

Expresión de la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y de las subunidades de integrinas α3 y β1 durante la placentación porcina.

WILLIAMSON, D. M.^{1, 2}; KONCURAT, M. A¹.

Resumen

La placenta porcina es epiteliocorial, adecidua, plegada, difusa y no invasiva, por lo que expresa moléculas de adhesión que posibilitan la formación de la interfase feto/materna. Las integrinas son glicoproteínas que gobiernan las interacciones celulares con la matriz extracelular y participan en la implantación de varias especies. El objetivo de éste estudio fue analizar y comparar la expresión de $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, α3 y β1 a fin de detectar la existencia de un patrón de expresión diferencial durante la placentación porcina. Se utilizaron placentas porcinas de \pm 37, 60, 70, 80 y 114 días de gestación y útero vacío. La presencia de integrinas se determinó por inmunoperoxidasa indirecta. Durante la placentación $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ se expresó cuantiosamente, disminuyendo a partir de los 80 días. La integrina β1 fue la que mayor positividad marcó en todos los tejidos placentarios estudiados, disminuyendo su expresión solo al final de la gestación. La subunidad α3 no se expresó en glándulas endometriales en ninguno de los períodos gestacionales estudiados. Los resultados de este estudio remarcan la importancia de la expresión de las integrinas durante la placentación porcina, particularmente β1 , en el transcurso de la gestación para permitir la remodelación de las vellosidades placentarias y α3 de las zonas interareolares.

Palabras clave: integrinas, placenta epiteliocorial, gestación, cerdos.

Expression of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, and subunits α3 and β1 during porcine placentation

Summary

Porcine placenta is epitheliochorial, diffuse, folded, adecidua, and non invasive, and express adhesion molecules different. Integrins are glycoproteins composed of α and β subunits that govern cellular interactions with the extracellular matrix. Recent studies showed that integrins have been involved in implantation events in several species. The aim of this study was to compare the expression of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, α3 and β1 during placentation porcine. Placental tissue from porcine female of 37, 60, 70, 80 and 114 days of gestation, and empty uterus were used. The detection of the integrins was analyzed by indirect immunoperoxidase. During placentation $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ was expressed abundantly, decreasing from day 80 on. The integrins β1 was the one that marked great positivity in all placental tissues studied, decreasing its expression only at the end of de gestation. The α3 subunits was not expressed in endometrials

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

² Becaria CONICET. e-mail: dmw@vet.unlpam.edu.ar|

Recibido: 12.02.2009 - Aceptado: 16.03.2010

glands in none of the gestational periods studied. The results of this study remark the importance of the expression of integrins during the porcine placentation, particularly $\beta 1$, during the gestation to allow the redesigning of the placental villi and $\alpha 3$ from interareolares zones.

Key Words: integrins, epitheliochorial placenta, pregnancy, pigs.

Introducción

La placenta porcina es epiteliocorial, adecidua, plegada, no invasiva y difusa. Se conforma mediante interdigitaciones entre las vellosidades del trofoectodermo y la superficie del epitelio uterino lo que permite el reconocimiento, adhesión e implantación de los *conceptus* en ésta especie polítopa. El contacto entre el *conceptus* y el endometrio depende de interacciones entre célula-célula y célula-matriz extracelular mediante uniones entre receptores de la superficie celular y sus ligandos tales como las integrinas, Muc-1, fibronectina u osteopontina^{16,2}.

Las integrinas comprenden una gran familia de proteínas transmembranas constituidas por dos subunidades glicoproteicas unidas entre sí no covalentemente, denominadas α y β . Se han identificado nueve subunidades β ($\beta 1$ - $\beta 9$) y diecinueve subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, αv , αIIb , αLR , αIEL , αx , αm , αL y αd) y se han definido alrededor de 25 heterodímeros diferentes de integrinas¹⁶.

La función de las integrinas, determinada por las combinaciones de subunidades α y β expresadas, depende de los procesos llevados a cabo por las células como los de diferenciación, inflamación, reparación de tejidos y transformación maligna².

El rol de las integrinas en el endometrio no está claramente definido, según Lessey and Arnold, 1998¹², éstas moléculas representan excelentes marcadores de estadíos normales y anormales de receptividad uterina y pueden proveer claves en los mecanismos de implantación y regulación de la gestación.

En bovinos, se sugiere que la fusión de las células binucleadas con el epitelio materno es el fenómeno que inicia los cambios en la expresión de las integrinas y las moléculas de

la matriz extracelular (MEC) en el estroma subepitelial uterino¹⁴. En ovinos, las integrinas juegan un papel predominante en las interacciones entre la MEC y sus receptores para traducir señales entre el trofoectodermo y las células epiteliales uterinas⁴. En el endometrio y blastocito caprino están expresadas la integrina $\alpha v \beta 3$ y las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 5$ que desempeñarían un importante papel en los procesos de implantación⁵. En el conejo, la integrina $\alpha v \beta 3$ está presente en el trofoblasto y en el embrión y puede estar involucrada en las interacciones maternas embrionarias tempranas⁹. Los resultados de estudios realizados en monos Rhesus sugieren que existe una correlación entre la expresión de las integrinas y sus ligandos de la MEC en la interfase feto materna y que estas sustancias podrían estar involucrados en el control de la proliferación y diferenciación celular, regulando la invasión de las células trofoblástica al comienzo de la gestación¹³. En la mujer, se considera a las integrinas como probables marcadores de la receptividad uterina para la implantación del embrión, y que esta acción ocurre cuando el útero se encuentra bajo la influencia de la progesterona⁵. Hanashi y col. 2003⁸, demuestran que la integrina $\beta 1$ participa en la fase final de la implantación en la decidua humana.

En especies con placenta epiteliocorial, se sugiere que la integrina $\alpha 5 \beta 1$ participa en eventos moleculares involucrados en los procesos de implantación¹⁶. Numerosos trabajos plantean el papel de las integrinas y de sus ligandos de la MEC, comparando su expresión entre el útero durante el ciclo estral con la preñez temprana de entre 10 y 15 días^{1,2,7,10}, incluyendo a aquellas involucradas en la

implantación porcina^{1, 2, 3, 6, 10, 16}, pero no encontramos los que evalúen su presencia durante el transcurso de la gestación. El objetivo de éste estudio fue analizar y comparar la expresión de $\alpha v\beta 3$, $\alpha 3$ y $\beta 1$ a fin de detectar la existencia de un patrón de expresión diferencial durante la placentación porcina.

Materiales y métodos

Animales y Tractos Reproductivos: Se muestrearon 25 cerdas mestizas de la zona de General Pico, La Pampa, Argentina ($35^{\circ} 62'$ y $63^{\circ} 45'$ de latitud y longitud respectivamente) y se recolectaron 5 muestras placentarias para cada uno de los períodos gestacionales seleccionados: ± 37 , 60, 70, 80 días de gestación, a término (114 días de gestación) y 5 úteros vacíos. 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 ug/ml de fungizona y se guardaron a $4^{\circ} C$ hasta su procesamiento en el laboratorio.

Determinación de la edad gestacional: Se estimó la edad gestacional de la preñez de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los embriones y/o los fetos obtenidos de cada cerda¹⁵.

Procesamiento del tejido placentario: Se fijaron las muestras placentarias maternas y fetales en formol tamponado con fosfato al 10% y se realizaron los cortes histológicos de $\pm 5 \mu m$.

Determinación de Integrinas: Dado que no existe en el mercado anticuerpos anti-integrinas porcinas se trabajó con anticuerpos anti-integrinas humanas como lo realizado por Bowen et al¹, García et al⁷ y Rashev et al¹⁶. Se realizó una técnica de inmunohistoquímica indirecta LSAB (Labeled Strptavidin Biotin Method): se lavó el tejido con solución salina tamponada (PBS), se agregó peróxido de hidrógeno al 3% (para bloquear la peroxidasa endógena) durante 5', se lavó con PBS y se agregó anticuerpo de ratón anti-subunidad de integrina $\beta 1$ humana monoclonal 1:100

(Chemicon) o anticuerpo de conejo anti-integrina $\alpha 3$ humana policlonal 1:500 (Chemicon); se incubó 20', se lavó nuevamente con PBS. Se agregó el segundo anticuerpo biotilado (inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra) incubando 20' y se lavó con PBS. Se colocó gotas de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (streptavidina/HRP de Dako Cytomation) y se incubó 20', se lavó con PBS nuevamente, se cubrió con solución cromógena diaminobencidina (DAB), 15', se lavó con agua destilada y se contrastó con hematoxilina (2'), se lavó con agua, se montó y observó al microscopio Axiophot (Zeiss). Para la determinación de $\alpha v\beta 3$ se utilizó un anticuerpo de ratón anti-integrina $\alpha v\beta 3$ humana monoclonal conjugado con biotina (Chemicon) dilución 1:100, que se reveló de igual manera que la técnica descripta anteriormente.

Como controles negativos utilizamos cortes de tejidos a los que se le realizó la misma técnica, sólo se reemplazó el primer anticuerpo por PBS.

Análisis estadístico: Los resultados se expresan en forma semicualitativa¹⁶, con una escala elegida en función de la coloración detectada, determinando que:

- (-): negativo
- (+): baja positividad
- (++): positividad intermedia
- (+++): alta positividad

Resultados

En todos los tejidos placentarios provenientes de los períodos gestacionales analizados se pudo determinar la presencia de integrinas, a excepción de $\alpha 3$ que fue negativa en glándulas endometriales tanto en útero vacío como en los distintos períodos gestacionales estudiados.

Expresión de la Integrina $\alpha v\beta 3$: Durante la placentación $\alpha v\beta 3$ se expresó cuantiosamente, tanto en vellosidades como en glándulas, disminuyendo a partir de los 80 días de gestación. Ver Tabla I. Foto 1 y Foto 2.

Expresión de la Subunidad $\beta 1$: Esta integrina fue la que mayor positividad marcó en todos los tejidos placentarios estudiados,

disminuyendo su expresión solo al final de la gestación. Ver Tabla II. Foto 3 y Foto 4.

Expresión de la Subunidad de Integrina $\alpha 3$: Se halló marcada positividad

de $\alpha 3$ en las vellosidades, mientras que las glándulas endometriales mostraron negatividad en todos los períodos gestacionales estudiados. Ver Tabla III. Foto 5 y Foto 6.

Tabla I: Expresión de la subunidad $\alpha V\beta 3$ 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		+	++	++	+++	++	+++
60 días		+	+++	+	+++	ND	+++
70 días		+++	+	-	+	+	+
80 días		-	-	-	++	ND	+++
114 días		+			-	+	

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

Tabla II: 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		+++	+++	++	++	+	++
60 días		++	+++	++	++	ND	++
70 días		+++	++	+++	+++	+	++
80 días		+++	++	++	+++	++	++
114 días		+	+	++	++	+	++

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

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

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

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



Foto 1: Placenta porcina de 70 días de gestación donde se observa la integrina $\alpha \beta 3$. (20x)

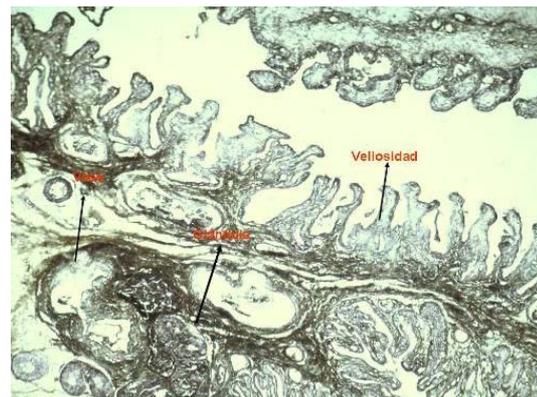


Foto 2: Control Negativo de Placenta porcina de 70 días de gestación. (20x)

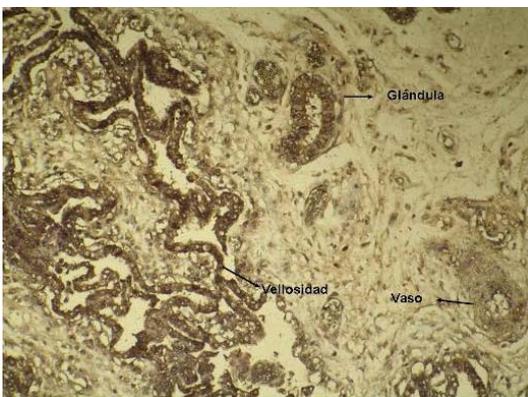


Foto 3: Placenta porcina de 37 días de gestación donde se observa la subunidad $\beta 1$. (20x)

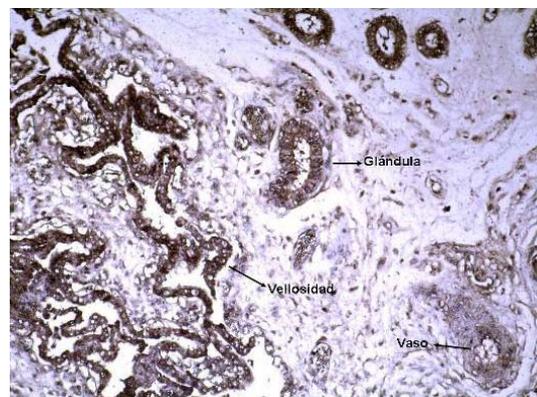


Foto 4: Control Negativo de Placenta porcina de 37 días de gestación. (20x)

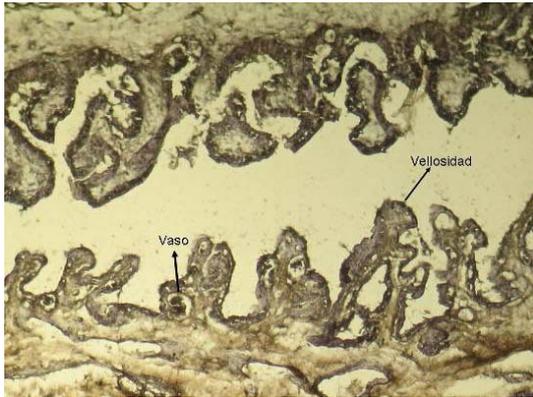


Foto 5: Placenta porcina de 114 días de gestación donde se observa la presencia de $\alpha 3$. (20x)

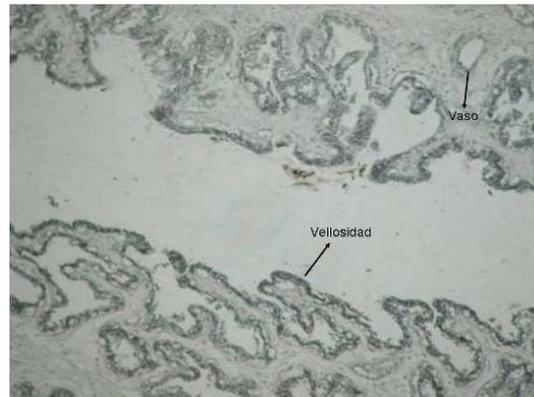


Foto 6: Control Negativo de Placenta porcina de 114 días de gestación. (20x)

Discusión

La placenta es un órgano integrado por estructuras de origen fetal y materno, originado especialmente para la gestación. En cerdos, dado el tipo de placenta epiteliocorial y no invasiva, solamente el trofoblasto se encuentra en íntimo contacto con los tejidos maternos; por eso las interacciones entre los epitelios trofoblástico y endometrial originan numerosos estudios acerca de la expresión de moléculas de adhesión, particularmente las integrinas, consideradas esenciales para el mantenimiento de una gestación. No hemos encontrado estudios que evalúen su presencia durante el transcurso de la placentación.

Según Bowen y col., 1996¹, en la implantación porcina el epitelio luminal uterino expresa las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ y $\beta 3$ que fueron detectadas por inmunofluorescencia indirecta; además plantea que la expresión de $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\beta 1$ halladas en el epitelio uterino se relacionan con el ciclo estral. Debido a que la placenta porcina posee la característica de que autofluoresce¹¹, las experiencias realizadas en este trabajo se efectuaron a través de una técnica de inmunohistoquímica indirecta empleando peroxidasa de rábano picante (HRP), por lo que no relacionamos los resultados de Bowen con los del presente trabajo.

Nosotros hallamos que las subunidades αv y $\beta 3$ se expresan en las vellosidades y el estroma

endometrial durante la implantación porcina, al igual que lo descrito por distintos autores en otras especies, como en interfase feto-materna en reshus monkey¹³, epitelio luminal murino¹², endometrio y células del blastocito caprino⁷ y embrión y trofoblasto del conejo⁹. Además, nosotros notamos alta expresión de esta integrina en el transcurso de la gestación solo hasta los 70 días.

Según Rashev y col., 2005¹⁶, en estudios realizados durante la preñez temprana porcina encuentra que $\alpha 5\beta 1$ fue elevada en trofoectodermo, superficie epitelial del endometrio uterino y glándulas endometriales, disminuyendo levemente su expresión a los 35 días, mientras que nosotros detectamos las subunidades $\beta 1$ con alta positividad hasta el final de la gestación. Dada la presencia cuantiosa de $\beta 1$ en los tejidos placentarios sugerimos su participación en el mantenimiento de la interfase feto-materna, particularmente en la arborización de las vellosidades, ya que disminuye su expresión solo a término. Lo que sugeriría la participación de éstas moléculas en los eventos de aposición y adhesión de la placenta porcina.

La expresión de la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas no se halló en glándulas uterinas en ningún período estudiado, pero se manifestó con alta intensidad en las vellosidades trofoblásticas fetales y maternas, al igual que en los vasos

sanguíneos durante la gestación, por lo que postulamos que ésta subunidad participaría en los procesos moleculares de adhesión involucrados en las zonas interaerolares para mantener la morfología de la interfase feto-materna.

Conclusión

Los resultados de este estudio remarcen la importancia de la expresión de las integrinas durante la placentación porcina, particularmente $\beta 1$ en el transcurso de la gestación para permitir la remodelación de las vellosidades placentarias y $\alpha 3$ especialmente en las zonas interaerolares.

Bibliografía

1. 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 trophoctoderm in vivo. *Biol Reprod*, 55: 1098-1106.
2. BOWEN, J.A. and HUNT, J.S. 2000. The role of Integrins in Reproduction. *Pro Soc Exp Biol Med*, 223: 331-343.
3. BURGHARDT, R. C.; BOWEN, J. A.; NEWTON, G. R. and BAZER, F. W. 1997. Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*, 52:151-64.
4. BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; JAEGER, L.A.; KA, H.; GARLOW, J.E.; SPENCER, T.E. and BAZER, F.W. 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.
5. CARSON, D.D.; BAGCHI, I.; DEY, S.K.; ENDERS, A.C.; FAZLABAS, A.T.; LESSEY, B.A. and YOSHINAGA, K. 2000. Embryo implantation. *Dev Biol*, 223: 217-237.
6. FOXCROFT, G.R.; DIXON, B.K.; TREACY, B. K.; JIANG, L.; NOVAK, S.; MAO, J. and ALMEIDA, F. C. L. 2000. Insights into conceptus-reproductive tract interactions in the pig. *J. Anim Sci*, 77: 1-15.
7. GARCIA, P.; NIETO, A.; SANCHEZ, M. A.; PIZARRO, M.; FLORES, J. M. 2004. Expresión of $\alpha 4$, $\alpha 5$ and $\beta 3$ integrin subunits, fibronectin and vitronectin in gona peri-implantation. *Anim Reprod Sci*, 80 (1-2): 91-100.
8. HANASHI, H.; SHIOKAWA, S.; AKIMOTO, Y.; SAKAI, K.; SUZUKI, N.; KABIR-SALMANI, M.; NAGAMATSU, S.; IWASHITA, M.; NAKAMURA, Y. 2003. Physiologic Role of Decidual $\beta 1$ Integrin and Focal Adhesion Kinase in Embryonic Implantation. *Endocr. J.*, 50 (2): 189-98.
9. ILLERA, M.; LORENZO, P. L.; GUI, Y.; BEYLER, S.; APPARAO, K.; LESSEY, B. 2003. A Role for $\alpha v \beta 3$ Integrin During Implantation in the Rabbit Model. *Biol Reprod*, 68: 766-771.
10. JAEGER, L.A.; JOHNSON, G.A.; KA, H.; GARLOW, J.G.; BURGHARDT, R.C.; SPENCER, T.E. and BAZER, F.W. 2001. Functional analysis of autocrine and paracrine signaling at the uterine-conceptus interface in pigs. *Reprod Suppl*, 58: 191-207.
11. KEYS, J.L.; KING, G.J. AND LAFOREST J.P. 1989. Autofluorescence of the Porcine Endometrium during Early Pregnancy. *Biology of Reproduction* 40: 220-222.
12. LESSEY, B. A.; ARNOLD, J. T. 1998. Paracrine Signaling in the Endometrium: Integrins and the Establishment of Uterine Receptivity. *J Reprod Immunol*, 39 (1-2): 105-16.
13. LI, Q.; YAN-LING, W.; SU-XIA, B.; SHAO-HUI, J.; WEI, Q.; SHUANG, T. and YUN-SHANG, P. 2003. Temporal and spatial expression of integrins and their extracellular matrix ligands at the maternal-fetal interface in the rhesus monkey during pregnancy. *Biol Reprod*, 69: 563-571
14. MACINTYRE, M. D.; LIM, H. C.; RYAN, K.; KIMMINS, S.; SMALL, J. A. and MACLAREN, L. A. 2002. Implantation-Associated Changes in Bovine Uterine Expression of Integrins and Extracellular Matrix. *Biol Reprod*, 66: 1430-1436.
15. MARRABLE, A. W. 1971. In: *The embryonic pig: a chronological account*. Ed. Exeter, Pitman Medical. London. pp 30-51.
16. RASHEV, P.; GEORGIEVA, D. REES 2005. Expression of $\alpha 5 \beta 1$ Integrin and Fibronectin during Early Pregnancy in Pigs. *Folia Biologica (Praha)* 51: 121-125.

