

### 38-2PA

## EXPRESIÓN DE VEGFA Y VEGFR2 EN LA PLACENTA DE CERDOS EN LOS 75 Y 85 DÍAS DE GESTACIÓN

Fiorimanti MR<sup>1,2</sup>, Cristofolini AL<sup>1,2</sup>, Luján M<sup>1</sup>, Barbeito CG<sup>2,3</sup>, Merkis CI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Microscopía Electrónica, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nac 36, Km 601. CPX5804BYA. Argentina. <sup>2</sup>CONICET. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina.

E-mail: [mfiorimanti@avv.unrc.edu.ar](mailto:mfiorimanti@avv.unrc.edu.ar)

En el cerdo, la gestación dura aproximadamente 114 días y la placenta es epiteliocorial, no invasiva, difusa, plegada y adecidua. Durante el desarrollo placentario, ocurre un proceso fundamental denominado angiogénesis, el cual consiste en la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este proceso depende de la expresión de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGFA), una proteína secretada por las células de la pared de los vasos sanguíneos, que actúa mediante la unión a VEGFR2 promoviendo la permeabilidad vascular, la proliferación y la migración de células endoteliales para la formación de vasos sanguíneos. El objetivo de este trabajo fue determinar la inmunoexpresión de VEGFA y su receptor VEGFR2 en placentas porcinas pretérmino, en los días 75 y 85 de gestación. Se utilizaron muestras de placentas de cerdas mestizas de 75 (n=5) y 85 (n=5) días de gestación provenientes de frigoríficos de la zona de Río Cuarto, Argentina (33,11° S, 64,3° O). Las muestras fueron fijadas en formol salino tamponado y procesadas a través de la técnica histológica convencional. Se realizaron cortes histológicos de  $\pm 4 \mu\text{m}$ . Para la inmunohistoquímica de VEGFA y VEGFR2 se utilizó un anticuerpo primario anti-VEGF y uno anti-VEGFR2 (Santacruz, USA), respectivamente, en una dilución 1/100 y anticuerpos secundarios (Cell Marque, USA). La observación se realizó a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) y, las imágenes se adquirieron mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al mismo. Se realizó una semicuantificación, donde la intensidad de marcación se calificó en: (-) negativa, (+) débil, (++) abundante, (+++) cuantiosa. Se determinó la distribución de la intensidad de inmunomarcación a través del valor de High Score (HS), definido como  $HS = \sum Pi (i+1)$ ; donde i: intensidad de marcación y Pi: porcentaje de células para cada marcación. Los datos fueron analizados estadísticamente con el software Infostat. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de VEGF entre el día 75 y 85 de gestación, sin embargo, hubo una mayor expresión del receptor VEGFR2 al día 75 respecto del día 85 de gestación. Estudios previos de nuestro laboratorio determinaron una menor expresión de VEGFA y sus receptores en la placenta porcina en el día 60 de gestación, sugiriendo que el proceso angiogénico estaría regulado por otros factores angiogénicos en el periodo medio de gestación. Entre los días 75 y 85, nuestros resultados evidencian una expresión abundante de VEGFA con una mayor expresión del receptor VEGFR2, abundante y cuantiosa, al día 75. Otros autores, describen un aumento progresivo en la expresión de VEGF y sus receptores en gestaciones avanzadas, a partir del día 80 de gestación y esta mayor expresión se correlaciona positivamente con el aumento del peso fetal y un mayor desarrollo vascular uterino entre los días 80 y 105 de gestación. En este periodo pretérmino habría un mayor desarrollo vascular y luego tendería a estabilizarse, aumentando sólo el diámetro de los vasos hacia el final de la gestación. Mediante estos resultados concluimos que, en el periodo pretérmino, a partir del día 75, hay una estimulación activa de la angiogénesis vía VEGFA/VEGFR2 en respuesta al aumento de los requerimientos nutricionales de los fetos.

### 39-3BMB

## CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS EMPLEANDO EL ENSAYO DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA (ESE)

Trillini NA<sup>1</sup>, Guidobaldi H<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IIByT (CONICET) y CEBICEM (FCEyN-UNC). Córdoba.

E-mail: [andretrillini@gmail.com](mailto:andretrillini@gmail.com)

La fecundación en mamíferos es un evento complejo que ocurre en el tracto reproductor de la hembra y consiste en la fusión del ovocito con un espermatozoide (spz). En su recorrido hasta el sitio de fecundación, los spz experimentan una serie de cambios bioquímico-físicos denominados en conjunto capacitación espermática, que le permiten fecundar exitosamente al ovocito. Además de progresar por su propia movilidad, los spz son ayudados por distintos mecanismos de orientación celular que lo guían dentro de oviducto y facilitan el encuentro con el ovocito. Uno de estos mecanismos se conoce como quimiotaxis, y se define como la orientación del movimiento del spz siguiendo un gradiente de concentración de una sustancia atractante. Hasta el momento se han descrito numerosas sustancias atractantes en mamíferos como progesterona, nucleótidos cíclicos y péptidos entre otros, provenientes de distintas fuentes como el fluido folicular (FF), fluido oviductal o secreciones de las células del cúmulus o del ovocito. El mecanismo de quimiotaxis ha sido caracterizado en numerosas especies (humanos, ratones, conejos, equinos y bovinos) y se ha demostrado mediante el empleo de fuentes de atractantes heterólogas, que este mecanismo está conservado en mamíferos. Recientemente, se ha demostrado que los spz de porcino responden quimiotácticamente hacia progesterona. Sin embargo, aún no se ha caracterizado si los espermatozoides pueden responder a fluidos foliculares heterólogos como el de bovino. Por lo que, en este trabajo, nos proponemos caracterizar la respuesta quimiotáctica hacia el fluido folicular de bovino empleando el Ensayo de Selección Espermática (ESE). Para el trabajo se emplearon muestras de semen porcino refrigeradas, los spz se separaron del plasma seminal por la técnica migración sedimentación, y se los incubó en medio capacitante (4,8 mM KCL, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 95 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM piruvato, 27,75 mM glucosa y 0.6% BSA) por 3 hs a 38°C en estufa con 5% CO<sub>2</sub> en aire. Luego, se evaluaron distintos parámetros con el fin de optimizar la respuesta quimiotáctica en la cámara del ESE. Los parámetros evaluados fueron: 1) Concentración de FF (diluciones 1:10<sup>3</sup> a 1:10<sup>5</sup>); 2) Tiempo de incubación en la cámara del ESE (15, 20, 25, 30 y 35 min) y 3) Concentración de spz (3, 4 y 5 mill/ml). Los resultados obtenidos indican que los espermatozoides responden quimiotácticamente al fluido folicular bovino. Y la respuesta quimiotáctica óptima se obtiene empleando una dilución de FF de 1:10<sup>4</sup>, colocando una concentración espermática de 3 mill/ml e incubándolos por 30 min en la cámara del ESE. Estos resultados comprueban que los espermatozoides de porcino también responden quimiotácticamente a fuentes de atractantes heterólogas y que éstas, pueden emplearse como control positivo para la identificación de otras sustancias atractantes o las condiciones fisiológicas en las cuales ocurre este mecanismo de atracción.