

## Actividad sérica del Factor Precoz de Preñez (EPF) durante la gestación en porcinos

Cecilia I Merkis<sup>1</sup>, Dra; Adriana B. Vivas<sup>2</sup>, Dra

<sup>1</sup>Area de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología Animal <sup>2</sup>Departamento de Anatomía Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional Río Cuarto, Estafeta Postal N°9, Río Cuarto, 5800, Argentina.\*

(Recibido: 30 abril, 2001; aceptado: 18 enero, 2002)

### Resumen

*Para lograr una preñez exitosa es necesario un reconocimiento inmunológico entre la madre y el feto. Tal reconocimiento se realizaría a través de señales como el Factor precoz de preñez (EPF) y de hormonas como la progesterona, que se sintetizan muy tempranamente y poseen actividad inmunosupresora. En este trabajo, se estudió el comportamiento de ambas sustancias durante toda la gestación en porcinos. Se investigó en el suero de 5 cerdas, la actividad de EPF y la concentración de progesterona en estro y en los días 3, 7, 14, 21, 28, 45, 75, 90 y 110 post-servicio. La actividad del EPF mostró un perfil bifásico. Durante el primer tercio de la gestación, en todos los casos el valor máximo de progesterona, apareció 7 días después de los valores máximos de la actividad EPF. Por el contrario, en los dos tercios restantes, los valores máximos de EPF coinciden con los valores máximos de progesterona. De los resultados obtenidos podemos concluir que el EPF sería un buen indicador de fertilización y trazador de viabilidad embrionaria.*

**Palabras Clave:** Factor Precoz de la Preñez, EPF, porcinos, preñez.

### Introducción

Para lograr una preñez exitosa debe producirse un reconocimiento inmunológico entre la madre y el feto (21). Este enigma inmunogenético se focaliza en el rol de la respuesta inmune materna hacia los antígenos paternos, los del feto y los de la placenta. (5, 6, 11). Este reconocimiento se realiza a través de señales que se producen muy tempranamente la mayoría de las cuales tendría actividad inmunosupresora (3, 7, 8, 9, 13, 20). Entre ellas podríamos citar a la progesterona, las prostaglandinas E2 y F2 $\alpha$ , glucoproteínas de alto peso molecular, interleuquinas: como la IL6, IL10 y la IL11, interferones y al Factor Precoz de Preñez (EPF) (1, 2, 4, 5, 9, 11, 15, 16, 18, 19, 22, 23).

El EPF fue descrito por primera vez en ratón e identificado luego en diferentes especies tales como suinos, bovinos, ovinos, equinos y humanos. El tiempo de aparición del EPF varía en las distintas especies, en rata se detectó a las 6 hs post-apareamiento (1), en cerda a las 72 hs (14, 16) y en la mujer a las 48 hs (10).

Hasta el presente la única técnica desarrollada para la detección del EPF es un ensayo *in vitro* propuesto por Morton H., et al., en 1974, que mide de manera indirecta la actividad del factor (17).

Por otra parte, la progesterona, hormona estrechamente involucrada en la preñez de los mamíferos, ya que prepara al endometrio para la

implantación y el mantenimiento de la preñez, es una de las responsables de la disminución de la actividad del sistema inmune (principalmente a nivel fetoplacentario), necesaria para permitir la sobrevivencia y normal desarrollo del embrión (11, 22, 23)

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad del Factor Temprano de la Preñez (EPF) en suero a lo largo de toda la gestación, para conocer el perfil de producción de este factor en porcinos y la comparación con el perfil de progesterona.

### Materiales y Métodos

Se utilizaron cerdas jóvenes, mestizas de edad uniforme, provenientes de la Granja Experimental de la Escuela de Agronomía de la ciudad de Río Cuarto, a las que se les sincronizó el celo con Regumate<sup>®</sup> (Alil Trembolona) administrándole la droga por vía oral en una dosis de 19 mg/día/cerda durante 13 días; luego de 5 días se comenzó a controlar el ciclo estral.

Se consideró día cero del ciclo al momento en que la cerda desarrolló el reflejo de quietud por medio de la presión del lomo ejercida por el operador.

A todos los animales se les extrajo muestras de sangre por punción de la vena de la oreja durante el estro y recibieron 3 servicios naturales controlados con diferentes verracos. Posteriormente, se obtuvieron muestras de sangre a los 3, 7, 14, 21, 28, 45, 75, 90 y 110 días post-servicio. Los sueros se separaron por centrifugación 10 min. a 200g y se conservaron en a -20°C hasta el momento de utilización. En todas las muestras se determinó la actividad EPF por la técnica de inhibición de formación de rosetas (RIT) y la concentración de progesterona por radioinmunoanálisis (RIA).

*Técnica de inhibición de formación de rosetas (RIT):* La actividad EPF se midió por la prueba de inhibición de formación de rosetas validada en nuestro laboratorio (12).

Esta prueba se fundamenta en la capacidad del EPF, en presencia de complemento, de potenciar la acción de un suero antilinfocitario (SAL) sobre la formación de rosetas activas entre linfocitos de cerdo y eritrocitos de carnero.

A una serie de 12 tubos conteniendo linfocitos periféricos de cerdos castrados (100 µl, 4 x 10<sup>6</sup> cél/

ml en Solución salina de Hank's, SSH), preincubados con las muestras de sueros, se les agregó: a 10 tubos, diferentes diluciones de SAL (250 µl de SAL 1 x 10<sup>3</sup> hasta 256 x 10<sup>6</sup> en SSH) y a dos tubos controles 250 µl de SSH.

A todos los tubos se les agregó 50 µl de complemento (50 µl diluido 1:5 en SSH). Las diluciones de SAL y complemento fueron realizadas el día del ensayo. La mezcla se incubó a 37°C por 60 min. Terminada la incubación, la mezcla se estabilizó a temperatura ambiente durante 10 min. y se les agregó 100 µl de glóbulos rojos de carnero (4 x 10<sup>7</sup> cél/ml). Inmediatamente los tubos se centrifugaron 5 min a 200g. El sedimento celular se resuspendió suavemente y se contó por duplicado las rosetas formadas en cámara cuentaglóbulos sobre un total de 200 células. El número de rosetas en cada dilución de SAL, se calculó como un porcentaje del valor de rosetas de los tubos controles.

Para evitar la subjetividad inherente al sistema el recuento se realizó por una sola persona que desconocía la procedencia de la muestra. El título de inhibición de rosetas (RIT) se definió como la mayor dilución de SAL capaz de inhibir formación de rosetas por lo menos en un 25% comparado con los tubos controles.

Se expresó como log<sub>2</sub> de la inversa de la dilución de SAL. Se procesó de manera similar y paralelamente sueros controles de actividad EPF positiva y negativa, utilizando sólo los datos de los ensayos en los que estos controles dieron el resultado esperado. Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

RIT ≥ 14 presencia de actividad EPF en suero.

RIT = 12 resultado dudoso. No permite asegurar la presencia de actividad EPF en suero.

RIT = 10 ausencia de EPF en suero.

*Valoración de progesterona sérica:* Se realizó con equipo comercial (Coat-A-Count. Progesterone-diagnostic Products Corporation - Los Angeles-USA). El coeficiente de variación (CV) intraensayo fue de 7.23% y el de interensayo 7.93%.

### Resultados

De las cinco cerdas estudiadas, sólo tres la N°1, N°2 y N°230 completaron el período gestacional luego

de 114, 114 y 112 días y con una camada de 4, 10 y 13 lechones vivos respectivamente. De las restantes, la N° 3 abortó entre los 28 y 45 días post-apareamiento y la N° 160 repitió el celo a los 20 días. Los títulos de inhibición de rosetas (RIT) en las muestras de suero obtenidas previo al servicio, estuvieron comprendidos en un rango de 10 a 12. En el suero de la cerda N° 160, se detectó actividad EPF francamente positiva (RIT=20) a las 72hs. del servicio.

En todos los casos estudiados, en el día 7 se pudieron comprobar valores de RIT con niveles correspondientes a la preñez. Los títulos de RIT mostraron un máximo, en todos los casos, alrededor del día 14 seguido por un marcado descenso de la actividad alrededor del día 21 con valores de RIT de hasta 12.

A partir de la segunda mitad de la gestación, se observa una menor variación entre los perfiles séricos de actividad del Factor Precoz de Preñez de los distintos casos (cerda N° 1, cerda N° 2 y cerda N° 230). Alcanzando valores de RIT de hasta 28 en el caso de la cerda N° 2, en el día 75, con un moderado descenso a partir del día 90 y hasta el día 110 aproximadamente. Una excepción la constituye la cerda N°1 que mantuvo niveles elevados por lo menos hasta los 90 días. La cerda N°230 mostró el mismo perfil que las cerdas anteriores, pero con valores de RIT inferiores (Figura 1).

Con respecto a la concentración de progesterona sérica en las cerdas N° 1, N° 2 y N° 230 se encontraron

valores elevados, con respecto a la N° 3, alrededor del día 14 con una concentración entre 48 y 64 ng/ml. En el intervalo comprendido entre los días 21 y 28 los valores descienden bruscamente. A partir del día 21, la concentración de progesterona vuelve a elevarse para alcanzar un valor máximo de 64 ng/ml entre los 75 y 90 días. En el día 90 las concentraciones descienden, fenómeno que no se observa en la cerda N°1 (Figura 2).

## Discusión

Algunos autores sugieren que el perfil sérico del Factor Precoz de Preñez (EPF) en porcinos es diferente a las de otras especies de interés productivo, sin embargo todos los estudios al respecto se basan en investigaciones de distintos lotes de animales en los diferentes estadios de la gestación (14).

En nuestro trabajo determinamos la actividad del EPF en un mismo lote de cerdas durante toda la preñez. Los niveles séricos de actividad EPF positiva se mantuvieron hasta el final de la gestación, con valores que descienden alrededor del momento de la implantación (16). Esto evidenciaría una clara síntesis bifásica del EPF (17), descartando el carácter polifásico propuesto por otros autores quienes observaron que en los primeros 28 días de preñez tanto la progesterona como el RIT aumentan entre los 7 y 14 días posteriormente ambos factores incrementan sus valores fluctuando, con valores máximos hacia el día 75 (14).

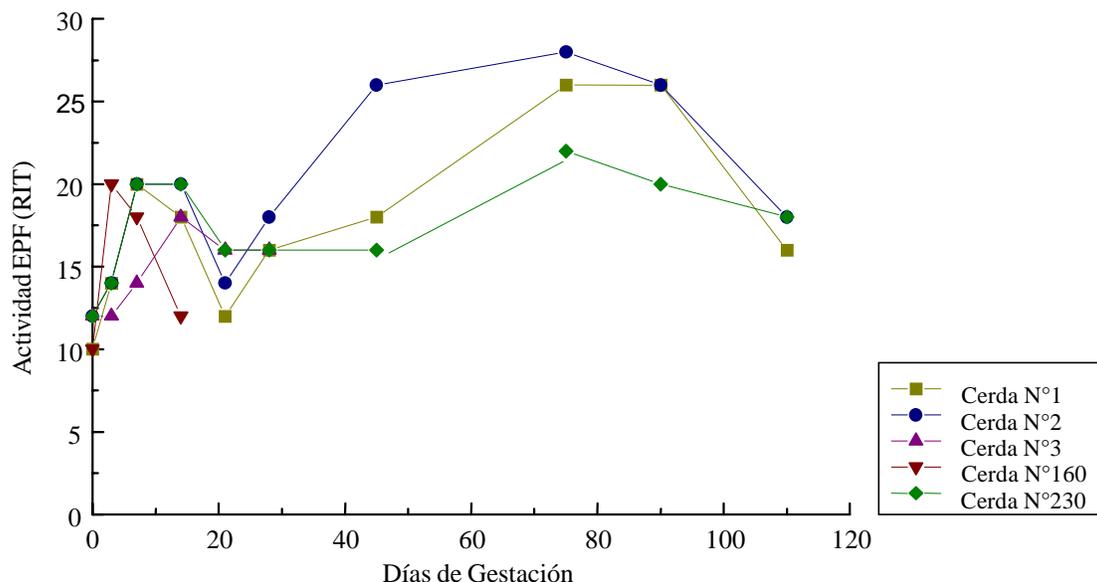
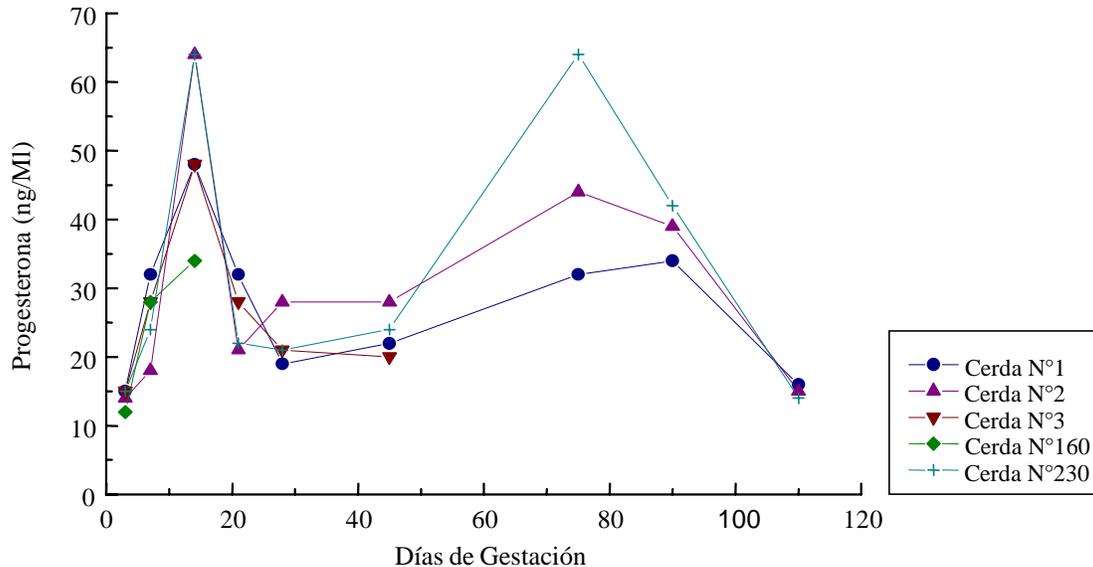


Figura 1. Actividad del Factor Temprano de la Preñez (RIT) en las cerdas estudiadas.



**Figura 2.** Concentración de progesterona (ng/ml) en las cerdas estudiadas.

Por el contrario, Koch y Ellendorf detectaron diferencia en la aparición de los valores máximos de progesterona y de EPF en 1,5 a 4 días (14).

En las cerdas que completaron el período gestacional, cerdas N° 1, N° 2 y N° 230, el valor máximo de progesterona durante el primer tercio de la gestación apareció 7 días después de los valores máximos de RIT correspondientes a esta etapa. En los dos tercios restantes de gestación, los valores máximos de progesterona son paralelos a los valores máximos de RIT.

La cerda N°3 mostró en el día 14 un aumento en la concentración de progesterona, pero con un valor ligeramente inferior al de las cerdas que completaron el período gestacional, cayendo la concentración (20 ng/ml) antes del día de la pérdida embrionaria. La muerte embrionaria se habría producido entre los 28 y 45 días. Posiblemente la falta de estímulo embrionario ocasionaría el descenso brusco de la progesterona originando entonces finalmente el aborto (11, 13, 22, 23).

En la cerda N°160, que repitió el celo, en ningún momento se observó un aumento significativo de la concentración sérica de progesterona, registrándose en el período de muestreo de la misma concentraciones no mayores de 34 ng/ml, esto permite suponer que la tasa ovulatoria pudo ser baja, lo que llevo a que la masa de tejido luteal fuera baja y consecuentemente

la concentración de progesterona, reiniciando con esto el ciclo estral. Este fenómeno, se produjo tempranamente comenzando antes de los 10 días y por consiguiente al faltar la señal proveniente de los embriones, los cuerpos lúteos regresaron como para repetir el celo (3, 5, 9, 16, 21).

La síntesis de EPF en porcinos se realiza en el transcurso de la preñez a partir de dos fuentes diferentes, siendo la primera de origen materno (desde la fertilización y hacia el período perimplantacional) y la segunda fetal (desde el período perimplantacional y hasta el parto). Las mayores fluctuaciones que se observan en el perfil de producción de EPF en los primeros 28 días se deberían a que la síntesis del factor la empezaría a comandar los fetos y la madre ya no intervendría en la síntesis del mismo. Los próximos estudios se basan en investigar algunos aspectos de la problemática anteriormente planteada. Con base en estos resultados podemos concluir que en porcinos, la actividad sérica EPF se detecta a lo largo de toda la gestación, cayendo sus niveles a valores negativos en los casos de aborto o repetición de celo. El perfil sérico del EPF tiene un carácter bifásico encontrándose actividad EPF positiva a las 72 hs post-servicio, y con una semana de anticipación a la aparición de los niveles gestacionales de progesterona. Por lo que el EPF podría ser considerado como un buen indicador de fertilización y trazador de viabilidad embrionaria.

### Summary

#### *Serum Early Pregnancy Factor (EPF) activity during gestation in sows*

*To achieve a successful pregnancy is necessary an immunological maternal recognition among the mother and the fetus. This recognition is realized by early embryonic signals e.g. early pregnancy factor (EPF) and progesterone. The appearance of early pregnancy factor and progesterone were studied through the pregnancy in sows. In the serum from five sows EPF activity and progesterone concentration was measured in oestrus and 3, 7, 14, 21, 28, 45, 75, 90 y 100 days post-mating. EPF activity shows a biphasic profile. During the first third of pregnancy, the highest progesterone values always followed elevated EPF activity with a delay of 7 days. During the two third last of pregnancy the highest values of progesterone were coincident with highest serum EPF activity. It is concluded that EPF is a good marker to detect successful fertilization and embryonic viability.*

**Key words:** *Early Pregnancy Factor, EPF, porcine, pregnancy.*

### Referencias

- Athanasas-Platsis S, Corcoran CM, Kaye P L, *et al.* Early pregnancy factor is required at two important stages of embryonic development in the mouse. *Am J Reprod Immunol.* 2000; 43(4): 223-233.
- Basu S. Endocrine changes during early pregnancy. Proc Early Embryonic Development Workshop by Swedish University of Agricultural Sciences & University of Uppsala, Sweden; 1984.
- Cavanagh AC, Morton H, Rolfe B E, *et al.* Ovum Factor: A first signal of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1982; 2: 97-101.
- Cavanagh AC. An update on the identity of early pregnancy factor and its role in early pregnancy. *J Assist Reprod Genet.* 1997; 14(9): 492-495.
- Chaouat G, Menu E. Immunology of pregnancy. In: *Reproduction in mammals and men.* Ed. By C. Thibau, H. M. C. Levassieur, R. M. F. Hunter, Ellipses, Paris. 1993; 461-474.
- Chardon P, Renard C, Vaiman M. The major histocompatibility complex in swine. *Immunol Rev.* 1999; 167: 179-192.
- Cheng SJ, Ma M, Qiao C X, *et al.* Early Pregnancy Factor activity in serum of patients with surgical abortions. *Am J Reprod Immunol.* 2000; 44(4): 211-213.
- Ehring GR, Kerschbaum HH, Eder C, *et al.* A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K<sup>+</sup> channels, Ca<sup>2+</sup> signaling, and gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med.* 1998; 188(9): 1593-1602.
- Engelhart H, Croy B, King G J. Role of uterine immune cells in early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1997; 52: 115-131.
- Fan XG, Zheng ZQ. A study of Early Pregnancy Factor activity in preimplantation. *Am J Reprod Immunol.* 1997; 37(5): 359-364.
- Geisert RD, Yelich JV. Regulation of conceptus development and attachment in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1997; 52: 133-149.
- Greco CR, Vivas AB, Bosch RA. Evaluación del Método de Detección del Factor Precoz de Preñez (EPF) en Cerdos. Importancia en el diagnóstico temprano de gestación. *Acta Physiol Pharmacol y Therap Latinoam.* 1992; 42(1): 43-50.
- Kelley KW. Cross-Talk between the immune and endocrine systems. *J Anim Sci.* 1988; 66: 2095-2108.
- Koch E, Ellendorf F. Prospects and limitations of rosette inhibition test to detected activity of Early Pregnancy Factor in the pigs. *J Reprod Fertil.* 1985; 74: 29-38.
- La Bonnardiére C. Nature and possible functions of interferons secreted by the preimplantation pig blastocyst. *J Reprod Fert Suppl.* 1993; 48: 157-170.
- Merkis C, Greco C, Vivas A, *et al.* Factor precoz de preñez (EPF) y progesterona como trazadores de fertilidad y de viabilidad embrionaria y fetal en la cerda. *Rev Prod Anim.* 1992; 12: 103-104.
- Morton H, Hegh V, Clunie GJA. Immunosuppression detected in pregnancy mice by rosette inhibition test. *Nature.* 1974; 249: 459-460.
- Ohnuma K, Yokoo M, Ito K, *et al.* Study of Early Pregnancy Factor (EPF) in equine (*Equus caballus*). *Am J Reprod Immunol.* 2000; 43(3): 174-179.
- Sakonju I, Enomoto S, Kamimura S, Hamana K. Monitoring bovine embryo viability with early pregnancy factor. *J Vet Med Sci* 1993, 55(2): 271-274.
- Shahani S K, Moniz C L, Bordekar AD, *et al.* Early Pregnancy Factor as a marker for assessing embryonic viability in threatened and missed abortion. *Gynecol Obstet Invest.* 1994; 37(2): 73-76.
- Spina V, Aleandri V, Pacchiarotti, A, *et al.* Immune tolerance in pregnancy. *Maternal-Fetal interactions.* *Minerva Ginecol.* 1998; 50(12): 533-537.
- Szekeres-Bartho J, Faust Z, Varga P. The expression of a progesterone-induced immunomodulatory protein in pregnancy lymphocytes. *Am J Reprod Immunol.* 1995; 34(6): 342-348.
- Szekeres-Bartho J, Faust Z, Varga P, *et al.* The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am J Reprod Immunol.* 1996; 35(4): 348-351.