

## Valoración de anticuerpos IgG asimétricos en suero sanguíneo y extractos placentarios porcinos

A. del C. Garro<sup>1</sup>, M. T. Gentile y M. A. Koncurat

Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam, Argentina

Recibido Agosto 06, 2013. Aceptado Mayo 24, 2014.

---

### Valuation of asymmetric IgG antibodies in swine serum and placental extracts

**Abstract.** Antibodies (AC) of the immune system play a role during gestation that has yet to be fully understood. The present investigation focused on the percentage of asymmetric AcIgG united to the lectin concanavalin A relative to total AcIgG, in blood serums and placental extracts of sows at different stages of gestation, utilizing the differential ELISA method. The 45 samples processed were of serum and homogenates of maternal (HoPM) and fetal (HoPF) placenta from sows at 30 d (n = 17), 65-70 d (n = 9), and 95-114 d (n = 6) d of gestation, and from 13 non-pregnant uteri (HoU). The difference between non-pregnant and pregnant sows in percentage (asymmetric AcIgG/total AcIgG) in serum ( $38 \pm 3$  vs.  $37 \pm 2$ ), was not significant, but there was a difference ( $P < 0.01$ ) between the two groups at 30 d and 95 d of gestation ( $32 \pm 3$  vs.  $43 \pm 3$ ). As for percentages (asymmetric AcIgG/total AcIgG) in HoPM, the 65 gestation sows significantly surpassed all other groups and those at 95 d gestation were inferior to all other groups. High percentages (asymmetric AcIgG/total AcIgG) were found in HoPF throughout gestation  $52 \pm 5$ ,  $44 \pm 3$ , and  $47 \pm 4$  at 30, 65, and 95 d, respectively). It is suggested that these antibodies were of maternal origin and serve to protect the fetus from its mother's immune system. We postulate that the presence of asymmetric AcIgG in serum and maternal and fetal placenta functions in regulation of the maternal immune response and is essential for a successful pregnancy.

**Key words:** Asymmetric IgG antibodies, Placenta, Swine

---

**Resumen.** Los anticuerpos (AC) del sistema inmune juegan un papel durante la gestación que aún queda por esclarecer. El trabajo presente enfocó el porcentaje de AcIgG asimétricos unidos a la lectina concanavalina A relativo al total de AcIgG, en suero sanguíneo y extractos placentarios de cerdas en diferentes períodos de gestación, utilizando el método ELISA diferencial. Se procesaron 45 muestras de suero, homogenatos placentarios maternos (HoPM) y fetales (HoPF), de cerdas gestantes de 30 d (n = 17), 65-70 d (n = 9) y 95-114 d (n = 6) de gestación, así como 13 úteros no gestantes (HoU). La diferencia entre cerdas vacías y gestantes en porcentaje de (AcIgG asimétricos/AcIgG totales) en suero ( $38 \pm 3$  vs.  $37 \pm 2$ ), no fue significativa, pero difirieron ( $P < 0.01$ ) los dos grupos de 30 y 95 d de gestación ( $32 \pm 3$  vs  $43 \pm 3$ ). En cuanto al porcentaje de (AcIgG asimétricos/AcIgG totales), las cerdas de 65 d de gestación superaron y los de 95 d fueron inferiores ( $P < 0.05$ ) a los demás grupos. Se hallaron altos valores de (AcIgG asimétricos/AcIgG totales) en HoPF a lo largo de la gestación ( $52 \pm 5$ ,  $44 \pm 3$ , and  $47 \pm 4$  at 30, 65, and 95 d, respectivamente) y se sugiere que estos anticuerpos fueron de origen materno a fin de proteger al feto del sistema inmune de la madre. Postulamos que la presencia de AcIgG asimétricos en suero y placenta materna y fetal funciona en la regulación de la respuesta inmune materna y es esencial para una preñez exitosa.

**Palabras clave:** Anticuerpos IgG asimétricos, Cerdos, Placenta.

---

<sup>1</sup>Autor para la correspondencia, e-mail: [adgarro4@hotmail.com](mailto:adgarro4@hotmail.com)

## Introducción

La placenta porcina es epiteliocorial, difusa, adecidua, plegada y no invasiva (Wooding y Burton, 2008). La morfogénesis del sistema inmune abarca el período fetal de la embriogénesis y comprende desde el día 32 al día 114 y se caracteriza por el crecimiento fetal, la formación del sistema linfático, la actividad hematopoyética de la médula ósea y la expansión de los ganglios linfáticos periféricos, que se producen entre los días 60 y 90 de gestación (Šinkora y Butler, 2009).

En la reproducción, el sistema inmunológico con sus mecanismos celulares y moleculares, juega un rol que aún no se comprende en su totalidad (Barrientos *et al.*, 2009). La IgG es el principal isotipo en el cerdo, constituyendo entre el 80 al 85% de las inmunoglobulinas en el suero y en el calostro porcino. En la década de 1970 se postuló, en distintas especies animales, que toda respuesta inmune cursa con una población de anticuerpos (Ac), del isotipo IgG, que poseen un comportamiento inmunológico y biológico diferente, denominados AcIgG asimétricos (Margni y Binaghi, 1972). Estos AcIgG asimétricos no forman agregados con el antígeno y como consecuencia no activan mecanismos biológicos efectores como lisis por complemento, fagocitosis y depuración antigénica *in vivo*. No precipitan el antígeno porque en solo una de las dos regiones de unión al antígeno, en los fragmentos Fab, existe un resto hidrocabonado rico en manosa, que crea un impedimento estérico y una marcada disminución de la afinidad al antígeno (Margni, 1989; Margni y Malan Borel, 1998).

Según Gentile *et al.* (1998), los AcIgG asimétricos se incrementan en suero y en extractos placentarios

durante la gestación en humanos y murinos. Por su parte, Margni y Malan Borel (1998), plantean que en murinos la placenta secreta moléculas o factores que regulan la síntesis de estos AcIgG asimétricos, siendo su función la protección fetal. Zencluseen *et al.* (2001) detectaron que durante el segundo trimestre de gestación el porcentaje de AcIgG asimétricos se incrementa marcadamente. Por otro lado, Barrientos *et al.* (2009) investigaron, en la mujer, la producción de AcIgG asimétricos como marcadores de fallos en la gestación temprana.

A pesar de los numerosos estudios realizados para comprender los fenómenos involucrados que permiten una gestación exitosa, aún no se conocen los mecanismos moleculares y celulares que participan. Múltiples antígenos tisulares que difieren entre el feto y la madre son potencialmente aloantígenos de tejidos reconocibles por el sistema inmune materno (Ye *et al.*, 2008). Por esta razón, 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 se protege contra agentes microbianos, sin desencadenar una respuesta inmune letal contra los tejidos fetales.

Pocos estudios investigan la respuesta inmune humoral mediada por Ac durante la gestación porcina, por ello, el objetivo del presente trabajo fue valorar el porcentaje de anticuerpos IgG asimétricos en muestras de suero sanguíneo y de extractos placentarios porcinos en diferentes períodos de gestación a fin de comprender los mecanismos que posibilitan una gestación exitosa.

## Materiales y Métodos

### Animales

Se obtuvieron tractos reproductivos (n=45) de cerdas mestizas en su segunda y tercera gestación, provenientes de la zona de General Pico, La Pampa, Argentina (35° 62' y 63° 45' de latitud sur y longitud oeste, respectivamente), durante la faena en un frigorífico regional, mediante un método de Sistema de Aturdimiento Eléctrico. Además, se extrajo sangre de cada cerda mediante flebotomía de la vena yugular antes del sacrificio. Inmediatamente después de recolectados, los tractos reproductivos se lavaron con solución salina de Hank (SSH) conteniendo 10.000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomina y 2,5 µg/mL de fungizona y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Se recogieron muestras de endometrio y placenta,

porción fetal y materna, para obtención de extractos placentarios porcinos maternos y fetales de 17 hembras de  $\pm$  30 d, 9 de  $\pm$  65-70 d, 6 de  $\pm$  95-114 d y 13 úteros de cerdas vacías. Se determinó la edad gestacional de los embriones/fetos según tabla confeccionada por Marrable (1971).

**Obtención de homogenatos placentarios maternos (HoPM), fetales (HoPF) y de útero no gestante (HoU):** Mediante un mortero se homogeneizó una parte de tejido placentario (o de útero vacío) con tres partes de solución fisiológica, se centrifugó dos veces a (500g), durante 10 min cada vez. El sobrenadante se repartió en alícuotas y se almacenó a -20°C.

**Determinación de Ac IgG asimétricos:** La detección de IgG simétricas y asimétricas se realizó en las muestras de suero y de homogenatos placentarios

maternos, fetales y de útero no gestante mediante cromatografía de afinidad ELISA de captura según Margni (1989). Se utilizó la lectina concanavalina A (Con A) con alta afinidad por oligosacáridos tipo "high manose" presentes en el Fab de estos anticuerpos. Brevemente, se sensibilizó la placa con Ac anti Fc de IgG porcino elaborado en cabra (Bethyl, USA), a una dilución de 1:500. Las muestras por duplicado se diluyeron con amor-tiguador Con-A, diluido 1:200 y sin el mismo y se incubaron en cámara húmeda. Posteriormente, se agregó el conjugado (Fc gama marcado con peroxi-dasa, Bethyl), se incubó, se lavó y se agregó

ortofenildietilamina (OPD) hasta la aparición del color. Se leyó la densidad óptica (DO) en espectrofotómetro a 490 nm (BioTeK® Instruments, Inc. USA). El porcentaje de AclgG asimétricos se calculó de la siguiente manera: % de AclgG asimétricos unidos a Con A = 100 - (Ac IgG no fijados a la Con/ AclgG totales) x 100 (Leoni *et al.*, 1986).

**Análisis Estadístico**

Para el análisis de los datos se realizó ANOVA y una prueba Tukey de comparaciones múltiples, utilizando el programa estadístico InfoStat, versión 2011, fijando el nivel de significación en 5% (Di Rienzo *et al.*, 2011).

**Resultados**

Se comparó los porcentajes de (AcIgG asimétricos/AclgG totales) en suero sanguíneo entre cerdas vacías y gestantes, hallándose concentraciones similares (38 ± 3 vs. 37 ± 2; F: 0.11 P< 0.74). Se hallaron diferencias significativas sólo entre las cerdas de 30 d versus 95 - 114 d de gestación (32 ± 3 vs. 43 ± 3, P<0.01). Las cerdas de 65-70 d (36 ± 3) no presentaron diferencias con los restantes grupos (Figura 1).

Se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de (AcIgG asimétricos/ AclgG totales) en

homogenatos de placenta materna (HoPM), siendo los valores mayores en las cerdas de 65-70 d y menores en las de 95-114 d que en todos los otros grupos estudiados. No se halló diferencias significativas entre cerdas vacías (HoU) (20.50 ± 6) vs. 30 d de gestación (27 ± 2) (Figura 2).

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de AclgG asimétricos en homogenatos de placenta fetal (HoPF) entre los distintos períodos gestacionales estudiados (P<0.41) de 30 d (52 ± 5), 65-70 d (44 ± 3) y 95-114 d (47 ± 4) (Figura 3).

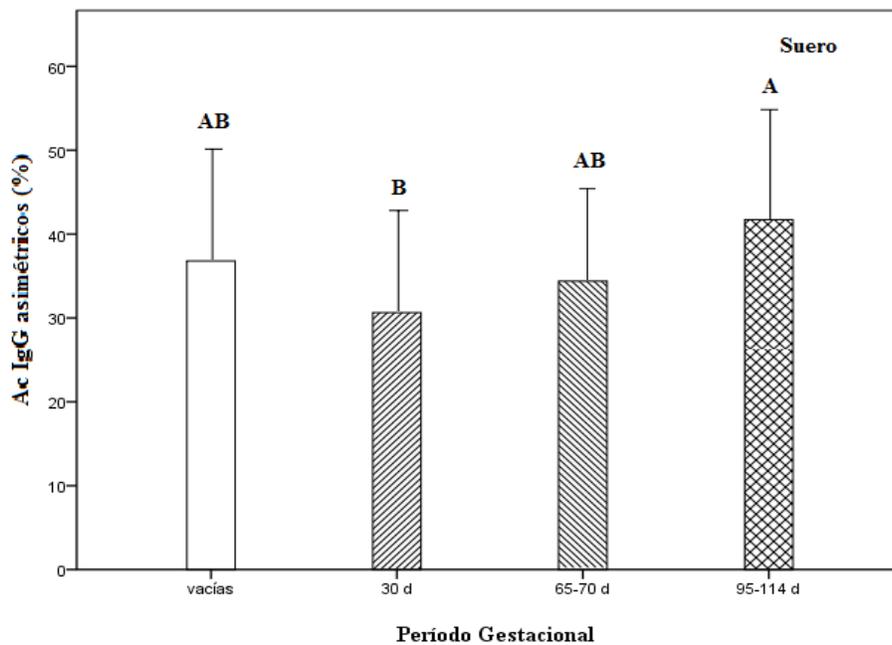


Figura 1. Porcentaje de AcIgG asimétricos entre los AclgG totales en muestras de suero en función de los períodos gestacionales estudiados (vacías, 30 d, 65-70 d, 95-114 d).

Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (Tukey, P<0.05).

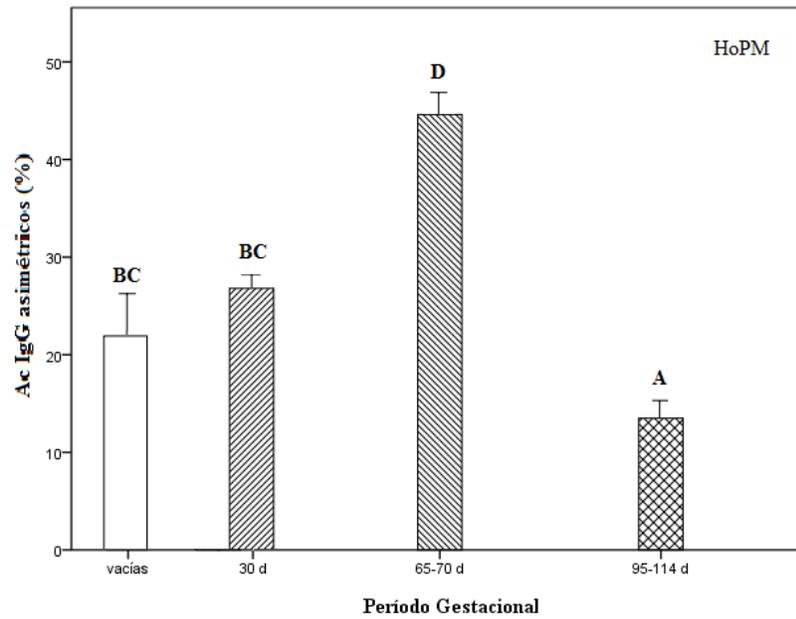


Figura 2. Porcentaje de AcIgG asimétricos entre los AcIgG totales en muestras de homogenatos de úteros vacíos (HoU) y de homogenatos placentarios maternos (HoPM) en función de los períodos gestacionales estudiados (30 d, 65-70 d, 95-114 d).

Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ).

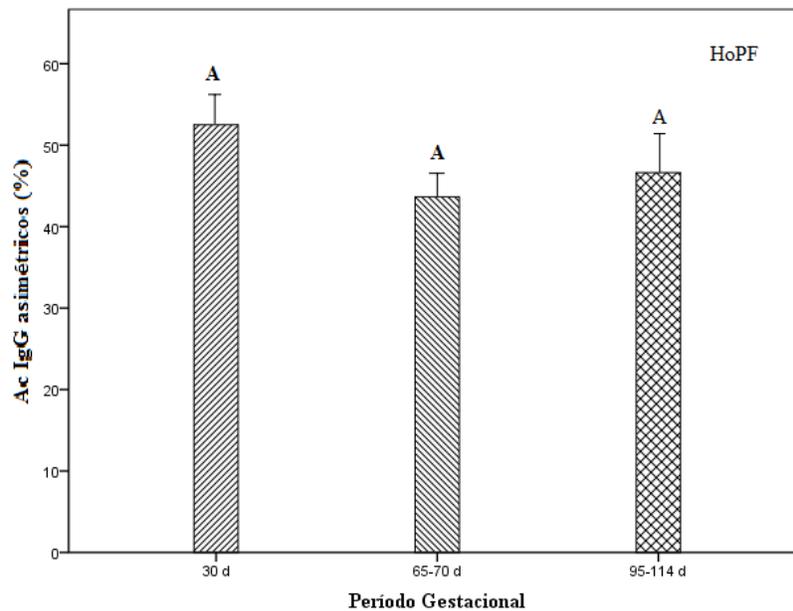


Figura 3. Porcentaje de AcIgG asimétricos entre los AcIgG totales en muestras de homogenatos placentarios fetales (HoPF) en función de los períodos gestacionales (30 d, 65-70 d, 95-114 d).

Barras con diferentes letras denotan diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ).

## Discusión

Coincidimos con Chen *et al.* (2012) en que la interacción inmunológica entre el feto y la madre es una comunicación especial que estaría regulada por la presentación de antígenos del feto, presentes en la superficie del trofoblasto, y por el reconocimiento de esos antígenos por parte del sistema inmune materno. En trabajos anteriores, realizados en nuestro laboratorio, encontramos gran afinidad de la lectina Con-A por el tejido placentario fetal y materno, sobre todo en muestras de  $\pm 55$  d de gestación (Koncurat *et al.*, 2004; Sanchis *et al.*, 2009). Recientemente, se determinó la presencia de AcIgG en la interfase feto materna porcina, por lo que continuamos con el estudio del papel de estas moléculas y del tipo de respuesta del sistema inmune que se organiza durante la preñez porcina (Garro *et al.*, 2013).

No hemos encontrado bibliografía sobre el rol de los AcIgG durante la preñez porcina, pero sí en otras especies. Así, si bien en suero no hallamos diferencias significativas en el porcentaje de (AcIgG asimétricos/AcIgG totales) entre cerdas vacías y gestantes, sí los encontramos entre los diferentes periodos de gestación. Sólo a los 30 d de preñez disminuyeron los AcIgG asimétricos relativo a los AcIgG totales en los sueros porcinos, mientras que al final de la preñez, aumentaron, al igual que sucede en ratas, cuyos valores en sangre aumentan en el segundo tercio de la gestación (Gentile *et al.*, 1992). También, en gestaciones humanas fue descrito un aumento de la concentración de los AcIgG asimétricos en sangre en el segundo trimestre de la gestación (Malan Borel *et al.*, 1991; Zenclussen *et al.*, 2001). Especulamos que, probablemente la disminución sérica detectada al inicio de la gestación porcina se deba al pasaje de dichos AcIgG asimétricos a la interfase feto materna, a fin de preservar el aloinjerto fetal; mientras que el aumento de AcIgG asimétricos séricos, al final de la preñez, reflejaría un mecanismo de compensación, a fin de subsanar la caída brusca de la concentración de IgG en suero, que se produce cuando la mayoría de las IgG se concentran en las glándulas mamarias para formar el calostro (Wagstrom *et al.*, 2000).

Además, en concordancia con Malal Borel *et al.* (1991) y Gentile *et al.* (1992), quienes determinaron en eluidos de placenta de mujer y ratas aumento de AcIgG asimétricos, nosotros también los hallamos en la placenta porcina en el segundo tercio de la gestación. Malal Borel *et al.* (1991) determinaron la presencia de AcIgG fijados a las membranas celulares de las células de la placenta murina a través de dos mecanismos diferentes, uno a través del receptor Fc presente en las células y el otro mecanismo convencional fijándose a los antígenos paternos. El aumento del porcentaje de AcIgG asimétricos entre los AcIgG totales a los 65-70 d de preñez en los HoPM, coincide con el período en que la placenta alcanza su meseta de crecimiento durante la preñez porcina (Wilson y Ford, 2001). Es el momento de gran remodelación celular de la estructura placentaria, particularmente de las vellosidades que conforman la interfase a través de mecanismos apoptóticos, para sustentar el crecimiento de los fetos (Merkis *et al.*, 2010). Por lo que pensamos que el aumento del porcentaje de AcIgG asimétricos detectado se debería a la necesidad de proteger con dichos Ac a las nuevas células de las vellosidades expuestas en la interfase feto-materna, a fin de proteger al feto del sistema inmunológico materno.

Con respecto a los resultados hallados en los HoPF, llama la atención el alto porcentaje de AcIgG asimétricos determinados en esos extractos en todos los periodos gestacionales estudiados, dado que el feto recién comienza a sintetizar sus primeros Ac a partir de los 50 d de preñez (Rothkötter, 2009; Butler *et al.*, 2009). Por lo que pensamos que los AcIgG asimétricos deben haber sido producidos por la madre a fin de proteger al aloinjerto fetal del sistema inmune materno como acontece en otras especies (Blois *et al.*, 2004).

En conclusión, se postula que la presencia de Ac IgG asimétricos en suero y extractos placentarios maternos y fetales forma parte de la regulación de la respuesta inmune materna durante la gestación porcina, permitiendo una preñez exitosa.

## Literatura Citada

- Barrientos, G., D. Fuchs, K. Schröcksnadel, M. Ruecke, M. G. García, B. F. Klapp, R. Raghupathy, S. Miranda, P. C. Arck, and S. M. Blois. 2009. Low levels of serum asymmetric antibodies as a marker of threatened pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 79:201.
- Blois, S., A. C. Zenclussen, M. E. Roux, S. Olmos, J. di Conza, P. C. Arck, and R. A. Margni. 2004. Asymmetric antibodies (AAb) in the female reproductive tract. *J. Reprod. Immunol.* 64:31.
- Butler, J. E., K. M. Lager, I. Splichal, D. Francis, I. Kacsokovics, M. Šinkora, N. Wertz, J. Sun, Y. Zhao, W. R. Brown, R. De Wald, S. Dierks, S. Muyltermans, J. K. Lunney, B. McCray, C. S. Rogers, M. J. Welsh, P. Navarro, F. Klobasa, F. Habe, J. Ramsoondar. 2009. The piglet as a model for B cell and immune system development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128:147-70.
- Chen, S. J., Y. L. Liu, and H. K. Sytwu. 2012. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. *Clin. Dev. Immunol.* Article ID 258391, 10 pp 10.1155/2012/2583912012:258391.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzales, E. M. Tablada y C. W. Robledo. 2011. InfoStat. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Córdoba. República Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Garro, A., M. T. Gentile, and M. A. Koncurat. 2013. Asymmetric IgG antibodies in serum and in swine placental extracts. SLIMP-Latin American Symposium on Maternal Fetal Interaction and Placenta. IV-LASRI-Latin Am. Symp. *Reprod. Immunol.*
- Gentile, M. T., I. Malal Borel, J. Angelucci, S. Miranda, and R. A. Margni. 1992. Preferential synthesis of asymmetric antibodies in rats immunized with paternal particulate antigens. Effect on pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 22:173.
- Gentile, M. T., P. Llambias, J. Dokmetjian, and R. A. Margni. 1998. Effect of pregnancy and placental factors on the quality of humoral immune response. *Immunol. Lett.* 62:151.
- Koncurat, M. A., C. Merkis, D. Zubeldía, A. Chanique, A. Cristofolini, M. Franchino, L. Abate Cano, G. Sanchis, P. Falco, and A. Vivas. 2004. Detection of glycoconjugates in the porcine placenta in different gestational periods. *Int. J. Morphol.* 22:35.
- Leoni, J., M. Labeta and R. A. Margni. 1986. The asymmetric IgG non-precipitating antibody. Localization of the oligosaccharide involved by Concanavalin A interaction. *Mol. Immunol.* 23:1397.
- Malal Borel, I., M. T. Gentile, J. Angelucci, J. Pividori, M. C. Guala, R. A. Binaghi, and R. A. Margni. 1991. IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. *J. Reprod. Immunol.* 20:129.
- Margni, R. A. and R. A. Binaghi. 1972. Purification and properties of non-precipitating rabbit antibodies. *Immunol.* 22:55.
- Margni, R. A. 1989. Anticuerpos IgG asimétricos. Estudios estructurales, inmunoquímicos y biológicos. *Medicina.* 49:147.
- Margni R. A. and I. Malan Borel. 1998. Paradoxical behavior of asymmetric IgG antibodies. *Immunol. Rev.* 163:77.
- Marrable, A. W. 1971. The embryonic pig: a chronological account. Exeter, Pitman Medical Publishing, Great Britain. p. 30-51.
- Merkis, C. I., A. Cristofolini, E. Sanchis, and M. Koncurat. 2010. Expression of death cellular receptors FAS/CD95 and during porcine placentation. *Int J Morphol.* 28:829.
- Rothkötter, H. 2009. Anatomical particularities of the porcine immune system physician's view. *Dev. Comp. Immunol.* 33:267.
- Sanchis, E. G., C. I. Merkis y M. A. Koncurat. 2009. Detección de glicoconjugados en las vellosidades placentarias porcinas de diferentes períodos gestacionales. *Red Vet.* 10:1.
- Šinkora, J. and J. E. Butler. 2009. The ontogeny of the porcine immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 33:273.
- Wagstrom, E. A., K. J. Yoon, and J. J. Zimmerman. 2000. Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunol.* 13:383.
- Wilson, M. E. and S. P. Ford. 2001. Comparative aspects of placental efficiency. *Reprod.* 58:223.
- Wooding, P. and G. Burton. 2008. Eutheria: Epithelio-chorial placentation in pig and horse. In: *Comparative Placentation. Structures, Functions and Evolution.* Ed. Springer, Berlin, Germany. p. 105-114.
- Ye L., W. Tuo, X. Liu, N. E. Simister and X. Zhu. 2008. Identification and characterization of an alternatively spliced variant of the MHC class I-related porcine neonatal Fc receptor for IgG. *Dev. Comp. Immunol.* 32:966.
- Zenclussen, A. C., M. T. Gentile, A. Kortebani, R. Mazzolli, and R. A. Margni. 2001. Asymmetric antibodies and pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 45:289.