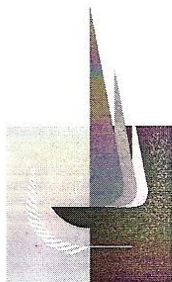


## ANEXO I



Número de Proyecto: .....

Año: .....

(No llenar)

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

## Facultad de Ciencias Veterinarias

**1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO**

**1.1. TÍTULO del PROYECTO:** "Estudio de la expresión de las integrinas durante la placentación porcina".....

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

**BÁSICA:** Consiste en trabajos experimentales o teóricos que se emprenden principalmente para obtener nuevos conocimientos acerca de los fundamentos de fenómenos y hechos observables, sin prever en darles ninguna aplicación o utilización determinada o específica.

**APLICADA:** Consiste también en trabajos originales realizados para adquirir nuevos conocimientos, pero fundamentalmente dirigidos hacia un objetivo práctico específico.

**DESARROLLO EXPERIMENTAL:** Consiste en trabajos sistemáticos basados en los conocimientos existentes, derivados de la investigación y/o la experiencia práctica, dirigidos a la producción de nuevos materiales, productos y dispositivos; al establecimiento de nuevos procesos, sistemas y servicios, o a la mejora substancial de los ya existentes, es decir, producir una tecnología.

**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, 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.	Responsabilidad (I)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Koncurat, Mirta Adriana	Dra Cs Biol.	I	D	Biología General	Prof Titular simple	10
Riesco, Oscar	Bioq, Esp Endocrinología		I	Biología General	Ayud. 1° simple	5
Garro, Adriana del Carmen	Med Vet, Ms Educ	III	I	Biología General	Adjunto Simple	5

Williamson, Delia María	Med Vet	V	I	Biología General	Ayud. simple	1°	10
Bruni, María de los Angeles	Lic Biol	V	I	Biología General	JTP semiexc		10
Alonso, Gabriela	Lic Biol		I	Biología General	Ayud. simple	1°	5
Gomez, María Bettina	Med Vet		I	Biología General	Ayud. simple	1°	5
Yaful, Graciela Noemí	Med Vet, Ms Educ	III	I	Obstetricia y Fisiopatología de la Reproducción	JTP semiexc		10
Hernandez, Mabel	Lic Biol		I	Histología I	JTP semiexc		10
Bartolomé, Julián	PhD		I	Obstetricia y Fisiopatología de la Reproducción	Prof Adjunto		15

(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 Dedicac. Hs./Sem.
Williamson, Delia María	CONICET	Beca Interna de Posgrado tipo I	Koncurat, Mirta	40

**2.3.2. TESISISTAS:**

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
Garro, Adriana del Carmen	Doctor en Ciencias Veterinarias	Estudio de la respuesta inmune humoral en la gestación porcina.	UNLP	Dra Mirta Koncurat	25
Yaful, Graciela Noemí	Doctor en Ciencias Veterinarias	Estudio de la placenta porcina. Concentración de hormonas esteroideas y parámetros de eficiencia reproductiva.	UNLP	Dra Mirta Koncurat	25
Williamson, Delia María	Doctor en Ciencias Veterinarias	Estudio del rol de las integrinas durante la placentación porcina.	UNLP	Dra Mirta Koncurat	40

**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: 3 años****3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 /2008 FINALIZACIÓN: 31 / 12/2010****4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)**

Las integrinas son una familia de proteínas, receptores transmembrana, que desencadenan diversos tipos de reacciones regulando la adhesión, migración e invasión celular. Cumplirían funciones esenciales mediando la adhesión entre el trofoblasto y el epitelio luminal uterino materno para permitir la remodelación fetal y placentaria durante la preñez. La placenta porcina es epiteliocorial, difusa, plegada y no invasiva y por su ubicación de barrera entre la madre y los embriones es el blanco natural del sistema inmunoendócrino y de la expresión de las moléculas de adhesión. El objetivo de este trabajo es profundizar el estudio de la respuesta inmunoendócrina durante la gestación porcina investigando la expresión de determinadas integrinas, las regulaciones hormonales, particularmente las ejercidas por las hormonas esteroideas, y las regulaciones inmunes a través de diversas citoquinas. En homogenatos de placenta fetal, materna y sueros porcinos provenientes de: 20, 30, 50, 70, 90 días de gestación y a término se determinará por Elisa la concentración de IFN-gama, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 y se dosará la concentración de progesterona, estrógeno y testosterona por quimioluminiscencia. En cortes histológicos placentarios se determinará la expresión de integrinas: alfa1, alfa3, alfav, beta1, beta3, alfavbeta3 y alfa2beta1 por inmunohistoquímica.

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

En los mamíferos la gestación es un fenómeno fisiológico que depende de precisas interacciones, que son originadas y reguladas por y entre el conceptus y su madre, siendo la placenta el órgano materno embrionario indispensable para una gestación exitosa. De este órgano depende, no solo la aceptación del conceptus, la sobrevivencia de los embriones y el éxito de la preñez, sino que también marca las posibilidades de sobrevivencia postnatal de los lechones.

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; van der Lende et al., 2001), variando este porcentaje hasta en un 50 – 52 %



según otros autores argentinos (Bosch et al., 2001). Por lo tanto, comprender los mecanismos que posibilitan la preñez permitirá originar estrategias que incrementen la tasa de sobrevivencia embrionaria, en esta especie de alto valor productivo.

La placenta porcina es epiteliocorial, difusa, plegada y no invasiva y por su ubicación de barrera entre la madre y los embriones es el blanco natural del sistema inmunoendocrino y de la expresión de las moléculas de adhesión, en especial las integrinas y sus ligandos, que cumplen funciones esenciales mediando la adhesión entre el trofoblasto fetal y el epitelio luminal uterino materno para permitir la formación de dicha placenta epiteliocorial (Lessey and Arnold, 1998; Foxcroft et al., 2000; Dantzer and Winther, 2001; Blois et al., 2005; Dosiou and Giudice, 2005). Además, en este fenómeno inmunoendocrino intervienen también otros factores séricos solubles y sustancias de naturaleza proteica, como son las Glicoproteínas asociadas a la preñez (Gap) (Szafranska et al., 1995) y el Factor Precoz de Preñez (EPF) (Koncurat y col., 1999; Merkis et al., 2001).

Desde el punto de vista hormonal, la gestación porcina se caracteriza por presentar una secreción continua de progesterona por parte del cuerpo lúteo, hormona que requieren todos los mamíferos para el mantenimiento y desarrollo de la preñez (Spencer and Bazer, 2002). La placenta elabora diversas hormonas proteicas y esteroides. Entre estas últimas se encuentran los estrógenos con su clásico modelo de secreción bifásico (Choi et al., 1997). Bazer y Thatcher (1977) 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, ya que cambian la vía de secreción de la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) hacia el lumen uterino evitando la vía vascular sanguínea sistémica para prevenir la luteolisis. También los estrógenos participarían en los fenómenos de placentación y de desencadenamiento del parto (Vivas et al., 2001a; Vivas et al., 2001b).

En nuestro laboratorio hemos podido demostrar que es el constituyente placentario fetal el que posee alta concentración de progesterona, lo que permite suponer que sería necesario una influencia ovárica y placentaria fetal sobre el cuerpo lúteo para el mantenimiento de la preñez porcina (Yaful et al., 2005).

Como acontece en la gestación de los mamíferos, en la preñez porcina el rol del sistema inmunitario continúa siendo un enigma inmunológico (Clark et al., 1999; Hedge et al., 2001). Hasta el momento, los factores que pueden causar la muerte del aloinjerto fetal, como es la presencia de las células T citotóxicas, NK o macrófagos en la interfase feto-materna, o la producción de anticuerpos contra aloantígenos del trofoblasto, no ha sido explicada (Clark, 1991; Mattsson et al., 1992; Meeusen et al., 1993; Engelhardt and King, 1996; Engelhardt et al., 1997; King et al., 1997). Numerosos trabajos están centrados en el rol que desempeñan las citoquinas durante la gestación y en especial en la interfase feto-materna, teniendo en cuenta el tipo celular que las produce y la cadena de regulaciones que sufren (Clark, 1991; Hunt, 1992; Stewart et al., 1992; Zion and Orvieto, 1992; Robertson et al., 1994; Robertson, 2000; Modric et al., 2000). Particularmente, se destaca el accionar de algunas citoquinas en tanto que moléculas con actividad inmunosupresora, tales como el TGF-β<sub>2</sub>, la IL-4, la IL-10 y la IL-13, que actuarían impidiendo la secreción de otras citoquinas que pueden activar las células NK, los macrófagos y/o las células T tipo Th1, citotóxicas, consideradas peligrosas para una gestación exitosa (Clark et al., 1999; Koncurat et al., 2001a y 2001b). Además, especialmente en el cerdo dada la presencia de células uterinas NK, entre las citoquinas que regularían la presencia de las células inmunitarias en el endometrio materno se encuentran el IFN-γ, la IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, siendo el IFN-γ secretado por el trofoblasto porcino conjuntamente con un nuevo tipo de interferón, el IFN-δ, tipo I (Lefèvre et al., 1998a; Lefèvre et al., 1998b; Croy et al., 2003; Zhang et al., 2003; Martinez et al., 2004). Está ampliamente aceptado que se produce una respuesta de tipo inflamatoria en el endometrio de la cerda después de la fertilización, que incluye cambios estructurales marcados en ese tejido y en la distribución tisular de las células inmunitarias uterinas, principalmente de los linfocitos (Bischof et al. 1995; Kelemen et al., 1996; Engelhardt et al., 2002a; Engelhardt et al., 2002b). También intervienen en la interfase fetomaterna las moléculas codificadas por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (Chardon et al., 1999), los



macrófagos, proteínas propias de la gestación, moléculas de adhesión y una intrincada red de citoquinas que modulan la respuesta inmunoendócrina controlando la implantación y permitiendo el desarrollo de la preñez porcina.

Si bien el conceptus porcino no invade ni erosiona la superficie epitelial uterina dentro de los confines del lumen uterino, él tiene gran actividad proteolítica e invasiva fuera del lumen uterino (Samuel, 1971; Samuel and Perry, 1972). Engelhardt and King (1996) postulan que se debería a propiedades intrínsecas del epitelio uterino, más que a las células coriónicas, lo que limita la invasión trofoblástica.

La comunicación celular mediada por las moléculas de adhesión involucra a las integrinas, familia de proteínas que conectan la matriz extracelular (MEC) con el citoesqueleto de la célula por lo que cumplen funciones en la adhesión, migración, invasión y control de la fisiología de la célula animal (Burrows et al., 1994; Haralson and Hassell, 1995; Foxcroft et al., 2000).

Las integrinas comprenden a una gran familia de proteínas heterodiméricas resultantes de una unión no covalente entre una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . Son receptores transmembrana, catión-dependientes. Han sido identificadas 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ , de lo cual resultan 23 heterodímeros conocidos. El ligando específico para cada heterodímero está determinado por la combinación específica de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Las integrinas se unen a la mayoría de los constituyentes de la MEC: varios tipos de colágeno, fibronectina, laminina, trombospondina, vitronectina, tenascina, Factor de von Willebrand y fibrinógeno. Son co-receptores de los receptores de superficie celular pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (que incluye ICAM-1, ICAM-2 y VCAM) así como de las caderinas (Kreis y Vale, 1993; Bowen and Hunt, 2000). En particular, dado el tipo de reacciones que desencadenan, ellas regularían la adhesión, migración e invasión celular.

Se ha estudiado la expresión de las integrinas en la interfase feto-materna de diversas especies. En la mujer, tres integrinas son consideradas marcadores de la receptividad uterina para la implantación del embrión, lo cual ocurre cuando el útero se encuentra bajo la influencia de la progesterona (Carson et al. 2000). En bovinos se sugiere que la fusión de las células binucleadas con el epitelio materno es el fenómeno que inicia cambios en la expresión de las integrinas y de las moléculas de la MEC en el estroma subepitelial uterino (MacIntyre et al. 2002). En ovejas, las integrinas serían los transductores de las señales celulares en la interfase feto-materna (Burghardt et al. 2002) y en monos Rhesus se sugiere que existe una correlación entre la expresión de las integrinas y sus ligandos de la MEC que regularían la invasión de las células trofoblásticas al comienzo de la gestación (Li Qin et al. 2003).

En cerdos, Bowen et al. (1996), seleccionaron la expresión de Muc-1 y de diversas integrinas durante el ciclo estral y la preñez temprana para identificar las moléculas expresadas en el útero receptivo a la adhesión del blastocisto. Constituyó el primer trabajo que demostró la influencia de los esteroides sobre la expresión de integrinas. Postularon que tres integrinas, miembros de la familia de receptores a fibronectina y el receptor a vitronectina serían las moléculas que posibilitan la adhesión del trofoblasto y la transmisión de señales entre las superficies epiteliales en contacto. Bowen and Hunt, 2000, realizaron una revisión de las integrinas involucradas en la gestación de diversas especies de interés productivo, entre ellas el cerdo, ratón y mujer. Foxcroft et al., 2000, incluyen a las integrinas entre las moléculas necesarias para la implantación y desarrollo de la preñez porcina, así como Jaeger et al., 2001.

Poco se conoce acerca de la expresión de estas moléculas durante el desarrollo de la gestación porcina en la interfase feto-placentaria, y, en particular, su interrelación o regulación por parte de las hormonas gestacionales y de las citoquinas.

Debido a todos estos interrogantes es que nos pareció apropiado profundizar el estudio de la respuesta inmunoendócrina durante la gestación porcina focalizando la investigación en el papel que cumplirían las siguientes integrinas: alfa1, alfa3, alfav, beta1, beta3, alfavbeta3 y alfa2beta1. Se tendrá en cuenta las posibles regulaciones hormonales, particularmente las ejercidas por las hormonas esteroideas, e inmunitarias a través de las citoquinas: IFN-gama, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-

18. Los ensayos se realizarán sobre cortes histológicos de tejidos placentarios, homogenatos de placenta fetal, materna y sueros porcinos provenientes de cerdas de 20, 30, 50, 70, 90 días de gestación y a término.

**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)**

- Humoral immune response during the porcine gestation. Yaful G, Riesco O, Garro A, Williamson D, Bruni M, Alonso G, Lacolla D and Koncurat M. Proceedings Contributed Papers IX World Conference on Animal production, Brasil, CD: 1-4, 2003.
- Patente de Invención P020103724 en el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI) con fecha 2 de octubre de 2002, bajo el Título: Metodología que permite determinar la actividad de la inmunidad humoral del cerdo. Solicitante: Universidad Nacional de La Pampa. A nombre de: Koncurat, MA.; Riesco, O; Garro, A.; Yaful, G. y Lacolla, D. Aceptada marzo de 2003.
- Detección de inmunoglobulina g en sueros, tejidos y extractos placentarios porcinos. Koncurat M, Riesco O, Garro A, Yaful G, Williamson D, Bruni M, Alonso G. Rev Cs Veterinarias, 5(1): 1-9, 2003.
- Hormonas esteroideas e interferón-gamma durante la preñez porcina. Martinez R, Greco C, Koncurat M, Escribano C, Vivas A. Revista Electrónica de Veterinaria, 10(V), (ISSN: 1695-7504) 2004.
- Incidence of Humoral Immune Response During The Porcine Gestation. Williamson, D; Yaful, G; Riesco, O; Garro, A; Alonso, G; Bruni, M; Lacolla, D y Koncurat, M. Biocell, 28(2), ISSN 0327-9545. 2004.
- Presencia de anticuerpos IgG asimétricos en sueros porcinos. Estudio preliminar. Gentile T; Margni R; Williamson D; Garro A; Alonso G; Bruni M; Riesco O; Yaful y Koncurat M. Jornada de Ciencia y Técnica. UNLPam, Secretaría de Ciencia y Técnica. General Pico, 29 de octubre de 2004.
- Concentración de progesterona en placenta materna, fetal y líquido amniótico durante la gestación porcina. Yaful G, Riesco O, Koncurat M. Archivos Latinoam Produc Anim, 2005.
- Preliminary Study of Expresión of Subunit alfa1 of Integrins During Porcine Placentation. Williamson D y Koncurat M. Biocell. Vol 30 N° 1-2006. ISSN 0327-9545
- Estudio de la Expresión de la Integrina alfa3 y de la Subunidad beta1 Durante la Placentación Porcina. Williamson D Y Koncurat M. V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR. VIII Congreso Nacional de Producción Porcina. XIV Jornadas de Actualización Porcina. 22-24 de mayo, 2006.
- Determinación de IgG asimétricas en sueros de hembras preñadas en diferentes períodos gestacionales. Autores: Garro, a, Gentile, T, De Leon, R, Koncurat, M. Libro de memorias V Congreso de Producción Porcina del Mercosur. VIII Congreso Nacional de Producción Porcina. XIV Jornadas de Actualización Porcina. Córdoba, Argentina. Mayo 2006.p. 266.
- Detección de IgG Porcina en Tejidos Placentarios: Estudio Preliminar. Autores: Garro, A. Gómez, B. Gentile, T. Koncurat M. XX Jornadas Científicas Asociación de Biología de Tucumán. Tafi del Valle. Tucumán. Argentina. Septiembre 2006 p256.
- Detección de la Subunidad alfa3 de las Integrinas Durante la Placentación Porcina. Williamson D y Koncurat M. XXIII Jornadas Científicas. Asociación de Biología de Tucumán. Septiembre de 2006. Tafi del Valle. Tucumán. Argentina.
- Detection of subunit alfa3 of integrins during porcine placentation. Williamson D y Koncurat m. Aceptada para publicar en Biocell. Septiembre de 2006. ISSN 0327-9545
- Expression of  $\beta$ 1 and  $\alpha$ 3 integrin subunits during porcine gestation. Williamson D. and Koncurat M. Aceptada para publicar en Biocell. Noviembre de 2006. ISSN 0327-9545.



- Expression of  $\beta 1$  and  $\alpha 3$  integrin subunits during porcine gestation. Williamson D. and Koncurat M. XXIV Reunión Científica Anual Sociedad de Biología de Cuyo. 1 y 2 de diciembre de 2006. Potrero de los Funes, San Luis.
- Enviado a Publicar: Expresión de la integrina  $\alpha v \beta 3$  y de las subunidades de integrinas  $\alpha 3$  y  $\beta 1$  durante la placentación porcina. Williamson, Delia; Koncurat, Mirta. Revista InVet, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. ISSN: 1514-6634. 29 de diciembre de 2006.
- Expression of  $\beta 1$  and  $\alpha 3$  integrin subunits during porcine gestation. Williamson, Delia; Koncurat, Mirta Revista Biocell, ISSN 0327-9545. Vol 31 N°1- pag 178- año 2007.
- Expresión de la subunidad  $\beta 3$  de las integrinas durante la placentación porcina. Williamson Delia, Alonso Gabriela, Hernandez Mabel, Koncurat Mirta. I Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de La Republica Argentina. XVI Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. IX Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología. XXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Huerta Grande, Córdoba. Volumen 1. Pag 49. 2007.
- Detección del Receptor Fc de IgG en placenta porcina. Garro Adriana, Gomez Bettina, Alonso Gabriela, Hernandez Mabel, Koncurat Mirta. I Reunion Conjunta de Sociedades de Biología de La Republica Argentina. XVI Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. IX Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología. XXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Huerta Grande, Córdoba. Volumen 1. Pag 48. 2007.
- Aceptado para publicar: Expression of subunit  $\beta 3$  of integrins during porcine placentation: preliminary study. Williamson Delia, Alonso Gabriela, Hernandez Mabel, Koncurat Mirta. Revista Biocell ISSN 0327-9545. 2007.
- Aceptado para publicar: Detection of IgG-Fc receptor in porcine placenta. Garro Adriana, Gomez Bettina, Alonso Gabriela, Bruni María, Hernandez Mabel and Koncurat Mirta. Revista Biocell ISSN 0327-9545. 2007.
- IgG and Fc receptor in porcine placenta. Garro Adriana, Gomez Bettina, Alonso Gabriela, Bruni, María, Hernandez Mabel, Koncurat Mirta. III Latin-American Symposium on Maternal-Fetal Interaction Placenta – Research & Clinical. 4-7 de noviembre, 2007 Los Cocos, Argentina. Vol III: 89-90, 2007.
- 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 (Supl. 1): 336-340, 2007.
- 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. 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, Gomez Bettina, Moschetti E y 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.

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

“Estudio de la apoptosis durante la placentación porcina”. Director: Dra Mirta Koncurat. Proyecto de Investigación (PPI), Universidad Nacional de Río Cuarto.  
Proyecto Picto 2005 “Estudio del rol de las integrinas durante la gestación porcina” Director: Dra Mirta Koncurat, Agencia.



“Incidencia de la respuesta inmune humoral en la gestación porcina” Director: Ms. Garro, Adriana. FCV, UNLPam.

“Estudio de la placenta porcina: concentración de hormonas esteroides y parámetros de eficiencia reproductiva”. Directora: Ms Yaful, Graciela. FCV, UNLPam.

## **6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO**

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

#### **PROBLEMA CIENTÍFICO**

Se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en permitir el reconocimiento, aposición y adhesión del trofoblasto fetal con el epitelio uterino materno porcino, procesos que permiten una gestación exitosa.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Investigar el papel de las integrinas durante la placentación porcina teniendo en cuenta las regulaciones hormonales e inmunitarias que se producen en la interfase feto-materna para permitir una preñez exitosa.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la presencia de las siguientes integrinas: alfa1, alfa3, alfav, beta1, beta3, alfavbeta3 y alfa2beta1 en la interfase feto materna de muestras procedentes de placentas porcinas de 20, 30, 50, 70, 90 días de gestación y a término por inmunohistoquímica.
2. Estudiar la estructura de útero vacío y de placentas provenientes de los diferentes períodos seleccionados mediante diversas técnicas histológicas.
3. Dosar la concentración de progesterona, estradiol y testosterona en extractos placentarios: Homogenatos de Placenta Fetal, Materna, Útero vacío y Sueros provenientes de los diferentes períodos gestacionales, por quimioluminiscencia.
4. Determinar la concentración de IFN-gama, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 en los extractos placentarios y sueros por ELISA.

#### **HIPÓTESIS**

La gestación porcina es un fenómeno fisiológico en el cual el sistema inmunoendócrino regula, no solo la aceptación del aloinjerto fetal, sino que modula la placentación a través de moléculas de adhesión, particularmente las integrinas, dado el tipo de placenta epiteliochorial, no invasiva.

#### **RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO**

Se espera comprobar la expresión de diversas integrinas en la placenta porcina y determinar su origen (fetal o materno), para comprender los mecanismos moleculares que permiten y sostienen la adhesión del trofoblasto al epitelio uterino conformando la placenta durante la preñez porcina.

Contar con moléculas claves involucradas en el correcto desarrollo de la preñez permitirá idear tecnologías que se podrán utilizar para seleccionar los reproductores que posean dichos marcadores.

Además, este 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.

Asimismo, este proyecto de investigación aportará a la formación de recursos humanos, permitiendo el desarrollo de tres tesis doctorales.

## 6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

### 1. Animales

Se utilizarán 5 muestras sanguíneas y placentarias provenientes de cerdas mestizas de la zona de General Pico, La Pampa, por cada período gestacional a estudiar: 20, 30, 50, 70, 90 días de gestación y a término. Además, se procesarán 5 muestras de sangre y de endometrio uterino provenientes de cerdas vacías y 5 muestras sanguíneas de machos.

Los tractos reproductivos de las cerdas en distintos períodos de gestación serán provistos por el Frigorífico Trenel SA (Trenel, La Pampa) y Frigorífico General Pico (General Pico, La Pampa). Las muestras de las placentas a término serán aportadas por criaderos de la zona.

En todos los casos, el tracto reproductivo se lavará 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), manteniéndolo a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

#### 1.1. Procesamiento del tracto reproductivo

El tracto reproductivo completo de las cerdas será colocado sobre una mesada y lavado nuevamente con SSH adicionado con 1 % de antibióticos y antimicóticos. Luego de realizar una palpación para detectar la ubicación de los embriones o fetos, los cuernos uterinos serán cuidadosamente abiertos en forma longitudinal, con una incisión por el borde anti-mesometrial, para observar el sitio de implantación y recoger muestras del tejido mesometrial endometrial y placentario fetal. Dado el tipo de placenta, no invasiva, se podrá separar fácilmente el constituyente placentario materno del fetal ejerciendo tracción sobre estos tejidos.

Parte del tejido placentario se preservará para el análisis de la estructura (microscopía óptica), otra para el estudio de la expresión de las integrinas y el resto se destinará a la obtención de extractos placentarios porcinos: Homogenato de Placenta Fetal (HoPF) y Homogenato de Placenta Materna (HoPM).

Luego de tomar las muestras placentarias se realizará la disección completa de los dos cuernos uterinos para recoger los embriones. Además, se recogerá muestras de líquido amniótico y cordón umbilical de los embriones/fetos contenidos en cada cuerno uterino determinando su ubicación en el útero gestante.

#### 1.2. Determinación de la edad gestacional

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

### 2. Obtención de Sueros

Extracción de sangre: A cada cerda se le extraerá sangre por el método de flebotomía. Las venas de elección serán: vena cava craneal y vena medial de la oreja. En el caso de muestras provenientes de frigorífico, se obtendrá la sangre por corte de la vena yugular.

Obtención de Suero: Una vez extraída la sangre se colocará en baño termostático aproximadamente durante 1 hora hasta lograr una 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 se conservará a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3. Análisis de la estructura de la placenta y útero porcino**

**Microscopía Óptica:** Parte de las muestras de tejido placentario fetal y materno se fijarán en líquido de Bouin. Se deshidratarán con baterías de alcoholes de graduación creciente para luego ser incluidas en parafina. Parte de los cortes, de aproximadamente  $4\ \mu\text{m}$ , se teñirán con hematoxilina-eosina, tinción tricrómica de Masson y/o P.A.S. (reacción de Schiff ácido periódico) y se observarán en un microscopio Nikon. Otras porciones de tejido placentario fetal y materno se guardarán a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la realización de cortes histológicos mediante un crióstato para la realización del estudio de integrinas.

### **4. Determinación de Integrinas en muestras de tejido placentario**

Se estudiará por inmunohistoquímica los cortes de tejido placentario provenientes de los diferentes períodos gestacionales procesados con un crióstato o sobre cortes histológicas, a fin de detectar la presencia de las siguientes integrinas mediante anticuerpos monoclonales y policlonales anti integrinas porcinas disponibles en el mercado: alfa1, alfa3, alfav, beta1, beta3, alfavbeta3 y alfa2beta1.

#### **4.1. Cortes por congelación**

Las muestras se depositarán en la gradilla del crióstato, que estará calibrado a por lo menos  $-30^{\circ}\text{C}$  y se realizarán cortes de  $\pm 5\ \mu\text{m}$  de espesor. Los cortes obtenidos se fijarán con acetona durante 10 min y en caso de no realizarse la técnica de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica se guardarán a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **4.2. Inmunohistoquímica**

La técnica de Inmunohistoquímica se realizará sobre cortes histológicos obtenidos por congelación, lavados con 20 mM de Tris-HCl (pH7,6) conteniendo 137 mM de NaCl y 0,1% (v/v) de Tween-20 (TBST Sigma, USA). Antes de realizar la primera incubación con los anticuerpos los portaobjetos conteniendo los cortes de tejido placentario serán tratados con 0,1% (v/v) de agua oxigenada en metanol por 5 min y lavados con TBST.

Serán incubados con un anticuerpo realizado en conejo anti-integrina a  $4^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Luego serán lavados con TBST e incubados con un anticuerpo biotinilado anti-conejo durante 15 min a temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C}$ ), lavados con TBST y tratados con un complejo de peroxidasa – estreptoavidina (Dako), 15 min, a temperatura ambiente.

Luego de realizar de nuevo lavados con TBST se incubarán con el reactivo de amplificación (Dako), nuevamente lavados con TBST y se les adicionará el sustrato, solución cromógena, durante 1 min. Posteriormente los portaobjetos serán lavados con agua destilada, teñidos con verde metilo, deshidratados y montados con Entelan (Merck) para ser observados con un microscopio (Nikon).

### **5. Obtención de Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF), Placenta Materna (HoPM) y de Útero no Preñado Porcino (HoUP)**

Parte del tejido placentario se utilizará para la realización de Homogenatos de Placenta Fetal Porcina (HoPF), Placenta Materna (HoPM) y de útero proveniente de cerdas vacías (HoUP). Se utilizarán para la determinación de hormonas, y citoquinas.

#### **5.1. Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF)**

Los Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF) se obtendrán de la siguiente manera: trozos de  $\pm 5\ \text{g}$  de placenta porcina de origen fetal se homogenizarán hasta obtener una pulpa con la ayuda de un molinillo eléctrico, se agregará tres partes de solución fisiológica por



parte de pulpa de placenta. Luego, para descartar los pequeños restos de tejido, se centrifugará 2 veces a 1800 rpm durante 5 minutos cada vez y el sobrenadante se guardará a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, denominándolo Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF).

### **5.2. Homogenatos de Placenta Materna (HoPM)**

Se obtendrán con el mismo procedimiento que para la obtención de HoPF utilizando solo porciones de placenta materna.

### **5.3. Homogenatos de Útero Porcina (HoUP)**

Los Homogenatos de Útero provenientes de hembras porcinas no preñadas (HoUP) se procesarán de la misma manera que el protocolo descrito para la obtención de Homogenato de Placenta fetal.

## **6. Determinación de Hormonas en Homogenatos de Placenta Fetal (HoPF), Placenta materna (HoPM) y Sueros Porcinos**

La cuantificación de Progesterona (P4),  $17\beta$  Estradiol (E2) y Testosterona se realizará por quimioluminiscencia, mediante un ensayo competitivo en fase sólida. El anticuerpo anti hormona se encuentra unido a una perla de poliestireno encerrada en una copa de reacción denominada IMMULITE Test Unit. La muestra compite en la Test Unit con la hormona marcada con un ligando durante 30 minutos. El material no unido es descartado por lavado centrífugo. En una segunda etapa se agrega un anticuerpo antiligando marcado con la enzima fosfatasa alcalina. La Test Unit es incubada por otros 30 minutos y el material no unido nuevamente descartado por lavado centrífugo. Posteriormente se agrega un sustrato (éster fosfato de adamantyl dioetano) cuya hidrólisis genera un compuesto quimioluminiscente que es leído en un fotomultiplicador

que posee el equipo. Los cálculos son realizados automáticamente en una curva Master que es recalibrada antes de usar. Se utilizará un equipo IMMULITE de DPC (Diagnostic product Corporation), USA.

## **7. Determinación de citoquinas en Homogenatos de Placenta Porcina Fetal (HoPF), Materna (HoPM) y Sueros Porcinos**

Se realizará por Enzaiminmunoanálisis (EIA) la determinación de las siguientes citoquinas: Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleuquina-6 (IL-6), IL-12, IL-15 e IL-18 en homogenatos de placenta porcina fetal, materna y sueros porcinos provenientes de los diferentes períodos de gestación. La técnica es una ELISA de amplificación de actividad, de captura (Margni, 1996), en el que se inmoviliza un anticuerpo monoclonal específico para cada citoquina estudiada en los pocillos de una placa de microtitulación. Cuando se agregan las muestras y los estándares en cada pocillo, la citoquina se une al anticuerpo fijado en la fase sólida. La presencia de la citoquina se revela con un anticuerpo policlonal específico para cada citoquina conjugado con peroxidasa. Al agregar el sustrato cromogénico aparece un desarrollo de color que es proporcional a la cantidad de citoquina unida en el primer paso. La reacción se frena con ácido sulfúrico 2 N y se mide la intensidad de color determinando la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm en un lector de microplaca de ELISA. La concentración de citoquina presente en cada una de las muestras se determinará utilizando una curva estándar.

## **8. Estadística**

Dado que hay más de dos poblaciones en estudio se realizarán 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 (Mosteller *et al.*, 1982). Las variables que se van a contemplar en la determinación de la concentración de citoquinas: IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18; hormonas esteroideas y la expresión de



**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	x	x	x	x	x
Dosaje Hormonas y Citoquinas	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Determinación de Integrinas	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Estudio Estructura Placentaria	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
Informe de Avance										x	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							
Dosaje Hormonas y Citoquinas	x	x	x	x	x	x					
Determinación de Integrinas	x	x	x	x	x	x					
Estudio Estructura Placentaria	x	x	x	x	x	x					
Presentación en Congresos/Publicaciones		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 (3), heladeras, balanzas, pHmetro, centrífuga, microscopios y lupa.

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

SENASA de General Pico dispone de un equipo ELISA y facilita su uso para determinar la concentración de citoquinas hasta la compra del propio.

**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:**

Proyectos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Agencia (Picto 2005) Ver Punto 5.3.
---

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

Equipamiento e Infraestructura .....	\$
Bienes de Consumo .....	\$ 7.500
Bibliografía .....	\$
Viajes .....	\$ 2.500
Personal de Apoyo .....	\$
Otros (especifique) .....	\$
<b>Total .....</b>	<b>\$ 10.000</b>

\* 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 FW and Thatcher WW. (1977) Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F2 $\alpha$  by the uterine endometrium. *Prostaglandins*, **14**: 397-401.
- Bischof RJ, Brandon MR and Lee CS. (1995) Cellular immune response in the pig uterus during pregnancy. *J Reprod Immunol*, **29**: 161-178.
- Blois S, Tometten M, Kandil J, Hagen E, Klapp BF, Margni R, Arck PC. (2005) Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 cross talk is a proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the fetomaternal interface in murine pregnancies. *J Immunol*, **174**: 1820-1829.
- Bosch RA, Alanis GA, Allende RA, Blanch MS, Bosch P y Callejas S. (2001) En: *Actualización en temas de reproducción animal*. Compilador, Bosch RA. Ed Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, pp: 150-152.
- Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC. (1996) Spatial and temporal analyses of integrin and muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoectoderm in vivo. *Biol Reprod*, **55**: 1098-1106.
- Bowen JA and Hunt JS. (2000) The role of Integrins in Reproduction. *Society for Experimental Biol and Med*, **223**: 331-343.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE and Bazer FW. (2002) Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic

- animals. *Cells, Tissues, Organs* special issue "Molecular Approaches in Cell-Cell Adhesion", Essen Symposium, Vol. 171, N° 3, 2002.
- Burrows TD, King A, Loke YW. (1994) Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation. *Placenta*, **15**: 21-33.
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazlabas AT, Lessey BA and Yoshinaga K. (2000) Embryo implantation. *Dev Biol*, **223**: 217-237.
- Chardon P, Renard C and Vaiman M. (1999) The major histocompatibility complex in swine. *Immunol Rev*, **167**: 179-192.
- Choi I, Collante WR, Simmen RC and Simmen FA. (1997) A development switch in expression from blastocyst to endometrial placental type cytochrome P450 aromatase genes in the pig and horse. *Biol Reprod*, **56**: 688-696.
- Clark DA. (1991) Controversies in reproductive immunology. *Crit Rev Immunol*, **11**: 215-247.
- Clark DA, Arck PC and Chaouat G. (1999) Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *AJRI*, **41**: 5-22.
- Croy BA, Esadega S, Chantakruas S, van De Heuvela M, Paffaro VA, Hea H, Blacka G, Ashkard, AA, Kisoe Y, Zhanga J. (2003) Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *Journal of Reproductive Immunology*, **59**: 175-191.
- Dantzer V, Winther H. (2001) Histological and immunohistochemical events during placentation in pigs. *Reproduction Suppl*, **58**: 209-222.
- Dickler H.B and Kunkel HG. (1972) Interaction of aggregated gamma-globulin with B lymphocytes. *J Exp Med*, **136**: 191-196.
- Dosiou C, Giudice L. (2005) Natural Killer Cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine Reviews*, **26**: 44-62.
- Engelhardt H, Croy BA and King GJ. (1997) Role of uterine immune cells in early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertility*, **52**: 115-131.
- Engelhardt H, Croy BA and King GJ. (2002a) Evaluation of Natural Killer Cell recruitment to embryonic attachment sites during early porcine pregnancy. *Biol Reprod*, **66**: 1185-1192.
- Engelhardt H, Croy BA and King GJ. (2002b) Conceptus influences the distribution of uterine leukocytes during early porcine pregnancy. *Biol Reprod*, **66**: 1875-1880.
- Engelhardt H and King GJ. (1996) Uterine natural killer cells in species with epitheliochorial placentation. *Nat Immun*, **15**: 53-69.
- Haralson MA, Hassell JR. (1995) Extracellular Matrix. A practical Approach. Series Editors: D Rickwood and BD Hames. Ed Oxford University Press, pp: 1-30.
- Hedge UC, Ranpura S, D'Souza S and Raghavan VP. (2001) Immunoregulatory pathways in pregnancy. *Indian J Biochem Biophys*, **38**: 207-219.
- Hunt JS. (1992) Immunobiology of pregnancy. *Curr Opin Immunol*, **4**: 591-596.
- Jaeger LA, Johnson GA, Ka H, Garlow JG, Burghardt RC, Spencer TE, Bazer FW. (2001) Functional analysis of autocrine and paracrine signaling at the uterineconceptus interface in pigs. *Reprod Suppl*, **58**: 191-207.
- Kelemen K, Bognar I, Paal M and Szekeres-Bartho J. (1996) A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *Cell Immunol*, **167**: 129-134.
- King A, Loke YW and Chaouat G. (1997) NK cells and reproduction. *Immunol Today*, **18**: 64-66.
- Koncurat M, Greco C y Vivas A. (1999) Hallazgo del factor precoz de preñez (EPF) en extractos placentarios porcinos. *Rev Brasil Reproduc Anim*, **3** (23): 193-195.

- Koncurat M, Martinez R, Greco C, VIVAS A. (2001a) TGF- $\beta$ 2 en suero y extractos placentarios porcinos en diferentes periodos de la gestación. *Rev Arg Prod Anim*, **21**: 201-202.
- Koncurat M, Martinez R, Escribano C, Vivas A. (2001b) IFN- $\gamma$  concentration in serum and porcine placental extracts from different gestation ages. *Biocell*, **25**: 101.
- Kreis T, Vale R. (1994) Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins. Ed Oxford University Press, London, pp: 3-11 y 143-145.
- Lefèvre F, Guillomot M, D'Andréa S, Battegay S and La Bonnardière C. (1998a) Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family. *Biochimie*, **80**: 779-788.
- Lefèvre F, Martinat-Botté F, Locatelli A, De Niu P, Terqui M and La Bonnardière C. (1998b) Intrauterine infusion of high doses of pigs trophoblast interferons has no antiluteolytic effects in cyclic gilts. *Biol Reprod*, **58**: 1026-1031.
- Lessey BA, Arnold JT. (1998) Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the establishment of uterine receptivity. *J Reprod Immunol*, **39**: 105-116.
- Li Qin, Yan-Ling Wang, Su-Xia Bai, Sho-Hui Ji, Wei Qiu, Shuang Tang and Yun-Shang Piao. (2003) Temporal and spatial expression of integrins and their extracellular matrix ligands at the maternal-fetal interface in the rhesus monkey during pregnancy. *Biol Reprod*, **69**: 563-571.
- MacIntyre M D, Lim HC, Ryan K, Kimmins S, Small J A and MacLaren L A. (2002). Implantation-Associated Changes in Bovine Uterine Expression of Integrins and Extracellular Matrix. *Biol Reprod*, **66**: 1430-1436.
- Margni RA. (1996) En: *Inmunología e Inmunología. Fundamentos*, 5ta edición, Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Martinez R, Greco C, Koncurat M, Escribano C, Vivas A. (2004). Hormonas esteroideas e interferón-gamma durante la preñez porcina. *Revista Electrónica de Veterinaria*, **10**(V), 2004. (ISSN: 1695-7504).
- Marrable AW. (1971) In: *The embryonic pig: a chronological account*. Ed. Exeter, Pitman Medical, London.
- Mattsson R, Mattsson A, Holmdahl R, Scheynius A and Van Der Meide PH. (1992) In vivo treatment with interferon-gamma during early pregnancy in mice induces strong expression of major histocompatibility complex class I and II molecules in uterus and decidua but not in extra-embryonic tissues. *Biol Reprod*, **46**: 1176-1186.
- Meeusen E, Fox A, Brandon M and Lee CS. (1993) Activation of uterine intraepithelial gamma delta T cell receptor-positive lymphocytes during pregnancy. *Eur J Immunol*, **23**: 1112-1117.
- Merkis C, Fernandez S, Martinez R, Chanique A, Greco C, Koncurat M, Troillet JC, Vivas A. (2001) Comparison of the Early Pregnancy Factor activity (EPF) in serum and placental porcine of different gestational periods. *Biocell*, **25**: 306
- Modric T, Kowalski AA, Green ML, Simmen RC and Simmen FA. (2000) Pregnancydependent expression of leukaemia inhibitory factor (LIF), LIF recepto-beta and interleukin-6 (IL-6) messenger ribonucleic acids in the porcine female reproductive tract. *Placenta*, **21**: 345-353.
- Mosteller F, Tukey J. (1982) Understanding robust and exploratory data analysis. Ed. Wiley JW and Sons Inc.
- Pope WF. (1994) Embryonic mortality in swine. In: *Embryonic mortality in domestic species*. Ed. Zavy MT and Geisert RD. Boca Raton, FL; CRC Press, Inc., pp: 53-77.
- Robertson SA. (2000) Control of the immunological environment of the uterus. *Reviews of Reprod*, **5**: 164-174.
- Robertson SA, Seamark RF, Guilbert LJ and Wegmann TG. (1994) The role of cytokines in gestation. *Critical Reviews Immunol*, **14**: 239-292.



- Samuel CA. (1971) The development of pig trophoblast in ectopic sites. *J Reprod Fertil*, **27**: 494-499.
- Samuel CA and Perry JS. (1972) The ultrastructure of pig trophoblast transplanted to an ectopic site in the uterine wall. *J Anat*, **113**: 139-149.
- Spencer TE and Bazer FW. (2002) Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Bioscience*, **7**: 1879-1898.
- Stewart CL, Kaspar P, Burnet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F and Abbondanzo SJ. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, **359**: 76-79.
- Szafranska B; Xie S; Green J and Roberts RM. (1995) Porcine pregnancy-associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophoectoderm. *Biol Reprod*, **53**: 21-28.
- Van der Lende T, Knol EF, Leenhouwers JJ. (2001) Prenatal development as a predisposing factor for perinatal losses in pigs. *Reprod Suppl*, **58**: 247-261.
- Vivas A, Carrizo E, Martinez R, Merkis C y Koncurat M. (2001a) Producción de hormonas esteroideas y proteicas por extractos placentarios porcinos. *Rev Arg Produc Animal*, vol **21** (supl. 1): 202-203.
- Vivas A, Martinez R, Moschetti E, Carrizo E, Merkis C y Koncurat M. (2001b) Correlación entre hormonas séricas y placentarias porcinas. *Rev Arg Produc Animal*, vol **21** (supl. 1): 203-204.
- Yaful G, Riesco O, Koncurat M. (2005) Concentración de progesterona en placenta materna, fetal y líquido amniótico durante la gestación porcina. Enviado a ALPA.
- Zenclussen AC, Gentile T, Kortebani G, Mazzolli A and Margni R. (2001) Asymmetric antibodies and pregnancy. *AJRI*, **45**: 289-294.
- Zhang JH, He H, Borzychowski AM, Takeda K, Akira S, Croy BA. (2003) Analysis of cytokine regulators inducing IFN- $\gamma$  production by mouse uterine natural killer cells. *Biol Reprod*, **69**(2): 404-411.
- Zion BR and Orvieto R. (1992) Cytokines –involvement in reproduction. *Fertility and Sterility*, **6**: 1093-1099