

Detección de inmuoglobulina G en sueros, tejidos y extractos placentarios porcinos

Koncurat, M¹.; Riesco, O¹.; Garro, A¹.; Yaful, G².; Lacolla, D¹.; Bruni, M¹.; Alonso, G¹.; Williamson, D. M¹

¹Departamento de Ciencias Básicas, ²Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.

Resumen

El cerdo posee IgG, IgM, IgA e IgE, habiéndose demostrado una gran homología de secuencia entre las IgGs porcinas y humanas. Poco se conoce acerca de la respuesta inmune humoral durante la preñez porcina. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de IgG porcinas en muestras de suero y extractos placentarios provenientes de cerdas vacías y preñadas de 30 y 91 días de gestación y en tejido placentario a término. En sueros de 15 animales, los valores medios de [IgG] mg/ml, obtenidos por proteinograma electroforético en tiras de acetato de celulosa gelificado, fueron: cerda vacía 23 mg/ml; 30 días: 19,5 mg/ml y a los 91 días de preñez 16,8 mg/ml. Por inmunodifusión radial, utilizando placas comerciales de agar calibradas para determinar la concentración de IgG humanas, pudo determinarse la [IgG] en sueros: cerdas vacías: 26,88 mg/ml; cerdas 30 días: 29,88 mg/ml y en cerdas 91 días 19,24 mg/ml. En extractos placentarios, Homogenatos de Útero Vacío: 3,40 mg/ml; Homogenatos de placentas (HoPP) de 30 días: 1,81 mg/ml y en HoPP de 91 días: 1,50 mg/ml. En los sobrenadantes de Medios de Cultivo de Células Placentarias (MCP) de 30 días: 2,11 mg/ml y en los MCP de 91 días de gestación: 1,20 mg/ml. Se observó, por inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo anti-IgG humano marcado con FITC, fluorescencia (++) sobre cortes desparafinados de placenta

porcina a término, en vellosidades coriónicas fetales en contacto con el lumen uterino. Probablemente dichos anticuerpos pertenezcan al tipo de anticuerpos protectores, asimétricos, descriptos en mujer y ratón.

Palabras claves: porcinos, placenta, IgG.

Summary

Studies have proved that humoral immune response is involved in swine pregnancy. Pigs have IgG, IgM, IgA and IgE. Swine IgG subclasses have their greatest similarity with those of the human, except for the near absence of hinge region variation. The goal of this study was to determine the presence of IgG in porcine serum, tissue and placental extracts. In 15 animals' serum, by means of electrophoresis proteinogram in strips of cellulose acetate, the average values were empty pig (n=5) 23mg/ml; 30 days (n=5) 19.5mg/ml; and 91 days of gestation (n=5) 16.8 mg/ml. By radial immunodiffusion (using calibrated commercial human kits to determine the concentration of human IgG), the average values in porcine serum (n=15) were non-pregnant swine 26.88 mg/ml; 30 days 29.88 mg/ml; 91 days of gestation 19.24 mg/ml. In placental extracts, Porcine Empty Uterus Homogenates: 3.40 mg/ml; Porcine Placenta Homogenates (PPHo) 30 days: 1.81mg/ml; PPHo 91 days: 1.50 mg/ml.

and in Porcine Placenta Conditioned Medium (PPCM) 30 days: 2.11 mg/ml and PPCM 91 days of gestation: 1.20 mg/ml. By direct immunofluorescencia, using one antibody (human anti-IgG conjugated with FITC), we observed: fluorescence (++) on placental tissues at term, in the foetal chorionics villi in contact with the uterine lumen. Probably these antibodies belong to the type of protective and asymmetric immunoglobulin G antibodies described in woman and mouse.

Key words: Swine, Placenta, IgG.

Introducción

Como acontece en la gestación de los mamíferos, en la preñez porcina el rol del sistema inmunitario continúa siendo un enigma inmunológico (Clark et al., 1999). Hasta el momento, los factores que pueden causar la muerte del aloinjerto fetal, como es la presencia de las células T citotóxicas, NK o macrófagos en la interfase feto-materna, o la producción de anticuerpos contra aloantígenos del trofoblasto, no ha sido explicada (Templeton et al., 1987; Clark, 1991; Mattsson et al., 1992; Meeusen et al., 1993; Engelhardt and King, 1996; King et al., 1997; Zhao et al., 1998; Arck et al., 1999).

La preñez porcina es un fenómeno fisiológico que depende de precisas interacciones, originadas y reguladas por y entre los *conceptus/fetos* y su madre, siendo la placenta el órgano inmuno-endócrino, materno embrionario, indispensable para una gestación exitosa. La placenta porcina se caracteriza por ser difusa, plegada, no invasiva, adecuada y epiteliocorial, (Amoroso, 1952; Dantzer et al., 1981). Durante la gestación porcina la respuesta inmune humoral es desempeñada por los linfocitos B en su doble papel: como células presentadoras

de antígenos y como células productoras de anticuerpos. A diferencia de la mujer, se acepta que en la cerda, dado el tipo de placenta, los anticuerpos encargados de la transferencia de la inmunidad pasiva de la madre al nuevo ser no se realizan (Tizard, 2000). Los anticuerpos son proteínas elaboradas por los vertebrados al ser estimulados con un antígeno y tienen capacidad para reaccionar específicamente con el inductor para producir su neutralización. La IgG porcina y humana comparten una gran homología de secuencia aminoacídica, un alto grado de similitud en las secuencias de sus genes de inmunoglobulinas y aproximadamente el mismo radio de sus cadenas livianas κ/λ (Butler et al., 1996), siendo el 85% del total de las inmunoglobulinas porcinas de la clase IgG (Tizard, 2000). Comprender los mecanismos que posibilitan la preñez porcina permitirá originar estrategias que incrementen la tasa de sobrevivencia embrionaria, en esta especie de alto valor productivo. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de IgG en muestras de suero y extractos placentarios porcinos provenientes de diferentes períodos gestacionales para comprender el papel del sistema inmune humoral durante la gestación porcina.

Materiales y Métodos

Sueros Porcinos

Se extrajo 10 ml de sangre a 15 cerdas mestizas, gestantes (5 de ± 30 días de preñez y 5 de ± 91 días de preñez) y a 5 cerdas vacías, provenientes de criaderos de la zona de General Pico, La Pampa. Una vez extraída la sangre, la misma fue puesta en un baño termostatizado (37 °C) por el término de media a una hora a los efectos de lograr una adecuada retracción del coágulo y del exudado del suero. Luego el suero se

clarificó por centrifugación a 1800 rpm durante 10 min, se fraccionó en alícuotas y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Inmunodifusión Radial (IDR)

Las muestras de suero se colocaron en placas comerciales de agar calibradas para determinar la concentración de inmunoglobulinas G, M y A (IgG, IgM e IgA) humanas, en función del halo de precipitación formado (Kallestad endoplate, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc.)

Cuantificación de Proteínas

Se determinó la concentración de proteínas en las diferentes muestras de suero realizando proteinogramas electroforéticos en tiras de papel de acetato de celulosa gelificado.

Placentas Porcinas

Se obtuvieron 15 placentas de cerdas gestantes de 30 y 91 días de gestación y a término (114 días) determinadas en función de la longitud céfalo-caudal de los fetos (Marrable, 1971). En todos los casos el tracto reproductivo fue removido inmediatamente después de la muerte del animal y lavado con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco) conteniendo 10.000U/ml de penicilina G sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomina y 2,5 µg/ml de fungizona (Gibco). Se tomaron muestras del tejido mesometrial endometrial y placentario fetal. Dado el tipo de placenta, no invasiva, se pudo separar el constituyente placentario materno del fetal ejerciendo presión sobre estos tejidos.

Microscopía Óptica

Las muestras de tejido placentario se fijaron con formol tamponado al 10% con fosfato y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de ±5 µm y parte de dichos cortes se colorearon con

Hematoxilina Eosina para el estudio de la estructura placentaria.

Inmunofluorescencia Directa (IFD)

Se realizó inmunofluorescencia directa sobre cortes de tejido placentario fetal provenientes de cerdas de 30, 91 días de gestación y a término. Se incubaron 1 h en oscuridad, en cámara húmeda, con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas totales (Igs) humanas, hecho en cabra y conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fluoline-“H”, BioMérieux SA.). Se lavó 3 veces cada portaobjeto con PBS, 10 min cada vez, a temperatura ambiente. Se observó con un microscopio epifluorescente (Nikon).

Extractos Placentarios

Úteros de cerda vacía y placentas de 30, 91 días de gestación y a término fueron procesadas para la elaboración de extractos placentarios: Homogenatos de Placenta Porcina (HoPP), Homogenatos de Útero Vacío Porcino (HoUP) y Medios Condicionados de Placenta Porcina (MCPP).

Homogenatos de Placenta Porcina (HoPP)

Trozos de placenta se homogeneizaron con un molinillo Moullinex 1:3 con PBS, la pulpa resultante se centrifugó 2 veces a 1700 rpm durante 10 min, el sobrenadante se alicuotó y se guardó a -20° C hasta su uso.

Homogenatos de Útero Porcino (HoUP)

De la misma manera que los HoPP se procesaron los úteros de cerda vacía para la confección de Homogenatos de útero vacío.

Medio Condicionado de Placenta Porcina (MCPP)

Parte de la pulpa placentaria se colocó en frascos de cultivo Falcon en proporción 1:20 con Mc Coy's 5 A suplementado con 10% de SFB, 1% de antibióticos y antimicóticos y 25 mM de HEPES. Fueron incubados a 37° C en

estufa gaseada por 96 h con 5% de CO₂. Al cabo de ese período, se descartaron los restos de tejido, se ultracentrifugó a 22.000g durante 30 min. Se recogió el sobrenadante, se esterilizó por filtración (membranas 0,22µm), se alicuotó y se guardó a -20° C hasta su uso, obteniéndose así el Medio Condicionado de Placenta Porcina (MCP).

Resultados

Proteinograma electroforético en acetato de celulosa gelificado

En la Tabla 1 se encuentran los valores absolutos (mg/ml) y relativos (%) de proteínas séricas provenientes de cerdas vacías y gestantes de 30 y 91 días de gestación, determinadas por electroforesis con tiras de acetato de celulosa gelificado.

Tabla 1. Determinación de la concentración de proteínas séricas porcinas. Valores Relativos (%) y Absolutos (mg/ml) en muestras de suero provenientes de cerda vacía y de 30 y 91 días de gestación, por electroforesis.

MUESTRAS	Cerde vacía		Cerde 30 días		Cerde 91 días	
	VALORES RELATIVOS (%)	VALORES ABSOLUTOS (mg/ml)	VALORES RELATIVOS (%)	VALORES ABSOLUTOS (mg/ml)	VALORES RELATIVOS (%)	VALORES ABSOLUTOS (mg/ml)
Albúmina	47,2	37,9	47,5	33,3	55,7	37,5
Alfa globulinas	19,5	15,7	20,0	14,0	15,3	10,3
Beta globulinas	4,6	3,7	4,6	3,2	3,9	2,6
Gamma globulinas	28,6	23,0	27,8	19,5	25,0	16,8
Proteínas totales		80,3		70,1		67,3
Globulinas		42,4		36,8		29,8
Indice A/G		8,9		9,0		12,6

En la Tabla 2 se hallan los resultados obtenidos de concentración de IgG (mg/ml) en sueros y extractos

placentarios porcinos por inmunodifusión radial (IDR).

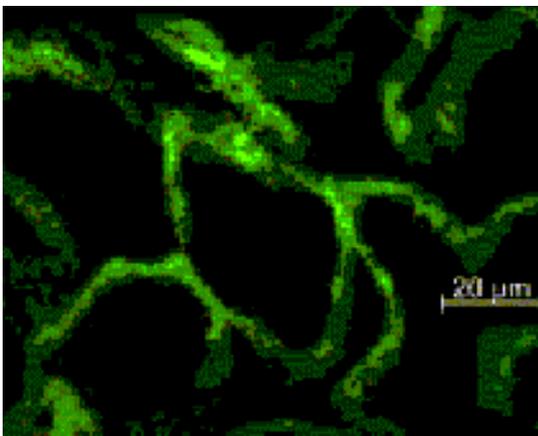
Tabla 2. Concentración de IgG (mg/ml) en sueros y extractos placentarios porcinos. Valores obtenidos de IgG, por inmunodifusión radial, en sueros y extractos placentarios porcinos (HoPP, HoUP y MCPP), provenientes de cerdas vacías y preñadas de 30 y 91 días de gestación.

		<u>Concentración de IgG (mg/ml)</u>
<u>Sueros</u>		
A. Cerda vacía	1:2	26,88 mg/ml
B. Cerda 30 días	1:2	29,88 mg/ml
C. Cerda 91 días	1:2	19,24 mg/ml
<u>Extractos placentarios</u>		
HoUP Homogenato útero vacío		3,40 mg/ml
HoPP Homogenato Placenta 30 días		1,81 mg/ml
HoPP Homogenato Placenta 91 días		1,50 mg/ml
MCPP Medio Condicionado de Placenta 30 días		2,11 mg/ml
MCPP Medio Condicionado de Placenta 91 días		1,20 mg/ml

Nota: Los estándares fueron calibrados contra el RPPHS (Reference Preparation for Proteins in Human Serum).

En la Foto 1 se observa inmunofluorescencia (++) en las vellosidades trofoblásticas placentarias a término marcadas con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas totales humanas conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Foto 1.



No se obtuvieron resultados cuantificables para las IgM e IgA utilizando antisueros humanos por inmunodifusión radial.

Discusión

Se observó una neta disminución de las globulinas en sueros de cerdas de 91 días de preñez, que se aprecia en el índice albúmina/globulinas, siendo más marcada la disminución de la fracción gammaglobulina (γ -globulinas). Dicho descenso de las γ -globulinas se explica por la captación de inmunoglobulinas por parte de la glándula mamaria, que posee receptores para unir la cadena pesada de la IgG₁. Las inmunoglobulinas forman parte del calostro, esencial en la sobrevivencia de los lechones dado el tipo de placenta no invasiva (Watson, 1980; Wagstrom et al., 2000).

No fue posible determinar diferencias significativas en la fracción γ -globulinas de sueros provenientes de cerdas vacías y preñadas, si se los considera desde el punto de vista de animales “normales” e “inmunizados”, dada la gran variabilidad que ocurre normalmente, de concentración de inmunoglobulina G (IgG), en el suero de los porcinos (17,00 a 29,00 mg/ml) (Tizard, 2000). Por inmunodifusión tampoco es posible demostrar diferencias antigénicas entre anticuerpos precipitantes y no-precipitantes provenientes de la misma

muestra de suero (Margni, 1996) y esto permite suponer que sea poco probable que el diferente comportamiento de ambos tipos de anticuerpos pueda estar relacionado con diferencias en su idiotipo (Gentile, 1993).

Los valores obtenidos por inmunodifusión radial de concentración de IgG en los diferentes extractos placentarios confeccionados muestran concentraciones muy inferiores a los hallados en sueros, tanto en las muestras provenientes de cerda vacía como en los diferentes períodos gestacionales estudiados, sin presentar diferencias significativas entre ellos.

De todas las clases de inmunoglobulinas, la mejor estudiada hasta el momento es la IgG. La IgG porcina y humana comparten una gran homología de secuencia aminoacídica (Kacskovics et al., 1994), un alto grado de similitud en las secuencias de sus genes de inmunoglobulina (Butler et al., 1996) y aproximadamente el mismo radio de sus cadenas κ/γ (Butler y Brown, 1994; Butler et al., 1996). El 85% del total de las inmunoglobulinas porcinas son tipo IgG, correspondiendo a la IgM sólo un 12% (Tizard 2000). Debido a estas propiedades de la molécula de IgG porcina es que se pudo determinar su presencia, por inmunodifusión radial, en sueros de cerdas vacías y preñadas de 30 y 91 días utilizando una molécula anti IgG humana. Con esta técnica se obtuvo valores de IgG ligeramente superiores a los hallados en los proteinogramas electrofóreticos; esto se explica por las características de la difusión radial, que se utiliza con muy buenos resultados en la valoración de proteínas que se encuentran presentes en mezclas complejas como son los componentes del suero (Margni, 1996). Asimismo, pudo demostrarse la presencia de anticuerpos sobre cortes de tejido placentario a término utilizando una anti inmunoglobulina total humana marcada

con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Conclusiones

Por inmunofluorescencia directa se pudo investigar la presencia de los anticuerpos sobre todos los cortes de tejido placentario porcino a término, lo que demostraría la participación del sistema inmune humoral en la gestación porcina. Probablemente dichos anticuerpos pertenezcan al tipo de anticuerpos asimétricos descritos en mujer y ratón y cuya función sería anular determinantes antigénicos expuestos a la acción de otros anticuerpos o de linfocitos citotóxicos, funcionando como anticuerpos protectores (Margni, 1996; Margni y Malan Borel, 1998; Zenclussen et al., 2001).

Bibliografía

- Amoroso, E. C.** 1952. Placentation. In: Marshall's Physiology of Reproduction. Ed. Parkes A. S. London: Longmans Green. Vol. 2, p 127-311.
- Arck, P.; Dietl, J. y Clark, D.** 1999. From the decidual cell internet: trophoblast-recognizing T cells. *Biology of Reproduction*, 60: 227-233.
- Butler, J. E. y Brown, W. R.** 1994. The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 43: 5-12.
- Butler, J. E.; Sun, J.; Kacskovics, I.; Brown, W. R. y Navarro, P.** 1996. The V_H and C_H immunoglobulin genes of swine: implications for repertoire development. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 54: 7-17.
- Clark, D. A.** 1991. Controversies in reproductive immunology. *Critical Review Immunology*, 11: 215-247.
- Clark, D. A.; Arck, P. C. y Chaouat, G.** 1999. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective

- pressure expressed at the uterine level. *American Journal Reproductive Immunology Microbiology*, 41: 5-22.
- Dantzer, V.; Björkaman, N. y Hasselager, E.** 1981. An electron microscopic study of histiotrophe in the interareolar part of the porcine placenta. *Placenta*, 2: 19-28.
- Engelhardt, H. y King, G. J.** 1996. Uterine natural killer cells in species with epitheliochorial placentation. *Nature Immunology*, 15: 53-69.
- Gentile, T.** 1993. Los anticuerpos IgG asimétricos durante la preñez en ratas. Su importancia en la aceptación del feto semialogeneico. Tesis Doctoral Universidad de Buenos Aires.
- Kacsokovics, I.; Jishan, S. y Butler, J. E.** 1994. Five putative subclasses of swine IgG identified from the cDNA sequences of a single animal. *Journal Immunology*, 153: 3565-3573.
- King, A.; Loke, Y. W. y Chauat, G.** 1997. NK cells and reproduction. *Immunology Today*, 18: 64-66.
- Margni, R. A.** 1996. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Edición 5ta. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. p. 345-361.
- Margni R.; Malan Borel, I.** 1998. Paradoxical behavior of asymmetric IgG antibodies. *Inmunology Review*, 63: 77-87.
- Marrable, A. W.** 1971. In: *The embryonic pig: a chronological account*. Ed. Exeter, Pitman medical, London.
- Mattsson, R.; Mattson, A.; Holmdahl, R.; Scheynius, A. y Van der Meide, P. H.** 1992. In vivo treatment with interferon-gamma during early pregnancy in mice induces strong expression of major histocompatibility complex class I and II molecules in uterus and deciduas but not in extra-embryonic tissues. *Biology Reproduction*, 46: 1176-1186.
- Meeusen, E.; Fox, A.; Brandon, M. y Lee, C. S.** 1993. Activation of uterine intraepithelial gamma delta T cell receptor-positive lymphocytes during pregnancy. *European Journal Immunology*, 23: 1112-1117.
- Templeton, J. W.; Tipton, R. C.; Garber, T.; Bondioli, K. y Kraemer, D. C.** 1987. Expression and genetic segregation of parenteral BoL a serotypes in bovine embryos. *Animal Genetics*, 18: 317-322.
- Tizard, I. R.** 2000. *Veterinary Immunology. An Introduction*. Sixth Edition. W.B. Saunders Company, USA.
- Wagstrom, E. A.; Yoon, K. J. y Zimmerman, J. J.** 2000. Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunology*, 13: 383-397.
- Watson, D. L.** 1980. Immunological functions of the mammary gland and its secretions comparative review. *Australian Journal Biology Science*, 33: 4013-4022.
- Zenclussen, A.; Gentile, T.; Kortebani, G.; Mazzolli, A.; Margni R.** 2001. Asymmetric Antibodies and Pregnancy. *Journal Reproduction Immunology*, 45: 289-294.
- Zhao, Y.; Burbach, J. A.; Roby, K. F.; Terranova, P. F. y Brannian, J. D.** 1998. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor α in the porcine corpus luteum. *Biology Reproduction*, 59: 1385-1391.