

Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

RESOLUCIÓN N° 311/2017

GENERAL PICO, 09 de Noviembre de 2017.-

VISTO:

La evaluación positiva enviada por integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias, respecto al Programa de Investigación: "*Placentación Porcina*", dirigido por la Dra. Mirta Adriana KONCURAT y Co-dirigido por la Dra. Delia María WILLIAMSON y,

CONSIDERANDO:

Que dicho Programa contiene tres (3) proyectos de investigación, cada uno con su respectivo trabajo.

Que el primero se denomina "*Expresión de integrina $\alpha\beta 1$ y sus ligandos, osteopontina y vitronectina en distintos estadios de la placentación porcina*", bajo la dirección de la Dra. Delia María WILLIAMSON.

Que el segundo se denomina "*Determinación de receptores para estrógenos en la gestación porcina*", bajo la dirección de la Dra. Graciela Noemí YAFUL y Co-dirección de la M.V. María del Carmen VIGLIERCHIO.

Que el tercero se denomina "*Estudio de Citoquinas durante la placentación porcina*", bajo la dirección de la Dra. Adriana del Carmen GARRO.

Que tendrá una duración de sesenta (60) meses, a partir del 1 de Enero de 2018 y hasta el 31 de Diciembre de 2022.

Que de acuerdo a la presentación el citado programa es de Investigación Aplicada.

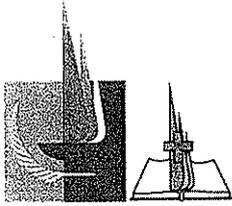
Que el citado programa ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad.

Que el Artículo 5° Anexo I de la Resolución N° 100/99 y su modificatoria N° 88/02 del Consejo Superior, estipula que: "*Todo Programa y todo Proyecto de Investigación que obtenga dos (2) evaluaciones externas favorables será acreditado mediante resolución del Consejo Directivo de cada Facultad a la que pertenezca*".

Que cuenta con dos (2) evaluaciones externas satisfactorias de acuerdo con lo previsto en la Resolución N° 100/99 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que las evaluaciones fueron realizadas por el Dr. Claudio BARBEITO (UNLP) y la Dra. Lidia Marina GOGORZA (UNRN).

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 09 de Noviembre de 2017, puesto el Programa de Investigación a consideración de los Sres. Consejeros, es aprobado por unanimidad.



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución N° 311/2017

112.-

POR ELLO:

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

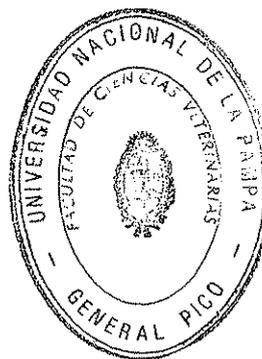
RESUELVE:

ARTICULO 1º: Acreditar como Programa de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el Programa denominado "*Placentación Porcina*" bajo la Dirección de la Dra. Mirta Adriana KONCURAT y la Co-dirección de la Dra. Delia María WILLIAMSON, el cual consta de cuarenta y uno (41) folios y que se adjunta como Anexo I de la presente Resolución.

ARTICULO 2º: El Programa contiene tres (3) Proyectos de Investigación "*Expresión de integrina $\alpha v\beta 1$ y sus ligandos, osteopontina y vitronectina en distintos estadios de la placentación porcina*", "*Determinación de receptores para estrógenos en la gestación porcina*" y "*Estudio de Citoquinas durante la placentación porcina*", serán desarrollados a partir del 1 de Enero de 2018 y hasta el 31 de Diciembre de 2022.

ARTICULO 3º: Justificar los gastos que se produzcan de pasajes, viáticos, combustibles, aparatos, material de laboratorio, etc., del citado proyecto.

ARTÍCULO 4º: Regístrese, comuníquese, tomen conocimiento los interesados, Secretaría de Ciencia, Técnica, Investigación y Posgrado. Cumplido, archívese.



[Handwritten signature]
DR. JOSE MARIA ROMERO
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO
Facultad de Ciencias Veterinarias
UNLPam

ANEXO I

PROGRAMA de INVESTIGACIÓN

Placentación Porcina

Director: Dra Koncurat Mirta Co-Director: Dra Williamson Delia

En cerdos, como en todas las especies mamíferas aún se desconocen los mecanismos celulares y moleculares que permiten una gestación exitosa. A pesar de los diferentes tipos de placenta, el enigma inmunológico de por qué la madre acepta al aloinjerto fetal aún persiste. El cuerpo del animal se adecua a la gestación a través, principalmente, de su sistema endócrino e inmunológico. La placenta porcina es epiteliochorial, no invasiva, difusa, plegada y adecidua. Esas características hacen suponer que las moléculas de adhesión, principalmente las integrinas y sus ligandos, son las herramientas moleculares que permiten las transformaciones estructurales, tanto del epitelio uterino como del trofoblasto para la formación de la placenta, órgano bimodal, transitorio, indispensable para la gestación.

Numerosos son los cambios arquitectónicos que sufre la placenta para aumentar la superficie de contacto que permita el abastecimiento de nutrientes, oxígeno y de eliminar los desechos de los embriones/fetos. Hemos demostrado el papel que desempeñan algunas integrinas ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 3$, $\beta 1$ y $\alpha 3$) durante la diferenciación de la placenta porcina a lo largo de la gestación en la interfase feto-placentaria, y, en particular, su interrelación o regulación por parte del sistema inmunitario.

La secreción de estrógenos realizada por el *conceptus* porcino constituye parte de las señales necesarias para que se produzca el reconocimiento de los embriones por su madre, ya que cambia el tipo de secreción de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) hacia el lumen uterino, por lo que se evita la vía vascular sanguínea sistémica previniendo la lutéolisis. Tradicionalmente, la acción de los estrógenos se describe asociada a dos receptores nucleares esteroides (ER alpha y ER beta) cuya función es como factor de transcripción promovido por ligando. Sin embargo, el estradiol también media eventos de señalización rápidos que involucran RE transmembrana tales como receptor serpentina acoplado a proteína G (GPER 30).

Se sabe que la interfase feto/materna es un sitio inmunológicamente activo con producción de diversas citoquinas regulatorias del proceso de inflamación que permite la implantación y posteriormente la placentación. Las citoquinas son glicoproteínas regulatorias de bajo peso molecular, solubles, de vida media corta que actúan en muy bajas concentraciones de forma autocrina o paracrina, y cuya función es establecer comunicación entre las células del sistema inmune y con las células vecinas a fin de coordinar las interacciones entre células, tales como diferenciación, proliferación, apoptosis, etc. Una amplia variedad de citoquinas se expresan en el útero gestante y se cree que estas moléculas inmunoregulatorias serían las responsables de determinar el tipo de respuesta inmune que se establece durante la gestación y permite una preñez exitosa. Hemos estudiado la expresión de varias citoquinas durante la placentación porcina, como el IFN- γ y las interleuquina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-1 beta, IL-10, IL-12, IL-15 e IL-18 tratando de dilucidar el papel que desempeñan en la interfase feto/materna y el tipo de células inmunitarias sobre las que actúan y como modulan las distintas etapas de la placentación porcina.

El objetivo de este Programa de Investigación es determinar la expresión de moléculas de adhesión y sus ligandos: integrina $\alpha v \beta 1$ y sus ligandos osteopontina y vitronectina; así como la de estrógenos y sus receptores: RE alpha, RE beta asociados a proteína G) y de la enzima citocromo P450 aromatasa sobre muestras de tejido uterino y placentario provenientes de 30, 60-70 días de gestación y a término, así como en cerdas no preñadas. En esos periodos además, se determinará la presencia de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ en suero y homogenatos placentarios maternos y fetales porcinos lo que permitirá comprender el tipo de respuesta inmunitaria y los mecanismos moleculares y celulares que posibilitan la preñez porcina. Los conocimientos que aporte este Programa permitirán originar estrategias que incrementen la tasa de sobrevivencia embrionaria en esta especie de alto valor productivo.

Resumen del Proyecto: “EXPRESIÓN DE INTEGRINA $\alpha v \beta 1$ Y SUS LIGANDOS, OSTEOPONTINA Y VITRONECTINA EN DISTINTOS ESTADÍOS DE LA PLACENTACIÓN PORCINA”.

Numerosos son los cambios arquitectónicos que sufre la placenta para aumentar la superficie de contacto y posibilitar como consecuencia el abastecimiento de nutrientes y oxígeno y la eliminación de los desechos de los embriones/fetos. En nuestro laboratorio estudiamos la expresión de las integrinas y sus ligandos a lo largo de la placentación porcina y establecimos potenciales relaciones con moléculas relacionadas con la inmunidad placentaria y con el sistema endocrino. Así, hemos demostrado la importancia de algunas integrinas ($\alpha v \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$, $\beta 1$ y $\alpha 3$) y sus ligandos (fibronectina, laminina y colágeno tipo V) en la interfase feto-placentaria a lo largo de la gestación porcina y, en particular, su interrelación con citoquinas que participan en el mantenimiento de la preñez. El objetivo de éste trabajo es estudiar el rol de la integrina $\alpha v \beta 1$ y sus ligandos en placentas porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales, tratando de individualizar moléculas implicadas en los procesos de adhesión placentaria durante la gestación porcina. Se determinará la presencia de la integrina $\alpha v \beta 1$ y sus ligandos osteopontina y vitronectina por técnicas inmunohistoquímicas en cortes de placentas porcinas de distintos períodos de gestación.

Resumen del Proyecto: “DETERMINACIÓN DE RECEPTORES PARA ESTRÓGENOS EN LA GESTACIÓN PORCINA”

La placenta porcina epiteliocorial, difusa, adecidua, plegada y no invasiva, es un órgano transitorio indispensable para el desarrollo de la gestación. Para el mantenimiento de la preñez se requiere de interacciones recíprocas entre el *conceptus* y el endometrio donde las hormonas esteroideas, estrógenos y progesterona, cumplen un rol vital en el mantenimiento de la gestación. Los estrógenos sintetizados por el *conceptus* promueven el reconocimiento materno-fetal en la gestación. Los efectos de los mismos están mediados por la interacción con sus receptores nucleares específicos y acoplados a proteína G. Por eso el objetivo de este Proyecto es determinar la inmunoexpresión de los receptores de estrógenos RE alpha, RE beta y acoplados a proteína G (GPER 30) en placenta porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales y de cerdas no gestantes.

Resumen del Proyecto: “ESTUDIO DE CITOQUINAS DURANTE LA PLACENTACIÓN PORCINA”

En cerdos, para que la gestación se lleve a cabo, debe establecerse un diálogo entre el *conceptus* y el endometrio que involucra por un lado al sistema inmunológico a fin de minimizar las posibilidades de rechazo del embrión; las moléculas de adhesión, que permiten el anclaje de los epitelios materno y fetal; y el sistema endócrino, así numerosas hormonas y factores de crecimiento actúan de manera sistematizada para llevar al éxito de la gestación. El objetivo de éste trabajo es estudiar la expresión de citoquinas durante la placentación porcina con el fin de dilucidar el rol que desempeñan en el proceso inflamatorio característico de la interfase feto/materna. Esto permitirá comprender el tipo de respuesta inmunitaria y los mecanismos moleculares y celulares que posibilitan la preñez porcina. Se realizarán dosajes de IL-1b, IL-6, Interferón Gamma (IFN- γ) y Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) en suero y Homogenatos de placentas porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales y de cerdas no gestantes.



TÍTULO: “Expresión de integrina $\alpha\beta 1$ y sus ligandos, osteopontina y vitronectina en distintos estadios de la placentación porcina”

INTEGRANTES

FIRMA

Williamson, Delia María

Koncurat, Mirta Adriana

Vélez, Carolina Lucía

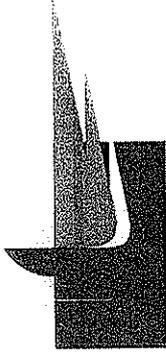
García, Mónica Graciela

Bruni, María de los Angeles

Garro, Adriana del Carmen

Alderete, Sergio

Sergio Alderete



Número de Proyecto:

Año:

(No llenar)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. **TÍTULO del PROYECTO** “Expresión de integrina $\alpha\beta 1$ y sus ligandos, osteopontina y vitronectina en distintos estadios de la placentación porcina”.

1.2. **TIPO de INVESTIGACIÓN:** Básica - Aplicada - Desarrollo Experimental

1.3. **CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL:** 1207, 1211, 1299: Reproducción Animal

1.4. **CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES:** 1407 -Porcinocultura

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. **AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS:** Departamento de Ciencias Básicas.

2.2. **OTRAS INSTITUCIONES:**

2.3. **EQUIPO de TRABAJO:** (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)

2.3.1 INTEGRANTES

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Williamson Delia María	Dra	III	D	Biología Gral	Semi Exc	7 hs
Koncurat Mirta Adriana	Dra	I	A	Biología Gral	Prof. Tit. Excl.	10 hs
Vélez Carolina Lucía	MV	V	I	Biología Gral	Aux. Simpl	3 hs
García Mónica	MV	V	I	Histología	Aux. Excl.	5 hs
Bruni María de los Angeles	Lic Biol	III	I	Biología Gral	JTP Semiexcl.	5 hs
Garro Adriana del Carmen	Dra	III	I	Biología Gral	Prof. Adj. Excl.	5 hs
Alderete Sergio	Est.		AI	Biología Gral	Adscripto	5 hs

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.

Soler, Jimena	UNLPam	Inicio a la Investigación	Dra Garro, Adriana	5 hs
Gastaldo, Keila	UNLPam	Inicio a la Investigación	Dra Williamson, Delia	5 hs

2.3.2. TESISISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.
Fernández, Lorena	Categoría 7 No docente	3 hs

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
	Director Co-Director Tesisista		

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 1 a 5 años con una sola prórroga). 5 años**3.1. FECHA de INICIO:** 01 / 01 / 2018 **FINALIZACIÓN:** 31 / 12 / 2022**4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)**

Numerosos son los cambios arquitectónicos que sufre la placenta para aumentar la superficie de contacto y posibilitar como consecuencia el abastecimiento de nutrientes y oxígeno y la eliminación de los desechos de los embriones/fetos. En nuestro laboratorio estudiamos la expresión de las integrinas y sus ligandos a lo largo de la placentación porcina y establecimos potenciales relaciones con moléculas relacionadas con la inmunidad placentaria y con el sistema endocrino. Así, hemos demostrado la importancia de algunas integrinas ($\alpha\beta3$, $\alpha5\beta1$, $\beta1$ y $\alpha3$) y sus ligandos (fibronectina, laminina y colágeno tipo V) en la interfase feto-placentaria a lo largo de la gestación porcina y, en particular, su interrelación con citoquinas que participan en el mantenimiento de la preñez. El objetivo de éste trabajo es estudiar el rol de la integrina $\alpha\beta1$ y

sus ligandos en placentas porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales, tratando de individualizar moléculas implicadas en los procesos de adhesión placentaria durante la gestación porcina. Se determinará la presencia de la integrina $\alpha\beta 1$ y sus ligandos osteopontina y vitronectina por técnicas inmunohistoquímicas en cortes de placentas porcinas de distintos períodos de gestación.

4.1 Palabras claves: (de 4 a 6)

Integrinas, Osteopontina, Vitronectina, Placenta, Porcino.

4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras) Res. N° 097-CS-12.

Numerous are the architectural changes that the placenta undergoes to increase the surface of contact and to enable as a consequence the supply of nutrients and oxygen and the elimination of the waste of the embryos / fetuses. In our laboratory we studied the expression of integrins and their ligands along the porcine placentation and established potential relationships with molecules related to placental immunity and the endocrine system. Thus, we have demonstrated the importance of some integrins ($\alpha\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\beta 1$ and $\alpha 3$) and their ligands (fibronectin, laminin and type V collagen) at the fetal-placental interface throughout porcine gestation and, in particular, their interrelation with cytokines involved in the maintenance of pregnancy. The objective of this work is to study the role of integrin $\alpha\beta 1$ and its ligands in porcine placentas from different gestational periods, trying to individualize molecules involved in the placental adhesion processes during porcine gestation. The presence of the integrin $\alpha\beta 1$ and its ligands osteopontin and vitronectin will be determined by immunohistochemical techniques in samples of porcine placentas of different periods of gestation.

4.3. Key words: (de 4 a 6)

Integrins, Osteopontin, Vitronectin, Placenta, Porcine.

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

Numerosos son los cambios arquitectónicos que sufre la placenta para aumentar la superficie de contacto y posibilitar como consecuencia el abastecimiento de nutrientes y oxígeno y la eliminación de los desechos de los embriones/fetos (Wooding and Burton, 2008). En nuestro laboratorio estudiamos la expresión de las integrinas y sus ligandos a lo largo de la placentación porcina y establecimos potenciales relaciones con moléculas relacionadas con la inmunidad placentaria y con el sistema endocrino. Así, hemos demostrado la importancia de algunas integrinas ($\alpha\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\beta 1$ y $\alpha 3$) y sus ligandos (fibronectina, laminina y colágeno tipo V) en la interfase feto-placentaria a lo largo de la gestación porcina y, en particular, su interrelación con citoquinas que participan en el mantenimiento de la preñez (Williamson, 2011; Vélez *et al.*, 2017). La integrina $\alpha\beta 1$, posee como receptores a la fibronectina, la vitronectina, el fibrinógeno y la osteopontina (Jimenez-Marin, 2002). Bowen *et al.* (1996), Johnson *et al.* (2001) y Frank (2015) reportaron que la presencia de las subunidades de integrina $\alpha\beta$ y $\beta 1$ durante el período de implantación porcina y ovina, jugaría un rol crucial en la adhesión de las células del trofoblasto con las células del epitelio luminal endometrial a través de la unión con sus ligandos. No hay estudios acerca de la expresión de la integrina $\alpha\beta 1$ en la interfase placentaria porcina en etapas posteriores a la implantación.

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína de la matriz extracelular implicada en una variedad de funciones, incluyendo adhesión celular y migración. Distintos estudios indican que las integrinas $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ tienen afinidad similar para la secuencia aminoacídica Arg-Gly-Asp (RGD) que se encuentra en la OPN (Hu *et al.*, 1995; Garlow, 2002). Jonhson *et al.* (2014)

reportan que durante la implantación en porcinos y ovinos la OPN interactúa con los receptores de integrinas expresados apicalmente en el epitelio luminal uterino (LE) y el trofoblasto para unir el *conceptus* al útero. Las investigaciones realizadas con cerdos y ovejas han establecido la importancia de la OPN durante el período de peri-implantación cuando los *concepti* son libres dentro del lumen uterino y requieren una señalización paracrina entre el/ellos y el endometrio (Garlow, 2002; Johnson *et al.*, 2014). También se ha demostrado que en el sistema inmune, la OPN es sintetizada por los macrófagos activados, las células T activadas y las células NK activadas. Existe una gran variedad de mediadores inflamatorios y factores de crecimiento que estimulan la transcripción de OPN como el TNF- α , IL-1b e IL-2, entre otros. La OPN co-estimula la proliferación de células y se clasifica como una citoquina Th1 por su capacidad para aumentar la producción de INF- γ e IL-2 (Fonollosa Pla, 2004; Wang and Dendhardt, 2008). Por otro lado se ha demostrado que la OPN es un importante factor anti-apoptótico en varias circunstancias, ya que la OPN bloquea la activación citotóxica inducida por los macrófagos y las células T (Denhardt *et al.*, 2001; Standal *et al.*, 2004). Durante la gestación porcina se ha determinado la expresión de OPN de un modo semicuantitativo; pero no hay registros que cuantifiquen su expresión en la interfase feto-materna, al menos en relación con uno de sus receptores, la integrina $\alpha\beta 1$, a fin de desentrañar su rol de adhesión celular durante la placentación porcina. Durante la gestación porcina hay etapas cruciales, tales como los 30 y 70 días de gestación (dg), momentos en que la apoptosis celular es elevada debido a la gran remodelación tisular de la placenta (Cristofolini *et al.*, 2010). Tampoco hay trabajos sobre la expresión de OPN y su posible relación con los niveles de citoquinas en estas etapas de la gestación.

La vitronectina contiene una secuencia RGD para unión a integrinas ($\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ o $\alpha IIb\beta 3$) que permite anclar células a la matriz extracelular. La interacción celular con vitronectina puede inducir la migración y tener un efecto sobre el crecimiento y la diferenciación celular (Felding-Habermann, 1993). La vitronectina se expresa, durante la gestación en caprinos, en las células endometriales y blastocísticas unidas durante el período de peri-implantación y puede jugar un papel en la complejidad de la cascada de implantación en esta especie (García *et al.*, 2004). No hay estudios sobre la expresión de la vitronectina en la interfase placentaria durante la gestación porcina, ni la relación que puede establecer con uno de sus receptores, la integrina $\alpha\beta 1$.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

- VÉLEZ C L, WILLIAMSON D M, KONCURAT M A. Determinación de IL-2 e IL-4 durante la gestación porcina. Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Capítulo de la Sociedad de Medicina Veterinaria. IX Jornadas y Reunión Anual. AAIV. Buenos Aires, Noviembre de 2016.
- WILLIAMSON D; RIESCO O; BARBEITO C; KONCURAT M. Perfil y rol de citoquinas en suero, homogenatos placentarios maternos y fetales a través de la gestación porcina. REDVET. 2015 vol.16 n°8. p1 - 14. ISSN1695-7504.
- VIGLIERCHIO M; GARCÍA M; RIESCO O; WILLIAMSON D; WILLIAMS S; LACOLLA D; KONCURAT M; YAFUL G. Progesterone receptors and progesterone concentration in serum and porcine maternal placental extracts. Chile. Providencia. 2015. Revista. Resumen. VI SLIMP & V LASRI. Latin American. Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta Home Organization About Become a Member Tribute Events News Contacts.
- VELEZ C; WILLIAMSON D; MARTIN P; KONCURAT M. Estrógenos y Expresión de la Integrina $\alpha\beta 3$ y Fibronectina en la Interfase Feto-Placentaria durante la Gestación.

- Argentina. Río Cuarto. 2014. Libro. Artículo Breve. Congreso. VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. Universidad Nacional de Río Cuarto
- VELEZ C; WILLIAMSON, DELIA; SAMPEDRO F; MARTIN P; GARCÍA M; KONCURAT M. Expresión de integrinas avb3 y fibronectina en interfase placentaria porcina. Argentina. La Plata. 2014. Libro. Resumen. Congreso. XVI Congreso y 13° Jornadas de Educación. Sociedad de Ciencias Morfológicas La Plata. Sociedad Cs Morfológicas La Plata
 - KONCURAT, M; BRUNI M; GARCÍA M; GARRO A; HERNANDEZ M; LACOLLA D; RIESCO O; VELEZ C; VIGLIERCHIO M; WILLIAMSON D. Placentación porcina. Argentina. Santa Rosa. 2014. Libro. Resumen. Jornada. Jornadas de Ciencia y Técnica 2014.
 - KONCURAT M; WILLIAMSON D; BRUNI M; GARCÍA M; GARRO A; GELADA M; HERNANDEZ M; MARTIN P; RIESCO O; SALAS C; SAMPEDRO F; VELEZ C; VIGLIERCHIO M. Estudio de moléculas de adhesión que participan en la placentación porcina. Argentina. Santa Rosa. 2014. Libro. Resumen. Jornada. Jornadas de Ciencia y Técnica 2014.
 - VELEZ C; WILLIAMSON D; KONCURAT M. Detección de fibronectina durante la placentación porcina. *Archivos latinoamericanos de producción animal.*: Asociación Latinoamericana de Producción Animal. 2014 vol.22 n°1/2. P 31 - 36. ISSN 1022-1301.
 - VELEZ C; WILLIAMSON D; SAMPEDRO F; GARCIA M; HERNANDEZ M; KONCURAT M. Expresión de Fibronectina en la Placenta Porcina. Argentina. La Plata. 2013. Libro. Resumen. Congreso. XV Congreso Sociedad Ciencias Morfológicas, 12 Jornadas de Educación. Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata
 - KONCURAT M; WILLIAMSON D; YAFUL G. Interrelación de IL-15 y estrógenos durante la preñez porcina temprana. *Medicina (Buenos Aires)*. 2012 vol.72 N°II. p 140 - 140. ISSN 0025-7680.
 - WILLIAMSON D; RIESCO O; VELEZ C; KONCURAT M. Determinación de la concentración de IFN-g, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 en suero, extractos placentarios maternos y fetales a través de la gestación porcina.. *Ciencia Veterinaria.*: UNLPam. 2011 vol. n°. p 30 - 41. ISSN 1515-1883.
 - WILLIAMSON DM. Estudio de la presencia de integrinas, y su relación con los niveles de esteroides e interleuquinas, durante la placentación porcina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2011.
 - KONCURAT M; YAFUL G; RIESCO O; WILLIAMSON D. Determination of IL-6, Progesterone and Estrogens during early pregnancy in pigs. *BIOCELL*.Mendoza: INST HISTOL EMBRIOL-CONICET. 2011 vol.35 n°2. p 142 - 142. ISSN 0327-9545.
 - SANCHIS G; WILLIAMSON D; CRISTOFOLINI A; MERKIS C; KONCURAT M. Osteopontin and avb3 integrins immunoexpression in porcine placenta tissues: preliminary studie. *BIOCELL.*: INST HISTOL EMBRIOL-CONICET. 2009 vol. n°. p 256 - 256. ISSN 0327-9545.
 - WILLIAMSON D; SANFILIPPO S; KONCURAT M. Expression of a3, b3 and b1 integrins subunits and avb3 during early porcine gestation. *BIOCELL.*: INST HISTOL EMBRIOL-CONICET. 2009 vol. n°. p 256 - 256. ISSN 0327-9545.
 - WILLIAMSON D; KONCURAT M. Expresión de la integrina avb3 y de las subunidades de las integrinas a3 y b1 durante la placentación porcina. *InVet.*: UBA. 2009 vol. n°. p 31 - 37. ISSN 1514-6634.
 - WILLIAMSON D; ALONSO G; HERNANDEZ M; KONCURAT M. Expression of subunit b3 of integrins during porcine placentation: preliminary studie. *BIOCELL*.Mendoza: INST HISTOL EMBRIOL-CONICET. 2008 vol.32 n°1. p 134 - 134. ISSN 0327-9545.

- WILLIAMSON D; YAFUL G; RIESCO O; KONCURAT M. Progesterona, Estrógenos y expresión de Integrinas en la Gestación Temprana Porcina. *Ciencia Veterinaria*: UNLPam. 2008 vol. n°. p 13 - 22. ISSN 1515-1883.
- RIESCO O; YAFUL G; WILLIAMSON D; KONCURAT M. Comparative study of radioimmunoassay and chemiluminescence in progesterone determinations in sera and fetal and placental maternal porcine homogenates. *International Journal of Morphology*. Temuco: International Journal of Morphology. 2008 vol.26 n°3. p 718 - 718. . e-ISSN 0717-9502
- WILLIAMSON D; KONCURAT M. Expression of b1 and a3 integrin subunits during porcine gestation. *BIOCELL*. Mendoza: INST HISTOL EMBRIOL-CONICET. 2007 vol.31 n°1. p 178 - 178. ISSN 0327-9545.
- WILLIAMSON, DELIA; KONCURAT, MIRTA. Expresión de la integrina avb3 y de las subunidades de integrinas a3 y b1 durante la placentación porcina.. *InVet*. Buenos Aires: 2006 vol. n°. p - . ISSN 1514-6634.

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

Se trabaja en forma conjunta en un Programa de investigación de esta Facultad denominado "Placentación porcina".

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

PROBLEMA CIENTÍFICO

Aún no se conocen los mecanismos moleculares que permiten una gestación exitosa. La placentación porcina depende de la interrelación espacial y temporal de las integrinas y sus ligandos. Comprender dichos mecanismos permitirá disminuir las pérdidas embrionarias y fetales.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el rol de la integrina $\alpha\beta 1$ y sus ligandos en placentas porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales, tratando de individualizar moléculas implicadas en los procesos de adhesión placentaria durante la gestación porcina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar la determinación de la integrina $\alpha\beta 1$ sobre preparados histológicos de placentas porcinas de diferentes períodos de gestación.

Realizar la determinación de vitronectina sobre preparados histológicos de placentas porcinas de diferentes períodos de preñez.

Realizar la determinación de osteopontina sobre preparados histológicos de placentas porcinas de diferentes períodos de preñez.

HIPÓTESIS

En el proceso de la placentación porcina existe una relación entre la expresión de la integrina $\alpha\beta 1$ y sus ligandos (osteopontina y vitronectina)

RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Éste estudio aportará conocimientos sobre la gestación porcina que brindará información acerca de los mecanismos involucrados en las pérdidas embrionarias y fetales, patologías de

suma importancia que afectan a esta especie. Disminuir dichas pérdidas provocará un incremento en la productividad que impactará en las empresas de ganado porcino.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

Animales. Se utilizarán 5 muestras placentarias provenientes de cerdas mestizas de la zona de General Pico, La Pampa, de los siguientes períodos gestacionales: 15-17 (en adelante 17), 30-35 (en adelante 30), 60, 70 y 114 días de gestación (dg). Además, se procesarán 5 muestras de endometrio uterino provenientes de cerdas no gestantes (NG). Se estimará la edad gestacional de las placentas de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los embriones/fetos obtenidos de cada cerda gestante (Marrable, 1971). Las etapas de gestación fueron seleccionadas de ese modo, ya que en ellas se cumplen eventos moleculares y fisiológicos indispensables para una gestación exitosa. A los 15-17 dg finaliza la etapa de implantación en la gestación porcina. A los 32 dg comienza la osificación y el desarrollo del sistema inmunológico. Entre los 60 y 70 dg se alcanza el mayor crecimiento placentario que luego continúa como una meseta en su desarrollo, ya que a partir de los 70 dg son los fetos quienes crecen de manera exponencial; también en este momento se observa la mayor remodelación placentaria celular determinada por estudios de apoptosis (Cristofolini, 2010). Los 114 dg (período a término) marcan el fin de los eventos celulares y moleculares que permitían la gestación y la cerda se prepara para el parto.

Placentas: Las placentas se lavarán con solución salina de Hank's (SSH), conteniendo 10.000 U/ml de penicilina G sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomina y 2,5 µg/ml de fungizona, manteniéndolas a 4°C hasta su procesamiento inmediato en el laboratorio. Se detectará la ubicación de los embriones/fetos y se realizará la toma de muestra de la interfase feto-materna en el sitio de implantación por el borde anti-mesometrial de los cuernos uterinos; inmediatamente se las preservará para el análisis a través de microscopía.

Análisis de la estructura de la placenta y útero. 1. Técnica para Microscopía Óptica: Se fijarán las muestras placentarias en formol adicionado de tampón fosfato al 10 %. Se deshidratarán las muestras: se colocarán en alcohol 96° una hora (1h), nuevamente en alcohol 96° 1h, deshidratante histológico (Biopur) 1h, deshidratante histológico/xilol 1h y xilol 1h. Luego se incluirán en parafina. Se realizarán los cortes de cada muestra de 5 µm, y se montarán sobre portaobjetos positivados. 2. Tinción de Hematoxilina-Eosina: Los cortes obtenidos en el párrafo anterior serán desparafinados y rehidratados. Luego se colorearán con Hematoxilina-Eosina (Luna, 1968). La observación se realizará a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss), adquiriendo las imágenes mediante una cámara digital Powershot G20 (Canon INC, Japón) adosada al microscopio.

Técnica inmunohistoquímica: Determinación de la integrina $\alpha\beta 1$, osteopontina y vitronectina: Mediante la técnica de inmunohistoquímica, por inmunoperoxidasa, se determinará la presencia de integrina $\alpha\beta 1$, osteopontina y vitronectina. Brevemente, los cortes histológicos obtenidos serán desparafinados, rehidratados y luego lavados con solución salina tamponada (pH 7,3). Los cortes serán previamente tratados con H_2O_2 al 3%, se les realizará recuperación antigénica y se los tratará luego con bloqueante de biotina endógena (Avidin Biotin blocking reagents, Cell Marque, USA). Seguidamente, serán incubados con el anticuerpo primario. Posteriormente serán incubados con el anticuerpo secundario biotinilado, y tratados con el complejo de peroxidasa-estreptavidina. Se incubarán con solución cromógena (diaminobenzidina: DAB) y se teñirán con hematoxilina de Mayer, como contraste. Se deshidratarán y montarán con Bálsamo de Canadá (Biopur, Argentina) para ser observados con un microscopio Axiophot (Zeiss), la adquisición de imágenes se realizará a través de la cámara digital Powershot G20 (Canon INC, Japón), adosada al microscopio.

Estadística. A la observación de los resultados de la expresión de las moléculas determinadas por inmunohistoquímica, primero se realizará un análisis semicuantitativo, tal como fue expresado por Conrad y col (2016), con una escala establecida, determinando que:

(-)= negativo, (+)= positividad leve, (++)= positividad moderada y (+++)= positividad fuerte. Luego, a las microfotografías de 400X se las analizará mediante el software de imágenes ImageJ (Ferreira y Rasband, 2012) expresando los resultados de un modo cuantitativo (Vasconcellos et al., 2014). Se determinará sobre la interfase placentaria (epitelio luminal endometrial y trofoblasto), la densidad óptica (DO) y el porcentaje de área inmunomarcada (%AIM) de la integrina $\alpha\beta 1$, de la osteopontina y vitronectina con el objetivo de interrelacionar la presencia de dichas moléculas.

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Poder identificar moléculas claves durante la placentación porcina permitirá profundizar el conocimiento de los mecanismos fisiológicos necesarios para una gestación exitosa. Dichos conocimiento se podrán utilizar para mejorar la capacidad uterina, la sobrevida del conceptus/embriones/fetos y la salud reproductiva porcina.

Un mejor conocimiento de los mecanismos que median las interacciones entre el conceptus/embriones/fetos y el tracto reproductivo de la cerda implicará importantes avances para mejorar la productividad de esta especie lo que producirá un impacto económico en las empresas de ganado porcino. Además, aportará elementos en la comprensión de los procesos involucrados en el correcto desarrollo de la placentación porcina que permitirá dilucidar mecanismos acerca de las pérdidas embrionarias y fetales, patologías de importancia que afectan a esta especie. Así como también, aportará en las causas que afectan la uniformidad y el crecimiento potencial de los lechones recién nacidos, parámetros muy deseables en los sistemas productivos intensivos, extensivos y mixtos.

Poder desarrollar este estudio permitirá la formación de recursos humanos en la investigación científica, tanto en la adquisición de habilidades intelectuales como en destrezas manuales necesarias para la realización de la parte experimental.

Este estudio permitirá generar conocimientos en el área de la reproducción animal, particularmente en los mecanismos fisiológicos que participan en la placentación de la cerda gestante.

Además, debido a los gastos económicos que generan los cuidados de las cerdas preñadas, comprender los mecanismos que originan la pérdida embrionaria y fetal, redundará en beneficios económicos a los productores porcinos.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Año 1

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Toma de muestra				x	x	x	x	x	x	x	
Dosaje de ligandos							x	x	x	x	x
Presentación en Congresos/Publicaciones								x	x	x	x
Informe de Avance											x

Año 2

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Toma de muestra				x	x	x	x				
Dosaje de moléculas de adhesión	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Presentación en Congresos/Publicaciones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X

Informe Parcial												X
-----------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---

Año 3

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Toma de muestra				x	x	x	x				
Dosaje de moléculas de adhesión y ligandos	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Presentación en Congresos/Publicaciones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Informe Parcial											X

Año 4

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Toma de muestra				x	x	x	x				
Dosaje de moléculas de adhesión	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Presentación en Congresos/Publicaciones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Informe Parcial											x

Año 5

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Toma de muestra				x	x	x	x				
Dosaje de moléculas de adhesión	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Presentación en Congresos/Publicaciones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Informe Final										x	X

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO**7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:**

Laboratorios equipados con freezer, heladera, balanzas, pHmetro, centrífuga. Microscopio. Software obtención imágenes. Máquina fotográfica.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD**7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN**

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

--

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)

*Equipamiento Infraestructura..... \$ -----

Bienes de Consumo	\$ 125.000
Bibliografía.....	\$ -----
Viajes.....	\$ 15.000
Personal de Apoyo	\$ -----
Otros (especifique)	\$ 000
Total.....	\$ 140.000
Presupuesto Estimado Anual:	
1° año: \$ 40.000	
2° año: \$ 30.000	
3° año: \$ 30.000	
4° año: \$ 25.000	
5° año: \$ 15.000	
Total del proyecto: \$ 140.000	

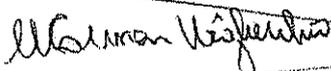
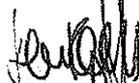
** El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.*

8.1. BIBLIOGRAFÍA

- Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. Biol Reprod. 1996 Nov;55(5):1098-1106.
- Conrad M, Freitag N, Diessler M, Hernandez R, Barrientos G, Rose M, Casas L, Barbeito C, Blois S. Differential spatiotemporal patterns of galectin expression are a hallmark of endotheliochorial placentation. Am J Reprod Immunol. 2016;75:317-325.
- Cristofolini A. Estudio de la Remodelación Celular Durante la Placentación Porcina. Tesis doctoral. FacCs Vet.UNRC. 2010.
- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. J. Clin. Invest. 2001;107(9):1055-1061.
- Felding-Habermann B. Vitronectin and its receptors. Curr Opin Cell Biol. 1993;5(5):864-868.
- Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide. Ed. IJ 1. 46r. 2012. p. 1-198.
- Fonollosa Pla V. Estudio de la Osteopontina en la esclerosis múltiple y su relación con la progresión de la enfermedad. Tesis doctoral. Barcelona. 2004. 124p.
- Frank JW. Characterization of integrins and osteopontin at the Uterine-placental interface during pregnancy In pigs and sheep. Tesis doctoral. Texas A&M University. 2015.
- García P, Nieto A, Sánchez M A, Pizarro M, Flores JM. Expression of α v, α 4, α 5 and β 3 integrin subunits, fibronectin and vitronectin in goat peri-implantation. Anim Reprod Sci. 2004;80:91-100.
- Garlow J; Ka H; Jonson G; Burghardt R; Jaeger L, Bazer F. Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. Biol Reprod. 2002;66:718-725.
- Hu DD, Lin EC, Kovach NL, Hoyer JR, Smith JW. A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5. J Biol Chem. 1995; 270(44):26232-8.

- Jimenez-Marín. Caracterización Molecular de las Integrinas Beta-1 (Cd29) y Beta-3 (Cd61) Porcinas. Obtención de Anticuerpos contra dominios específicos de ambas moléculas. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. 2002.
- Johnson G, Burghardt R, Bazer F. Osteopontin: a leading candidate adhesion molecule for implantation in pigs and sheep. *J.Anim Sci Biotechnol.* 2014;5:56.
- Johnson GA, Bazer FW, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Pfarrer C, Spencer TE, Burghardt RC. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol Reprod.* 2001 Sep;65(3):820-828.
- Kridli RT, Khalaj K, Bidarimath M, Tayade C. Placentation, maternal-fetal interface, and conceptus loss in swine. *Theriogenology* 2016;85(1):135-144.
- Margni R.A. Inmunología e Inmunología. Fundamentos. 5ta edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1996.
- Marrable A. The embryonic pig: A chronological account. Exeter (ed), Pitman medical, London, 1971.
- Marrable, A.W. In: The embryonic pig: a chronological account. 1971. Ed. Exeter, Pitman Medical, London.
- Pope W, First N. Factors affecting the survival of pig embryos. *Theriogenology.* 1985;23, 91-105.
- Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp. Oncol.* 2004;26(3):179-184.
- Vélez C, Barbeito C, Koncurat M. $\alpha v \beta 3$ Integrin and fibronectin expressions and their relation to estrogen and progesterone during placentation in swine. *Biotechnic & Histochemistry.* 2017. En prensa.
- Wang KX and Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. 2008. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(5-6):333-45.
- Williamson DM. Estudio de la presencia de integrinas, y su relación con los niveles de esteroides e interleuquinas, durante la placentación porcina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2011.
- Wooding P, Burton G. Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution. Cambridge, United Kingdom, Ed. Springer, 2008, p. 105-114.

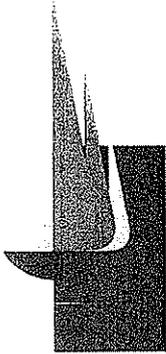
TITULO: "Determinación de receptores para estrógenos en la gestación porcina"

INTEGRANTES	FIRMA
Yaful, Graciela Noemí	
Viglierchio, María del C	
García, Mónica Graciela	
Lacolla, Daniel Vicente	
Sierra, Griselda Denisse	
Witt, Silvana Lorena	
Koncurat, Mirta Adriana	
Marrón, Yolanda Mabel	
Williams, Sara	

Número de Proyecto:

Año:

(No llenar)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. 1.1. TÍTULO del PROYECTO “Determinación de receptores para estrógenos en la gestación porcina”

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Básica - Aplicada - Desarrollo Experimental

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: 1207, 1211, 1299: Reproducción Animal

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: 1407-Porcinocultura

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS: Departamento de Ciencias Básicas y Departamento de Producción Animal.

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

2.3. EQUIPO de TRABAJO: (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)

2.3.1 INTEGRANTES

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Respon-sabilidad (I)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Yaful, Graciela Noemí	Dra.	III	D	Obstetricia	JTP S	5 horas
Viglierchio, María del C	M.V.	IV	CD	Química Biológica	PA SE	10 horas
García, Mónica Graciela	M.V.	V	I	Histología	Ay. 1° EX	5 horas
Lacolla, Daniel Vicente	M.V.	III	I	Histología	PA EX	5 horas
Sierra, Griselda Denisse	Bioq.	s/c	I	Química Biológica	Ay. 1° SE	5 horas
Witt, Silvana Lorena	Lic.	V	I	Química Biológica	Ay. 1° SE	5 horas
Koncurat, Mirta Adriana	Dra.	I	A	Biología General	Prof. Titular	5 horas
Gastaldo, Keila	Est.		AI	Biología General		2 horas
Soler, Jimena	Est.		AI	Biología General		2 horas

(I) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.
Marrón, Yolanda Mabel	UNLPam	Perfeccionamiento en la Investigación	Yaful, Graciela Noemí	5 horas

2.3.2. TESISISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.
Viglierschio, María del Carmen	Dra en Cs Veterinarias	Determinación de los receptores para estrógenos y progesterona, en tejidos placentarios fetales y maternos de hembras porcinas, y su relación con la concentración sérica y tisular	FCV -UNLP	Dra Yaful Graciela	10 hs

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.
Fernández, Lorena	Categoría 7 No docente	3 hs

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.
Viglierschio, María del Carmen	Tesista	Determinación de los receptores para estrógenos y progesterona, en tejidos placentarios fetales y maternos de hembras porcinas, y su relación con la concentración sérica y tisular.	10
Yaful, Graciela Noemí	Director	Determinación de los receptores para estrógenos y progesterona, en tejidos placentarios fetales y maternos de hembras porcinas, y su relación con la concentración sérica y tisular	10

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 1 a 5 años con una sola prórroga)

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 2018 **FINALIZACIÓN:** 31 / 12 / 2022

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

La placenta porcina epiteliocorial, difusa, adecidua, plegada y no invasiva, es un órgano transitorio indispensable para el desarrollo de la gestación. Para el mantenimiento de la preñez se requiere de interacciones recíprocas entre el *conceptus* y el endometrio donde las hormonas esteroideas, estrógenos y progesterona, cumplen un rol vital en el mantenimiento de la gestación. Los estrógenos sintetizados por el *conceptus* promueven el reconocimiento materno-fetal en la gestación. Los efectos de los mismos están mediados por la interacción con sus receptores nucleares específicos y acoplados a proteína G. Por eso el objetivo de este proyecto es determinar la inmun expresión de los receptores de estrógenos RE alpha, RE beta y acoplados a proteína G (GPER 30) en placenta porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales y de cerdas no gestantes.

4.1 Palabras claves: (de 4 a 6)

Porcino / Placenta/ Estrógenos / Receptores

4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras) Res. N° 097-CS-12.

The porcine placenta diffuse, adecidua, folded and non-invasive is a transient organ essential for the development of gestation. Pregnancy maintenance requires reciprocal interactions between the *conceptus* and the endometrium where the steroid hormones, estrogens and progesterone play a vital role in the maintenance of gestation. The estrogen synthesized by the *conceptus* promote maternal-fetal recognition in gestation. The effects of these are mediated by interaction with their specific nuclear receptors and G protein Coupled. Therefore, the aim of this work is to determine the immun expression of estrogen receptors ER alpha, ER beta and G protein coupled (GPER 30) in porcine placenta from different gestational periods and non-pregnant sows.

4.3. Key words: (de 4 a 6)

Porcine / Placenta / Estrogens / Receptors

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

Dado que las pérdidas prenatales y posnatales limitan la rentabilidad económica en la producción porcina, el manejo reproductivo es fundamental para alcanzar índices óptimos que se traduzcan en una mayor rentabilidad y eficiencia de la inversión. En cerdos, la mortalidad embrionaria temprana sin causa específica, ya sea infecciosa o tóxica, está situada entre un 30 a 40 %, observándose que la mayoría de las pérdidas ocurren antes del día 30 de gestación (Pope, 1994, Bazer y col., 2014), aunque en nuestra región, en el norte de la provincia de La Pampa y sur de Córdoba, puede alcanzar hasta un 50% - 52% (Bosch y col., 2001; Yaful, 2009; Garro, 2015). El ambiente prenatal proporcionado por la cerda, es crucial en la supervivencia de los embriones/fetos, y la placenta como órgano transitorio es indispensable para el desarrollo de la gestación. De ella no sólo depende la implantación del *conceptus* y el mantenimiento del mismo, sino que además marca la posibilidad de sobrevida postnatal de las crías (Van der Lende and Vans Rens, 2003).

La placenta porcina es epiteliocorial, difusa, adecidua, plegada y no invasiva (Amoroso, 1952; Perry, 1981). El mantenimiento de la preñez requiere de interacciones recíprocas entre el *conceptus* y el endometrio. La placenta produce una variedad de hormonas, tanto proteicas como esteroides, que actúan de manera parácrina sobre el endometrio para permitir cambios en la expresión de los genes que soportan el crecimiento y desarrollo del *conceptus* (Spencer and Bazer, 2004). Actúan sobre el endometrio regulando la diferenciación y función de las células

uterinas (Mulac-Jericevic and Conneely, 2004; Sukjumlong et al., 2005; Sukjumlong et al., 2009, Geisert et al., 2017).

La placentación en porcinos está precedida por un prolongado período de peri-implantación caracterizado por la migración, espaciamiento y elongación del *conceptus* (días 4-12 post-fertilización). Las hormonas esteroides secretadas por el ovario, estrógenos (E) y progesterona (P₄), producen una serie de cambios en el endometrio de la cerda gestante que permite la implantación de los embriones. La acción principal sobre el útero gestante de los mamíferos es la proliferación y diferenciación de las células endometriales (Rider et al., 1998), que promueven la aposición del trofoblasto al epitelio materno seguido de la adhesión del mismo al epitelio luminal uterino, proceso que permite la implantación y la placentación (Garlow et al., 2002; Geisert et al., 2017).

Algunos autores postularon que la secreción de estrógenos realizada por el *conceptus* porcino constituye parte de las señales necesarias para que se produzca el reconocimiento de los embriones por su madre, cambiando el tipo de secreción de la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) hacia el lumen uterino, por lo que se evita la vía vascular sanguínea sistémica previniendo la lutéolisis (Bazer and Thatcher, 1977; Ziecik et al., 2016). La transición de la secreción endócrina a exócrina ocurre entre los días 10 y 12 de gestación y estaría asociada con el período de elongación del *conceptus*. Un segundo período de producción de E₂ ocurriría entre los 15 a 25-30 días de preñez. Otros autores sugieren que las dos fases de producción de E₂ son necesarias para la prolongación de la secreción de PGF_{2α} hacia el lumen uterino (Spencer and Bazer, 2004). Numerosos trabajos apoyan la hipótesis anterior, así se postula que se producen cambios en la proporción de PGE₂:PGF_{2α}, siendo el estradiol el agente más eficaz del cambio (Ziecik, 2002; Ziecik et al., 2016). Durante la gestación temprana, los estrógenos placentarios actúan sobre el epitelio endometrial en forma parácrina incrementando la expresión de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento semejante a la insulina I (IGF-I), el factor 7 de crecimiento del fibroblasto (FGF-7), y de osteopontina (Spencer and Bazer, 2004). Estos factores estimulan la actividad mitótica del trofoectodermo (Wilson and Ford, 2000) y permiten el desarrollo del *conceptus* mediante acciones parácrinas y autócrinas (Persson et al., 1997; Spencer and Bazer, 2004).

La progresión de la preñez durante la peri-implantación requiere de una liberación de estrógenos controlada, incrementos de estas hormonas por encima de los niveles fisiológicos pueden terminar con la gestación o retrasar el desarrollo del *conceptus* (Cardenas et al., 1997; Heano y Hernández, 2000).

En la biosíntesis de los estrógenos, es imprescindible el rol de las enzimas citocromo P450-aromatasa, que catalizan el paso limitante en la producción de esta hormona tanto en el ovario como en cualquier tipo celular. Las células que expresan algunas de las diferentes isoformas de aromatasa se caracterizan por su actividad esteroideogénica. El *conceptus* porcino incrementa la concentración de aromatasa (CYP 19 A) y de proteína regulatoria aguda esteroideogénica (STAR) sobre el día 11-12 de la gestación (Geisert et al., 2016).

Los efectos fisiológicos de los estrógenos pueden ser explicados a través de vías de señalización diversas que se originan en la existencia de múltiples tipos de receptores y por lo tanto múltiples mecanismos de señalización celular que pueden durar segundos, horas a días (Prossnitz and Barton, 2011). Tradicionalmente, la acción de los estrógenos se describe asociada a dos receptores nucleares esteroides (ER alpha y ER beta) cuya función es como factor de transcripción promovido por ligando. Sin embargo, el estradiol también media eventos de señalización rápidos que involucran RE transmembrana tales como receptor serpentina acoplado a proteína G (GPER 30) (Zimmerman et al., 2016). Geisert et al. (2014; 2017) expresan a partir de los datos obtenidos que los estrógenos fetales actúan sobre los RE alpha en el epitelio luminal uterino permitiendo el reconocimiento materno, estimulando la secreción uterina y regulando la elongación e implantación. Sin embargo, Viglierchio y col. (2017) sugieren que los estrógenos fetales se ligan al RE beta trofoblastico para promover la liberación de moléculas de señalización relacionadas con la inmunotolerancia materna y la remodelación placentaria. La expresión de los

receptores de estrógenos en el epitelio luminal y en el trofoblasto en la peri-implantación, regulan la comunicación epitelio – estroma uterino esencial para el desarrollo, la función uterina y la supervivencia de los embriones hasta el fin de la gestación.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

- Concentración de Progesterona y expresión de las Integrinas $\alpha v \beta 3$ $\beta 1$ y $\alpha 3$ durante la placentación porcina. Williamson Delia, Yaful Graciela, Riesco Oscar, Koncurat Mirta. XX Reunión Latinoamericana de Producción Animal, XXX Reunión Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal y V Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol 15 (Sup.1):336-340, 2007.
- Estrogen, progesterone and integrins during porcine placentation. Williamson Delia, Riesco Oscar, Alonso Gabriela, Hernández Mabel, Moschetti E. and Koncurat Mirta. III Latin-American Symposium on Maternal-Fetal Interaction Placenta-Research & Clinical. 4-7 de noviembre, 2007. Los Cocos, Argentina. Vol III, 63-64, 2007.
- Steroid hormones during early pregnancy in swine. Yaful Graciela, Riesco Oscar, Cerutti Dante, Gómez Bettina, Moschetti E. and Koncurat Mirta. III Latin-American Symposium on Maternal-Fetal Interaction Placenta-Research & Clinical. 4-7 de noviembre, 2007. Los Cocos, Argentina. Vol III: 64, 2007.
- Comparative study of radioimmunoassay and chemiluminescence in progesterone determination in serum and fetal and placental maternal porcine homogenates. Riesco, O.; Yaful, G.; Williamson, D. and Koncurat, M. International Journal of Morphology, 26 (3):734, version on-line. ISSN 0717-9502, 2008.
- Progesterona, Estrógenos y Expresión de Integrinas en la Gestación Temprana Porcina. Williamson, D.; Yaful, G.; Riesco, O.F. y Koncurat, M.A. Ciencia Veterinaria, 10 (1): 13-23. ISSN: 1515-1883, 2008.
- Detección de la Integrina α y $\beta 3$ durante la Placentación Porcina. Koncurat, M.; Viglierchio, M.C.; Hernández, M. y Williamson, D. //En Resúmenes de las I Jornadas Patagónicas de Biología y III Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Naturales de la UNSJB. Trelew, 11 al 13 de marzo de 2009.
- Estudio de la Placenta Porcina: Concentración de Hormonas Esteroides y Parámetros de Eficiencia Reproductiva [tesis doctoral]. Yaful, G.N. La Plata (Buenos Aires): Universidad Nacional de La Plata. 1-73. 2009.
- Determinación de IL-6, progesterona y estrógenos en la preñez porcina temprana. Koncurat, MA; Yaful, GN; Riesco, O; Williamson DM. Resúmenes de la Asociación de Biología de Tucumán, XXVII Jornadas Científicas. 13-15 de octubre de 2010. Tafí del Valle, Tucumán, Argentina. 2010.
- Expresión de Integrinas y concentración de Progesterona y Estrógenos durante la preñez porcina. Williamson D, Riesco O, Vélez C y Koncurat M. Memorias VII Jornada de ciencia y Técnica de la FCV, UNLPam, General Pico, La Pampa ISSN 1853-9750. Premio al mejor Poster.
- Eficiencia reproductiva y homonas esteroideas durante la gestación porcina temprana. Yaful G, Riesco O, Koncurat M. Memorias XXII Reunión Latinoamericana de Producción Animal (ALPA). 24-26 de octubre de 2011, Montevideo, Uruguay.
- Comparación de técnicas de recuperación antigénica en placentas y úteros porcinos para la determinación de receptores de progesterona. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Barrales H, Hernández M, Yaful G. En Memorias XVII Jornadas de Actualización Porcina, XI Congreso Nacional de Producción Porcina, VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur. 14 al 17 de agosto del 2012. Pág. 236. Salta. Argentina.

- Determinación de receptores de progesterona en placenta fetal durante la placentación porcina. Yaful G, Viglierchio M, García M, Iglesias G, Torres P, Soler I, Williamson D, Rossi D. En Memorias XVII Jornadas de Actualización Porcina, XI Congreso Nacional de Producción Porcina, VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur. 14 al 17 de agosto del 2012. Pág. 238. Salta. Argentina.
- Interrelación de Progesterona, Estrógenos e IL – 15 durante la Preñez Porcina Temprana. Viglierchio, M.; Williamson, D.; Yaful, G.; Koncurat, M. En Resúmenes de las V Jornadas Científicas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. 18 al 19 de octubre de 2012. Pág. 30. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL. Esperanza. Santa Fe.
- Determinación de receptores para progesterona isoformas A y B en tejidos placentarios fetales y maternos de cerdas y su relación con la concentración sérica y tisular. Viglierchio, M.; García, M.; Riesco, O.; Lacolla, D.; Riesco, S.; Witt, S.; Yaful, G. En Jornada de Ciencia y Técnica 2012. “Proyectar y Comunicar: estrategias para la investigación en la UNLPam”. 1° ed. Santa Rosa: UNLPam. 2013. E-Book. ISBN 978-950-863-178-7. 18 de octubre. General Pico. La Pampa. Fecha de catalogación: 14/09/2012
- Determinación de receptores de progesterona isoforma A, en ovarios y tejidos placentarios fetales y maternos de cerdas preñadas. Viglierchio, M.; Williams, S.; García, M.G.; Riesco, O.; Lacolla, D.; Riesco, S.; Witt, S.; Koncurat, M.; Yaful, G. En Resúmenes (CD) III Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal – INITRA. 16 de noviembre de 2012. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. Res. CD 1637/12. Resúmenes en In Vet Vol. 14 N° 2, 2012. ISSN 1514-6634.
- “Immunolocalization of progesterone receptor isoform a in ovaries and placental tissues during pregnancy in pigs”. M Viglierchio, S Williams, MG García, D Lacolla, M Koncurat, G Yaful. SLIMP LASRI Organizing Committee del V SLIMP-Latin American Society for Maternal Fetal Interaction & Placenta I, Poster 18 al 20 febrero de 2013. Abstracts en Placenta 34 (2013) A1-A94.
- Expresión de las moléculas de adhesión durante la placentación porcina. Williamson, D.; Vélez, C.; Garro, A.; Viglierchio, M.; García, M.; Hernández, M.; Riesco, O.; Bruni, M.; Martín, P.; Gelada, M.; Sampredo, F.; Salas, C.; Koncurat, M. En Libro de Resúmenes VIII Jornada de Ciencia y Técnica y I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería UNLPam. E-Book. ISBN 978-950-863-207-4. Pág 13. 12 de diciembre de 2013. General Pico. La Pampa.
- Determinación de receptores de progesterona isoforma A en placenta materna durante la gestación porcina y en endometrio de cerdas no gestantes. Viglierchio, M.; García, M.; Lacolla, D.; Murcia, V.; Cerutti, D.; Riesco, O.; Riesco, S.; Sierra, G.; Witt, S.; Koncurat, M.; Yaful, G. En Libro de Resúmenes VIII Jornada de Ciencia y Técnica y I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería UNLPam. E-Book. ISBN 978-950-863-207-4. Pág 16. 12 de diciembre de 2013. General Pico. La Pampa.
- Determinación de los receptores para estrógenos y progesterona en tejidos placentarios fetales y maternos de hembras porcinas, y su relación con la concentración sérica y tisular. Viglierchio, M. En Libro de Resúmenes VIII Jornada de Ciencia y Técnica y I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería UNLPam. E-Book. ISBN 978-950-863-207-4. Pág 15. 12 de diciembre de 2013. General Pico. La Pampa.
- Inmunolocalización de receptores de progesterona total, isoforma A e isoforma B en úteros de cerdas no gestantes y de cerdas gestantes de 35 días. Viglierchio, M.; Williams, S.; García, M.; Lacolla, D.; Koncurat, M. y Yaful, G. En Memorias VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. XII Congreso Nacional de Producción Porcina. XVIII Jornadas de Actualización Porcina. ISBN 978-987-688-071-8. Pág. 219. 12 al 15 de agosto de 2014. Mar del Plata. Buenos Aires.

- Expresión de los receptores para estrógenos y progesterona en ovarios de cerdas gestantes y no gestantes. Viglierchio, M.; García, M.; Williams, S. y Yaful, G. En de Ciencias Morfológicas La Plata. E-book. ISBN 978-987-26182-3-0. Pág. 47. 19 de septiembre de 2014. La Plata. Buenos Aires.
- Placentación Porcina. Koncurat, M.; Bruni, M.; García, M.; Garro, A.; Hernández, M.; Lacolla, D.; Riesco, O.; Velez, C.; Viglierchio, M.; Williamson, D. En Libro de Resúmenes Jornada de Ciencia y Técnica 2014: Investigación y Transferencia en la UNLPam. 1° ed. E-Book. ISBN 978-950-863-216-6. 23 de octubre de 2014. Santa Rosa. La Pampa.
- Estudio de las moléculas de adhesión que participan en la placentación porcina. Koncurat, M.; Williamson, D.; Bruni, M.; García, M.; Garro, A.; Gelada, M.; Hernández, M.; Marín, P.; Riesco, O.; Salas, C.; Sampredo, F.; Vélez, C.; Viglierchio, M. En Libro de Resúmenes Jornada de Ciencia y Técnica 2014: Investigación y Transferencia en la UNLPam. 1° ed. E-Book. ISBN 978-950-863-216-6. 23 de octubre de 2014. Santa Rosa. La Pampa.
- Determinación de receptores para progesterona isoformas A y B en tejidos placentarios fetales y maternos de cerdas y su relación con la concentración sérica y tisular. Yaful, G.; García, M.; Lacolla, D.; Murcia, V.; Riesco, O.; Riesco, S.; Sierra, G.; Vaquero, P.; Viglierchio, M.; Witt, S. En Libro de Resúmenes Jornada de Ciencia y Técnica 2014: Investigación y Transferencia en la UNLPam. 1° ed. E-Book. ISBN 978-950-863-216-6. 23 de octubre de 2014. Santa Rosa. La Pampa.
- Localización de receptores de progesterona isoforma A en útero de cerdas no gestantes y placenta materna durante la gestación temprana. Viglierchio, M.; Williams, S.; García, M.; Lacolla, D.; Murcia, V.; Yaful, G. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. ISSN 1022-1301. Vol. 22, Núm. 3, 4: 81-85.
- “Progesterone receptors and progesterone concentration in serum and porcine maternal placental extracts”. M Viglierchio, MG García, O Riesco, DM Williamson, S Williams, D Lacolla, M Koncurat, G Yaful. VI SLIMP-Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta. Mar del Plata (Buenos Aires), 13 al 16 de abril de 2015. Abstracts en Placenta 36 (2015) 469-521.
- Expresión de Receptores de Estrógenos en Placenta Porcina. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Pitte V, Koncurat M, Yaful G. En Libro de Memorias XIII Congreso Nacional de Producción Porcina y VIII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. ISBN 978-987-688-176-0. Pág. 201. 09 al 12 de agosto de 2016. Resistencia. Chaco. Maternal-fetal communication: role of fetal estrogens in porcine pregnancy. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Marrón Y, Moscovakis E, Koncurat M, Yaful G. Placenta Vol 51 ([http://www.placentajournal.org/issue/S0143-4004\(17\)X0002-7?page=1](http://www.placentajournal.org/issue/S0143-4004(17)X0002-7?page=1)). 2017. Puerto Varas, Chile.

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

Se trabaja en forma conjunta en un Programa de investigación de esta Facultad denominado “Placentación porcina”.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

PROBLEMA CIENTIFICO

Teniendo en cuenta que los estrógenos permiten el reconocimiento materno –fetal, comprender dichos mecanismos permitirá disminuir las pérdidas embrionarias y fetales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de los receptores de estrógenos y de la enzima citocromo P450 aromataasa en tejidos placentarios fetales y maternos, para comprender los mecanismos moleculares que posibilitan la preñez porcina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar por inmunohistoquímica la localización de los receptores de estrógenos (RE alpha, RE beta y asociados a proteína G) y de la enzima citocromo P450 aromataasa en el tejido placentario fetal y materno, y en el útero no gestante (NG) de hembras porcinas.

2. Establecer las concentraciones de estrógenos en suero y en homogenatos de extractos placentarios materno (HoPM), fetales (HoPF) y útero NG (HoU).

HIPÓTESIS

En la placentación porcina, la inmunoexpresión de los receptores de estrógenos, sugieren un rol importante en el mantenimiento de la preñez.

RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Este estudio aportará conocimientos sobre la gestación porcina que brindará información acerca de los mecanismos involucrados en las pérdidas embrionarias y fetales. Disminuir dichas pérdidas provocará un incremento en la productividad que impactará en las empresas de ganado porcino.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

Animales: Se utilizarán 24 cerdas mestizas provenientes de la zona de General Pico, La Pampa. De la totalidad de los animales, 16 serán cerdas preñadas por monta natural de diferentes períodos gestacionales y 8 serán cerdas cíclicas.

Las cerdas, tanto las gestantes (G) como las no gestantes (NG), estarán en sistemas al aire libre (a campo), alojadas en forma colectiva. El régimen de alimentación será a base de dietas comerciales.

El estado de vacuidad (cerdas NG) o de preñez (G), se confirmará mediante el uso de ultrasonografía, que se realizará a los 22 días post-servicio.

Las cerdas G serán sacrificadas en frigoríficos o mataderos municipales habilitados por SENASA, para obtener las muestras placentarias entre los 15 a 18 días (n=6), entre los 30 a 35 días de gestación (n=5) y entre los 68 a 72 días de gestación (n=5).

Sueros porcinos: Se extraerá sangre de las cerdas G y NG, por el método de flebotomía de la vena medial de la oreja. Una vez extraída la sangre, la misma será puesta en un baño termostático (37 °C) por el término de media a una hora a los efectos de lograr una adecuada retracción del coágulo. Luego el suero se clarificará por centrifugación a 1800 rpm durante 10 minutos, se fraccionará en alícuotas y se conservará a - 20 °C hasta su uso (Koncurat et al., 1999).

Tractos reproductivos: El tracto reproductivo completo de las cerdas será removido inmediatamente después de la muerte del animal y lavado con solución salina de Hank's (SSH) (Gibco) conteniendo 10.000 U/ml de penicilina G sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomina y 2.5 µg/ml de fungizona (Gibco) (Koncurat et al., 1999).

Luego se palpará el tracto para detectar la presencia de embriones o fetos y se retirarán los ovarios, determinando en éstos la cantidad de cuerpos lúteos (CL) funcionales.

Homogenatos placentarios: Los homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF) se obtendrán pesando trozos de placenta materna o fetal (~ 5 g), y se homogeneizarán con un molinillo Moullinex en una proporción 1:3 con buffer fosfato salino (PBS). La pulpa resultante se centrifugará 2 veces a 1700 rpm durante 10 minutos a fin de descartar pequeños restos de tejido, y el sobrenadante se fraccionará y se guardará a - 20 °C hasta su posterior uso (Koncurat, 2003). Los homogenatos de útero provenientes de hembras porcinas NG (HoUP) se procesarán de la misma manera que el protocolo descrito para la obtención de homogenatos de extractos placentarios.

Determinación de Estrógenos en suero materno y homogenatos placentarios y útero de cerdas NG: la determinación de los estrógenos se realizará por Inmunoensayo Enzimático Quimioluminiscente en fase sólida en un equipo DPC (*Diagnostic Product Corporation*, Los Angeles, CA).

Determinación de receptores de Estrógenos y de la enzima aromatasa, en cortes de tejidos placentarios y úteros NG.

Técnica para microscopía óptica: Se separará cuidadosamente el componente placentario fetal del materno y ambos se fijarán en formaldehído con PBS al 10 %. Luego se deshidratará con baterías de alcoholes de graduación creciente (70, 90, 95, 100 %), se aclararán con xileno y se incluirán en parafina. Se realizarán cortes de aproximadamente 4 µm, que serán montados en portaobjetos destinados a la detección de receptores de estrógenos. Del mismo modo se procesarán los úteros NG.

La determinación de los receptores de estrógenos y de la enzima aromatasa, se realizará por inmunohistoquímica mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales.

Las muestras serán observadas con un microscopio Primo Star (Carl Zeiss) y la adquisición de imágenes se realizará con una cámara Canon, PowerShot G10, de 14.7 megapíxeles, a través del software AxionVision Release 4.8.

Análisis estadístico: Los resultados de la técnica de inmunomarcación para la determinación de receptores de estrógenos y de la enzima aromatasa, se expresarán en forma cuantitativa a través de la estimación de la intensidad de la misma. Las imágenes serán adquiridas, procesadas, examinadas y analizadas por medio de un software de imágenes. Los resultados de cada muestra se expresarán en *densidad óptica relativa (ROD)* (Durléj et al., 2010). Las ROD y las concentraciones de estrógenos y progesterona en suero porcino y en homogenatos de extractos placentarios y úteros vacíos serán analizadas a través de análisis de varianza. Con el fin de estudiar la asociación o dependencia entre las variables, se realizarán correlaciones de Pearson (Di Rienzo et al., 2001).

6.3. **CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS**

Permitirá identificar la localización de los RE y la expresión de la enzima aromatasa, en los tejidos placentarios fetales y maternos.

Este estudio aportará conocimientos sobre la gestación porcina que brindará información acerca de los mecanismos involucrados en las pérdidas embrionarias y fetales.

6.4. **CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES**

AÑO 2018											
ACTIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TOMA DE MUESTRAS			X	X	X	X	X	X	X	X	X

DOSAJE HORMONAL									X	X	X	X
PROCESAMIENTO DE DATOS						X	X	X	X	X	X	X
PRESENTACION A CONGRESOS								X	X	X	X	
INFORME DE AVANCE												X
AÑO 2019												
ACTIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
REVISION BIBLIOGRÁFICA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TOMA DE MUESTRAS			X	X	X	X	X	X				
DOSAJE HORMONAL	X	X	X	X	X	X	X	X				
PROCESAMIENTO DE DATOS						X	X	X	X	X	X	X
PRESENTACION A CONGRESOS								X	X	X	X	
INFORME DE AVANCE												X

AÑO 2020												
ACTIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
REVISION BIBLIOGRÁFICA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TOMA DE MUESTRAS			X	X	X	X	X	X				
DOSAJE HORMONAL	X	X	X	X	X	X	X	X				
PROCESAMIENTO DE DATOS						X	X	X	X	X	X	X
PRESENTACION A CONGRESOS								X	X	X	X	
INFORME DE AVANCE												X

AÑO 2021											
ACTIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DOSAJE HORMONAL	X	X	X	X							
PROCESAMIENTO DE DATOS	X	X	X	X							
PUBLICACIONES/CONGRESOS				X	X	X	X	X	X	X	X
INFORME DE AVANCE									X	X	X

AÑO 2022											
ACTIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DOSAJE HORMONAL	X	X	X	X							
PROCESAMIENTO DE DATOS	X	X	X	X							
PUBLICACIONES/CONGRESOS				X	X	X	X	X	X	X	X
INFORME DE AVANCE									X	X	X

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

Laboratorios equipados con freezer, heladera, balanzas, pHmetro, centrífuga. Microscopio. Software obtención imágenes. Máquina fotográfica. Equipo de ELISA.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

Homogeneizador de tejidos.

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)
 *Equipamiento e Infraestructura..... \$ 20.000

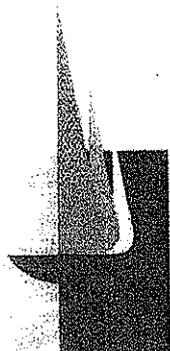
Bienes de Consumo	\$ 120.000
Bibliografía.....	\$ -----
Viajes.....	\$ 10.000
Personal de Apoyo	\$ -----
Otros (especifique) Determinación de Hormonas.....	\$ 15.000
Total.....	\$ 165.000
Presupuesto Estimado Anual:	
1° año: \$ 40.000	
2° año: \$ 35.000	
3° año: \$ 35.000	
4° año: \$ 30.000	
5° año: \$ 25.000	
Total del proyecto: \$ 165.000	

* El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.

8.1. BIBLIOGRAFÍA

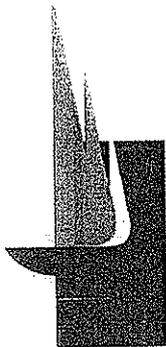
1. Amoroso, E.C.. Placentation. In: Marshall's, editores. Physiology of Reproduction. London, 1952. Vol 2: p. 127-331.
2. Bazer, F.W. and W.W. Thatcher. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F2alpha by the uterine endometrium. Prostaglandins, 1977; 14(2): p. 397-400.
3. Bazer, FW; Wu, G; Johnson GA, Wang X. Environmental factors affecting pregnancy: Endocrine disrupters, nutrients and metabolic pathways. Mol Cell Endocrinol. 2014; 398 (1-2):53-68.
4. Bosch, R.A.; Alanis, G.A.; Allende, R.A.; Blanch, M.S.; Bosch, P. and Callejas, S. En: Universidad Nacional de Río Cuarto, editores. Actualización en temas de reproducción animal. Córdoba, Argentina: Compilador, Bosch, R.A. 2001. p. 150-152.
5. Cardenas H, Trout WE, Simmen RC, Pope WF. Short-term effects of exogenous estradiol-17 beta on blastocyst development during the period of elongation in swine. Anim Reprod Sci 1997, 47: 123-35. Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; González, L.; Tablada, E.; Díaz, M.; Robledo, C. and Balzarini, M. Estadística para las Ciencias Agropecuarias. 2001, 4 ed. Trunfar. Córdoba. Argentina.
6. Durlej, M.; Tabarowski, Z. and Slomcynska, M. Immunohistochemical study on differential distribution of progesterone receptor A and progesterone receptor B within the porcine ovary. Animal Reproduction Sciences. 2010, 121: 167-173.
7. Garlow JE, Ka H, Johnson GA, Burgharatt RC, Jaeger LA, Bazer FW. Analysis of Osteopontin at the Maternal – Placental Interface in Pigs. Biol Reprod 2002, 66: 718- 25.
8. Garro, A., Estudio de la respuesta inmune humoral en la gestación porcina. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 2015.
9. Geisert R, Lucy M, Whyte J, Ross J and Mathew D. Cytokines from the pig conceptus: roles in conceptus development in pigs. Journal of Animal Science and Biotechnology. 2014. 5: 51. (Disponible en <http://www.jasbsci.com/content/5/1/51>).

10. Geisert R, Whyte J, Meyer A, Mathew S, Juarez M, Lucy M, Prather R, Spencer T. Rapid conceptus elongation in the pig: An interleukin 1 beta 2 and estrogen-regulated phenomenon. *Mol Reprod Dev.* 2017, 9999: 1 – 15. (Disponible en <http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/mrd>).
11. Henao F, Hernández A. Un enfoque genético de la mortalidad prenatal en porcinos. *Rev Col Cienc Pec*, 2000, 13: 1.
12. Koncurat, M.; Greco, C. and Vivas, A. Hallazgo del factor precoz de preñez (EPF) en extractos placentarios porcinos. *Rev Brasil Reprod Anim.* 1999, 3 (23):193-195.
13. Koncurat, M.A. Estudio inmunoendócrino de la preñez porcina. Papel de la placenta [tesis doctoral]. Río Cuarto (Córdoba): Universidad Nacional de Río Cuarto. 2003.
14. Mulac-Jericevic, B. and Conneely, O.M. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction.* 2004, 128: 139-146.
15. Perry, J.S. The mammalian fetal membranes. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1981, 62:321-335.
16. Persson E, Sahlin L, Masironi B, Dantzer V, Eriksson H, Rodriguez-Martinez H. Insulin-like growth factor-I in the porcine endometrium and placenta: localization and concentration in relation to steroid influence during early pregnancy. *Anim Reprod Sci*, 1997, 46:261-81.
17. Pope, W.F. Embryonic mortality in swine. In: Zavy, M.T. and Geisert, R.D. editores. *Embryonic Mortality in Domestic Species.* 1994, Boca Raton, FL: CRC Press: p. 53-77.
18. Prossnitz E, Barton M. *Nat Rev Endocrinol.* 2011, 7 (12): 715-726.
19. Rider, V.; Kimler, B.F. and Justice, W.M. Progesterone-growth factor interactions in uterine stromal cells (minireview). *Biol Reprod.* 1998, 59:464-469.
20. Spencer, T.E. and Bazer, F.W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *Journal Animal Sciences.* 2004, 82: E4- 13.
21. Spencer, T.E. and Bazer, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2004, 2: 49.
22. Sukjumlong, S.; Dalin, A-M.; Sahlin, L. and Persson, E. Immunohistochemical studies on the progesterone receptor (PR) in the sow uterus during the oestrous cycle and in inseminated sows at oestrus and early pregnancy. *Reproduction.* 2005, 129: 349-359.
23. Sukjumlong, S.; Persson, E.; Dalin, A-M.; Janson, V. and Sahlin, L. Messenger RNA levels of estrogen receptors α and β and progesterone receptors in the cyclic and inseminated/early pregnant sow uterus. *Animal Reproduction Science.* 2009, 112: 215-228.
24. Van der Lende, T. and Van Rens, B.T. Critical periods for foetal mortality in gilts identified by analysing the length distribution of mummified fetuses and frequency of non- fresh stillborn piglets. *Animal Reproduction Sciences.* 2003, 75:141-150.
25. Viglierchio M, Williams S, García M, Lacolla D, Marrón Y, Moscovakis E, Koncurat M, Yaful G. Maternal-Fetal Communication: Role of fetal estrogens in porcine pregnancy, Placenta. 2017, Abstracts, 51: 116
(Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.064>).
26. Wilson ME, Ford SP. Effect of estradiol-17 beta administration during the time of conceptus elongation on placental size at term in Meishan pigs. *J Animal Sci* 2000, 78: 1047-52.
27. Yaful, G.N. Estudio de la Placenta Porcina: Concentración de Hormonas Esteroides y Parámetros de Eficiencia Reproductiva [tesis doctoral]. La Plata (Buenos Aires): Universidad Nacional de La Plata. 2009
28. Ziecik AJ. Old, new and the newest concepts of inhibition of luteolysis during early pregnancy in pig. *Domest Anim Endocrinol* 2002, 23 (1-2): 265-75
29. Ziecik AJ, Przygodzka E, Kaczmarek M. Corpus Luteum Regression and Early Pregnancy Maintenance in Pigs. *The Life Cycle of the Corpus Luteum.* Chapter. Pp 227-248. 2016 (disponible en https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-43238-0_12)
30. Zimmerman M, Budish R, Kashyop S, Lindsey S. GPER – novel membrane estrogen receptor. *Clin Sci*, 2016, 130 (12):1005-1016.



TITULO: Estudio de Citoquinas durante la placentación porcina.

INTEGRANTES	FIRMA
Garro, Adriana del Carmen	
Koncurat, Mirta Adriana	
Williamson, Delia María	
Vélez Carolina Lucía	
Soler, Jimena	
Gastaldo, Keila	



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

Número de Proyecto:

Año:

(No llenar)

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO: Estudio de Citoquinas Durante la Placentación Porcina.

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada -

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: 1207, 1211, 1299: Reproducción Animal

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: 1407-Porcinocultura

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS: Departamento de Ciencia Básicas.

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

2.3. EQUIPO de TRABAJO: (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)

2.3.1. INTEGRANTES

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Responsabilidad (I)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Garro, Adriana del Carmen	Dra.	III	D	Biología General	Prof. Adj	15 hs
Koncurat, Mirta Adriana	Dra.	I	A	Biología General	Prof. Tit.Excl.	7 hs
Williamson, Delia María	Dra.	III	I	Biología General	Aux. Doc. Semiexcl	6 hs
Vélez Carolina Lucía	MV	V	I	Biología General	Aux. Doc. Simple	5hs

(I) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.2. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
Soler, Jimena	UNLPam	De Iniciación en Investigación	Dra. Adriana Garro	5hs
Gastaldo, Keila	UNLPam	De Iniciación en investigación	Dra. Williamson Delia	5hs

2.3.2. TESISISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.
Fernández, Lorena	Categoría 7- No docente	3 hs

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedic. Hs./Sem.
	Director Co-Director Tesisista		

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 1 a 5 años con una sola prórroga)

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 18 **FINALIZACIÓN:** 31 / 12 / 22

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

En cerdos, para que la gestación se lleve a cabo, debe establecerse un diálogo entre el *conceptus* y el endometrio que involucra por un lado al sistema inmunológico a fin de minimizar las posibilidades de rechazo del embrión; las moléculas de adhesión, que permiten el anclaje de los epitelios materno y fetal; y el sistema endócrino, así numerosas hormonas y factores de crecimiento actúan de manera sistematizada para llevar al éxito de la gestación. El objetivo de éste trabajo es estudiar la expresión de citoquinas durante la placentación porcina con el fin de dilucidar el rol que desempeñan en el proceso inflamatorio característico de la interfase feto/materna. Esto permitirá comprender el tipo de respuesta inmunitaria y los mecanismos moleculares y celulares que posibilitan la preñez porcina. Se realizarán dosajes de IL-1b, IL-6, Interferón Gamma (IFN- γ) y Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) en suero y Homogenatos de placentas porcinas provenientes de diferentes periodos gestacionales y de cerdas no gestantes.

4.1 Palabras claves (de 4 a 6): Interleuquinas/interferón gama/TNF-alfa/placenta/porcino

4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras) Res.N° 097-CS-12.

In pigs, for gestation to take place, a dialogue must be established between the *conceptus* and the endometrium, which involves the immune system in order to minimize the possibility of embryo rejection; the adhesion molecules that allow the anchoring of the maternal and fetal epithelia; and the endocrine system, thus numerous hormones and growth factors act in a systematized way to lead the success of gestation. The objective of this work is to study the expression of cytokines during porcine placentation in order to elucidate the role that they play in the inflammatory process characteristic of the feto-maternal interface. This will allow understanding the type of immune response and the molecular and cellular mechanisms that make porcine gestation possible. It will be determined IL-1b, IL-6, Gamma Interferon (IFN- γ) and Tumor Necrosis

Factor Alpha (TNF- α) in serum and in Porcine Homogenates from different gestational periods and non-pregnant sows.

4.3. **Key words (4 - 6):** Interleukins / Interferon gamma / TNF-alpha / placenta / porcine

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

El cerdo (*Sus scrofa domestica*) es una especie de alto valor productivo adaptado para la producción de carne, dado que crece y madura con rapidez. La hembra porcina es poliéstrica anual la cual alcanza la pubertad a los 6–7 meses de edad y su ciclo estral dura aproximadamente 21 días con una tasa de ovulación media de 15-25 óvulos/ciclo. La gestación dura aproximadamente 114 días y es un fenómeno fisiológico que obedece a precisas interacciones entre el *conceptus* y su madre, las cuales se van a llevar a cabo mediante el desarrollo de la placenta. Ésta es un órgano transitorio formado por tejidos maternos y embrionarios, responsable de la aceptación del *conceptus*, la sobrevivencia de los embriones y el éxito de la gestación. Luego de la fecundación los cigotos se implantan en el endometrio, proceso que comienza alrededor de los 8-10 días de gestación, período durante el cual se produce un marcado remodelaje uterino y la diferenciación del *conceptus*, cambiando de una forma esférica a una tubular y luego larga filamentosa, de manera que los embriones tempranos cubran la superficie uterina para que más tarde puedan adherirse a ella. Durante este proceso de elongación, el trofoblasto secreta estrógenos (E_2) que actúan como señal en el reconocimiento de la preñez (Bazer *et al.*, 1977) y como marcador de elongación del trofoblasto (Spencer and Bazer, 2004; Spencer and Bazer, 2004). Para que se produzca la aposición trofoblástica se requiere un endometrio receptivo, un embrión normal y funcional, y un diálogo o comunicación cruzada entre estos dos organismos que son diferentes inmunológica y genéticamente. Una vez completada la aposición de los epitelios trofoblástico y endometrial continua el desarrollo de la placenta.

La placenta porcina es de tipo epiteliochorial, no invasiva, adecidua, plegada y difusa y cumple sus funciones a través de la adhesión entre las membranas fetales y el endometrio, lo que permite el intercambio fisiológico entre el feto y la madre. El diálogo que se establece entre el *conceptus* y el

endometrio involucra por un lado al sistema inmunológico, que minimiza las posibilidades de rechazo del embrión, las moléculas de adhesión, que permiten el anclaje de los epitelios materno y fetal y el sistema endócrino, quienes a través de numerosas hormonas y factores de crecimiento, actúan de manera sistematizada para llevar al éxito de la gestación (Mathew *et al.*, 2016).

Esta comunicación cruzada involucra, además de otros factores, la generación de una respuesta inmune de tipo inflamatoria, resultando en la implantación del *conceptus* y la generación de la placenta (Kridli *et al.*, 2016). La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria que actúa como mediador central de la inflamación y la inmunidad innata en los mamíferos (Dinarello, 2011; Garlanda, 2011). Según Geisert *et al.* (2012), la IL-1 β está involucrada en la implantación del *conceptus*, la invasión y la inmunotolerancia feto-materna de distintas especies. Esta citoquina participa en el desarrollo del trofoblasto y comunicación con el endometrio y es necesaria para una correcta implantación (Geisert, 2015). Los niveles de expresión de IL-1 β en el *conceptus* aumentan entre los días 11 y 15 de la gestación y luego disminuyen, al igual que la caspasa-1 y el factor de transcripción NF- κ B (Ross *et al.*, 2003). También se ha descrito un aumento de expresión del receptor de IL-1 en tejidos de placenta materna en ese mismo período de implantación confirmando la efectiva señalización de IL-1 β . Por lo tanto hay numerosos trabajos que demuestran la importancia de IL-1 β en la implantación en cerdo pero no hay trabajos que analicen el rol de IL-1 β en el transcurso de la gestación porcina, período en el que también se producen altos porcentajes de pérdidas embrionarias (Kridli *et al.*, 2016). El período de gestación tardía cumple con etapas cruciales para su desarrollo exitoso, en las cuales IL-1 β puede estar

involucrada. A los 32 días comienza la osificación y el desarrollo del sistema inmunológico. En el período de 60-70 días de preñez se alcanza el mayor crecimiento placentario y comienza un estado de meseta en su desarrollo para comenzar el feto a crecer de manera exponencialmente, también se observa la mayor remodelación placentaria celular determinada por estudios de apoptosis (Cristofolini, 2010) y de moléculas de adhesión que conforman la interfase feto materna (Vélez *et al.*, 2017).

Numerosos trabajos describen el rol de otras citoquinas que podrían estar reguladas por IL-1 β a lo largo de la gestación porcina (Kridli *et al.*, 2016).

La IL-6 posee propiedades pro- y anti-inflamatorias y se sintetiza en respuesta a ciertos microorganismos y a otras citoquinas tales como la IL-1 β (Clauzure *et al.*, 2016). En el primer trimestre de la gestación la IL-6 está implicada en la remodelación de tejidos placentarios, así como en la hematopoyesis y la vascularización de las vellosidades placentarias (Koncurat *et al.*, 2010), habiéndose observado en el día 32 un incremento de IL-6 en la placenta fetal (Williamson, 2011), aumento que se relaciona con un incremento de anticuerpos asimétricos, los cuales son esenciales para prevenir el rechazo inmune del feto (Garro, 2015). Por otra parte, esta regulación de IL-6 se relaciona con altos niveles de E₂ secretados en el mismo período, sugiriendo que la función de esta citoquina no se limita al sistema inmune y al proceso de inflamación, sino que puede intervenir en procesos de osteogénesis y angiogénesis durante la gestación.

Al igual que IL-6, los niveles de interferón gamma (IFN- γ) se encuentra aumentados a los 32 días de gestación en placenta porcina fetal (Williamson, 2011). El IFN- γ , es una citoquina proinflamatoria producida principalmente por linfocitos estimulados y también es sintetizada por las células del trofoblasto de cerdos (Tayade *et al.*, 2006). Durante la implantación porcina, entre los días 12-20 de gestación, el trofoectodermo secreta enormes cantidades de IFN- γ hacia el lumen uterino (Koncurat *et al.*, 2001). Se postula que el IFN- γ podría permanecer en este compartimento y ser efector directo de la despolarización de la membrana apical del epitelio endometrial. Esto daría como resultado la remodelación parcial o profunda de este tejido materno, condición necesaria para la implantación de los embriones (Murphy *et al.*, 2009).

El factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), es otra citoquina involucrada en la gestación porcina. En períodos tempranos, durante la implantación, TNF- α regula la expresión de progesterona (Jana *et al.*, 2008a; Jana *et al.*, 2008) y de E₂ (Franczak *et al.*, 2014). También está involucrado en la diferenciación celular, remodelación tisular y apoptosis en la primera fase de la gestación porcina (Suzuki *et al.*, 2014). Se desconoce su rol durante la placentación en la preñez porcina (Kridli *et al.*, 2016).

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

Concentración de Progesterona y expresión de las Integrinas $\alpha\beta 3$, $\beta 1$ y $\alpha 3$ durante la placentación porcina. Williamson Delia, Yaful Graciela, Riesco Oscar, Koncurat Mirta. XX Reunión Latinoamericana de Producción Animal, XXX Reunión Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal y V Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito. Artículo Completo. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol 15 (Supl. 1) 2007. Pag 336-340.

Estrogen, progesterone and integrins during porcine placentation. Williamson Delia, Riesco Oscar, Alonso Gabriela, Hernandez Mabel, Moschetti, Koncurat Mirta. III Latin-American Symposium on Maternal-Fetal Interaction Placenta – Research & Clinical. November 4-7, 2007 Los Cocos, Argentina. Vol III, 63-64, 2007.

Progesterona, estrógenos y expresión de integrinas en la gestación temprana porcina Williamson, D; Yaful, G; Riesco, O y Koncurat M. Revista Ciencia Veterinaria (ISSN: 1515-1883), 10(1):13-22. 2008.

Determinación de la concentración de IL-18, IL-15 e IL-12 en suero, homogenatos placentarios maternos y fetales durante la gestación porcina. Williamson D, Riesco O, Vélez C y

Koncurat M. X° Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; X° Congreso Nacional de Producción Porcina. 8 al 11 de agosto de 2010. Mendoza Capital. (ISBN: 978-950-665-616-4), Pp: 277.

Concentration of IL-6, IL-12 and IFN- γ in serum and placental extracts during porcine gestation. Koncurat, M; Williamson, D; Vélez, C y Riesco, O. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 2-5 noviembre, 2010. Buenos Aires, Argentina. 2010.

Determinación de IL-6, progesterona y estrógenos en la preñez porcina temprana. Koncurat, MA; Yaful, GN; Riesco, O; Williamson DM. En: Asociación de Biología de Tucumán, XXVII Jornadas Científicas. 13-15 de octubre de 2010. Tafi del Valle, Tucumán, Argentina. 2010.

Determinación de la concentración de IL-18, IL-15, IL-12, IL-6 e IFN- γ en homogenatos placentarios maternos, fetales y suero a través de la gestación porcina. Koncurat, MA, Riesco OF, Vélez C y Williamson, DM. XXII Reunión Latinoamericana de Producción Animal.

Determination of IL-6, Progesterone and Estrogens During Early Pregnancy in Pigs. Koncurat, M A; Yaful G N, Riesco O F y Williamson, D M. Biocell. ISSN: 0327 – 9545.Vol.: 35(2). Pag. A142. 2011.

Determinación de la concentración de IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 en suero, extractos placentarios maternos y fetales a través de la gestación porcina. Williamson D M; Riesco O F; Vélez, C y Koncurat, M A. Ciencia Veterinaria. ISSN: 1515-1883.2011.

Concentración de Interleuquina-15 y Progesterona en Extractos Placentarios Maternos, Fetales y Suero en la Preñez Porcina. Koncurat, M A; Riesco, O F; Vélez, C y Williamson, D. IV Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. ISBN: 978-950-665-697 -

Determinación de la concentración de IL-18, IL-15, IL-12, IL-6 e IFN- γ en homogenatos placentarios maternos, fetales y suero a través de la gestación porcina. Koncurat, M A; Riesco, O F; Vélez, C y Williamson, D M. XXII Reunión Latinoamericana de Producción Animal. Montevideo. Uruguay. 24-26 de Octubre de 2011.

Determinación de IL-15, IL-18 y Progesterona Durante la Gestación Porcina. Williamson D, Riesco O, Vélez C y Koncurat. XI Congreso Nacional de Producción Porcina, VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur. 2012.

Determinación de Receptores de Progesterona en Placenta Fetal Durante la Placentación Porcina. Yaful G, Viglierchio M, García M, Iglesias G, Torres P, Soler I, Williamson D y Rossi D. XI Congreso Nacional de Producción Porcina, VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur. 2012.

Interrelación de Progesterona, Estrógenos e IL-15 Durante la Preñez Porcina Temprana. Viglierchio M, Williamson D, Yaful G, Koncurat M. V Jornadas Científicas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. 2012.

Concentración de Interleuquina-15 en Suero y Extractos Placentarios Porcinos Durante la Preñez Porcina. Vélez C, Williamson D, Riesco O y Koncurat M. V Jornadas Científicas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. 2012.

Interrelación de IL-15 y estrógenos durante la preñez porcina temprana. Koncurat M, Williamson D y Yaful G en: LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 2013

Fibronectina y Progesterona durante la gestación porcina. Vélez C, Williamson D, Bruni M, Riesco O, Garro A, Yaful G y Koncurat M. VI Jornadas de la Asociación Argentina de Inmunología. Noviembre de 2013.

Progesterone Receptors and Progesterone Concentration in Serum and Porcine Maternal Placental Extracts. Lacolla D; Viglierchio M; Williamson D; Koncurat M; García M; Williams S; Yaful G; RIESCO O. Chile. Providencia. 2015. Revista. Resumen. Otro. VI SLIMP & V LASRI. Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta.

Estrógenos y Expresión de la Integrina avb3 y Fibronectina en la Interfase Feto-Placentaria durante la Gestación. Williamson D; Martín P; Vélez C; Koncurat M. Argentina. Río

Cuarto. 2014. Libro. Artículo Breve. Congreso. VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. Universidad Nacional de Rio Cuarto.

Perfil y rol de citoquinas en suero, homogenatos placentarios maternos y fetales a través de la gestación porcina. Williamson D; Riesco O; Barbeito C; Koncurat M. REDVET. 2015 vol.16 n°8. p1 - 14. ISSN 1695-7504.

Determinación de IL-1b e IL-10 Durante la Gestación Porcina. Vélez C; Williamson D; García M; Koncurat M. Argentina. Resistencia. 2016. Congreso. Congreso Porcino Mercosur.

Determinación de IL-2 e IL-4 durante la gestación porcina. Vélez, C L, Williamson, D M, Koncurat, M A. Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Capítulo de la Sociedad de Medicina Veterinaria. IX Jornadas y Reunión Anual. AAIIV 2016.

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

Se trabaja en forma conjunta en un Programa de investigación de esta Facultad denominado "Placentación porcina".

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

PROBLEMA CIENTÍFICO

Aún no se conocen los mecanismos moleculares que permiten una gestación exitosa. La placentación porcina depende de la interrelación de las moléculas de adhesión con el sistema endócrino e inmunológico. Comprender dichos mecanismos permitirá disminuir las pérdidas embrionarias y fetales.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de las citoquinas durante la placentación porcina con el fin de dilucidar el rol que desempeñan en el proceso inflamatorio característico de la interfase feto/materna. Esto permitirá comprender el tipo de respuesta inmunitaria y los mecanismos moleculares y celulares que posibilitan la preñez porcina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar dosajes de IL-1b, IL-6, IFN- γ y TNF- α en suero y Homogenatos de placenta porcina (HoPP) provenientes de diferentes períodos gestacionales. Establecer posibles relaciones entre los niveles de citoquinas hallados durante el desarrollo placentario de la preñez porcina.

HIPÓTESIS

En el proceso de la placentación porcina existe una regulación en la expresión de las citoquinas, sugiriendo un rol de éstas moléculas en el mantenimiento de la preñez.

RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Éste estudio aportará conocimientos sobre la gestación porcina que brindará información acerca de los mecanismos involucrados en las pérdidas embrionarias y fetales, patologías de suma importancia que afectan a esta especie. Disminuir dichas pérdidas provocará un incremento en la productividad que impactará en las empresas de ganado porcino.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

1- Animales. Se utilizarán 5 muestras sanguíneas y placentarias provenientes de cerdas mestizas de frigoríficos de la zona de General Pico, La Pampa, de los siguientes períodos gestacionales: 30, 60-70 días y a término. Además, se procesarán 5 muestras de sangre y de endometrio uterino provenientes de cerdas no gestantes.

Se estimará la edad gestacional de las placentas de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los fetos obtenidos de cada cerda gestante (Marrable, 1971); además, se determinará el sexo y peso.

2- Extracción de sangre. En el caso de muestras provenientes de frigorífico, se obtendrá la sangre por corte de la vena yugular. Con respecto a las muestras de cerdas a término se le extraerá sangre por el método de flebotomía. Las venas de elección serán: vena cava craneal y vena medial de la oreja.

3- Obtención de Suero. Una vez extraída la sangre se dejará a temperatura ambiente hasta lograr adecuada retracción del coágulo y exudado del suero. Luego se centrifugará a 1800 rpm durante 10 minutos, para clarificar el suero, se fraccionará en alícuotas y conservará a -20°C hasta su uso.

4- Análisis de la estructura de la placenta y útero. Técnica para Microscopía Óptica: Se fijarán las muestras placentarias en formol adicionado de tampón fosfato al 10 %. Se deshidratarán las muestras de la siguiente manera: se colocarán en alcohol 96° una hora, nuevamente en alcohol 96° una hora, deshidratante histológico (Biopur) una hora, deshidratante histológico/xilol por partes iguales una hora y xilol una hora. Luego se incluirán en parafina. Se realizarán los cortes de cada muestra de aproximadamente 5 μm , montando por portaobjetos de a tres o cuatro cortes; previamente al montaje se colocarán los cortes en un baño termostático a 40°C con agua y gelatina para que no se plieguen. Se teñirán con Hematoxilina-Eosina y se observarán con un microscopio óptico Zeiss (Alemania).

5- Obtención de Homogenatos de Placenta Materna (HoPM), Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF) y de Útero No gestante Porcino (HoU).

5-1- Los Homogenatos de Placenta Materna (HoPM) y de Placenta Fetal (HoPF) se procesarán de la siguiente manera: a ± 5 g de tejido placentario porcino se lo homogenizará de tal manera de obtener una pulpa, con la ayuda de un molinillo eléctrico. Una parte de la pulpa de placenta se homogenizará con tres partes de solución fisiológica. Luego, para descartar los pequeños restos de tejido se centrifugará y el sobrenadante se guardará a -20°C hasta su uso.

5-2- Los Homogenatos de Útero provenientes de hembras porcinas no gestantes (HoU) se procesarán de la misma manera que el protocolo descrito en el Párrafo 5-1.

6- Determinación de citoquinas en Homogenatos de Placenta Materna (HoPM), Fetal (HoPF), de útero no gestante (HoU) y Sueros Porcinos. Se realizará por ELISA de captura (Margni, 1996), mediante anticuerpos específicos de especie, la determinación de las siguientes citoquinas: IL-1b, IL-6, IFN- γ y TNF- α en los extractos placentarios maternos, fetales, de útero no gestante y en los sueros porcinos provenientes de los períodos de gestación seleccionados, así como de hembras no preñadas.

Estadística. Dado que hay más de dos poblaciones en estudio se harán las correspondientes comparaciones a través de una ANOVA. En caso de que no se verifiquen los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad se utilizarán test no paramétricos.

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Poder identificar citoquinas claves durante la placentación porcina permitirá profundizar el conocimiento de los mecanismos fisiológicos necesarios para una gestación exitosa. Dichos conocimientos se podrán utilizar para optimizar la capacidad uterina, la sobrevivencia de los embriones/fetos y la salud reproductiva porcina.

Un mejor conocimiento de los mecanismos que median las interacciones entre el *conceptus*/embriones/fetos y el tracto reproductivo de la cerda implicará importantes avances para mejorar la productividad de esta especie lo que producirá un impacto económico en las empresas de ganado porcino. Además, aportará elementos en la comprensión de los procesos involucrados en el correcto desarrollo de la placentación porcina que permitirá dilucidar mecanismos acerca de las pérdidas embrionarias y fetales, patologías que afectan a esta especie.

Aportará también conocimiento en las causas que afectan la uniformidad y el crecimiento potencial de los lechones recién nacidos, parámetros muy deseables en los sistemas productivos intensivos, extensivos y mixtos.

Poder desarrollar este estudio permitirá la formación de recursos humanos en la investigación científica, tanto en la adquisición de habilidades intelectuales como en destrezas manuales necesarias para la realización de la parte experimental.

Este estudio permitirá generar conocimientos en el área de la reproducción animal, particularmente en los mecanismos fisiológicos e inmunológicos que participan en la placentación de la cerda gestante.

Además, debido a los gastos económicos que generan los cuidados de las cerdas preñadas, comprender los mecanismos que originan la pérdida embrionaria y fetal, redundará en beneficios económicos a los productores porcinos.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Año 1

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Toma de muestra				x	x	x	x	x	x	x	
Dosaje de citoquinas							x	x	x	x	x
Presentación en Congresos/Publicaciones								x	x	x	x
Informe de Avance											x

Año 2

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Toma de muestra				x	x	x	x				
Dosaje de citoquinas	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Presentación en Congresos/Publicaciones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Informe de avance											X

Año 3

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Toma de muestra				x	x	x	x				
Dosaje de citoquinas	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Presentación en Congresos/Publicaciones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Informe de avance											X

Año 4

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Toma de muestra				x	x	x	x				
Dosaje de citoquinas	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Presentación en Congresos/Publicaciones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Informe de avance											X

Año 5

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Revisión Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Presentación en Congresos/Publicaciones	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Informe de final								x	x	x	X

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO**7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:**

El lugar de trabajo cuenta con el área de microscopía y 2 laboratorios, que posee la infraestructura, los servicios y el equipamiento necesarios para la realización del plan de trabajo.

a- El área de Histología: cuenta con los equipamientos necesarios para el procesamiento de las muestras para confección de tacos y posterior montaje al portaobjetos (micrótomo, estufa, baño maría). b- El área de Microscopía Óptica: cuenta con un sistema de monitoreo las 24 hs centralizado con la Guardia de la Universidad y salida de emergencia. Todas las muestras histológicas serán fotografiadas con un microscopio Carl Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) equipado con una cámara digital Canon PowerShot G20 (Tokio, Japón), adquiridas con el software Axiovision (AxioVision 4.8, Carl Zeiss) y procesadas en formato TIFF. c- Laboratorio de toma de muestras: cuenta con mesadas y equipamiento requerido para el procesamiento de las muestras, tanto para histología como para la realización de homogenatos. d- Laboratorio: cuenta con dos mesadas de trabajo, una heladera vertical con freezer, dos freezer horizontales, un lector de microplacas para ELISA (BioTeK® Instruments, Inc. USA), un agitador de microplacas (DPC, USA), una centrifuga, un pHmetro, una balanza, una balanza analítica y un microondas.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

--

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

--

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

--

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)
*Equipamiento e Infraestructura..... \$

Bienes de Consumo	\$ 14.5000
Bibliografía.....	\$
Viajes.....	\$ 15.000
Personal de Apoyo	\$
Otros (especifique)	\$
Total.....	\$ 160.000

Presupuesto Estimado Anual:

1° año: \$ 35.000

2° año: \$ 35.000

3° año: \$ 40.000

4° año: \$ 40.000

5° año: \$ 10.000

Total del proyecto: \$ 160.000

** El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.*

8.1. BIBLIOGRAFÍA

- Bazer, F.W. and W.W. Thatcher. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F2alpha by the uterine endometrium. Prostaglandins, 1977. 14(2): p. 397-400.
- Clazure, M.; Valdivieso, A.G.; Massip Copiz, M.M.; Mori, C.; Dugour, A.V.; Figueroa, J.M. and Santa Coloma, T.A. Intracellular Chloride Concentration Changes Modulate IL-1beta Expression and Secretion in Human Bronchial Epithelial Cultured Cells. J Cell Biochem, 2016.
- Cristofolini A. Estudio de la Remodelación Celular Durante la Placentación Porcina. Tesis doctoral. Fac Cs Vet.UNRC. 2010.
- Dinarello, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 519-50.

- Franczak, A., Wojciechowicz B, Kolakowska J, Kotwica G. The effect of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α on estradiol-17 β release in the myometrium: the in vitro study on the pig model. *Theriogenology*. 2014;81(2):266-274.
- Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 2013. 39(6): p. 1003-18.
- Garro, A. Estudio de la respuesta inmune humoral en la gestación porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 2015.
- Geisert, R., Fazleabas, A., Mathew, L. and Mathew, D. Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1beta. *Cell Tissue Res*, 2012. 349(3): p. 825-38.
- Geisert, R.D., G.A. Johnson, and R.C. Burghardt. Implantation and Establishment of Pregnancy in the Pig. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2015. 216: p. 137-63.
- Jana, B., Koszykowska, M. and Andronowska, A. The effect of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha, interleukin (IL)-1beta and IL-6 on prostaglandins (PG) F2 alpha and E2 secretion from maternal placenta in pigs. *Pol J Vet Sci*, 2008. 11(4): p. 315-22.
- Jana, B, Koszykowska M, Andronowska A. The effect of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha, interleukin (IL)-1beta and IL-6 on prostaglandins(PG)F2alpha and E2 secretion from maternal placenta in pigs. *Pol J Vet Sci*. 2008;11(4):315-322.
- Koncurat MA, Greco C y Vivas A. IFN-g concentration in serum and porcine placental extracts from different gestation ages. *Biocell*, 2001. 25(3):23.
- Koncurat, MA; Yaful, GN; Riesco, O; Williamson DM. Determinación de IL-6, progesterona y estrógenos en la preñez porcina temprana. En: Asociación de Biología de Tucumán, XXVII Jornadas Científicas. 13-15 de octubre de 2010. Tafi del Valle, Tucumán, Argentina. 2010.
- Kridli RT, Khalaj K, Bidarimath M, Tayade C. Placentation, maternal-fetal interface, and conceptus loss in swine. *Theriogenology* 2016;85(1):135-144.
- Margni, R.A. Inmunología e Inmunquímica. Fundamentos. 5ta edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. 1996.
- Marrable, A.W. In: The embryonic pig: a chronological account. Ed. Exeter, Pitman Medical, London. 1971.
- Mathew D, Lucy M, Geisert R. Interleukins, interferons and establishment of pregnancy in pigs. *Reproduction*. 2016;151:111-122
- Murphy S, Tayade C, Ashkar A, Hatta K, Zhang J, Croy A. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod*, 2009. 80(5):848-859.
- Ross, J.W., Malayer, J., Ritchey, J. and Geisert, R. Characterization of the interleukin-1beta system during porcine trophoblastic elongation and early placental attachment. *Biol Reprod*, 2003. 69(4): p. 1251-9.
- Spencer, T.E. and F.W. Bazer. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci*, 2004. 82 E-Suppl: p. E4-13.
- Spencer, T.E. and F.W. Bazer. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. 2: p. 49.
- Suzuki, C., Yoshioka, K., Yamada, M., Miyamoto, T. and Manabe, N. Expressions of tumor necrosis factor-alpha, its receptor I, II and receptor-associated factor 2 in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Vet Res Commun*, 2014. 38(1): p. 1-10.
- Tayade C, Black GP, Fang Y, Croy BA. Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. *J Immunol*, 2006;176(1):148-156.
- Vélez C, Barbeito C, Koncurat M. $\alpha\beta 3$ Integrin and fibronectin expressions and their relation to estrogen and progesterone during placentation in swine. *Biotechnic & Histochemistry*. 2017. En prensa.

- Vélez C. Integrinas y su regulación por el sistema inmune durante la placentación porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. 2017.
- Williamson, D. Estudio de la presencia de integrinas, y su relación con los niveles de esteroides e interleuquinas, durante la placentación porcina. FCV, UNLP, Argentina, 2011.