

## Concentración de progesterona y expresión de las Integrinas $\alpha V\beta 3$ , $\beta 1$ y $\alpha 3$ durante la placentación porcina

### Progesterone concentration and $\alpha V\beta 3$ , $\beta 1$ y $\alpha 3$ integrins expression during porcine placentation

Williamson, D<sup>1</sup>; Yaful, G<sup>2</sup>; Riesco, O<sup>1</sup> y Koncurat, M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Básicas, <sup>2</sup>Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Argentina. [dmw@vet.unlpam.edu.ar](mailto:dmw@vet.unlpam.edu.ar)

#### Resumen

La placenta porcina es epiteliochorial, difusa, plegada, adecidua y no invasiva. Por su ubicación es el blanco del sistema endocrino y de la expresión de moléculas de adhesión, como las integrinas. El objetivo del trabajo fue investigar la concentración de progesterona en extractos placentarios fetales y maternos y su posible efecto sobre la expresión de las integrinas  $\alpha V\beta 3$ ,  $\beta 1$  y  $\alpha 3$  en cortes de placenta porcina de diferentes estadios gestacionales. Para la cuantificación de Progesterona se utilizó radioinmunoanálisis y la presencia de integrinas se determinó por inmunohistoquímica. La Integrina  $\alpha V\beta 3$  a los 37 días de gestación evidenció positividad intermedia en las vellosidades maternas. A los 60 días se observa marcada positividad y a los 70 días se observó baja positividad en vellosidades maternas. Las vellosidades trofoblásticas y maternas evidenciaron gran presencia de la subunidad  $\beta 1$  desde el inicio hasta los 80 días de gestación, disminuyendo a término. Las vellosidades trofoblásticas fetales y maternas evidenciaron alta presencia de  $\alpha 3$  a través de la gestación. Con respecto a la progesterona, se observó en los homogenatos de útero vacío baja concentración en relación al suero de hembras vacías. La concentración de progesterona en extractos placentarios fetales fue incrementándose al avanzar la gestación. En conclusión, se puede suponer que serían necesarias la integrina  $\alpha V\beta 3$  y la subunidad  $\beta 1$  en las vellosidades para mantener la adhesión del trofoblasto con el epitelio uterino durante la gestación, ya que disminuyen a término. Con respecto a la progesterona, no hallamos correlación con la expresión de las integrinas estudiadas.

**Palabras clave:** porcino, placenta, gestación, integrinas, progesterona.

#### Abstract

The porcine placenta is epitheliochorial, folded, adecidua, non invasive and diffuse. For its location, are the target of the endocrine system and the expression of adhesion molecules, as integrins. The aim of this study was to investigate the progesterone concentration in fetal and maternal placental extracts, and the effects that she may cause over the integrins expression  $\alpha v\beta 3$ ,  $\beta 1$  and  $\alpha 3$  in placental porcine slices of different gestational periods. For the quantification of progesterone was used radioimmunoassay and the presence of integrins was detected by immunocytochemistry. The  $\alpha v\beta 3$  integrin in maternal villi showed, moderate positivity at 37 days, high positivity at 60 days and low positivity at 70 days of gestation. Trophoblastic and maternal villi showed high presence of  $\beta 1$  subunits from the beginning to the day 80 of gestation, decreasing at term. Fetal trophoblastic and maternal villi exhibited high intensity of integrin  $\alpha 3$  throughout the pregnancy. In homogenates of porcine empty uterus we observed low concentration of progesterone in relation to empty female serum. Progesterone concentration in fetal placental extracts increases during gestation. In conclusion, results of this study suggested that  $\alpha v\beta 3$  integrins and  $\beta 1$  subunit could be necessary to keep the adhesion of trophoblastic with uterin epithelium during gestation, cause these decreases at term. Progesterone concentration showed none correlation with integrins expression studied.

**Keywords:** porcine, placenta, gestation, integrins, progesterone.

#### Introducción

En los mamíferos la gestación es un fenómeno que depende de precisas interacciones, que son originadas y reguladas por y entre el *conceptus* y su madre, siendo la placenta el órgano materno embrionario indispensable para una gestación exitosa. La placenta porcina es epiteliochorial, difusa, plegada, adecidua y no invasiva. Por su ubicación de barrera entre la madre y los embriones es el blanco natural del sistema endocrino y de la expresión de las moléculas de adhesión, en especial las integrinas que cumplen funciones necesarias para mediar la adhesión entre el trofoectodermo y el epitelio uterino materno. Las integrinas son proteínas heterodiméricas transmembranas constituidas por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que participan en múltiples

eventos reproductivos incluyendo fertilización, implantación y placentación en varias especies (Bowen et al., 2000). En la implantación en humanos son consideradas marcadores de receptividad uterina, lo que ocurre en el útero bajo la influencia de la progesterona. Durante la implantación en ratones, la integrina  $\alpha 4\beta 1$  es inducida por estradiol y regulada negativamente por progesterona (Basak et al., 2002). La gestación porcina se caracteriza por presentar una secreción continua de progesterona por parte del cuerpo lúteo, hormona que requieren todos los mamíferos para el soporte, supervivencia y desarrollo de la preñez (Spencer and Bazen, 2002). La exposición del endometrio a la progesterona en la preñez temprana disminuye los receptores de progesterona en el epitelio, proceso que está asociado con la disminución de la mucina de la superficie celular y de proteínas de adhesión (Spencer et al., 2004). En cerdos, la progesterona incrementa la expresión de  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  durante el período peri-implantación lo que podría en parte definir la ventana de implantación en esta especie (Burghardt et al., 2002; Bowen et al., 1996, 2000). Se ha hallado que en la placenta fetal se encuentra una concentración de progesterona marcadamente superior a la hallada en la placenta materna (Yaful y et al., 2005). El objetivo de este trabajo fue investigar la concentración de progesterona hallada en extractos placentarios fetales y maternos y su posible efecto sobre la expresión de las integrinas  $\alpha V\beta 3$ ,  $\beta 1$  y  $\alpha 3$  en cortes histológicos de placenta porcina provenientes de diferentes estadios gestacionales.

### Materiales y Métodos

Muestras sanguíneas y placentarias de cerdas mestizas de la zona de General Pico, La Pampa, Argentina ( $35^{\circ} 62'$  y  $63^{\circ} 45'$  de latitud y longitud respectivamente) de aproximadamente: 37, 60, 70, 80 días de gestación y a término (114 días de gestación) y útero vacío fueron estudiadas.

Se estimó la edad gestacional de las placentas de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los embriones y/o los fetos obtenidos de cada cerda gestante (Marrable, 1971).

Los extractos placentarios (Homogenatos de Placenta Porcina (HoPP) y de Útero no Preñado Porcino (HoUP) se obtuvieron de la siguiente manera: a  $\pm 5$  g de tejido placentario porcino con tres partes de solución fisiológica se los molió, se centrifugó y el sobrenadante se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Koncurat et al., 1999). Para la cuantificación de Progesterona ( $P_4$ ) en HoUP, HoPM y sueros se utilizó la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) competitivo en fase sólida (Margni, 1996).

La Integrina  $\alpha V\beta 3$  en muestras de tejido placentario se detectó mediante el uso de un anticuerpo de ratón anti-integrina  $\alpha V\beta 3$  humana monoclonal conjugado con biotina (Chemicon); la subunidad de las Integrinas  $\beta 1$  se detectó mediante el uso de un anticuerpo de ratón anti-subunidad de integrina  $\beta 1$  humana monoclonal (Chemicon) y la subunidad de las integrinas  $\alpha 3$  mediante un anticuerpo de conejo anti-integrina  $\alpha 3$  humana policlonal (Chemicon) que se revelaron con una anti-mouse inmunoglobulinas/HRP de cabra policlonal (DakoCytomation). Las muestras fueron observadas con un microscopio Axiophot (Zeiss) y la adquisición de imágenes se realizó con una cámara Canon, PowerShot G6, 7,1 megapíxeles (Canon, Japón).

Los resultados de la expresión de integrinas se expresaron en forma cualitativa en función de la coloración detectada, determinando que: (-) negativo; (+) baja positividad; (++) positividad intermedia y (+++) alta positividad.

### Resultados

#### *Expresión de la Integrina $\alpha V\beta 3$ :*

En cerdas vacías, la integrina  $\alpha V\beta 3$  fue detectada con baja positividad (+) a nivel del epitelio uterino. A los 37 días de gestación se observó positividad intermedia (++) a nivel de las vellosidades maternas. A los 60 días, marcada positividad en las vellosidades maternas. A los 70 días se observó alta positividad (+++) en las vellosidades trofoblásticas y baja positividad (+) en las vellosidades maternas. En placentas a término la expresión es baja (+) a nivel de vellosidades trofoblásticas (Tabla 1).

#### *Expresión de la Subunidad de Integrina $\beta 1$*

En útero vacío  $\beta 1$  se observó en el epitelio uterino luminal con baja positividad (+). En vellosidades trofoblásticas tempranas se halló marcada positividad de  $\beta 1$  (+++). A los 60 días, las vellosidades maternas expresaron alta positividad. A los 70 días: marcada positividad de  $\beta 1$  sobre todo en las vellosidades trofoblásticas y positividad intermedia (++) en vellosidades maternas. En placentas a término la expresión a nivel de vellosidades tanto fetales como maternas es baja (Tabla 2).

Tabla 1. Expresión de la subunidad  $\alpha\beta 3$  de las integrinas en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales

Tracto Reproductivo	Epitelio Uterino	Vellosidades		Glándulas Uterinas	Vasos Sanguíneos	Fibras Conectivas	
		Fet.	Mat.			Fet.	Mat.
Útero vacío	+			+++	++		++
37 días		ND	++	++	+++	ND	+++
60 días		ND	+++	+	+++	ND	+++
70 días		+++	+	-	+	+	+
114 días		+			-	+	

Fet: Fetal; Mat: Materno; ND: No Determinado; +, ++, +++: Diferentes Grados de Positividad.

Tabla 2. Expresión de la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales

Tracto Reproductivo	Epitelio Uterino	Vellosidades		Glándulas Uterinas	Vasos Sanguíneos	Fibras Conectivas	
		Fet.	Mat.			Fet.	Mat.
Útero vacío	+			+++	++		++
37 días		+++	ND	ND	++	+	ND
60 días		ND	+++	++	++	ND	++
70 días		+++	++	+++	+++	+	++
80 días		+++	++	++	+++	++	++
114 días		+	+	++	++	+	++

Fet: Fetal; Mat: Materno; ND: No Determinado; +, ++, +++: Diferentes Grados de Positividad.

#### Expresión de la Subunidad de Integrina $\alpha 3$

La Subunidad de las integrinas  $\alpha 3$  se observó en útero vacío con positividad intermedia (++) a nivel del epitelio uterino y negativa (-) a nivel de glándulas uterinas. Se expresó con alta positividad a través de la gestación a nivel de las vellosidades maternas (+++). A nivel de glándulas uterinas se observó negatividad de  $\alpha 3$  en todos los períodos gestacionales estudiados. Los resultados se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3. Expresión de la subunidad  $\alpha 3$  de las integrinas en útero vacío y placentas de diferentes períodos gestacionales

Tracto Reproductivo	Epitelio Uterino	Vellosidades		Glándulas Uterinas	Vasos Sanguíneos	Fibras Conectivas	
		Fet.	Mat.			Fet.	Mat.
Útero vacío	++			-	++		+
37 días		+++	ND	ND	+++	+	ND
60 días		++	+++	-	++	ND	++
70 días		ND	+++	-	++	ND	++
80 días		ND	++	-	++	ND	++
114 días		+++			+++	++	

Fet: Fetal; Mat: Materno; ND: No Determinado; +, ++, +++: Diferentes Grados de Positividad.

#### Determinación de Progesterona en Homogenatos de Placenta Porcina (HoPP) y Sueros Porcinos

Se observó en los homogenatos de útero vacío baja concentración de progesterona (media: 0,62 ng/ml) en relación al suero de hembras vacías donde fue de 18,62 ng/ml. La concentración de progesterona en extractos placentarios fetales (HoPF) fue incrementándose al avanzar la gestación. Se halló una concentración alta de progesterona en todos los HoPF correspondientes a los días de gestación estudiados, los promedios fueron, día 37: 8,74 ng/ml; día 40: 22,52 ng/ml; día 60: 33,60 ng/ml, día 70: 39,02 ng/ml; día 80: 40,00 ng/ml y a término 40,00 ng/ml. Con respecto a los extractos placentarios maternos (HoPM) las concentraciones fueron bajas, día 37: 0,95 ng/ml, día 40: 1,13 ng/ml; día 60: 2,72 ng/ml; día 70: 2,65 ng/ml; día 80: 3,70 ng/ml y a término: 1,08 ng/ml.

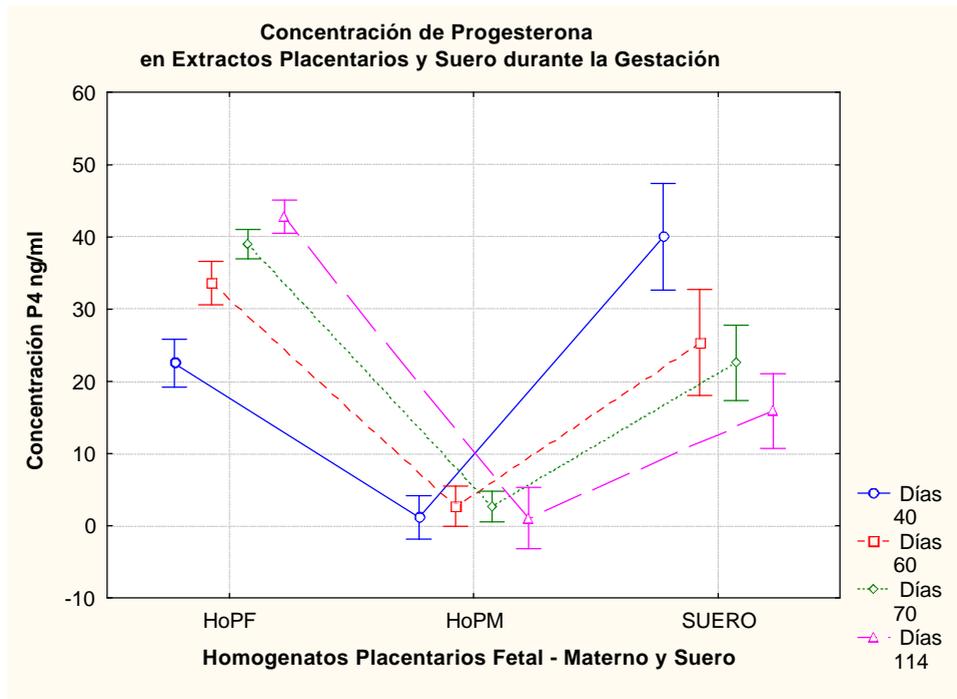


Gráfico 1. Concentración de Progesterona en Extractos Placentarios y Suero durante la gestación.

### Discusión

El trofoblasto porcino es el tejido que se encuentra en íntimo contacto con los tejidos maternos, lo que origina numerosos estudios acerca de la expresión de moléculas de adhesión, esenciales para la formación de la placenta epiteliocorial. Debido a que la placenta porcina posee la característica de autofluorescer las experiencias realizadas en el presente trabajo se efectuaron a través de una técnica de inmunohistoquímica indirecta empleando peroxidasa de rábano picante (Keys et al., 1989). Según Spencer et al., (2004), en cerdos, la progesterona incrementa la expresión de  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 5\beta 1$  durante el período de peri-implantación lo que puede en parte definir la ventana de implantación. En un estudio de Bowen et al., (1996) con cerdas ovariectomizadas y subsecuentemente tratadas con: estrógenos, progesterona o combinación de estrógeno y progesterona, observaron que progesterona sola, o en combinación con estrógenos, drásticamente incrementa los niveles de expresión de las subunidades  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  de las integrinas y en menor grado la subunidad  $\beta 1$ , mientras que las subunidades  $\alpha v$  y  $\beta 3$  no fueron afectadas por los esteroides. Con respecto a la expresión de la integrina  $\alpha v\beta 3$ , observamos que disminuye en las glándulas uterinas a través de la gestación. Además, al fin de la preñez, a pesar de la alta concentración de progesterona hallada en los extractos placentarios fetales, disminuye marcadamente la expresión de  $\alpha v\beta 3$  en las vellosidades fetales. Por otro lado, la expresión de la subunidad de integrina  $\beta 1$  en vellosidades trofoblásticas fetales a lo largo de la gestación no se vería influenciada por la concentración de progesterona hallada en los Homogenatos Placentarios Fetales (HoPF); en placentas a término, su expresión disminuye notablemente a pesar de la alta concentración de progesterona hallada en los HoPF. Además, hallamos que su expresión en las glándulas uterinas no se vería afectada por la concentración de progesterona, ya que detectamos positividad alta (+++) hasta los 70 días de preñez e intermedia (++) a partir de lo 80 días y a término. Con respecto a la subunidad de integrina  $\alpha 3$ , notamos que su expresión es negativa en las glándulas uterinas a través de la gestación, indiferente a la concentración de progesterona en HoPM. A diferencia de las integrinas antes analizadas,  $\alpha 3$  se observó con una expresión elevada en las vellosidades placentarias a lo largo de la preñez, incluidas las placentas expulsadas a término.

### Conclusión

Se puede suponer que sería necesaria la expresión de las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y de la subunidad  $\beta 1$  en las vellosidades para mantener la adhesión del trofoblasto con el epitelio uterino, en parte colaborando en la conformación de la placenta epiteliocorial durante la gestación, ya que solo disminuye su marcaje a término. Con respecto a la concentración de progesterona, a pesar de la gran variación detectada en los extractos placentarios fetales y maternos, no hallamos correlación con la expresión de las integrinas estudiadas.

### Literatura Citada

- Basak, S., R. Dhar and C. Das. 2002. Steroids modulate the expression of  $\alpha 4$  integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation. *Biol Reprod.* 66: 1784-1789.
- Bowen, J.A., Bazer, F.W. and Burghardt, R.C. 1996. Spatial and temporal analyses of integrin and muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoectoderm in vivo. *Biol Reprod.* 55: 1098-1106.
- Bowen, J.A. and J.S. Hunt. 2000. The role of Integrins in Reproduction. *Pro Soc Exp Biol Med.* 223: 331-343.
- Burghardt, R.C.; G.A. Johnson, L.A. Jaeger, H. Ka, J.E. Garlow, T.E. Spencer and F.W. Bazer. 2002. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells, Tissues, Organs special tissue "Molecular Approaches in Cell-Cell Adhesion"*, Essen Symposium, Abstract 171.
- Keys, J. L., G. J. King and J. P. LaForest. 1989. Autofluorescence of the Porcine Endometrium during Early Pregnancy. *Biol Reprod.* 40: 220-222.
- Koncurat, M., C. Greco and A. Vivas. 1999. Hallazgo del factor precoz de preñez (EPF) en extractos placentarios porcinos. *Rev Brasil Reprod Anim.* 3: 193-195.
- Margni, R.A. 1996. *Inmunología e Inmunología. Fundamentos.* 5ta edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. pp 799-851.
- Marrable, A. W. 1971. In: *The embryonic pig: a chronological account.* Ed. Exeter, Pitman Medical. London. pp 30-51.
- Spencer, T.E.; G.A Johnson, R.C Burghardt and F.W Bazer. 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from domestic animals. *Biol Reprod.* 71: 2-10.
- Spencer, T.E.; G.A. Johnson, F.W. Bazer and R.C. Burghardt. 2004. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction.* 128 (6): 657-658.
- Yaful G., O. Riesco y M. Koncurat. 2005. Concentración de progesterona en placenta materna, fetal y líquido amniótico durante la gestación porcina. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 13 (Supl 1): 136-137.