo estral y en la preñez en el trofoectodermo del *conceptus* sobre el día 12 de gestación, pero la función y la regulación no está completamente dilucidada en cerdos.

Según los resultados obtenidos y en base a lo analizado para RE β en la especie porcina por Koehler *et al.* (2005) y los efectos de RPA en el ratón por Mulac-Jericevic and Conneely (2004), sugerimos que los Es fetales interactúan con los RE β en el trofoblasto y la P4 se liga a los RPA en el tejido conectivo endometrial para modular la expresión de moléculas de señalización y sus receptores relacionados con la implantación, el mantenimiento de la gestación y con la formación de la placenta materna y fetal.

En base a este estudio, proponemos que sería interesante analizar la presencia de otros receptores de estas hormonas como receptor estrógeno α y receptor de progesterona

isoforma B durante la implantación, como también el efecto de su positividad o negatividad sobre la presencia de ciertas moléculas, como las moléculas de adhesión, factores de crecimiento y/o interleuquinas; ya que sus acciones son claves en la regulación de la correcta placentación durante este período.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrales H., Cappuccio J., Williams S. Libro *"Compendio de clínica y sanidad de los cerdos: de la granja al laboratorio"* Capítulo 7: *"Diagnóstico de fallas reproductivas en producción porcina"*. 2004; p.187-203.
- Bazer F. W., Johnson GA. *Pig blastocyst-uterine interactions*. Differentiation. 2014; p. 87, 52-65.
- Betancourt Alonso M. A., Flores-Pérez F., Rosas-Velasco C., Pérez-Martínez M. *Papel de las citoquinas en la implantación embrionaria en mamíferos domésticos*. Artículo de revisión. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 2006.
- Braun R. *"Producción porcina el complejo educativo productivo de la actividad en Argentina"*. 2015; p.21-77.
- Celani M., Fernández Surribas J., Von Lawzewitsch, I. *Lecciones de Histología Veterinaria*. Volumen 1. Ed: Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. 1984; p. 36.
- Durlej M., Tabarowski Z., Slomczynska M. *Immunohistochemical study on differential distribution of progesterone receptor A and progesterone receptor B within the porcine ovary*. Anim Reprod Sci. 2010; p.121: 167-173.
- Freking B. A, Leymaster K. A, Vallet J. L., Christenson R. K. *Number of fetuses and conceptus growth throughout gestation in lines of pigs selected for ovulation rate or uterine capacity*. J Anim Sci. 2007; 85: 2093-2103.
- Hafez E., Hafez B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ma Edición, Ed McGraw-Hill, México. 2003; p. 85.
- Iglesias D., Ghazen G. *"Estudios socioeconómicos de los sistemas agroalimentarios y agroindustriales: Análisis de la cadena de la carne porcina en Argentina"* Revista boletín N°12 Edición INTA Anguil y Balcarce. 2013; Cap. II.
- Ka H, Seo H, Choi Y, Yoo I, Han J. *Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin- β at the time of implantation in pigs*. J Anim Sci Biotechnol. 2018; 9:44.
- Koehler K. F., Helguero L.A., Haldosen L.A., Warner M., Gustafsson J.A. *Reflections on the Discovery and Significance of Estrogen Receptor β* . Endocr Rev. 2005; 26(3):465-478.
- Luna L.G. Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces. Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Company. 1968.
- Mulac-Jericevic B., Conneely, O.M. *Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors*. *Reproduction*. 2004; 128: 139-146.
- Murray R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V., Weil A. Libro Harper Bioquímica Ilustrada Edición 28 .1996; p.406-444.
- Santos Vidal S. *Tinción de Hematoxilina-eosina* Trabajo final de Master Universitario en Ciencia y Tecnología Química Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Educación a Distancia. 2017
- Tang Y.Q., Li C., Sun X. J., Liu Y., Wang X. T., Guo Y.B. *Fructus Ligustrus Lucidi modulates estrogen receptor expression with no uterotrophic effect in ovariectomized rats*. BMC Complement Altern Med. [internet]. 2018; 18(1): 118. Disponible en: PubMed central.
- Velez, C. *Integrinas y su regulación por el Sistema inmune durante la gestación porcina*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2017.
- Vigliorchio M. *Determinación de receptores para estrógenos y progesterona en tejidos placentarios fetales y maternos porcinos, y su relación con la concentración sérica y tisular*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2020.
- Wooding P., Burton G. Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution. Cambridge, United Kingdom, Ed. Springer. 2008; p. 105-114.