

Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

RESOLUCIÓN Nº 352/2022

GENERAL PICO, 01 de Diciembre de 2022.-

VISTO:

La evaluación positiva enviada por las/los integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, respecto del Proyecto de Investigación: "Estudio del proceso proinflamatorio y su regulación durante la placentación porcina" y,

CONSIDERANDO:

Que estará bajo la dirección de la Dra. Mariángeles CLAUZURE, participando como Asesores el Dr. Ángel Gabriel VALDIVIESO (Investigador Adjunto CONICET, A BIOMED, UCA-CONICET) y el Dr. Claudio BARBEITO (Investigador Principal CONICET, Histología FCV UNLP), en carácter de Investigadores/as la Lic. Laura Romina GIAI, la Dra. Carolina Lucía VELEZ, la Dra. Delia María WILLIAMSON, la Dra. María del Carmen VIGLIERCHIO, la M.V. Mónica Graciela GARCÍA, el M.V. Daniel Vicente LACOLLA, el Esp. Sebastián RAMOS y la Dra. Ana Inés PORTU, en carácter de Asistente/s Investigador/as el/las estudiante/s de la carrera Medicina Veterinaria: Augusto QUIRÓZ PERALTA, Micaela Agustina TOLEDANO GALLARDO y Nazarena Cristina VILCHE.

Que tendrá una duración de sesenta (60) meses, a partir del 01 de Enero de 2023 y hasta el 31 de Diciembre de 2027.

Que de acuerdo a la presentación el citado proyecto es de Investigación aplicada.

Que participan en su desarrollo el Área Porcinos del Instituto de Medicina Reproductiva Veterinaria (IMERVET), el Laboratorio de Biología y Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF), todos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que, además, participarán el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), la Unidad Ejecutora del CONICET y la Universidad Católica Argentina.

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

Que el Artículo 5º Anexo I de la Resolución Nº 100/99 y su modificatoria Nº 88/02 del Consejo Superior UNLPam, 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 Nº 100/99 y Nº 88/02 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que las evaluaciones fueron realizadas por Dra. Melisa B. NICLOUD (Instituto de Investigaciones Biomédicas-Pontificia Universidad Católica Argentina) y la Dra. Adriana BURGUEÑO (Instituto de Investigaciones Biomédicas-Pontificia Universidad Católica Argentina).



Corresponde a Resolución N° 352/2022

//2.-

Que dicho proyecto cuenta con la aprobación del formulario del protocolo institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación bajo la responsabilidad el consejo asesor institucional para el uso y cuidado de animales de experimentación (CAICUAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 01 de Diciembre de 2022 puesta la acreditación del Proyecto de Investigación a consideración de los/as Sres/as. Consejeros/as, es aprobada por unanimidad.

POR ELLO:

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

RESUELVE:

ARTICULO 1º: Acreditar como Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el proyecto denominado: *"Estudio del proceso proinflamatorio y su regulación durante la placentación porcina"*, que se encuentra bajo la dirección de la Dra. Mariángeles CLAUZURE, participando como Asesores el Dr. Ángel Gabriel VALDIVIESO (Investigador Adjunto CONICET, A BIOMED, UCA-CONICET) y el Dr. Claudio BARBEITO (Investigador Principal CONICET, Histología FCV UNLP), en carácter de Investigadores/as la Lic. Laura Romina GIAI, la Dra. Carolina Lucía VELEZ, la Dra. Delia María WILLIAMSON, la Dra. María del Carmen VIGLIERCHIO, la M.V. Mónica Graciela GARCÍA, el M.V. Daniel Vicente LACOLLA, el Esp. Sebastián RAMOS y la Dra. Ana Inés PORTU, en carácter de Asistente/s Investigador/as el/las estudiante/s de la carrera Medicina Veterinaria: Augusto QUIRÓZ PERALTA, Micaela Agustina TOLEDANO GALLARDO y Nazarena Cristina VILCHE, el cual consta de diecinueve (19) folios y se adjunta como Anexo de la presente Resolución.

ARTICULO 2º: El proyecto tendrá una duración sesenta (60) meses, a partir del 01 de Enero de 2023 y hasta el 31 de Diciembre de 2027.

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/as interesados/as, Secretaría de Investigación, Posgrado y Extensión. Cumplido, archívese.

TITULO: "ESTUDIO DEL ROL DE INTERLEUQUINA-1B SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA PLACENTACIÓN PORCINA"

INTEGRANTES	FIRMA
Clauzure, Mariángeles	
Valdivieso, Ángel Gabriel	
Vélez, Carolina Lucía	
Williamson, Delia María	
Viglierchio, María del Carmen	
García, Mónica Graciela	
Lacolla, Daniel Vicente	
Giai, Laura Romina	
Portu, Ana Inés	
Ramos, Sebastián	
Quiroz, Augusto	
Barbeito, Claudio	 <small>DR. CLAUDIO BARBEITO PROF. TITULAR MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN</small>
Vilche, Nazarena Cristina	
Toledano Gallardo, Micaela Agustina	



Número de Proyecto:

Año:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO “ESTUDIO DEL PROCESO PROINFLAMATORIO Y SU REGULACIÓN 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

1.5. ÁREA DE CONOCIMIENTO: Agropecuarias y del ambiente

1.6. SUBÁREA DE CONOCIMIENTO: Ciencias Veterinarias

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS: Universidad Nacional de La Pampa; Facultad de Ciencias Veterinarias; Instituto de Medicina Reproductiva Veterinaria (IMERVET); Área Porcinos; Laboratorio de Biología y Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos de la Facultad de Ciencias Veterinarias (CIDEF).

2.2. OTRAS INSTITUCIONES: Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Unidad Ejecutora del CONICET, Universidad Católica Argentina.

2.3. EQUIPO de TRABAJO

2.3.1 . INTEGRANTES

Apellido y Nombre	CUIL	Título Académico	Categoría Investigación	R (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicación Hs./Sem
Clauzure, Mariángeles	27-30782086-8	Dra. Esp.	S/C (FCV-UNLPam) Investigador Asistente (CONICET)	D	Biología Gral (FCV UNLPam) CONICET	Ay. 1° Simple, Exclusiva CONICET	20 hs

Corresponde al Anexo de la Resolución N° 352/22 C.D.

Valdivieso, Ángel G.	20-26308250-9	Dr.	S/C Investigador Adjunto (CONICET)	A	BIOMED (UCA-CONICET)	Exclusivo CONICET	3 hs
Giai, Laura R.	27-36220623-0	Lic. Prof en Biología	S/C	I	Biología Gral.	Adscripta	5 hs
Vélez, Carolina L.	27-28485826-9	Dra.	V	I	Histología	JTP, Semi Exclusiva	3 hs
Williamson, Delia M.	27-24499522-0	Dra.	III	I	Biología Gral.	Prof. Adj. Exclusiva	3 hs
Vigliierchio, María del C.	23-14928306-4	Dra.	IV	I	Química Biol.	Prof. Adj. Exclusiva	3 hs
García, Mónica G.	27-13213398-6	MV.	V	I	Histología	Prof. Adj. Exclusiva	3 hs
Lacolla, Daniel V.	20-10809421-5	MV	III	I	Histología	Prof. Consulto Simple	3 hs
Ramos, Sebastián	20-31486758-1	Esp.	S/C	I	Producción porcina	Ay. 1° Simple	2 hs
Portu, Ana I.	27-31892745-1	Dra.	S/C	I	Bacteriología y Micología	JTP, Semi Exclusiva	2 hs
Barbeito, Claudio	20-14922728-9	Dr.	I Investigador Principal (CONICET)	A	Histología FCV-UNLP	Prof. Titular Exclusivo CONICET	2 hs
Quiróz Peralta, Augusto	20-34767153-4	Est.	S/C	AI			2 hs
Toledano Gallardo, Micaela A.	27-44342170-5	Est.	S/C	AI		Estudiante	1 hs
Vilche, Nazarena C.	27-44120123-6	Est.	S/C	AI		Estudiante	1 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 Dedicac. Hs./Sem.

2.3.2. TESISISTAS:

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

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

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: 5 años

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 /2023 FINALIZACIÓN: 31 / 12/ 2027

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

Para que la gestación sea exitosa, el diálogo que se establece entre el *conceptus* y el endometrio involucra, entre otros, al sistema inmunológico y sus moléculas llamadas citoquinas. El objetivo de este trabajo es estudiar el proceso proinflamatorio de la interfase feto/materna durante la placentación porcina con el fin de dilucidar que citoquinas y que mecanismos moleculares desempeñan un rol fundamental en la preñez porcina. Se analizarán niveles de expresión de IL-6, IFN- γ y TNF- α (PCR, ELISA) en sueros y homogenatos de distintos períodos gestacionales. Se estudiará la actividad de enzimas catalasa y GST como mediadores de respuesta antioxidante, y niveles endógenos de GSH como mediador de la respuesta no enzimática (espectrofotometría, western blot). Se analizará la producción de ROS (fluorescencia). En cultivos primarios se realizarán tratamientos con inhibidores de IL-1 β y de las distintas vías de señalización para determinar una relación entre las citoquinas, y un efecto causal entre la secreción de IL-1 β y la producción de ROS. Con este plan se espera obtener conocimientos que contribuyan a comprender mecanismos fisiológicos que participan en la placentación porcina y que en un futuro permitan originar estrategias para incrementar la tasa de sobrevivencia embrionaria en esta especie de alto valor productivo.

4.1 Palabras claves: (de 4 a 6)

Citoquinas/Estrés-oxidativo/Respuesta-antioxidante/Reproducción/Placenta/Porcinos

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

In a successful pregnancy, the dialogue established between the *conceptus* and the endometrium involves, among others, the immune system and its main molecules called cytokines. The aim of this work is to study the proinflammatory process of the fetus/maternal interface during pig placentation in order to elucidate which cytokines and which molecular mechanisms play a fundamental role in pig pregnancy. The expression of IL-6, IFN- γ and TNF- α will be analyzed (PCR, ELISA) in sera and homogenates from different gestational periods. The activity of catalase and GST enzymes as mediators of antioxidant response, and endogenous levels of GSH as a mediator of non-enzymatic response (spectrophotometry, western blot) will be studied. The production of ROS (fluorescence) will be analyzed. In primary cultures, treatments with inhibitors of IL-1 β and of the different signaling pathways will be carried out to determine a relationship between cytokines, and a causal effect between IL-1 β secretion and ROS production. With this plan, it is expected to obtain knowledge that contributes to understanding physiological mechanisms that participate in pig placentation and that in the future may originate strategies to increase the embryonic survival rate in this species of high productive value.

4.3. Key words: (de 4 a 6)

Cytokines/Oxidative-stress/Antioxidant-response/Reproduction/Placenta/Pigs

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

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

La producción porcina en Argentina se encuentra en constante crecimiento, el cual puede explicarse teniendo en cuenta los bajos costos que representa criar cerdos en comparación con otros animales. A nivel productivo, la actividad cuenta con numerosas ventajas intrínsecas, como son la disponibilidad de granos que conforman la base de la alimentación y el principal costo de producción, el clima favorable, las reservas de agua potable y la falta de amenazas sanitarias [1]. Desde hace 20 años, la producción de carne porcina alcanza su máximo histórico aumentando a un ritmo del 10 % año a año [2], llegando

a un consumo de 16,29 kg/habitante/año calculado en abril del año 2022 y reduciendo cada vez más la necesidad de importación [3]. Al sector porcino argentino se le presenta una gran oportunidad dado el incremento de la tasa de crecimiento poblacional en los países en vías de desarrollo, con el consiguiente aumento de necesidades de alimento [4]. Ese mercado internacional presentará mayores requerimientos de productos con altas especificaciones de calidad en cuanto a presentación, sanidad, seguridad y valor nutricional. El aumento mundial del consumo de carnes magras, relacionado con hábitos de alimentación más saludables, la demanda de carne vacuna insatisfecha, las preferencias crecientes de productos orgánicos y ecológicos con certificaciones que denoten el respeto en el uso de los recursos naturales, el medio ambiente y el bienestar animal, posicionan a la carne de cerdo como el producto más apropiado a estas exigencias [1]. Nuestro país cuenta con muy buen estatus sanitario, disponibilidad de materias primas de máxima calidad, suelos aptos, clima adecuado y buena disponibilidad de agua potable. Todos estos factores permitirían desarrollar la actividad respetando el medio ambiente y el bienestar animal, a un costo de producción competitivo a nivel mundial [1].

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. Las pérdidas prenatales limitan la producción. En la gestación pueden ocurrir alteraciones en la migración de los embriones, su elongación, el reconocimiento inmunológico de la preñez por la madre y la competencia embrionaria por el lugar de implantación. A pesar de los numerosos trabajos científicos que existen sobre los períodos tempranos de la gestación porcina, aún permanece gran cantidad de mecanismos sin dilucidar. La mortalidad embrionaria temprana sin causa específica origina la mayor cantidad de pérdidas, con valores entre un 30 % y un 40 % antes del día 30 de preñez [5, 6]. En nuestra región, norte de la provincia de La Pampa y sur de Córdoba, las pérdidas pueden alcanzar hasta un 50% [7]. Según otros estudios, un 15-20 % de las pérdidas tienen su lugar entre los días 30 y 50 de preñez y luego ocurre un 5-10 % de muerte adicional entre los días 90 y 114 de gestación [8-10]. Estos porcentajes conllevan a demarcar una de las variables más importantes de la industria porcina como es el número de partos de cerda por año [11].

El cerdo (*Sus scrofa*) es un mamífero de alto valor productivo adaptado para la producción de carne, dado que crece y madura con rapidez. La hembra porcina es poliéstrica anual y alcanza la pubertad a los 6-7 meses de edad. El 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 proceso fisiológico que obedece a precisas interacciones entre el *conceptus* (producto de la concepción en cualquier etapa de desarrollo, desde la fertilización al nacimiento, e incluye el embrión o el feto y las membranas embrionarias) y su madre, las cuales se llevan a cabo mediante el desarrollo de la placenta. Éste 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, el cigoto es transportado hacia los cuernos uterinos para su implantación en el endometrio. La implantación es un proceso progresivo en el que el *conceptus* se aproxima y adhiere al endometrio materno. La implantación del blastocisto porcino 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 que actúan como señal en el reconocimiento de la preñez [12] y como marcador de elongación del trofoblasto [13, 14]. 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 [15]. Una vez completada la aposición de los epitelios trofoblástico y endometrial continua el desarrollo de la placenta.

La placenta porcina requiere de la adhesión entre las membranas fetales y el endometrio, lo que permite el intercambio fisiológico entre el feto y la madre. Dentro de las funciones que realiza se destaca el rol que presenta de generar tolerancia inmunológica frente al *conceptus* en desarrollo, asegurando su supervivencia. Es también un órgano endocrino, ya que sintetiza hormonas esteroideas y peptídicas, y diferentes factores de crecimiento que, actuando en conjunto, se encargan de llevar la

gestación a término. Regula la homeostasis de la unidad feto-placentaria permitiendo el intercambio constante de gases, nutrientes y desechos entre el feto y la madre. La placenta también cumple una función protectora frente a traumatismos o a agentes infecciosos. Según la especie, existen diversos tipos de placenta, que varían por su constitución y tipo de capas celulares que se interponen entre la sangre de la madre y la sangre del embrión. En el caso del cerdo, la placenta es de tipo epiteliochorial, no invasiva, adecidua, plegada y difusa. Anatómicamente se pueden distinguir claramente en la placenta porcina tres regiones. Una es la zona embrionaria, ubicada en el centro del corion que contiene al embrión propiamente dicho rodeado por la membrana corioalantoidea. La segunda región es la zona paraplacentaria, la cual incluye membranas extraembrionarias y se encuentra a ambos lados de la región embrionaria. La tercera región es la compuesta por los extremos avasculares o apéndices necróticos, denominados así porque carecen de vellosidades y vascularización; su función es sellar la unidad feto-placentaria y separarla de las placentas adyacentes. Para que la gestación se lleve a cabo, 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. También se encuentran involucradas las moléculas de adhesión, las cuales permiten el anclaje de los epitelios materno y fetal. Otro sistema involucrado es el endócrino, numerosas hormonas y factores de crecimiento actúan de manera sistematizada y llevan al éxito de la gestación [16].

La Interleuquina-1 β (IL-1 β) es una citoquina proinflamatoria que actúa como mediador central de la inflamación y la inmunidad innata en los mamíferos [17, 18]. La IL-1 β está involucrada en la implantación del *conceptus*, la invasión y la inmunotolerancia feto-materna [19]. Esta citoquina se sintetiza en forma de precursor [20] y es escindida a su forma madura mediante la actividad de caspasa-1 [21, 22], localizada en complejos que se denominan “inflamomas” [23]. La IL-1 β media sus efectos biológicos a través de un receptor de membrana denominado receptor de la IL-1 de tipo I (IL-1RI), el cual contiene un dominio de transducción de señales en la región citoplásmica [24]. Tras la unión de la IL-1 β al receptor, la transducción de señales implica varias fosforilaciones y la formación de nuevos complejos con otras quinasas y proteínas adaptadoras, que finalmente dan lugar a la activación del NF- κ B y AP-1, entre otros factores de transcripción involucrados en su señalización [25, 26]. En las primeras etapas de la gestación, el blastocisto, inicia un diálogo con el endometrio de manera de obtener su receptividad. 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 [27]. El rol de la IL-1 β ha sido ampliamente estudiado en el período de implantación de distintas especies [19]. Esta citoquina participa en el desarrollo del trofoblasto y comunicación con el endometrio y es necesaria para una correcta implantación [28]. Los niveles de expresión de la IL-1 β en el *conceptus* aumentan entre los días 11 y 15 de la gestación y luego disminuyen [29-31], al igual que la caspasa-1 y el factor de transcripción NF- κ B [32]. 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 la IL-1 β [31]. Por lo tanto, hay numerosos trabajos que demuestran la importancia de la IL-1 β en la implantación en cerdo, pero aún no ha sido estudiado el rol de la IL-1 β en el transcurso de la gestación porcina, período en el que también se producen altos porcentajes de pérdidas embrionarias [27]. El período de gestación tardía cumple con etapas cruciales para su desarrollo exitoso, en las cuales la 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 exponencial, también se observa la mayor remodelación placentaria celular determinada por estudios de apoptosis [33]. Recientemente, hemos demostrado que la IL-1 β se encuentra presente en la interfase feto-materna durante la gestación porcina en los períodos de mayor remodelación tisular placentario (60-70 días); y en suero a término (114 días), probablemente para facilitar la expulsión de las placentas durante el parto [34].

Diversos trabajos describen el rol de otras citoquinas que podrían estar reguladas por la IL-1 β a lo largo de la gestación porcina [27]. La Interleuquina-6 (IL-6) posee propiedades pro- y antiinflamatorias y se sintetiza en respuesta a ciertos microorganismos y a otras citoquinas como la IL-1 β [35]. 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 [36]. En el día 32 se ha observado el incremento de IL-6 en la placenta fetal [37, 38], aumento que se relaciona con un incremento de anticuerpos asimétricos, los cuales son esenciales para prevenir el rechazo inmune del feto [39]. Por otra parte, esta regulación de IL-6 se relaciona con altos niveles de estrógenos secretados en el mismo período [40], 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 [41] y angiogénesis [36] durante la gestación. Al igual que IL-6, los niveles de Interferon- γ (IFN- γ) se encuentran aumentados a los 32 días de gestación en placenta porcina fetal [37, 38]. El IFN- γ es una citoquina proinflamatoria producida principalmente por linfocitos estimulados y también es sintetizada en las células del trofoblasto de cerdos [42]. Durante la implantación porcina, entre los días 12-20 de gestación, el trofoectodermo secreta enormes cantidades de IFN- γ hacia el lumen uterino [43, 44]. 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 [10]. El Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), es otra citoquina involucrada en la gestación porcina. En períodos tempranos, durante la implantación, TNF- α regula la expresión de progesterona [45, 46] y de estrógenos [47]. También está involucrado en la diferenciación celular, remodelación tisular y apoptosis en la primera fase de la gestación porcina [48]. Se desconoce su rol en la gestación tardía [27].

Si bien aún no están ampliamente estudiados los mecanismos involucrados, está descrito que citoquinas proinflamatorias como la IL1 β , regulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [49, 50]. Trabajos en distintas especies sugieren que la gestación es un proceso caracterizado por un estado de estrés oxidativo, en el cual la placenta produce altos niveles de ROS [51-53]. El exceso de radicales libres pueden ocasionar daños a nivel celular [54], alterando la formación de la placenta y del feto [55], o generar complicaciones posteriores durante la gestación como preclampsia o pérdidas embrionarias [56, 57]. En un trabajo reciente realizado en porcinos, se ha demostrado un aumento de estrés oxidativo durante el periodo de gestación tardía y lactancia [58]. Más interesante aún, otro trabajo demuestra que variando la alimentación de los cerdos se puede regular la producción de ROS y en consecuencia la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α [59].

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)

En estudios recientemente publicados de nuestro grupo de trabajo [34], se determinó la presencia de IL-1 β en sueros, homogenatos de úteros de cerdas no gestantes y homogenatos de extractos placentarios maternos y fetales de los distintos períodos gestacionales seleccionados (30, 60, 70 y 114 días). Como muestra la Figura 1, se ha observado que la concentración tisular de IL-1 β aumenta durante la gestación, llegando a un pico de concentración en los 60-70 días, tanto en placenta materna como fetal. Luego se observó que la IL-1 β descende en el periodo a término (114 días). A nivel sistémico, la determinación demostró un patrón contrario, ya que los niveles séricos de IL-1 β permanecen basales durante la gestación y aumentan al final de la misma. Entre los 60 y 70 días del período gestacional se producen profundos cambios estructurales placentarios, que permiten el crecimiento exponencial fetal. La IL-1 β sería necesaria en esta etapa a nivel tisular, para participar en los mecanismos moleculares que permiten esta remodelación en la interfase placentaria. Por

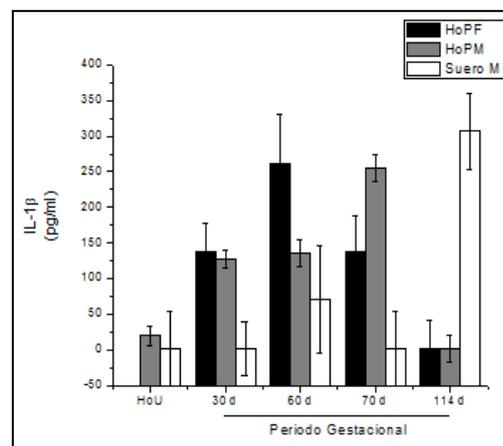


Figura 1: Concentración de IL-1 β (pg/ml) en homogenatos de útero no gestante (HoU) y homogenatos de placenta fetal (HoPF), homogenatos de placenta materna (HoPM) y suero materno de distintos períodos de gestación.

otro lado, el aumento de la citoquina a nivel sérico, al final de la gestación, probablemente tenga como objetivo activar el sistema inmune proinflamatorio para el desencadenamiento del parto.

Durante este trabajo se ampliarán los estudios del proceso proinflamatorio y su regulación durante la placentación porcina. Estudiaremos otras citoquinas proinflamatorias (IL-6, IFN- γ y TNF- α) y la posible influencia de IL-1 β sobre la secreción de estas citoquinas. También nos enfocaremos en el estudio del estrés oxidativo y del sistema de respuesta antioxidante durante el proceso inflamatorio de placentación porcina. Intentaremos dilucidar los mecanismos moleculares involucrados.

En síntesis, el estudio del proceso proinflamatorio y su regulación durante la placentación porcina tiene como fin dilucidar el rol que esta citoquina desempeña en el proceso inflamatorio característico de la interfase feto/materna. Mediante la comprensión del conocimiento del tipo de respuesta inmunitaria y los mecanismos moleculares y celulares que posibilitan la preñez porcina, se espera obtener herramientas que en el futuro puedan incrementar la producción porcina, disminuyendo la alta tasa de muerte embrionaria sin causa específica.

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

Trabajos publicados en los cuales se demuestra experiencia en la metodología de estudio y técnicas propuestas.

Trabajos publicados en Revistas Nacionales/Internacionales

“Histamine H4 Receptor Agonism Induces Antitumor Effects in Human T-Cell Lymphoma”. Clazure, M., Táquez Delgado, M. A., Phillip, J. M., Revuelta, M. V., Cerchietti, L., & Medina, V. A. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 26;23(3):1378. doi: 10.3390/ijms23031378.

“NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) and caspase 1 (CASP1) modulation by intracellular Cl⁻ concentration”. Clazure M, Valdivieso ÁG, Dugour AV, Mori C, Massip-Copiz MM, Aguilar MÁ, Sotomayor V, Asensio CJA, Figueroa JM, Santa-Coloma TA. *Immunology.* 2021 Apr 9. doi: 10.1111/imm.13336. Epub 2021 May 2.

“CFTR chloride channel activity modulates the mitochondrial morphology in cultured epithelial cells”. García R, Falduti C, Jara R, Clazure M, Massip-Copiz MM, de Los Ángeles Aguilar M, Santa-Coloma TA, Valdivieso ÁG. *Int J Biochem Cell Biol.* 2021 Apr 9:105976. doi: 10.1016/j.biocel.2021.105976. Online ahead of print.

“EGFR activity upregulates lactate dehydrogenase A (LDHA) expression, LDH activity and lactate secretion in cultured IB3-1 cystic fibrosis lung epithelial cells”. María Macarena Massip-Copiz, Ángel Gabriel Valdivieso, Mariángeles Clazure, Consuelo Mori, Cristian J A Asensio, María Ángeles Aguilar, Tomás Santa-Coloma. *Biochem Cell Biol.* 2021 Jan 22. doi: 10.1139/bcb-2020-0522. Epub 2021 Jan 22.

“Identification and characterization of human PEIG-1/GPRC5A as a 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) and PKC-induced gene”. Mori C, Valdivieso ÁG, Clazure M, Massip-Copiz MM, Aguilar MÁ, Cafferata EGA, Santa Coloma TA. *Arch Biochem Biophys.* 2020 Jul 15;687:108375. doi: 10.1016/j.abb.2020.108375. Epub 2020 Apr 25.

“IFN- γ and IL-10: seric and placental profile during pig gestation. Carolina Vélez, Mariángeles Clazure, Delia Williamson, Mirta A. Koncurat and Claudio Barbeito. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* Aceptado para su publicación. Octubre 2020.

“Inmunolocalización de la integrina A5 β 1, la laminina y el colágeno tipo V en placenta porcina en diferentes etapas gestacionales”. Vélez, CL; Williamson, DM; Clazure, M; Koncurat, MA; Barbeito, CG. *InVet* Dic 2019, 21 (2): 1-13. ISSN 1514-6634 (impreso). ISSN 1668-3498 (en línea).

“Impairment of CFTR activity in cultured epithelial cells upregulates the expression and activity of LDH resulting in lactic acid hypersecretion”. Valdivieso ÁG, Clazure M, Massip-Copiz MM, Cancio CE, Asensio CJA, Mori C, Santa-Coloma TA. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Apr;76(8):1579-1593. doi: 10.1007/s00018-018-3001-y. Epub 2019 Jan 1.

"IL-1 β , IL-2 and IL-4 concentration during porcine gestation". Carolina Lucía Vélez, Mariangeles Clazure, Delia María Williamson, Claudio Gustavo Barbeito, Tomás Santa Coloma, Mirta Adriana Koncurat. *Theriogenology*. 2019 Jan 25;128:133-139. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.017.

"Concentración de Interleuquina 1- β durante la placentación porcina". Carolina Lucía Velez, Mariangeles Clazure, Delia María Williamson, Claudio Gustavo Barbeito, Tomás Santa Coloma, Mirta Adriana Koncurat. *Ciencia Veterinaria*. 2018 Dic; vol 20; num 1. doi: 10.19137/cienvet20182011.

"N-acetyl cysteine reverts the proinflammatory state induced by cigarette smoke extract in lung Calu-3 cells". Ángel G. Valdivieso, Andrea V. Dugour, Verónica Sotomayor, Mariángel Clazure, Juan M. Figueroa and Tomás A. Santa-Coloma. *Redox Biology*. 2018 Jun; 16:294-302. doi: 10.1016/j.redox.2018.03.006. Epub 2018 Mar 14.

"Epieregulin (EREG) is upregulated through an IL-1 β autocrine loop in Caco-2 Epithelial Cells with Reduced CFTR Function". Massip-Copiz, María; Clazure, Mariángel; Valdivieso, Ángel; Santa-Coloma, Tomás. *J Cell Biochem*. 2017 Nov 1. doi: 10.1002/jcb.26483.

"CFTR Modulates RPS27 Gene Expression Using Chloride Anion as Second Messenger". Ángel G. Valdivieso, Consuelo Mori, Mariángel Clazure, Macarena Massip-Copiz, and Tomás A. Santa-Coloma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2017 Sep 21; 633: 103-109. doi: 10.1016/j.abb.2017.09.014.

"CFTR Impairment Upregulates c-Src Activity through IL-1 β Autocrine Signaling". Massip-Copiz MM, Clazure M, Valdivieso ÁG, Santa-Coloma TA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2017 Feb 15; 616: 1-12. doi: 10.1016/j.abb.2017.01.003.

"Intracellular Chloride Concentration Changes Modulate IL-1 β Expression and Secretion in Human Bronchial Epithelial Cultured Cells". Clazure M, Valdivieso ÁG, Massip-Copiz MM, Mori C, Dugour AV, Figueroa JM, Santa-Coloma TA. *J Cell Biochem*. 2016 Dec 20. doi: 10.1002/jcb.25850.

"The Chloride Anion Acts as a Second Messenger in Mammalian Cells – Modifying the Expression of Specific Genes". Ángel G. Valdivieso, Mariángel Clazure, Macarena Massip-Copiz, Tomás A. Santa-Coloma. *Cell Physiol Biochem*. 38(1):49-64, 2016.

"Disruption of Interleukin-1 β Autocrine Signaling Rescues Complex I Activity and Improves ROS Levels in Immortalized Epithelial Cells with Impaired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Function". Mariángel Clazure, Ángel G. Valdivieso, María M. Massip Copiz, Gustavo Schulman, María L. Teiber, Tomás A. Santa Coloma. *PLoS One*. 9(6), 2014.

"The Mitochondrial Complex I Activity is Reduced in Cells with Impaired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Function". Ángel G. Valdivieso, Mariángel Clazure, María C. Marín, Guillermo L. Taminelli, María M. Massip Copiz, Francisco Sánchez, Gustavo Schulman, María L. Teiber, Tomás A. Santa Coloma. *PLoS One*. 7(11), 2012.

"Measurement of CFTR Activity using Fluorescence Spectrophotometry". Ángel G. Valdivieso, María C. Marín, Mariángel Clazure and Tomás A. Santa-Coloma. *Anal Biochem*. 418(2):231-7, 2011.

Trabajos presentados y publicados en congresos y jornadas (últimos cinco años)

"Expresión del receptor de IL-6 en la placentación porcina: Resultados preliminares". Gai L.R.; Williamson D.M.; López, N.; Koncurat M.A.; Vélez C.L.; Clazure M. XIII Jornadas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria - I Reunión Latinoamericana de Inmunología Veterinaria. 19 y 20 de Noviembre de 2021. Modalidad Virtual. UNLPam, General Pico, La Pampa, Argentina.

"Expresión de vitronectina en la placentación porcina: Resultados preliminares". Quiroz Peralta J., Vélez C., Lopez N., Clazure, M., García M., Williamson D. XIII Jornadas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria - I Reunión Latinoamericana de Inmunología Veterinaria. 19 y 20 de Noviembre de 2021. Modalidad Virtual. UNLPam, General Pico, La Pampa, Argentina.

"Efectos de la administración de progesterona exógena en la gestación porcina". Carolina Lucía Vélez, Sebastián Ramos, Florencia Farcey, Mariángel Clazure, Agustín Nicolás, Augusto Quiroz Peralta, Natalia López, Delia María Williamson. Jornadas de Ciencia y Técnica. 13 y 14 de Octubre de 2021. Modalidad Virtual. UNLPam, General Pico, La Pampa, Argentina.

"Estudio de citoquinas durante la placentación porcina". C Velez, Mirta Koncurat, Adriana Garro, Ana Inés Portu, Delia Williamson, Mariángel Clazure, Yolanda Marrón, Marega Nahuel, Lopez Natalia,

Gastaldo, Keila, Romina Giai. Jornadas de Ciencia y Técnica. 13 y 14 de Octubre de 2021. Modalidad Virtual. UNLPam, General Pico, La Pampa, Argentina.

“Concentración de Interleuquina-6 en suero y extractos placentarios durante la gestación porcina”. Giai LR, Williamson DM, Vélez CL and Clazure M. X Jornadas de Jóvenes Investigadores, Junio 3 y 4, 2021. Modalidad Virtual. Buenos Aires, Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA.

“Interleukin-6 concentration in serum and placental extracts during porcine gestation”. Giai LR, Williamson DM, Vélez CL and Clazure M. LXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica - SAIC. Noviembre 10-13, 2020. Modalidad Virtual. Res. N°330, Medicina (Buenos Aires) 2020:80 (Supl.V).

“Intracellular chloride modulation of IL-1 β secretion and the NLRP3 inflammasome expression/activity require SGK1”. Clazure, Mariángeles; Valdivieso, Ángel G.; Mori, Consuelo; Massip-Copiz, M. Macarena; Sotomayor, Verónica; Asensio, Cristian J. A.; Santa Coloma, Tomás A. LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica - SAIC. Noviembre 13-16, 2019. Mar del Plata, Argentina. Res. N°72, Medicina (Buenos Aires) 2019:79 (Supl.IV).

“Antitumor role of histamine H4 receptor in human T-cell lymphoma. Therapeutic benefit for combination therapy with histamine and histone deacetylase inhibitors”. Clazure, Mariángeles; Taquéz Delgado, Mónica; Cerchietti, Leandro; Medina, Vanina A. LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica - SAIC. Noviembre 13-16, 2019. Mar del Plata, Argentina. Res. N°143, Medicina (Buenos Aires) 2019:79 (Supl.IV).

“Relación entre la expresión de osteopontina y la de citoquinas durante la placentación porcina”. Vélez, Carolina Lucía; Williamson, Delia María; Clazure, Mariángeles; Koncurat, Mirta Adriana; Barbeito, Claudio. XII Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. 7 y 8 de noviembre de 2019. Universidad Nacional de La Plata.

“Programa placentación porcina. Estudio de Citoquinas durante placentación porcina”. Vélez, Carolina Lucía; Williamson, Delia María; Koncurat, Mirta Adriana; Clazure, Mariángeles; Giai Romina; Gastaldo, Keila; López, Natalia. I Jornada de Interinstitucional de extensión - IV Jornada interinstitucional de ciencia y técnica. Facultad de Ingeniería y Facultad de Ciencias Veterinarias. 31 de Octubre, 2019. General Pico, La Pampa.

“INF γ and IL-10 seric and placental profile during porcine gestation”. C. Vélez, D. Williamson, M. Clazure, M. Koncurat, C. Barbeito. Congreso Internacional: International Federation of Placenta Associations-IFPA 2019/ VIII Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta-SLIMP. 10-13 de Septiembre, 2019. Buenos Aires, Argentina.

“Participación de los niveles de Cl- intracelular e Interleuquina-1 β en la producción de estrés oxidativo en células de epitelio respiratorio FQ”. Figueroa, Juan M.; Clazure, Mariángeles; Valdivieso, Ángel G.; Massip-Copiz, María M.; Mori, Consuelo; Dugour, Andrea V.; Santa-Coloma, Tomás A. V CONGRESO ARGENTINO DE FIBROSIS QUÍSTICA. 09-11 de Mayo, 2019. Buenos Aires, Argentina.

“Intracellular chloride modulates NLRP3 inflammasome and IL-1 β secretion”. Clazure, Mariángeles; Valdivieso, Ángel G.; Massip-Copiz, M. Macarena; Mori, Consuelo; Asensio, Cristian J. A.; Santa Coloma, Tomás A. LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica - SAIC. Noviembre 14-17, 2018. Mar del Plata, Argentina. Res. N°24, Medicina (Buenos Aires) 2018:78 (Supl.III).

“Concentración de IFN- γ , IL-2 e IL-4 en suero y placenta porcina”. Vélez, C.; Williamson, D.; Garro, A.; Clazure, M.; Barbeito, C.; Santa-Coloma, T.A.; Koncurat, M. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores 6, 7 y 8 de junio de 2018, Buenos Aires, Argentina. InVet Vol. 20 N° 1-2, 2018.

“Intracellular Chloride Acts as a Second Messenger for CFTR Modulating IL-1 β Expression”. Clazure, Mariángeles; Massip-Copiz, María M.; Mori, Consuelo; Asensio, Cristian; Sotomayor, Verónica; Valdivieso, Ángel G.; Santa-Coloma, Tomás A. REUNIÓN CONJUNTA DE SOCIEDADES DE BIOCIENCIAS. LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica - SAIC. Noviembre 13-17, 2017. Buenos Aires, Argentina. Res. N° 564, Medicina (Buenos Aires) 2017: 77 (Supl. I).

“CFTR Chloride Channel Modulates the Mitochondrial Dynamics”. Varela, Rocío; Clazure, Mariángeles; Massip-Copiz, María M.; Mori, Consuelo; Aguilar, Maria de los A.; Santa-Coloma, Tomás

A; Valdivieso, Ángel G. REUNIÓN CONJUNTA DE SOCIEDADES DE BIOCENCIAS. LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica - SAIC. Noviembre 13-17, 2017. Buenos Aires, Argentina. Res. N° 478, Medicina (Buenos Aires) 2017: 77 (Supl. I).

“Efecto de un concentrado de humo de cigarrillo sobre un modelo in vitro de epitelio respiratorio asmático: respuesta al budesonide y estrés oxidativo”. Dugour, Andrea V.; Valdivieso, Ángel G.; Clazure, Mariángeles; Calello, Mariana; Santa-Coloma, Tomás A; Figueroa, Juan M.LV Reunión Anual de la Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica. 06 - 08 de Noviembre, 2017. Buenos Aires, Argentina.

“Concentración de IFN- γ en suero y placenta porcina”. Vélez, C.; Williamson, D.; Garro A.; Clazure, M; Gastaldo K, Soler J, Alderete S, Marrón Y, Viglierchio M; Koncurat, M. X Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria (AAIV). Facultad de Ciencias Veterinaria, UBA. 08-10 de Noviembre, 2017. Buenos Aires, Argentina.

“Relación entre IL-1 β , $\alpha\text{v}\beta 3$ y fibronectina durante la gestación porcina”. Vélez, C.; Williamson, D.; Clazure, M; Koncurat, M. V Jornadas Internacionales Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Facultad de Ciencias Veterinaria, UBA. 16- 18 de Mayo, 2017. Buenos Aires, Argentina.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

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

Objetivo General:

Estudiar el proceso proinflamatorio de la interfase feto/materna durante la placentación porcina con el fin de dilucidar que citoquinas y que mecanismos moleculares desempeñan un rol fundamental en la preñez porcina.

Objetivos Específicos:

1. Estudio del rol de IL-1 β sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias involucradas en el desarrollo placentario: IL-6, IFN- γ y TNF- α .
2. Estudio del estrés oxidativo y del sistema de respuesta antioxidante durante el proceso inflamatorio de placentación porcina.

Hipótesis:

En el proceso de la placentación porcina existiría una regulación en la expresión de IL-1 β , la cual a su vez regularía la expresión de IL-6, IFN- γ y TNF- α y la producción de especies reactivas de oxígeno. Esta regulación sugeriría un posible rol de la citoquina en el mantenimiento de la preñez.

CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO

A partir de los antecedentes y resultados preliminares expuestos, se plantean hipótesis principales correspondientes a cada uno de los objetivos planteados.

Hipótesis 1: La expresión de IL-1 β modula la expresión de otras citoquinas inflamatorias involucradas en el desarrollo placentario como IL-6, IFN- γ y TNF- α .

Recientemente demostramos que existe una modulación de la expresión de IL-1 β en el período de gestación tardía, período en el cual se producen altos porcentajes de pérdidas embrionarias.

Numerosos trabajos sugieren que otras citoquinas, reguladas por IL-1 β , podrían tener un rol fundamental a lo largo de la gestación porcina. Trabajos de otros autores demuestran que IL-6, IFN- γ y TNF- α son citoquinas que se encuentran involucradas en períodos tempranos, durante la implantación. Hasta el momento se desconoce su rol en la gestación tardía, que cumple con etapas cruciales para su desarrollo exitoso. Nuestro primer objetivo específico es determinar los niveles de expresión de IL-6, IFN- γ y TNF- α en muestras de sueros y homogenatos de tractos reproductivos de cerdas mestizas. Las muestras placentarias seleccionadas serán de distintos períodos de gestación: 17, 30, 60, 70 y 114 días, períodos en los cuales la gestación cumple con etapas cruciales para su desarrollo exitoso: implantación, inicio de la osificación y el desarrollo del sistema inmunológico, mayor crecimiento placentario y comienzo de un estado de meseta en el desarrollo del feto para un crecimiento

exponencial. Posteriormente, se comprobarían estos resultados en cultivos primarios de placenta y ampliarían el estudio ya que se cuenta con la ventaja de que en estos cultivos podremos realizar tratamientos con inhibidores de IL-1 β y de las distintas vías de señalización para determinar una relación entre las distintas citoquinas y conocer más sobre el proceso inflamatorio de este período.

Hipótesis 2: La variación de la expresión de citoquinas proinflamatorias durante el proceso de la placentación porcina modula la producción de ROS.

Trabajos en distintas especies describen que citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , regulan la producción ROS y que la gestación es un proceso caracterizado por un estado de estrés oxidativo. Este exceso de radicales libres de origen placentario puede ocasionar daños a nivel celular, alterando la formación de la placenta y del feto, o generar complicaciones posteriores durante la gestación como preclampsia o pérdidas embrionarias. Actualmente, el mecanismo por el cual ocurren estas alteraciones no es completamente entendido. Es por esto por lo que nuestro segundo objetivo específico es estudiar el estrés oxidativo y el sistema de respuesta antioxidante durante el proceso inflamatorio de placentación porcina, ya sea en muestras de suero o en homogenatos de extractos placentarios maternos y fetales en los distintos períodos gestacionales. Posteriormente, se comprobarían estos resultados en cultivos primarios de placenta y ampliarían el estudio de transducción de señales en este proceso inflamatorio utilizando tratamientos con inhibidores de IL-1 β y de las distintas vías de señalización para determinar una relación entre las distintas citoquinas y la producción de ROS.

TIPO DE DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y MÉTODOS

Objetivo 1: Estudio del rol de IL-1 β sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias involucradas en el desarrollo placentario: IL-6, IFN- γ y TNF- α .

Se obtendrán sueros y se prepararán homogenatos a partir de tractos reproductivos de cerdas mestizas. Las muestras placentarias seleccionadas serán de distintos períodos de gestación (17, 30, 60, 70 y 114 días). Las mismas serán controladas en estructura y peso como se indica en materiales y métodos. Se tomaron esos períodos para los estudios ya que en ellos la gestación cumple con etapas cruciales para su desarrollo exitoso: Entre los 16 y 20 días ocurre el proceso de implantación. 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 exponencial. Aquí también se observa la mayor remodelación placentaria celular determinada por estudios de apoptosis [11]. El período a término se escogió ya que indica el fin de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la gestación.

Con el fin de ampliar nuestro estudio del perfil proinflamatorio durante la placentación porcina, se analizarán los niveles de expresión de IL-6, IFN- γ y TNF- α por Real Time PCR en las muestras provenientes de los distintos períodos gestacionales. Se utilizará el ensayo de ELISA para medir los niveles de las mismas citoquinas secretadas en cada muestra de homogenato. A partir de cultivos primarios de placenta, comprobaremos los resultados que se hayan obtenido con los homogenatos, con la ventaja de que en estos cultivos podremos realizar tratamientos con inhibidores de IL-1 β y de las distintas vías de señalización para determinar una relación entre las distintas citoquinas (IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α) y conocer más sobre el proceso inflamatorio de este período.

Objetivo 2: Estudio del estrés oxidativo y del sistema de respuesta antioxidante durante el proceso inflamatorio de placentación porcina.

En las muestras de suero y homogenatos mencionadas anteriormente se estudiará la actividad de las enzimas catalasa y glutatión-S-trasferasa (GST) como mediadores de respuesta antioxidante, y niveles endógenos de glutatión (GSH) como mediador de la respuesta no enzimática. Estas determinaciones se realizarán por métodos espectrofotométricos cinéticos (actividad) y western blot (cantidad de proteína). Se analizará la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante 2', 7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) por fluorescencia, microscopía confocal de fluorescencia y citometría de flujo [49]. En el caso de obtener resultados positivos, utilizando cultivos primarios comprobaremos los resultados que se hayan obtenido con los homogenatos. Se realizarán tratamientos con inhibidores de IL-1 β y de las distintas vías de señalización para determinar un efecto causal [49]

entre la secreción de IL-1 β y la producción de ROS, y definir los mecanismos de regulación involucrados.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

Los métodos necesarios para la realización de los objetivos del trabajo están siendo aplicados actualmente en el lugar de trabajo propuesto o en el LBCM del BIOMED-UCA-CONICET (con el cual se trabaja en colaboración), por lo que no se esperan dificultades técnicas mayores.

Animales: Se utilizarán un total de 24 tractos reproductivos de cerdas Landrace/Yorkshire, primera gestación (informada según historia clínica). Clínicamente sanas, con 150 kilogramos de peso vivo y una edad promedio de 14 a 18 meses de vida, provenientes del centro de producción de genética porcina, del Instituto de Medicina Reproductiva Veterinaria (IMERVET), de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Pampa, General Pico, La Pampa. Los animales se sacrificarán en el frigorífico de la ciudad de Intendente Alvear "Frigorífico Rojas". Las muestras se tomarán en distintos momentos de la gestación: implantación (16-20 días de gestación n=4), placentación temprana (30-35 días de gestación; n=4), placentación media (60-65 días de gestación; n=4), placentación tardía (70-80 días de gestación; n=4) y a término (114 días de gestación, día del parto; n=4). Además, se procesarán 4 muestras de sangre y de endometrio provenientes de cerdas no gestantes (NG) para utilizarlas como control. Se estimará la edad gestacional de las placentas de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los fetos obtenidos de cada cerda gestante. Las etapas de gestación fueron seleccionadas de ese modo, ya que en ellas se ocurren procesos moleculares y fisiológicos indispensables para una gestación exitosa. A los 16-20 días de gestación finaliza la etapa de implantación en la gestación porcina. A los 30 días de gestación comienza la osificación y el desarrollo del sistema inmunológico. Alrededor de los 60 días de gestación se alcanza el mayor crecimiento placentario y se establece, entre los 70 y 80 días de gestación un estado de meseta en su desarrollo para comenzar, a partir de esta etapa, los fetos a crecer de manera exponencial; también se observa la mayor remodelación placentaria celular determinada por estudios de apoptosis. Los 114 días de gestación (período a término) marcan el fin de los eventos celulares y moleculares que permitan la gestación y el individuo se prepara para el parto. Los procedimientos experimentales se encuentran detallados en el anexo II (CAICUAE).

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 estreptomicina y 2,5 μ g/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. Seguidamente, se realizará la incisión en el borde anti-mesometrial de los cuernos uterinos, en el sitio de implantación, de cada unidad feto-materna, comenzando del ovario izquierdo y hacia la derecha. Luego, se separarán con cuidado las placentas maternas de las fetales y se tomará una muestra de cada placenta para la realización de homogenatos placentarios. De cada embrión/feto se registrarán las medidas de peso y longitud.

Extracción de sangre y obtención de suero: A cada cerda se le extraerá sangre por el método de venopunción de la vena yugular. 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 10 minutos, para clarificar el suero, y se conservará a -20 °C hasta su uso.

Obtención de homogenatos de tejido placentario: Se desmenuzará 5 g de tejido placentario porcino mediante tijeras y un mortero de manera tal que se obtenga una pulpa. 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 a 1700 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes se conservarán a -20 °C.

Determinación de interleuquinas IL-6, IFN- γ y TNF- α en sueros y homogenatos: Se aplicará la técnica de ELISA de captura mediante kits comerciales específicos de la especie porcina del laboratorio R&D Systems (Minneapolis, USA). La concentración de interleuquinas presentes en cada una de las muestras se determinará utilizando una curva estándar midiendo la intensidad de color a 450 nm en un lector de microplaca de ELISA.

Cultivos primarios de placenta: Se utilizará el método descrito por Bridger y col. [60], adaptándolo para el cultivo primario de placenta porcina. Brevemente, el tejido placentario de los períodos seleccionados se lavará con PBS tres veces y disgregará en trozos pequeños. El tejido se digerirá durante la noche a 37 °C con colagenasa I al 0,2%. Después de un pipeteo suave, el tejido disociado se filtrará a través de una malla para eliminar tejido no disgregado. Se centrifugará 1000 rpm durante 10 min, el sedimento celular se suspenderá en medio de cultivo DMEM (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) con 10 % de SFB (Internegocios, Argentina) en incubadora de células a 37 °C con 5% de CO₂. El medio se renovará cada dos días hasta obtener los cultivos adecuados para trabajar.

Aislamiento de ARN: El ARN será aislado utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Se cuantificará la concentración mediante absorbancia a 260 nm y su pureza determinada por la relación 260/280 (ARN/proteínas) y 260/230 (ARN/sales). La integridad de este será corroborada mediante gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR): Se realizará la reacción de retrotranscripción usando la enzima transcriptasa reversa M-MMLV (Promega, Madison WI) según las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se realizará cuantificando la expresión de genes mediante el método del $\Delta\Delta C_t$. Se usará el equipo de PCR en tiempo real (CFX96 Real-Time PCR System, BIO-RAD). Se sintetizarán "primers" específicos contra los genes en estudio. Para la qPCR se utilizará SYBR® Green master mix (Bio-Rad, CA, USA).

Extracción de proteínas totales: La extracción de proteínas se realizará con buffer RIPA con inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas será determinada por la técnica BCA (Bicinchoninic acid assay) mediante un kit comercial (Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit, USA).

Western blots: Se realizará mediante SDS-PAGE y transferencia a membrana de nitrocelulosa o PVDF. Se usarán los anticuerpos primarios necesarios y anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina o "peroxidasa" para revelar según sea necesario. En el caso de usar fosfatasa alcalina, el revelado se realizará con los sustratos NBT-BCIP. Para el caso de usar peroxidasa, el revelado se realizará con los reactivos adecuados usando un documentador de geles (GE 4100).

Actividad específica de catalasa: La actividad específica de catalasa se determinará en espectrofotómetro monitoreando el decrecimiento constante de la absorbancia a 240 nm del peróxido de hidrógeno en fosfato (50 mM, pH 7.0), conteniendo 25 mM de H₂O₂.

Actividad específica de GST: La determinación se realiza utilizando CDNB (0,5 mM) disuelto en acetonitrilo 1% (v/v) y GSH (2,5 mM) como sustrato. El cambio de absorbancia se registra en espectrofotómetro a 340 nm.

Contenido de GSH endógeno: Se utilizará sulfhidrilo ditiobisnitrobenzoato (DTNB) como reactivo. El producto TNB, por ruptura del puente S-S, se detecta por espectrofotometría con un máximo de absorbancia a 412 nm. El contenido de GSH será medido como tioles ácidos solubles. Para la curva de GSH estándar, se utilizará GSH oxidado 0,1 mM.

Determinación especies reactivas de oxígeno: Para medir el nivel de ROS intracelular se utilizará la sonda diacetato de 2',7'diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Esta sonda, al ingresar a la célula pierde los grupos acetato (DA) por la acción de esterasas intracelulares, generando DCFH; al ser oxidado por las ROS, el DCFH forma el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Las muestras se incubarán con DCFH-DA 10 µM a 37 °C por 60 min y se determinará la intensidad de fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 510 ± 10 nm y una de emisión de 540 ± 10 nm mediante un espectrofluorímetro para placas (NOVOSTAR BMG LABTECH GmbH Ortenberg, Germany), citometría de flujo (Accuri, Becton Dickinson) y/o microscopía confocal de fluorescencia (LSM510, Carl Zeiss).

Análisis estadísticos: Los análisis estadísticos se realizarán por ANOVA y Tukey HSD (p<0,05). En el caso que no se cumpla el supuesto de homogeneidad de varianza y normalidad, se utilizará un test de varianza no paramétrica, Kruskal-Wallis., mediante el programa INFOSTAT.

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

Se espera que los conocimientos que aporte este plan de trabajo contribuyan a comprender los mecanismos fisiológicos que participan en la placentación de la cerda gestante y que en un futuro permitan originar estrategias para incrementar la tasa de sobrevivencia embrionaria en esta especie de alto valor productivo.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

El cronograma es tentativo, ya que los resultados no pueden garantizarse. Debido a las características del proyecto, algunas partes de los objetivos se abordarán en forma simultánea. El cronograma que se indica en la tabla siguiente es en forma muy resumida. Cada objetivo se iniciará desde el comienzo del proyecto y hasta el final de los cinco años, porque no depende uno del otro. El cronograma es tentativo, es posible que se requieran modificaciones durante la ejecución dependiendo de los resultados que se vayan obteniendo; de ser así, será comunicado durante los informes de avance.

Descripción	1er Año	2do Año	3er Año	4to Año	5to Año
Objetivo 1: Estudio del rol de IL-1β sobre la expresión de citoquinas inflamatorias involucradas en el desarrollo placentario: IL-6, IFN-γ y TNF-α.					
- Obtención de sueros y preparación de homogenatos a partir de tractos reproductivos	[Barra azul que cubre todo el ancho de la fila]				
- Se utilizarán ensayos de ELISA para medir los niveles de IL-6 y TNF- α secretados en cada muestra de homogenato.	[Barra azul]				
- Puesta a punto de cultivos primarios de placenta.		[Barra azul]			
- Estudio de las distintas vías de señalización para determinar una relación entre las distintas citoquinas en cultivos primarios de placenta			[Barra azul]		
-Determinación de los niveles de expresión de IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α mediante ensayos de Western Blot.			[Barra azul]		
-Análisis de los niveles de expresión de IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α por Real Time PCR.			[Barra azul]		
- Revisión bibliográfica	[Barra azul que cubre todo el ancho de la fila]				
- Informe de resultados en Jornadas/Congresos	[Barra azul]	[Barra azul]	[Barra azul]		
Objetivo 2: Estudio del estrés oxidativo y del sistema de respuesta antioxidante durante el proceso inflamatorio de placentación porcina.					
- Estudio de catalasa y GST como mediadores de respuesta antioxidante, y niveles endógenos de GSH como mediador de la respuesta no enzimática (métodos espectrofotométricos y WB).				[Barra azul]	
- Análisis de la producción de ROS mediante fluorescencia, microscopía confocal de fluorescencia y/o citometría de flujo.				[Barra azul]	
- Estudio de las distintas vías de señalización para determinar una relación entre las distintas citoquinas y la producción de ROS en cultivos primarios de placenta.					[Barra azul]
- Revisión bibliográfica	[Barra azul que cubre todo el ancho de la fila]				
- Informe de resultados en Jornadas/Congresos				[Barra azul]	
- Informe final de resultados/ Publicación de resultados en revista científica internacional.					[Barra azul]

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

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

Los laboratorios y centros mencionados de la Facultad cuentan con la infraestructura y la mayoría del equipamiento necesario para la realización de este plan de trabajo.

Las cerdas reproductoras estarán alojadas en el Centro de Genética Porcina ubicado en el campo escuela UDEP que cuenta con todo lo necesario para los procedimientos planteados.

El Laboratorio de Biología cuenta con equipos y salas necesarias para la toma y procesamiento de muestras: mesadas, baño térmico, centrifuga, heladera, freezers. 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 térmico). El área de Microscopía Óptica cuenta con un microscopio Carl Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) equipado con una cámara digital Canon PowerShot G20 (Tokio, Japón) y software Axiovision (AxioVision 4.8, Carl Zeiss).

El CIDEF cuenta con numerosos equipos y diversas salas necesarias para varias de las determinaciones planteadas: horno para PCR (A300 Fast Thermal CyclerLongGene), equipo de "Real-Time-PCR" (CFX96 Real-Time PCR System, BIO-RAD), espectrofotómetro de microvolúmenes DS-11 DeNovix, espectrofotómetro (SP2000UV SPECTRUM), sistema de electroforesis (agarosa o poliacrilamida, Mini-PROTEAN Tetra MP4 BIO-RAD), lector de microplacas para ELISA (RT6000, RAYTO), lavador microplacas (RT2600, RAYTO), autoclave, equipo de agua ultra pura, estufas de cultivo, gabinetes de seguridad biológica, centrifugas, pHmetro, balanza granataria, balanza analítica, heladeras, freezers -20°C y -80°C y otros equipos menores.

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

Parte del trabajo se realizará en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Unidad Ejecutora del CONICET, al cual pertenece el Dr. Ángel Gabriel Valdivieso (Director adjunto de Doctorado y co-autor de la mayoría de los trabajos publicados por la directora de este proyecto). El BIOMED cuenta con numerosos equipos de uso general en biología celular y molecular y diversas salas para investigación como cuartos de cultivo de células animales, cultivos primarios y bacterias, cuarto de citometría de flujo, cuartos de microscopía convencional y confocal, cuarto frío, cuarto oscuro y cuartos para equipos comunes, entre otros que permitirían realizar cualquiera de los objetivos planteados en caso de no contar con el equipamiento necesario dentro de la Facultad de Veterinarias. Resumidamente, los principales equipos no disponibles y necesarios para el desarrollo de las tareas planteadas son: microscopio de fluorescencia confocal (LSM510, Carl Zeiss), citómetro de flujo (Accuri, Becton Dickinson), documentador de geles (químico y fluorescencia) para Western blots (GE), espectrofluorímetro de placas (NOVOstar, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany) y otros equipos menores.

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

Mención en 7.2.

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN

PRESTAMO BID PICT 2019-3704, Investigadora Responsable: Mariángeles Clazure.

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

Equipamiento e Infraestructura

Bienes de Consumo	\$ 145000
Viajes.....	\$ 15000
Total	\$ 160000
Presupuesto Estimado Anual:	
1° año: \$ 10.000	
2° año: \$ 20.000	
3° año: \$ 40.000	
4° año: \$ 40.000	
5° año: \$ 50.000	
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

1. García, S., El Mercado de carne de cerdo en Argentina y en el mundo. Fericerdo, Ed INTA E.E.A. Marcos Juárez. Asociación Argentina de Productores de Porcinos 2007: p. 1-6.
2. Senasa, S.I.d.G.d.S.A.S., 2018.
3. Ministerio de Agroindustria, P.d.I.N.A., Evolución mensual y anual de los principales indicadores porcinos. Junio 2022.
4. Brunori, J., Producción de cerdos en la Argentina. Situación, oportunidades y desafíos. INTA Marcos Juarez., 5 de Noviembre de 2014.
5. Pope, W., Embryonic mortality in swine. Embryonic mortality in domestic species. Ed. Zavy MT and Geisert RD. Boca Ratón, Fl, Estados Unidos., 1994: p. 53-77.
6. Bazer, F.W. and G.A. Johnson, Pig blastocyst-uterine interactions. Differentiation, 2014. 87(1-2): p. 52-65.
7. Bosch RA, A.G., Allende RA, Blanch MS, Bosch P, Callejas S. Mortalidad embrionaria basal en las especies domésticas de interés productivo. En: Actualización en temas en reproducción animal. 1ra Edición. Compilador, Bosch RA. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto. 2001; p. 150-52.
8. Vonnahme, K.A., et al., Impacts on conceptus survival in a commercial swine herd. J Anim Sci, 2002. 80(3): p. 553-9.
9. Wilson, M.E., et al., Differential gene expression during elongation in the preimplantation pig embryo. Genesis, 2000. 26(1): p. 9-14.
10. Murphy, S.P., et al., Interferon gamma in successful pregnancies. Biol Reprod, 2009. 80(5): p. 848-59.
11. Cristofolini, A., et al., Cellular remodelling by apoptosis during porcine placentation. Reprod Domest Anim, 2013. 48(4): p. 584-90.
12. 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.
13. 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.
14. Spencer, T.E. and F.W. Bazer, Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. Reprod Biol Endocrinol, 2004. 2: p. 49.
15. J., P., Inmunología de la implantación. . Ginecol Obstet, 1999. 45(1): p. 14-22.
16. Mathew, D.J., M.C. Lucy, and D.G. R, Interleukins, interferons, and establishment of pregnancy in pigs. Reproduction, 2016. 151(6): p. R111-22.
17. Dinarello, C.A., Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood, 2011. 117(14): p. 3720-32.
18. Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani, The interleukin-1 family: back to the future. Immunity, 2013. 39(6): p. 1003-18.

19. Geisert, R., et al., Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1beta. *Cell Tissue Res*, 2012. 349(3): p. 825-38.
20. Pizarro, T.T. and F. Cominelli, Cloning IL-1 and the birth of a new era in cytokine biology. *J Immunol*, 2007. 178(9): p. 5411-2.
21. Dinarello, C.A., Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: p. 519-50.
22. Lamkanfi, M., Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(3): p. 213-20.
23. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 2002. 10(2): p. 417-26.
24. Casadio, R., et al., Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. *FEBS Lett*, 2001. 499(1-2): p. 65-8.
25. Walsh, M.C., et al., TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. *PLoS One*, 2008. 3(12): p. e4064.
26. Takaesu, G., et al., Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(7): p. 2475-84.
27. Kridli, R.T., et al., Placentation, maternal-fetal interface, and conceptus loss in swine. *Theriogenology*, 2016. 85(1): p. 135-44.
28. 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.
29. Tuo, W., J.P. Harney, and F.W. Bazer, Developmentally regulated expression of interleukin-1 beta by peri-implantation conceptuses in swine. *J Reprod Immunol*, 1996. 31(3): p. 185-98.
30. Ross, J.W., et al., Analysis and characterization of differential gene expression during rapid trophoblastic elongation in the pig using suppression subtractive hybridization. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. 1: p. 23.
31. Ross, J.W., et al., Characterization of the interleukin-1beta system during porcine trophoblastic elongation and early placental attachment. *Biol Reprod*, 2003. 69(4): p. 1251-9.
32. Mathew, D.J., et al., Activation of the transcription factor nuclear factor-kappa B in uterine luminal epithelial cells by interleukin 1 Beta 2: a novel interleukin 1 expressed by the elongating pig conceptus. *Biol Reprod*, 2015. 92(4): p. 107.
33. Cristofolini, A.L., Estudio de la remodelación celular durante la placentación porcina. 2010.
34. Velez, C., et al., IL-1beta, IL-2 and IL-4 concentration during porcine gestation. *Theriogenology*, 2019. 128: p. 133-139.
35. Clazure, M., et al., Intracellular Chloride Concentration Changes Modulate IL-1beta Expression and Secretion in Human Bronchial Epithelial Cultured Cells. *J Cell Biochem*, 2016.
36. Gutierrez G, J.G., Dubinsky V, Pasqualini R S, Gentile M T. , El rol de la interleuquina 6 en el éxito gestacional. . *SAEGRE*, 2008. 15: p. 43-7.
37. Koncurat MA, Y.G., Riesco OF, Williamson DM. , Determinación de IL-6, progesterona y estrógenos en la preñez porcina temprana. . *Memorias XXVII Jornadas científicas Asociación de biología de Tucumán.*, 2010: p. 145.
38. 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.
39. Garro, A., Estudio de la respuesta inmune humoral en la gestación porcina. *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata*, 2015.
40. Yaful G, R.O., Koncurat M., Concentración de progesterona en placenta materna, fetal y líquido amniótico durante la gestación porcina. *ALPA*, 2005. 13: p. 136-7.
41. Girasole, G., et al., 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest*, 1992. 89(3): p. 883-91.
42. Tayade, C., et al., Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. *J Immunol*, 2006. 176(1): p. 148-56.

43. Lefevre, F., et al., Intrauterine infusion of high doses of pig trophoblast interferons has no antiluteolytic effect in cyclic gilts. *Biol Reprod*, 1998. 58(4): p. 1026-31.
44. Koncurat MA, M.R., Greco C y Vivas A., IFN-g concentration in serum and porcine placental extracts from different gestation ages. *Biocell*, 2001. 25(3):23.
45. Jana, B., M. Koszykowska, and A. Andronowska, 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): p. 315-22.
46. Jana, B., et al., The effect of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin (IL)-1 beta and IL-6 on chorioamnion secretion of prostaglandins (PG)F 2 alpha and E2 in pigs. *Reprod Biol*, 2008. 8(1): p. 57-68.
47. Franczak, A., et al., The effect of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha on estradiol-17beta release in the myometrium: the in vitro study on the pig model. *Theriogenology*, 2014. 81(2): p. 266-74.
48. Suzuki, C., et al., 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.
49. Clazure, M., et al., Disruption of interleukin-1beta autocrine signaling rescues complex I activity and improves ROS levels in immortalized epithelial cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function. *PLoS One*, 2014. 9(6): p. e99257.
50. Harijith, A., D.L. Ebenezer, and V. Natarajan, Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol*, 2014. 5: p. 352.
51. Casanueva, E. and F.E. Viteri, Iron and oxidative stress in pregnancy. *J Nutr*, 2003. 133(5 Suppl 2): p. 1700S-1708S.
52. Myatt, L. and X. Cui, Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*, 2004. 122(4): p. 369-82.
53. Chen, X. and T.O. Scholl, Oxidative stress: changes in pregnancy and with gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*, 2005. 5(4): p. 282-8.
54. Serdar, Z., et al., Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*, 2003. 268(1): p. 19-25.
55. Prater, M.R., et al., Placental oxidative stress alters expression of murine osteogenic genes and impairs fetal skeletal formation. *Placenta*, 2008. 29(9): p. 802-8.
56. Gupta, S., A. Agarwal, and R.K. Sharma, The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*, 2005. 60(12): p. 807-16.
57. Sugino, N., The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. *Placenta*, 2007. 28 Suppl A: p. S133-6.
58. Berchieri-Ronchi, C.B., et al., Oxidative stress status of highly prolific sows during gestation and lactation. *Animal*, 2011. 5(11): p. 1774-9.
59. Shen, Y., et al., Fish Oil and Olive Oil Supplementation in Late Pregnancy and Lactation Differentially Affect Oxidative Stress and Inflammation in Sows and Piglets. *Lipids*, 2015. 50(7): p. 647-58.
60. Bridger, P.S., et al., Validation of primary epitheloid cell cultures isolated from bovine placental caruncles and cotyledons. *Theriogenology*, 2007. 68(4): p. 592-603.