TÌTULO:

Estudio de moléculas de adhesión que participan en la placentación porcina

INTEGRANTES	FIRMA
Dra Williamson, Delia María	
Dra Koncurat, Mirta Adriana	
Ms Garro, Adriana	
M.V.Viglierchio, María del Carmen	
M.V.García, Mónica	
Biol.Hernandez, Mabel	
Esp. Riesco, Oscar	

Corresponde al Anexo I de la Resolución Nº **360/11 C.D.**

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 moléculas de adhesión que participan en 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.
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 Acade-mico	Categ. Invest.	Respo n-sabili-dad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Williamson, Delia María	Dra	IV	D	Biología General	Ayudante 1º semiexc.	10
Koncurat, Mirta Adriana	Dra	I	CD	Biología General	Titular exclusivo	15

Garro, Adriana	Ms	III	I	Biología General	Adjunto Simple	5
Viglierchio, María del Carmen	Med. Vet	SC	I	Química Biológica	Adjunto semiexc.	5
García, Mónica	Med. Vet	SC	I	Histología II	Ayudante 1° semiexc.	5
Hernández, Mabel	Biolog	IV	I	Histología I	JTP semiexcl	5
Riesco, Oscar	Espec	V	I	Biología General	Ayudante 1° simple	5

(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.
Vélez, Carolina	UNLPam	Perfeccionamiento en la Investigación	Dra Koncurat, Mirta Dra Williamson, Delia	40

2.3.2. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
Vélez, Carolina	**Dr en Ciencias Veterinarias**	**"Estudio de Integrinas y su Regulación por el Sistema Inmune Innato y Adquirido durante la Placentación Porcina**	**FCV – UNLP**	**Dra Mirta Koncurat Co-Director Dr Claudio Barbeito**	**40 hs**

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 Tesista		

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

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 2012 FINALIZACIÓN: 31 / 12/ 2016

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

La placenta es un órgano integrado por estructuras de origen fetal y materno, originado especialmente para la gestación. En cerdos, dado el tipo de placenta epiteliocorial y no invasiva, el trofoblasto se encuentra en íntimo contacto con los tejidos maternos, por lo tanto las interacciones entre los epitelios trofoblástico y endometrial son cruciales para el establecimiento de la preñez y se requieren interacciones coordinadas. El objetivo de éste trabajo es estudiar el rol de las integrinas y sus ligandos en placentas porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales, tratando de individualizar moléculas implicadas en los procesos de adhesión placentaria durante la gestación porcina y su posible interrelación con el sistema inmunológico. Para lo cual se determinará la expresión de las moléculas de adhesión, $\alpha V\beta 3$ y $\alpha 2V\beta 1$ y sus ligandos a través de anticuerpos: anti colágeno V, anti laminina y antifibronectina, por inmunoperoxidasa en cortes de tejido placentario desparafinados de 30, 60-70 días de gestación y a término. En esos períodos se determinará la presencia de IL-2, IL-4 e IL-10 en suero y homogenatos placentarios maternos y fetales porcinos mediante ELISA.

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

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

La placenta es un órgano integrado por estructuras de origen fetal y materno, originado especialmente para la gestación. En cerdos, dado el tipo de placenta epiteliocorial y no invasiva, el trofoblasto se encuentra en íntimo contacto con los tejidos maternos, por lo tanto las interacciones entre los epitelios trofoblástico y endometrial son cruciales para el establecimiento de la preñez y requiere interacciones coordinadas que involucran numerosas hormonas, factores de crecimiento, células del sistema inmunitario y citoquinas (Robertson, 2000; Bazer et al. 2008; Bazer et al. 2009; Williamson, 2011).

El sistema endócrino a través de las hormonas gestacionales prepara y mantiene la receptividad del aparato reproductor femenino; mientras que el sistema inmunológico participa en el reconocimiento del aloinjerto fetal permitiendo la aceptación de los embriones y el desarrollo de la gestación (Margni, 1996; Tizard, 2009).

En este proceso complejo intervienen las células del sistema inmune y numerosas citoquinas, particularmente se destaca la acción de las células NK uterinas (NKu), macrófagos, linfocitos T y B (Engelhardt et al., 1997, Cristofolini, 2010; Williamson, 2011).

Numerosos trabajos están centrados en el rol que desempeñan las citoquinas durante la gestación y en especial en la interfase feto-materna, analizando el tipo celular que las produce y la cadena de regulaciones que sufren (Clark, 1991; Pollard et al., 1991; Hunt, 1992; Stewart et al., 1992; Zion and Orvieto, 1992; Terranova, 1997; Lotem and Sachs, 1999; Modric et al., 2000).

Particularmente, se destaca la acción de algunas citoquinas en tanto que moléculas con actividad inmunosupresora, tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β2), el factor estimulante de colonias granulo-monocitarias (GM-CSF), la interleuquina 4 (IL-4), la IL-6, la IL-10 y la IL-13, que actuarían inhibiendo la secreción de otras citoquinas que pueden activar a las células NKu, a los macrófagos y/o a las células T tipo Th1, citotóxicas, consideradas peligrosas para una gestación exitosa (Clark, 1999; Margni, 1996; Koncurat et al., 2001a; Koncurat et al., 2010; Williamson, 2011).

El trofoblasto porcino, a diferencia de lo que ocurre en otras especies como el hombre, secreta gran cantidad de interferón gama (IFN-γ), tipo II, durante el período de implantación (Lefèvre et al., 1998a; Koncurat et al., 2001b) y a los 32 días de preñez (Koncurat et al., 2010; Williamson, 2011). Esta citoquina posee actividades biológicas opuestas a la IL-4, por lo que actuaría favoreciendo la diferenciación linfocitaria hacia células T, tipo Th1 citotóxicas.

Las moléculas de adhesión comprenden una variedad de proteínas de membrana y han sido clasificadas en cinco subfamilias, las integrinas, las selectinas, las caderinas, las mucinas y las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Botella, 2001; Reddy and Mangale, 2003).

Las integrinas constituyen una familia de proteínas que, por lo general, conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto de la célula cumpliendo funciones en la adhesión, migración, invasión y control de la fisiología celular. Conforman una familia de proteínas heterodímeras que

son receptores transmembrana, catión-dependientes, compuestas de subunidades α y β. Han sido identificadas, en el humano, 24 subunidades α y 9 subunidades β, de lo cual resultan 25 heterodímeros conocidos. El ligando específico para cada heterodímero está determinado por la combinación específica de las subunidades α y β (Bowen and Hunt, 2000; Alberts et al., 2004).

En ovinos, las integrinas juegan un rol predominante en las interacciones entre la matriz extracelular (MEC) y sus receptores para traducir señales celulares entre el trofoectodermo y las células epiteliales uterinas (Burghardt et al., 2002). 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 las moléculas de la MEC en el estroma subepitelial uterino (MacIntyre et al., 2002). Estudios realizados en monos Rhesus sugieren que existe una correlación entre la expresión de las integrinas y sus ligandos de la MEC en la interfase feto materna y que podrían estar involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, regulando la invasión de las células trofoblástica al comienzo de la gestación (Li Qin et al., 2003).

En cerdos, se ha estudiado el papel de las integrinas y de sus ligandos de la MEC comparando la expresión entre el útero durante el ciclo estral con la preñez temprana de entre 10 y 15 días (Bowen et al., 1996; Bowen and Hunt, 2000; Jaeger et al., 2001). Poco se conoce acerca de la expresión de estas moléculas y sus ligandos durante el desarrollo de la gestación porcina en la interfase feto-placentaria, y, en particular, su interrelación o regulación por parte del sistema inmunitario (Ashworth et al, 2010; Williamson, D 2011).

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)

- Preliminary Study of Expresión of Subunit β1 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 αvβ3 y de la Subunidad β1 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. 22-23 Y 24 de mayo. ISBN-10: 950-665-394-1. ISBN-13: 978-950-665-394-1. MEMORIAS 2006.
- Detección de la Subunidad β3 de las Integrinas Durante la Placentación Porcina. Williamson D y Koncurat M. XXIII Jornadas Científicas. Asociación de Biología de Tucumán. Septiembre de 2006. Tafí del Valle. Tucumán. Argentina.
- Detection of subunit β of integrins during porcine placentation. Williamson D y Koncurat M. Biocell. Septiembre de 2006. ISSN 0327-9545
- Expression of β1 and α3 integrin subunits during porcine gestation. Williamson D. and Koncurat M. Aceptada para publicar en Biocell. Noviembre de 2006. ISSN 0327-9545.
- Expression of β1 and α3 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.
- Expresión de la integrina αvβ3 y de las subunidades de integrinas α3 y β1 durante la placentación porcina. Williamson, Delia; Koncurat, Mirta. Revista InVet, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. ISSN: 1514-6634.
- Expression of β1 and α3 integrin subunits during porcine gestation. Williamson, Delia; Koncurat, Mirta Revista Biocell, ISSN 0327-9545. Vol 31 Nº1- pag 178- año 2007.
- Expresión de la subunidad β3 de las integrinas durante la placentacion porcina. Williamson Delia, 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 49. 2007.

- Expression of subunit β3 of integrins during porcine placentation: preliminary study. Williamson Delia, Alonso Gabriela, Hernandez Mabel, Koncurat Mirta. Revista Biocell ISSN 0327-9545. 2007.
- Concentración de Progesterona y expresión de las Integrinas αv β3, β1 y α3 durante la placentación porcina. Williamson Delia, Yaful Graciela, Riesco Oscar, Koncurat Mirta. XX Reunión Latinoamericana de Producción Animal, XXX Reunión Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal y V Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito. Artículo Completo. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol 15 (Supl. 1) 2007. Pag 336-340.
- Estrogen, progesterone and integrins during porcine placentation. Williamson Delia, Riesco Oscar, Alonso Gabriela, Hernandez Mabel, Moschetti, Koncurat Mirta. III Latin-American Symposium on Maternal-Fetal InteractionPlacenta – Research & Clinical. November 4-7, 2007 Los Cocos, Argentina. Vol III, 63-64, 2007.
- Expresión de la integrina αvβ3 y de las subunidades β3 y β1 en la placentación porcina. Williamson D, Koncurat M. IX Congreso Nacional de Producción Porcina, XV Jornadas de Actualización Porcina. 26 al 28 de mayo. ISBN: 978-950-655-475-7. pag. 214. Memorias 2008.
- Expression of subunit β3 of integrins during porcine placentation: Preliminary study. Williamson D, Alonso G, Hernandez M, Koncurat M. Revista BIOCELL. ISSN 0327-9545. VOL 32 Nº 1. 2008.
- Detección de la integrina αvβ3 durante la placentación porcina. Koncurat M, Viglierchio M, Hernández M y Williamson D. I Jornadas Patagonicas de Biología y III Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biologicas – marzo, 2009. ISBN 978-987-1591-16-9.
- Inmunoexpresión de osteopontina e integrina αvβ3 en tejidos placentarios porcinos. Estudio preliminar. Sanchis G, Williamson D, Cristofolini A, Merkis C y Koncurat M. XVII Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. Agosto 2009. Pag 47. Huerta Grande, Córdoba.
- Expresión de las subunidades α3, β3 y β1 de las integrinas y de αvβ3 durante la gestación temprana porcina. Williamson D y Koncurat M. XVII Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. Agosto 2009. Pag 67. Huerta Grande, Córdoba.
- Osteopontin and αvβ3 integrin immunoexpresion in porcine placental tissues. Preliminary study. Sanchis G, Williamson D, Cristofolini A, Merkis C y Koncurat M. Biocell (ISSN 0327-9545), 33(3):A256.2009
- Expression of α3, β3 and β1 integrin subunits and αvβ3 during early porcine gestation. Williamson D, Sanfilippo S and Koncurat M. Biocell (ISSN 0327-9545), 33(3):A256.2009
- Expresión de la subunidad β1 de las integrinas durante la gestación temprana porcina. Williamson D, Clauzure M, Koncurat M. Memorias 6º Jornadas Ciencia y Técnica, FCV-UNLPam. Agosto de 2009. Pag. 32. ISSN: 1852-5725.
- Progesterona, estrógenos y expresión de integrinas en la gestación temprana porcina Williamson, D; Yaful, G; Riesco, O y Koncurat M. Revista Ciencia Veterinaria (ISSN: 1515-1883), 10(1):13-22, 2008.
- Expresión de la integrina αvβ3 y de las subunidades de integrinas β3 y β1 durante la placentación porcina. Williamson D y Koncurat M. InVet (ISSN: 1514-6634), 11(1-2):31-37. 2009.
- Determinación de la concentración de IL-18, IL-15 e IL-12 en suero, homogenatos placentarios maternos y fetales durante la gestación porcina. Williamson D, Riesco O, Vélez C y Koncurat M. X° Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; X° Congreso Nacional de Producción Porcina. 8-11 de agosto de 2010. Mendoza Capital. (ISBN: 978-950-665-616-4), Pp: 277.

- Concentration of IL-6, IL-12 and IFN-γ in serum and placental extracts during porcine gestation. Koncurat, M; Williamson, D; Velez, C y Riesco, O. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 2-5 noviembre, 2010. Buenos Aires, Argentina. 2010.
- Determinación de IL-6, progesterona y estrógenos en la preñez porcina temprana. Koncurat, MA; Yaful, GN; Riesco, O; Williamson DM. Resúmenes de la Asociación de Biología de Tucumán, XXVII Jornadas Científicas. 13-15 de octubre de 2010. Tafí del Valle, Tucumán, Argentina. 2010.

- Expresión de Inteegrinas y concentración de Progesterona y Estrógenos durante la preñez porcina. Williamson D, Riesco O, Vélez C y Koncurat M. Memorias VII Jornada de ciencia y Técnica de la FCV, UNLPam, General Pico, La Pampa ISSN 1853-9750. Premio al mejor Poster.
- Determinación de la concentración de IL-18, IL-15, IL-12, IL-6 e IFN-γ en homogenatos placentarios maternos, fetales y suero a través de la gestación porcina. Koncurat, MA, Riesco OF, Vélez C y Williamson, DM. XXII Reunión Latinoamericana de Producción Animal (ALPA). 24–26 de octubre de 2011, Montevideo, Uruguay.
- Determinación de la concentración de IFN-γ, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 en suero, extractos placentarios maternos y fetales a través de la gestación porcina. Williamson, D M; Riesco, O F; Vélez, C y Koncurat, M A. En Revista Ciencia Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. 2011. Enviado a publicar.

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

"Determinación de los receptores para progesterona, isoformas A y B, en tejidos placentarios fetales y maternos de cerdas y su relación con la concentración sérica y tisular". FCV – UNLPam.

"Determinación del rol de la progesterona a través de sus receptores en útero y en placenta porcina" Directora: Dra Graciela Yaful, UNRN.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

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

PROBLEMA CIENTÍFICO

Aún no se conocen los mecanismos moleculares que permiten una gestación exitosa. La placentación porcina depende de la interrelación espacial y temporal de las integrinas y sus ligandos, que a su vez están reguladas por el sistema endócrino e inmunológico. Comprender dichos mecanismos permitirá disminuir las pérdidas embrionarias y fetales.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el rol de las integrinas y sus ligandos en placentas porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales, tratando de individualizar moléculas implicadas en los procesos de adhesión placentaria durante la gestación porcina y su posible interrelación con el sistema inmunológico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar dosajes de IL-2, IL-4 e IL-10 en suero y Homogenatos de placenta porcina (HoPP) provenientes de diferentes períodos gestacionales.
- Realizar determinaciones de integrinas y sus ligandos sobre preparados histológicos de placentas porcinas de diferentes períodos de preñez.
- Establecer posibles relaciones entre los niveles de citoquinas con la expresión tisular de integrinas y sus ligandos hallados durante el desarrollo placentario de la preñez porcina.

HIPÓTESIS

En el proceso de la placentación porcina la presencia de integrinas está regulada por el sistema inmune materno.

RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

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

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

1- Animales. Se utilizarán 5 muestras sanguíneas y placentarias provenientes de cerdas mestizas de la zona de General Pico, La Pampa, de los siguientes períodos gestacionales: 30, 60-70 días y a término. Además, se procesarán 5 muestras de sangre y de endometrio uterino provenientes de cerdas vacías.
Se estimará la edad gestacional de las placentas de acuerdo a la longitud céfalo-caudal de los fetos obtenidos de cada cerda gestante (Marrable, 1971); además, se determinará el sexo y peso.

2- Extracción de sangre. A cada cerda se le extraerá sangre por el método de flevopunción. 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.

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

4- Análisis de la estructura de la placenta y útero. Técnica para Microscopía Óptica:
Se fijarán las muestras placentarias en formol adicionado de tampón fosfato al 10 %. Se deshidratarán las muestras de la siguiente manera: se colocarán en alcohol 96° una hora, nuevamente en alcohol 96° una hora, deshidratante histológico (Biopur) una hora, deshidratante histológico/xilol por partes iguales una hora y xilol una hora. Luego se incluirán en parafina. Se

realizarán los cortes de cada muestra de aproximadamente 5 µm, montando por portaobjetos de a tres o cuatro cortes; previamente al montaje se colocarán los cortes en un baño termostatizado a 40ºC con agua y gelatina para que no se plieguen. Se teñirán con Hematoxilina-Eosina y se observarán con un microscopio óptico Zeiss (Alemania).

5- Obtención de Homogenatos de Placenta Materna Porcina (HoMP), Homogenatos de Placenta Fetal Porcina (HoFP y de Útero Porcino (HoUP).

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

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

6- Determinación de citoquinas en Homogenatos de Placenta Materna (HoMP), Fetal (HoFP) y Sueros Porcinos. Se realizará por ELISA de captura (Margni, 1996), la determinación de las siguientes citoquinas: IL-2, IL-4 e IL-10 en los extractos placentarios maternos, fetales y sueros porcinos provenientes de los períodos de gestación seleccionados, así como en los extractos de útero vacío.

7- Cuantificación de Integrinas y Ligandos en muestras de tejido placentario fetal y materno. Se estudiará la expresión de integrinas: $\alpha V\beta 3$ y $\alpha 2V\beta 1$ y sus ligandos: anti colágeno V, anti laminina y antifibronectina, por inmunoperoxidasa en cortes de tejido placentario desparafinados de los períodos seleccionados, mediante anticuerpos.

Los resultados de la inmunoperoxidasa se expresarán en forma semicualitativa con una escala elegida en función de la coloración detectada, determinando que: (-) negativo, (+/-) pobre intensidad de fluorescencia, (++) fluorescencia positiva y (+++) cuantiosa fluorescencia. Además, se determinará la densidad óptica de la coloración obtenida por in munoperoxidasa.

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

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

Poder identificar moléculas claves durante la placentación porcina permitirá profundizar el conocimiento de los mecanismos fisiológicos necesarios para una gestación exitosa. Dichos conocimiento se podrán utilizar para mejorar la capacidad uterina, la sobrevida del conceptus/embriones y la salud reproductiva porcina.
Un mejor conocimiento de los mecanismos que median las interacciones entre el conceptus/embriones/fetos y el tracto reproductivo de la cerda implicará importantes avances para mejorar la productividad de esta especie lo que producirá un impacto económico en las empresas de ganado porcino. Además, aportará elementos en la comprensión de los procesos involucrados en el correcto desarrollo de la placentación porcina que permitirá dilucidar mecanismos acerca de las pérdidas embrionarias y fetales, patologías de suma importancia que

afectan a esta especie. Así como también, en las causas que afectan la uniformidad y el crecimiento potencial de los lechones recién nacidos, parámetros muy deseables en los sistemas productivos intensivos, extensivos y mixtos.

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

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

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

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Año 1

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

Año 2

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

Año 3

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

Año 4

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

Año 5

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

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

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

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

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

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

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

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

Equipamiento e Infraestructura ……..$

Bienes de Consumo …….$ 37000

Bibliografía …… $ 3000

Viajes …..……..…….…… $ 7500

Personal de Apoyo ……..……..…….. $

Otros (especifique), Servicios a terceros …….…… $ 2500
TOTAL ……. $ 50000

Presupuesto Estimado Anual:
1° año: $ 14.000
2° año: $ 11.000
3° año: $ 10.000
4° año: $ 8.000
5° año: $ 7.000

*** 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

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2004) Biología molecular de la célula. 4 ed. Ed Omega.

ASHWORTH, M.D.; ROSS, J.W.; STEIN, D.R.; WHITE, F.J.; DESILVA, U.W.; GEISERT, R.D. (2010) Endometrial caspase 1 and interleukin-18 expression during the estrous cycle and peri-implantation period of porcine pregnancy and response to early exogenous estrogen administration. Reprod Biol Endocrinol 8(1):33-41.

BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; SPENCER, T.E.; WU, G. (2008) Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. Biol Reprod, 8(3):179-211.

BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A. (2009) Interferons and uterine receptivity. Semin Reprod Med, 27(1):90-102.

BOTELLA LLUSIA, J. (2001) Integrins and reproduction. An R Acad Nac Med, 118(1): 173-185.

BOWEN, J.A.; BAZER, F.W. and BURGHARDT, R.C. (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, J.A. and HUNT, J.S. (2000) The role of Integrins in Reproduction. Society for Experimental Biology and Medicine, 223: 331-343.

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 tissue “Molecular Approaches in Cell-Cell Adhesion”, Essen Symposium, 171.

CARSON DD, BAGCHI I, DEY SK, ENDERS AC, FAZLABAS AT, LESSEY BA and YOSHINAGA K. (2000) Embryo implantation. Dev Biol, 223: 217-237.

CLARK A. (1991) Controversies in Reproductive Immunology. Crit Rev Immunol, 11: 215-247.

CLARK DA (1999) Signaling at the Fetomaternal Interface. AJRI, 41: 169-173

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

CRISTOFOLINI, A.L. (2010) Estudio de la remodelación celular durante la placentación porcina. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.

CRISTOFOLINI, A.L.; MERKIS, C. y KONCURAT, M.A. (2010). J

CROY, B. A.; ESADEGA, S.; CHANTAKRUAS, S.; VAN DE HEUVELA, M.; PAFFARO, V. A.; HEA, H.; BLACKA, G.; ASHKARD, A. A.; KISOE, Y. and 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.

ENGELHARDT, H.; CROY, B.A. and KING, G.J. (1997) Role of uterine immune cells in early pregnancy in pigs. J Reprod & Fertility, 52: 115-131.

HUNT, J.S. (1992) Immunobiology of pregnancy. Curr Opin Immunol, 4: 591-596.

JAEGER, L.A.; JOHNSON, G.A.; KA, H.; GARLOW, J.G.; BURGHARDT, R.C.; SPENCER, T.E. and BAZER, F.W. (2001) Functional analysis of autocrine and paracrine signaling at the uterine-conceptus interface in pigs. Reprod Suppl, 58: 191-207.

KONCURAT, M.; MARTINEZ, R.; GRECO, C. and VIVAS, A. (2001a) TGF-β_2 en suero y extractos placentarios porcinos en diferentes períodos de la gestación. Rev Arg Prod Anim, 21: 201.

KONCURAT, M.; MARTINEZ, R.; ESCRIBANO, C. and VIVAS, A. (2001b) IFN-γ concentration in serum and porcine placental extracts from different gestation ages. Biocell, 25(3).

KONCURAT, M.; WILLIAMSON, D.; VELEZ, C. y RIESCO. O. (2010) Concentration of IL-6, IL-12 and IFNγ in serum and placental extracts during porcine gestation. En: First French-Argentine Immunology Congress. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 2-5 noviembre, 2010. Buenos Aires, Argentina.

LEFÈVRE, F.; MARTINAT-BOTTÉ, F.; LOCTELLI, A.; DE NIU, P.; TERQUI, M.; and LA BONNARDIERE, C. (1998a) Intrauterine infusión of high doses of pigs trophoblast interferons has no antiluteolytic effects in cyclic gilts. Biol Reprod, 58: 1026-1031.

LI, Q.; YAN-LING, W.; SU-XIA, B.; SHAO-HUI, J.; WEI, Q.; SHUANG, T. and YUN-SHANG, P. (2003) Temporal and spatial expression of integrins and their extracellular matrix ligands at the matenal-fetal interface in the rhesus monkey during pregnancy. Biol Reprod, 69: 563-571

LOTEM, J. and SACHS, L. (1999) Cytokines as Suppressors of Apoptosis. Apoptosis, 4: 187-196

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, R.A. (1996) Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5ta edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

MARRABLE, A.W. (1971) In: The embryonic pig: a chronological account. Ed. Exeter, Pitman Medical, London.

MODRIC, T.; KOWALSKI, A. A.; GREEN, M. L.; SIMMEN, R. C. and SIMMEN, F. A. (2000) Pregnancy-dependent 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.

POLLARD, J. W.; HUNT, J. S.; WIKTOR-JEDRZEJCZAC, W. and STANLY, E. R. (1991) A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirements for CSF-1 in female fertility. Dev Biol, 148: 273-283.

REDDY, K.V. and MANGALE, S.S. (2003) Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. Tissue cell, 35(4): 260-273.

ROBERTSON, S. A. (2000) Control of the immunological environment of the uterus. Reviews of Reprod, 5: 164-174

STEWART, C. L.; KASPAR, P.; BURNET, L. J.; BHATT, H.; GADI, I.; KONTGEN, F. and ABBONDANZO, S. J. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. Nature, 359: 76-79.

TERRANOVA, P. F. (1997) Potencial roles of tumor necrosis factor-α in follicular development, ovulation and the life span of the corpus luteum. Domest Animal Endrocrinol, 14: 1-15.

TIZARD, I.R. (2009) Introducción a la inmunología veterinaria. 8° ed. Ed. Elseiver, España.

WILLIAMSON, D. (2011) Estudio de la presencia de integrinas, y su relación con los niveles de esteroides e interleuquinas, durante la placentación porcina. Tesis Doctoral. FCV, UNLP, Argentina.

ZION, B. R. and ORVIETO, R. (1992) Cytokines-involvement in reproduction. Fertility and Sterility, 6: 1093-1099.