

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.

Williamson, D.M.¹; Riesco, O.F.¹; Vélez, C.¹; y Koncurat, M.A.¹

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

dmw@vet.unlpam.edu.ar

Resumen

La gestación en las cerdas dura 114 ± 3 días y la placenta es epiteliocorial, difusa, plegada, no invasiva y adecidua. La apropiada interacción entre el embrión periimplantado y el endometrio materno estaría bajo el control de citoquinas paracrinas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 en sueros y en extractos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) porcina provenientes de cerdas de diferentes períodos gestacionales. Se utilizaron muestras de 61 tractos reproductivos provenientes de cerdas mestizas comprendidos entre 30 y 114 días de gestación, y de cerdas no preñadas. Se determinó la concentración de interferón- γ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 por ELISA en fase sólida. El IFN- γ , la IL-6 y la IL-12 mostraron un pico a los 32 días de gestación sólo en los extractos placentarios fetales. La IL-15 se mantuvo elevada durante la preñez, disminuyendo a término. La IL-18 se encontró en los extractos placentarios fetales a los $\pm 60-70$ días de preñez. En conclusión, la presencia de IL-6 a los 32 días marcaría el correcto establecimiento de la preñez, contribuyendo además su presencia el comienzo del desarrollo del sistema inmunitario y la osificación fetal. Se sugiere que la IL-15 estimularía la síntesis de IgG, mientras que las IL-12, IL-15 e IL-18 en momentos puntuales de la gestación, como del IFN- γ , señalarían el rol del sistema inmune innato en la preñez porcina.

Palabras claves: porcino, gestación, placenta, interleuquinas, interferón.

Abstract

Determination of the concentration of IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-15 and IL-18 concentrations in sera, and maternal and

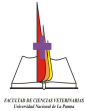
foetal placenta extracts through pig gestation

Pregnancy in sows lasts 114 ± 3 days and has a placenta epitheliochorial, diffuse, folded, non invasive and adecidua. The proper interaction between peri-implanted embryo and the maternal endometrium would be under the control of cytokine especially paracrines. The aim of this work was to study the presence of IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-15 and IL-18 in sera and in extracts of maternal (HoPM) and fetal (HoPF) placenta from sows of different gestational periods. Some samples of reproductive tracts from 61 swines between 30 and 114 days of gestation, and non-pregnant sows were used. It was determined the concentration of interferon- γ , IL-6, IL-12, IL-15 and IL-18 by solid-phase ELISA. IFN- γ , IL-6 and IL-12 showed a peak at 32 days of gestation only in the fetal placental extracts. IL-15 remained high during pregnancy, decreasing at term. IL-18 was found in fetal placental extracts between $\pm 60-70$ days of pregnancy. In conclusion, the presence of IL-6 on day 32 would mark the correct establishment of pregnancy, contributing its presence the beginning of the development of the immune system and fetal ossification. It is suggested that IL-15 stimulate the synthesis of IgG, whereas IL-12, IL-15 and IL-18 together IFN- γ at specific times of gestation, would indicate the role of the innate immune system in swine pregnancy.

Key words: porcine, gestation, placenta, interleukins, interferon.

Introducción

El establecimiento de la preñez en los mamíferos requiere interacciones coordinadas entre el *conceptus* y el endometrio, la cual involucra numerosas hormonas, factores de crecimiento y citoquinas que actúan mediante receptores



específicos (Robertson, 2000). La gestación en las cerdas dura 114 ± 3 días y posee una placenta epiteliocorial, difusa, plegada, no invasiva y adecidua (Amoroso, 1952; Dantzer 1985). Desde el punto de vista genético, la madre y el feto no son idénticos, debido a que el feto hereda un grupo de genes polimórficos diferentes del padre y de la madre. Por lo tanto, en la mayoría de las combinaciones de parejas hay múltiples antígenos tisulares que difieren entre el feto y la madre y son potencialmente aloantígenos de tejido reconocibles por el sistema inmune materno. Por ese motivo, surge el interrogante de por qué no se induce una respuesta por parte de las células inmunes maternas hacia esos aloantígenos y de cómo la madre provee protección contra agentes microbianos, sin desencadenar una respuesta inmune letal contra los tejidos fetales.

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

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

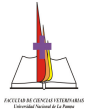
Los interferones (IFNs) son glicoproteínas, que se agrupan en IFN de tipo I e IFN de tipo II. El conceptus porcino es la única especie mamífera que secreta IFN de los dos tipos: IFN- γ e IFN- δ , y esta secreción la realiza durante el período de peri-implantación, proveyendo la oportunidad de que estos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

La IL-6 es una citoquina multifuncional, sintetizada por células placentarias como las trofoblásticas y podría actuar induciendo la glicosilación asimétrica de las IgG (Margni y Zenclussen, 2001), considerando que la presencia de IL-6 desplaza la balanza Th1/Th2 hacia una respuesta Th2. En el primer trimestre de la gestación la IL-6 estaría implicada en la remodelación de tejidos placentarios, así como en la hematopoyesis y la vascularización de las vellosidades placentarias (Gutierrez et al., 2008).

La IL-12 juega un rol importante en la inducción de la respuesta inmune mediada por células, aumenta la actividad de los linfocitos T citotóxicos y de las NK y está involucrada en la diferenciación de las células T vírgenes hacia la subpoblación Th1 (Hasan et al., 1999). La IL-12 fue reconocida inicialmente como inductora de la síntesis de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica humana *in vitro*. Los macrófagos y las células dendríticas son la principal fuente de IL-12 en muchos tejidos.

La IL-15 es una citoquina requerida para la diferenciación de las células NKu en el ratón. Verma et al. (2000) han demostrado, en la mujer, que la IL-15 es producida en la mucosa uterina y que puede afectar la citotoxicidad y proliferación de NKu, sugiriendo que dichas NKu son potencialmente capaces de responder a IL-15. A diferencia de las células NK sanguíneas, las células NKu no se transforman en células citolíticas potentes, lo cual es críticamente importante para una célula que está presente en la interfase materno-fetal ya que la actividad citolítica destruiría el trofoblasto. Los macrófagos son también una importante fuente de IL-15 en el útero.

El sistema de la IL-18 incluye a receptores, la proteína de unión y el mismo precursor de la IL-18, la cual es promotora de una respuesta Th1 con inducción de la producción de IFN- γ . La expresión de IL-18 y su ARNm en el endometrio humano es mayor durante la fase secretoria que en la fase proliferativa. Así, la expresión y el nivel apropiado de IL-18 e IL-18BP (proteína de unión) durante el período de implantación del endometrio secretorio



pueden modular la red de citoquinas Th1/Th2 durante la implantación embrionaria (Huang, 2006).

Algunos trabajos analizan a las citoquinas involucradas en la implantación en seres humanos y el modelo murino (Margni, 1996; Verma et al., 2000; Margni y Zenclussen, 2001; Huang, 2006; Gutierrez et al., 2008; Oh y Croy, 2008) pero aún no se analizó la expresión o el rol de las citoquinas IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 durante el transcurso de la gestación porcina. Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 en sueros y en extractos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) porcina provenientes de cerdas de diferentes períodos gestacionales.

Materiales y Métodos

Animales y tractos reproductivos: Se recolectaron 61 tractos reproductivos provenientes de cerdas mestizas de la zona de General Pico, La Pampa, Argentina (35° 62' y 63° 45' de latitud y longitud, respectivamente), comprendidos entre 30 y 114 días de gestación, y de cerdas no preñadas. De los 61 tractos reproductivos, seis correspondieron a úteros de cerdas no gestantes en diferentes fases del ciclo estral, tres en fase folicular y tres en fase luteal. Las mismas se tomaron como testigos. El resto de los tractos reproductivos (55) incluyeron placentas provenientes de cerdas gestantes en diferentes períodos gestacionales: 32, 35, 40, 44, 50, 51, 60, 65, 70, 80, 90 y 114 días de preñez. 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 estreptomycin y 2,5 μ g/ml de fungizona y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Obtención de suero: A cada cerda se le extrajo sangre por corte de la vena yugular. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente hasta lograr retracción del coágulo y exudado del suero. Se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos, se fraccionó en alícuotas y conservó a -20°C.

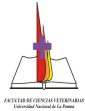
Obtención de homogenatos de placenta porcina (HoPP) y de útero no preñado porcino (HoU): Los extractos placentarios

se obtuvieron de la siguiente manera: 5 g de tejido placentario porcino materno o fetal con tres partes de solución fisiológica fueron molidos a fin de obtener una pulpa. Luego se centrifugó y el sobrenadante se guardó a -20°C, denominándolos Homogenatos de Placenta Porcina Materna (HoPM) y Homogenatos de Placenta Porcina Fetal (HoPF). Los homogenatos de útero provenientes de hembras porcinas no preñadas (HoU) fueron procesados de la misma manera (Konkurat, 2003).

Determinación de citoquinas en homogenatos de placenta porcina (HoPP) y sueros porcinos: Se realizó por Enzaimunoenálisis (ELISA) en fase sólida la determinación del IFN- γ y de la IL-6, la IL-12, la IL-15 y de la IL-18, en homogenatos de placenta materna y fetal, en homogenatos de útero vacío y en sueros porcinos provenientes de los diferentes períodos estudiados.

Determinación de IFN- γ : A la placa de ELISA que posee el anticuerpo anti-porcino IFN- γ (Thermo Scientific, USA) se le adicionó 50 μ l de diluyente estándar en cada pocillo y 50 μ l de muestra. Luego se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó tres veces. Posteriormente se adicionó el anticuerpo anti-porcino IFN- γ biotilado, se lo incubó a temperatura ambiente durante una hora y se lavó tres veces la placa. Se colocó 100 μ l de solución Streptavidina-Peroxidasa de rábano picante (Streptavidina-HRP) incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó tres veces y se incubó con 100 μ l de sustrato tetrametilbencidina (TMB) en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Se detuvo la reacción con solución Stop y se midió la absorbancia a 450 nm (BioTeK® Instruments, Inc. USA).

Determinación de Interleuquina-6: En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura policlonal anti-Interleuquina 6 porcino (R&D Systems, USA) se adicionó 50 μ l/pocillo de diluyente de ensayo RD1-63 y 100 μ l/pocillo de estándar, control o muestra. Se mezcló durante un minuto y se cubrió, incubándose durante 2 hs a temperatura ambiente. Se lavó la placa con 400 μ l/pocillo de buffer de lavado. Se agregó 200 μ l de conjugado de IL-6



porcino. Se cubrió e incubó 2 hs. Se lavó nuevamente. Se adicionó 120 μl /pocillo de solución sustrato incubándose a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad. Se frenó la reacción con 120 μl /pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK[®] Instruments, Inc. USA).

Determinación de Interleuquina-12: En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura anti-Interleuquina 12 humana (Thermo Scientific, USA) se adicionaron 50 μl /pocillo de estándar o muestra por duplicado y 100 μl /pocillo de reactivo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavó la placa 3 veces con solución amortiguadora de lavado. Se adicionaron 100 μl /pocillo de reactivo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) incubándose a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó nuevamente y se adicionaron 100 μl /pocillo de solución sustrato TMB incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se detuvo la reacción con 100 μl /pocillo de solución stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK[®] Instruments, Inc. USA).

Determinación de Interleuquina-15: Se incubó la placa ELISA con el anticuerpo de captura anti-humano IL-15 purificado (eBioscience, Inc. USA) durante toda la noche a 4°C. Se lavó la placa 5 veces con 250 μl /pocillo de buffer de lavado. Se incubó la placa con diluyente de análisis 1X a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa 5 veces con solución amortiguadora de lavado. Se adicionaron 100 μl /pocillo de estándar en los pocillos correspondientes y 100 μl /pocillo de las muestras estudiadas en los restantes pocillos. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y se lavó 5 veces con solución amortiguadora de fosfato. Posteriormente, se incubó la placa con 100 μl /pocillo del anticuerpo de detección (anticuerpo anti-humano IL-15 policlonal conjugado con biotina) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó 5 veces con solución amortiguadora de lavado y se adicionaron 100 μl /pocillo de Avidina-HRP incubándose a temperatura ambiente

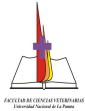
durante 30 minutos. Se lavó nuevamente y se colocó 100 μl /pocillo de Solución Substrato incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detuvo la reacción con 50 μl /pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK[®] Instruments, Inc. USA).

Determinación de Interleuquina-18: En la placa de ELISA que posee el anticuerpo de captura anti-Interleuquina 18 porcino (Neogen Corporation, USA/Canadá) se adicionaron 300 μl /pocillo de solución amortiguadora de lavado, se vaciaron y se adicionaron 100 μl de diluyente de muestra en duplicado en todos los pocillos correspondientes a los estándares y se colocaron 100 μl de estándar en los pocillos designados. Se agregaron 50 μl de diluyente de muestra y 50 μl de la muestra en cada uno de los pocillos correspondientes. Se adicionaron 50 μl /pocillo de reactivo conjugado con biotina, se cubrió la placa y se la incubó a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de microplaca a 200 rpm. Se lavó la placa 3 veces con solución amortiguadora de lavado y se adicionaron 100 μl /pocillo de reactivo conjugado con HRP incubándose a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de microplaca a 200 rpm y se lavó nuevamente. Se colocaron 100 μl /pocillo de solución sustrato TMB incubándose a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 μl /pocillo de Solución Stop y se leyó la placa a 450 nm (BioTeK[®] Instruments, Inc. USA).

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

Resultados

Determinación de IFN- γ : La concentración de IFN- γ (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de



distintos períodos de preñez se observa en la Fig. 1.

En la Fig 2 se observa la regresión de la concentración de IFN- γ (pg/ml) en homogenatos de placenta fetal provenientes de distintos días de la gestación porcina. R^2 ajustado=0,995; $p=0,0033$.

Determinación de IL-6: Al igual que lo descubierto con el IFN- γ , la IL-6 presentó alta concentración a los 32 días de preñez en HoPF (Fig. 3). La regresión de los valores de IL-6 (pg/ml) en suero de cerdas vacías y cerdas en distintos períodos de gestación se presenta en la Fig. 4.

Determinación de IL-12: La concentración de IL-12 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez se observa en la Fig. 5.

Determinación de IL-15: La concentración de IL-15 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez se observa en la Fig. 6.

Determinación de IL-18: La concentración de IL-18 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez se observa en la Fig. 7.

La regresión de la concentración de IL-18 (pg/ml) en homogenato de útero vacío y homogenatos de placenta materna en distintos períodos gestacionales se presentan en la Fig. 8.

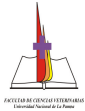
Discusión y Conclusiones

En cerdos, dado el tipo de placenta epiteliochorial y no invasiva, el trofoblasto se encuentra en íntimo contacto con los tejidos maternos; por lo tanto, las interacciones entre los epitelios trofoblástico y endometrial son cruciales. En el presente trabajo nos planteamos estudiar la presencia de citoquinas durante la gestación porcina. Con respecto al IFN- γ , en nuestro trabajo determinamos un pico de producción de IFN- γ a los 32 días de gestación, sólo en HoPF (1.515,07 pg/ml), ya que en HoPM hallamos 57,63 pg/ml. En el resto de los períodos estudiados y al momento del parto los valores fueron

menores de 15 pg/ml, límite de sensibilidad del kit utilizado, tanto en los homogenatos de placenta materna y fetal porcina como en sueros. Si bien esta citoquina es reconocida por su función proinflamatoria, en la placenta humana parece actuar como un inhibidor de una invasión trofoblástica excesiva (Hu et al., 2008), por lo que en una especie con placentación no invasiva como la porcina, la elevada concentración pos implantación podría formar parte de los mecanismos que impiden la invasión trofoblástica.

En los estudios realizados con otras especies, ciertos autores (Agarwal et al., 2000; Robertson et al., 2010) observaron un incremento de la IL-6, o de la expresión del gen de la IL-6, al momento del parto en la gestación humana y murina respectivamente. En nuestro trabajo sólo se observó un gran incremento de la concentración de IL-6 en los homogenatos de placenta fetal porcina a los 32 días de gestación, encontrando niveles de concentración muy bajos tanto en HoPM, HoPF como en suero en los diferentes períodos estudiados. La IL-6 es una citoquina pleiotrópica, (Tizard, 2009) que regula la transición del proceso de inflamación, y en la mayoría de los mamíferos para que pueda llevarse a cabo la implantación debe producirse una inflamación controlada que posibilite una gestación exitosa. En el útero porcino la implantación se presenta con particularidades, tales como presencia marcada de estrógenos, además de una remodelación tisular, tanto del útero como de la placenta y los embriones, que implica una gran actividad de angiogénesis y una fuente alternativa de producción de IL-6 es el endotelio vascular durante la inflamación (Male et al., 2008). En nuestro laboratorio hemos observado correlación entre los valores de estrógenos e IL-6 durante los períodos gestacionales estudiados (Koncurat y col., 2010).

También se sabe que la IL-6 es una citoquina capaz de inducir la síntesis de inmunoglobulinas y participa en la glicosilación de las IgG. Margni (1996), demostró que luego de la implantación, en diferentes especies, la madre produce anticuerpos bloqueantes (Ac asimétricos),



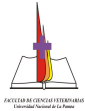
los cuales son esenciales para prevenir el rechazo inmune del feto. Concordando con ese resultado, (Garro et al., 2006; Garro et al., 2010) observaron la presencia de Ac asimétricos en cerdas preñadas en diferentes períodos gestacionales tapizando el lumen endometrial. Por lo tanto, el incremento de IL-6 que se observa en la placenta fetal en el día 32 podría relacionarse con un mecanismo para disminuir las posibilidades de rechazo del conceptus en el que estarían involucrados los anticuerpos asimétricos. Por todo esto, nuestros resultados parecen demostrar que durante la gestación porcina, la IL-6 estaría regulada por la concentración de estrógenos y marcaría el correcto establecimiento de la preñez, contribuyendo además su presencia al comienzo del desarrollo del sistema inmunitario y la osificación fetal (Koncurat et al., 2010).

Hasta el presente no se hallan estudios que evalúen la presencia y el rol de la IL-12 durante el transcurso de la gestación porcina. En nuestro laboratorio, detectamos picos de concentración a los 70 y 90 días de gestación en suero pero que son inferiores a los valores hallados en extractos placentarios maternos, que se mantienen altos y constantes durante toda la gestación. Mientras que en HoPF se encontró un pico de concentración, comprendido entre los 32 y los 44 días de preñez, con valores mayores a los dosados en extractos placentarios maternos. Un rol clásico de la IL-12 es favorecer la respuesta tipo Th1, activando a los macrófagos y a las NK e induciendo la producción de IFN- γ , por lo que aumenta la actividad citolítica de linfocitos T y NK. También se sabe que el IFN- γ aumenta la producción de IL-12 y a su vez que IL-12 puede actuar en forma sinérgica con la IL-18 para provocar una respuesta Th1 (Tizard, 2009).

Pocos trabajos estudiaron la presencia de IL-15 en la gestación. Éstos se refieren solamente al primer trimestre de la gestación humana, especie con placentación hemocorial, deciduada (Verma et al., 2000; Boomsma et al., 2009). Ningún trabajo investigó la presencia de IL-15 en la especie porcina durante su preñez. En el presente estudio se halló que las hembras vacías porcinas presentan una alta

expresión de IL-15 en homogenatos uterinos que difieren significativamente con respecto a los valores hallados durante la gestación. La concentración sérica de IL-15 fue alta y se manifestó de forma pulsátil durante la preñez, salvo a los 70 días que descendió significativamente. Sólo en este período, se halló un aumento de IL-15 en los HoPM y HoPF porcinos en relación a los valores séricos, lo que hace suponer que la IL-15 sería necesaria en la interfase fetomaternal, tanto en los componentes placentarios maternos como fetales. En la mujer la IL-15 está relacionada con la aparición de NK a los 15 días de gestación, nuestros resultados no apoyan estos hallazgos, ya que los aumentos de IL-15 en HoPF se producen solo a los 60-70 días de preñez. Aunque se sabe que las NK aparecen tempranamente en el endometrio gestante porcino (Yu et al., 1993; Engelhardt et al., 1997; Dimova et al., 2008) pensamos que esta citoquina debe cumplir funciones diferentes durante la preñez humana y porcina. Al analizar los resultados obtenidos de IL-15, tanto en suero como en los extractos placentarios, sean de origen fetal o materno, llama la atención que, de todas las citoquinas estudiadas, la IL-15 es la única que se mantiene elevada durante la gestación, disminuyendo solo a término. Se podría suponer que, en parte, su presencia sería necesaria para estimular la síntesis de IgG por células B, ya que en otros estudios hallamos marcada presencia de IgG (simétricas y asimétricas) sobre el lumen uterino gestante, postulando que dichas IgG protegerían la gestación (Garro et al., 2010).

Se halló que la IL-18 se expresa en forma de picos pulsátiles durante el transcurso de la gestación solamente en los extractos placentarios fetales. Según Ashworth et al. (2010), la IL-18 es producida por el endometrio y está relacionada con la implantación porcina, ya que la asocia con el pico de IFN- γ que se observó entre los días 15 y 18 de gestación. Nosotros no encontramos esa asociación en las etapas más avanzadas de la preñez, ya que la IL-18 solo la hallamos a partir de los 44 días de preñez en extractos placentarios fetales, así como también a los 65 y 70 días, mientras

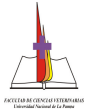


que la presencia del IFN- γ fue notoria a los 32 días. Asimismo, como la IL-15, la IL-18 es producida, también entre otras células por los macrófagos, promueve la producción de IFN- γ y potencia la actividad de las NK induciendo una respuesta inmune tipo Th1 (Male et al., 2008). Además, estas dos citoquinas se expresan solamente en los extractos placentarios fetales en momentos semejantes de la gestación porcina, lo que hace suponer que son sintetizadas por el componente placentario fetal.

Con respecto a las citoquinas estudiadas, se destaca su presencia sobre todo en los extractos placentarios fetales y que se presentan como relevantes en dos momentos de la gestación, a los 32 días y a los \pm 60 días. Desde el punto de vista de la biología reproductiva de la cerda, dichos tiempos marcan eventos importantes. Así, 32 días en una gestación exitosa, es considerada como el inicio de la osificación fetal y el comienzo del desarrollo del sistema inmunológico fetal. Por otro lado, alrededor del día 60 se alcanza al mayor crecimiento placentario, ya que a partir de ahí, son los fetos los que presentan el mayor aumento de tamaño con respecto al desarrollo de la placenta. Ya Butler y Howard en 2002 postularon que, en cerdos, el paradigma establecido en ratón de células Th1/Th2 no se puede determinar, debido a las particularidades de las poblaciones linfocitarias porcinas y a los perfiles de liberación de citoquinas que poseen. En coincidencia con ellos no creemos que una preñez porcina exitosa deba reflejar una respuesta inmune tipo Th2 como fue postulado por Wegmann et al. (1993), ya que encontramos un perfil de citoquinas diferente. Nuestros resultados son coincidentes con los estudios más actuales que parecen demostrar que aún en el ratón, la inmunología de la preñez y la red de citoquinas que se establecen son demasiado complejas para explicarlas solamente mediante el modelo Th1/Th2 (Zenclunsen et al., 2007). Por nuestros resultados postulamos que el hallazgo de las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 en momentos puntuales de la gestación porcina, así como la del IFN- γ , señalarían el rol del sistema inmune innato en la preñez porcina.

Bibliografía

- Agarwal, R.; Loganath, A.; Roy, A.C.; Wong, Y.C.; Lindoff, C and Ng, S.C. 2000.** Increased expression of interleukin 6 in term compared to the first trimester human placental villi. *Horm Metab Res.* 32(5):164-8.
- Amoroso, E.C. 1952.** Placentation. In: *Physiology of Reproduction.* Ed. Marshall's, London. 2:127-331.
- Ashworth, M.D.; Ross, J.W.; Stein, D.R.; White, F.J.; Desilva, U.W. and Geisert, R.D. 2010.** 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.* 8(1):33-41.
- Boomsma, C.M.; Kavelaars, A.; Eijkemans, M.J.; Amarouchi, K.; Tklenburg, G.; Gutknecht, D.; Fauser, B.J.; Heijnen, C.J. and Macklon, N.S. 2009.** Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online.* 18(1):85-94.
- Butler, J.E.; Howard, C. 2002.** Summary of the comparative immunoglobulin workshop (CIgW) on immunoglobulins (Igs) and Fc receptors. *Vet Immunol Immunopathol.* 87(3-4):481-84
- Costeas, P.A.; Koumouli, A.; Giantsiou-Kyriakou, A.; Papaloizou, A and Koumas, L. 2004.** Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss. *Hum Immunol.* 65(2):135-41.
- Dantzer, V. 1985.** Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat Embryo.* 172:281-93.
- Dimova, T.; Mihaylova, A.; Spassova, P and Georgieva, R. 2008.** Superficial implantation in pigs is associated with decreased numbers and redistribution of endometrial NK-cell populations. *Am J Reprod Immunol.* 59:359-69.
- Engelhardt, H.; Croy, B.A. and King, G.J. 1997.** Role of uterine immune cells in early pregnancy in pigs. *J Rep Fert.* 52:115-31.
- Garro, A.; Gentile, T.; De León, R. y Koncurat, M. 2006.** Determinación de IgG asimétricas en sueros de hembras preñadas en diferentes períodos gestacionales. En: *Memorias V congreso de producción*



- porcina del MERCOSUR; Córdoba, Argentina. 2006. p. 266.
- Garro, A.; Gentile, T.; De León, R. y Koncurat, M. 2010.** Determinación de anticuerpos asimétricos en extractos placentarios porcinos. En: XXVII Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. Tafí del Valle, Tucumán, Argentina. 2010. p. 231.
- Gutierrez, G.; Junovich, G.; Dubinsky, V.; Pasqualini, R.S. y Gentile, M.T. 2008.** El rol de la interleuquina 6 en el éxito gestacional. SAEGRE. 15:43-7.
- Hasan, M.; Najjam, S.; Gordon, M.Y.; Gibbs, R.V. and Rider, C.C. 1999.** IL-12 is a heparin-binding cytokine. J Immunol. 162:1064-70.
- Hu, Y.; Tan, R.; MacCalman, C.D.; Eastbrook, G.; Park, S.; Dutz, J.P. and von Dadelszen, P. 2008.** IFN- γ -mediated extravillous trophoblast outgrowth inhibition in first trimester explant culture: a role for insulin-like growth factors. Mol Hum Rep. 14(5):281-9.
- Huang, H.Y. 2006.** The cytokine network during embryo implantation. Chang Gung Med J. 29(1):25-36.
- Joyce, M.M.; Burghardt, J.R.; Burghardt, R.C.; Hooper, N.; Bazer, F.W. and Johnson, G.A. 2008.** Uterine MHC class I molecules and 2-microglobulin are regulated by progesterone and conceptus interferons during pig pregnancy. J Immunol. 181:2494-505.
- Koncurat, M.A. 2003.** Estudio inmunoendócrino de la preñez porcina. Papel de la placenta [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Koncurat, M.A.; Martinez, R.; Greco, C. y Vivas, A. 2001.** IFN- γ concentration in serum and porcine placental extracts from different gestation ages. Biocell. 25(3):23.
- Koncurat, M.A.; Yaful, G.N.; Riesco, O.F. y Williamson, D.M. 2010.** Determinación de IL-6, progesterona y estrógenos en la preñez porcina temprana. En: Memorias XXVII Jornadas científicas Asociación de biología de Tucumán. 2010 Octubre 13-15; Tafí del Valle, Tucumán, Argentina. p. 145.
- Male, D.; Brostoff, J.; Roth, D. and Roitt, I.M. 2008.** Inmunología. Fundamentos. 11 ed. Ed. Panamericana SA, España.
- Margni, R.A. 1996.** Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5 ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. p. 799-851.
- Margni, R.A. and Zenclussen, A.C. 2001.** During pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies. Am J Reprod Immunol. 46:181-87.
- Oh, M.J. and Croy, B.A. 2008.** A map of relationships between uterine natural killer cells and progesterone receptor expressing cells during Mouse pregnancy. Placenta. 29(4):317-23.
- Robertson, S.A. 2000.** Control of the immunological environment of the uterus. Reviews of Reprod. 5:164-74.
- Robertson, S.A.; Christiaens, I.; Dorian, C.L.; Zaragoza, D.B.; Care, A.S.; Banks, A.M. and Olson, D.M. 2010.** Interleukin-6 is an essential determinant of on-time parturition in the mouse. Endocrinol. 151(8):3996-4006.
- Tizard, I.R. 2009.** Introducción a la inmunología veterinaria. 8 ed. Ed. Elsevier, España.
- Verma, S.; Hiby, S.E.; Loke, Y.W. and King, A. 2000.** Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. Biol Reprod. 62:959-68.
- Wegmann, T.G.; Lin, H.; Guilbert, L. and Mosmann, T. 1993.** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? Immunol Today. 14:353-6.
- Yu, Z.; Croy, B.A.; Chapeau, C. and King, G.J. 1993.** Elevated endometrial natural killer cell activity during early porcine pregnancy is conceptus-mediated. J Rep Immunol. 24(2):153-64.
- Zenclussen, A.C.; Schumacher, A.; Zenclussen, M.L.; Wafula, P. and Volk, H.D. 2007.** Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. Expert Rev Mol Med. 9(10):1-14.

Fig. 1: Concentración de IFN- γ (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

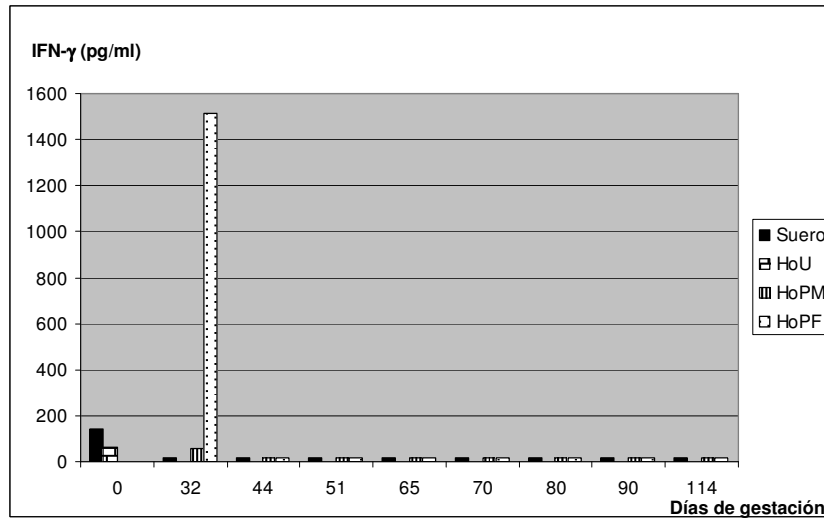


Fig. 2: Regresión de la concentración de IFN- γ (pg/ml) en homogenatos de placenta fetal provenientes de distintos días de la gestación porcina. Los valores menores a 15 pg/ml fueron considerados iguales a 15 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = 0,0005x^4 - 0,1508x^3 + 17,6883x^2 - 895,6747x + 16510,964$;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

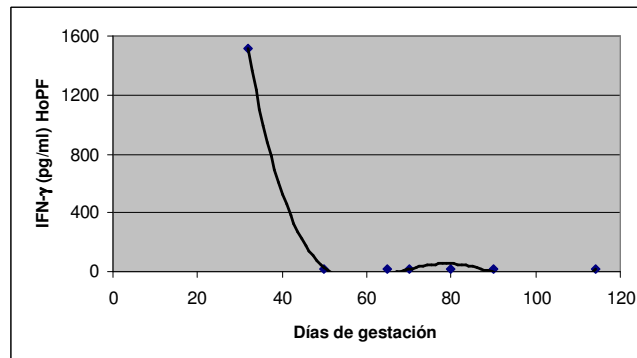


Fig. 3: Concentración de IL-6 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

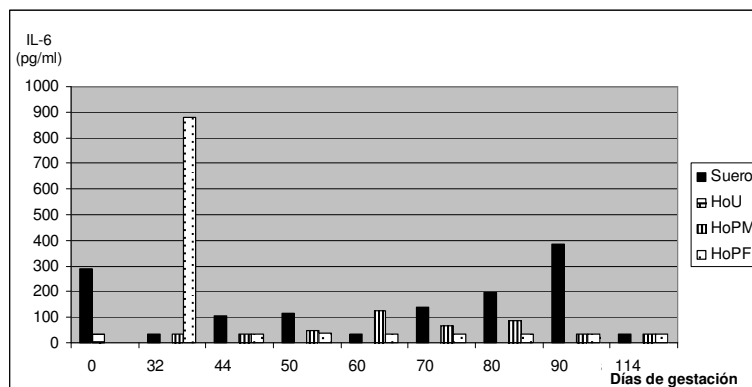


Fig. 4: Regresión de los valores IL-6 (pg/ml) en suero de cerdas vacías y cerdas en distintos períodos de gestación. Los valores menores a 34 pg/ml fueron considerados iguales a 34 pg/ml. Polinomio de cuarto orden; $y = -0,0001x^4 + 0,0114x^3 - 0,57x^2 + 2,7512x + 281,6792$; R^2 ajustado = 0,6227; $p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

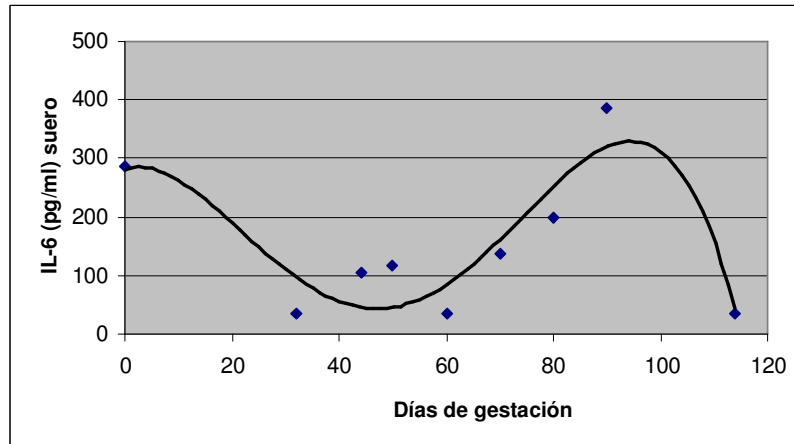


Fig. 5: Concentración de IL-12 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

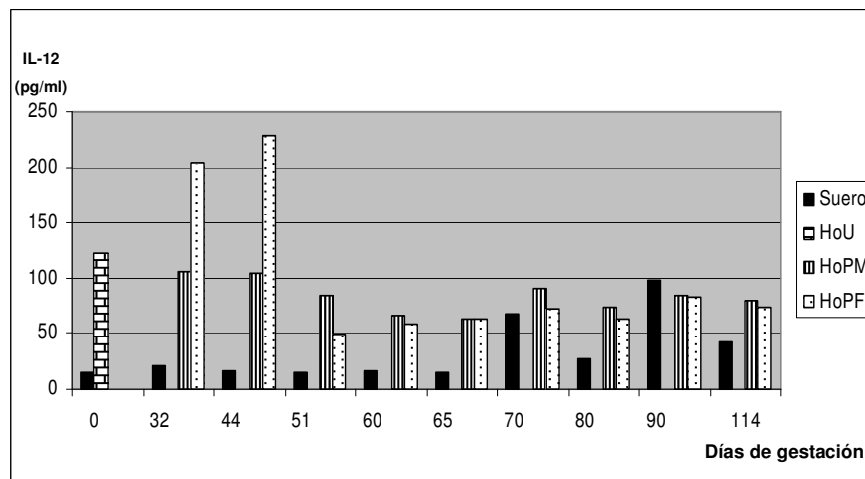


Fig. 6: Concentración IL-15 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

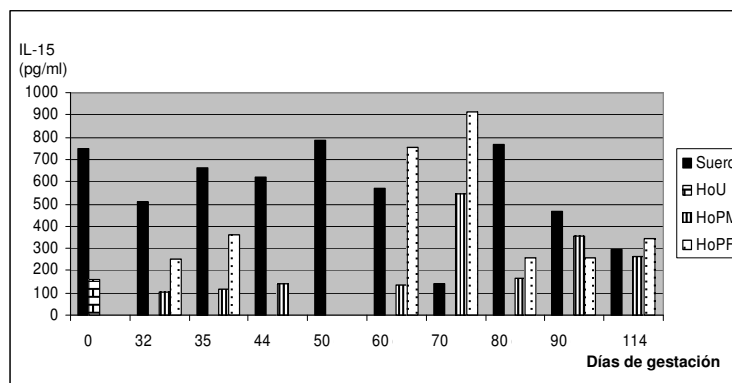


Fig. 7: Concentración IL-18 (pg/ml) en suero, homogenatos de útero vacío (HoU) (día 0) y homogenatos de placenta materna y fetal provenientes de distintos períodos de preñez.

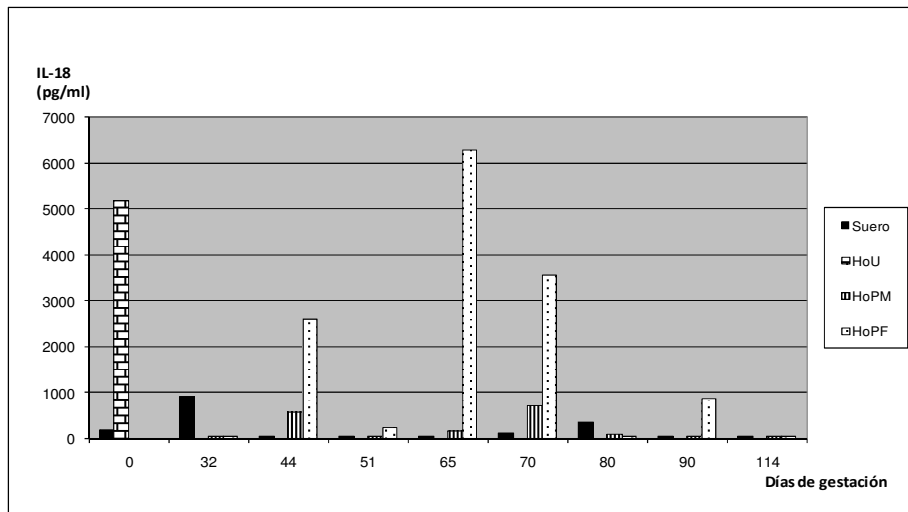


Fig. 8: Regresión de la concentración de interleuquina 18 (pg/ml) en homogenatos de útero vacío y homogenatos de placenta materna en distintos períodos gestacionales. Los valores menores a 39 pg/ml fueron considerados iguales a 39 pg/ml. Polinomio cúbico; $y = -0,0153x^3 + 3,3739x^2 - 231,1314x + 5086,898$; R^2 ajustado = 0,9206; $p = 0,0011$.

