

Universidad de la República

PEDECIBA BIOLOGÍA

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Ciencias Fisiológicas

# EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN MATERNA SOBRE LA GESTACIÓN TEMPRANA EN OVINOS: ÉNFASIS ENDÓCRINO- METABÓLICO



Lic. Victoria de Brun

Orientador: PhD. Ana Meikle

Co-orientador: PhD. Alfonso Abecia  
PhD. Cecilia Sosa

Laboratorio de Técnicas Nucleares  
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República

Departamento de Producción Animal y Ciencias de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

“Lo maravilloso de aprender algo es que nadie puede arrebatárnoslo”.

Martin Luther King

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado, un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

“Don’t follow your dreams; chase them”...

R Dumb

## **AGRADECIMIENTOS**

No siento este logro propio, este logro es compartido. No hubiese sido posible para mí concluir esta tesis si no fuera por la ayuda y compañía de todos ustedes...

Agradezco a mi familia, por estar a mi lado en cada etapa, por alentarme y acompañarme en mis logros. A papá, mamá y Claudio, gracias por aconsejarme y apoyarme en las decisiones que elijo para este camino, la vida. Gracias por su confianza, por estar siempre, y por los valores, por enseñarme a no aflojar, aún en momentos difíciles. Gracias por el esfuerzo puesto todo este tiempo para que siga adelante, construyendo mi carrera.

A Ana Meikle, mi tutora, quien me guió a través de este camino que es la ciencia. Gracias por confiar y creer en mí, incluso en momentos en que yo pensaba que estaba todo perdido. Gracias por valorar mi esfuerzo, y por tenerme paciencia, por tu ayuda, por promover siempre el crecimiento personal. Siento que recién empiezo a caminar por este sendero. A Alfonso Abecia, mi co-tutor, por brindarme la oportunidad de viajar a Zaragoza, por su calidez y hospitalidad durante las pasantías en Zaragoza, y por su confianza durante el transcurso de esta tesis. A Cecilia Sosa, mi co-tutora, por hacernos sentir como en casa durante las estancias en Zaragoza, por brindarnos su tiempo, por su ayuda y por estar siempre presente desde el otro lado.

A mis compañeras del laboratorio: Isa, Mile, Paula P, Paula N, Andi, Gretel y Claudia. Es realmente lindo compartir los días con ustedes. Gracias por su cariño diario, y por estar disponibles para dar una mano o “prestar una oreja”. Gracias por su calidez. A Isa, por tu apoyo técnico y optimismo constante, por estar siempre disponible, por enseñarme tanto. A Mariana Carriquiry, por su asistencia estadística y técnica, que fue indispensable para el desarrollo de esta tesis.

A Paco y Mile, por su compañía y compañerismo. Fue muy lindo disfrutar de los días en Zaragoza con ustedes.

A Gustavo y Pepín, quienes nos recibieron siempre con una sonrisa, por estar siempre atentos a lo que necesitáramos.

Por último, pero no menos importante...a mis amigos. Por bancarme durante todo este proceso y en la vida...

A Fran, Valen, Mai y Romi, mis amigas biólogas. Gracias por escucharme siempre!, por compartir la locura de la biología. Por tantas horas de estudio y risas. Por tantos momentos vividos... Sin dudas este camino no sería tan lindo sin ustedes. Por tener

siempre una palabra justa para decirme, por su incondicionalidad. Gracias también al “sobri” que con su llegada nos iluminó a todas!.

A mis amigas de siempre: Ali, Silvi, Noe, Borre, Amen, Rosi. Gracias!!, por estar y haber estado siempre para mí, en muchas y distintas situaciones. Por bancarme cuando me pongo insoportable, y por darme consejos cuando los necesito. Por entenderme y por su amistad incondicional. A Ali, gracias por las largas y productivas horas de estudio!, determinantes durante el desarrollo de la tesis.

A toda la barra linda de Ciencias: Eri, Mauri, Juan, Vicen, Fola, Guille, Marce, Valen, Romi, Fran, Mai. Gracias por todos los momentos compartidos y por compartir!!.

A todos, ¡Gracias! Por estar ahí cada día, por permitirme caminar a su lado.

## TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	11
SUMMARY .....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
Importancia de la eficiencia reproductiva .....	13
Ciclos reproductivos en la oveja .....	13
<i>Ciclo estral</i> .....	14
<i>Gestación temprana</i> .....	16
Mecanismos de acción hormonal .....	17
Nutrición y reproducción.....	19
<i>Mediadores entre el estado metabólico y el sistema reproductivo</i> .....	20
<i>Efectos de la subnutrición sobre el desarrollo folicular y calidad del oocito</i> .....	22
<i>Efectos de la subnutrición sobre las concentraciones de progesterona</i> .....	23
<i>Influencia de la subnutrición sobre el desarrollo embrionario y el ambiente uterino</i> .....	24
Planteo de la presente tesis.....	26
HIPÓTESIS .....	26
OBJETIVOS .....	27
<i>General</i> .....	27
<i>Específicos</i> .....	27
METODOLOGÍA.....	28
Diseños experimentales .....	28
<i>Aspectos generales</i> .....	28
Determinaciones en plasma, tracto reproductivo e hígado .....	31
<i>Metabolitos</i> .....	31
<i>Hormonas</i> .....	31
<i>Transcriptos</i> .....	31
Análisis estadístico.....	32
RESULTADOS.....	33
Subnutrición y variables reproductivas .....	33
Subnutrición, variables endócrino-metabólicas y estado reproductivo .....	35
Efecto local del Cuerpo Lúteo .....	37

DISCUSIÓN.....	38
Subnutrición y variables reproductivas .....	38
Subnutrición y expresión génica en el tracto reproductivo .....	43
Efecto local del Cuerpo Lúteo .....	44
CONCLUSIONES.....	45
CONSIDERACIONES FINALES .....	46
REFERENCIAS .....	47

## APENDICE

Los experimentos llevados a cabo fueron sintetizados en los artículos que se especifican debajo y que en la presente tesis se refieren como Artículos I, II y III:

- I.** V. de Brun, A. Meikle, A. Casal, M. Sequeira, I. Contreras-Solís, M. Carriquiry, F. Forcada, C. Sosa, J. A. Abecia. Periconceptual undernutrition modifies endocrine profiles and hepatic gene expression in sheep. Enviado y aceptado con modificaciones en: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.
- II.** V. de Brun, A. Meikle, F. Forcada, I. Palacín, L. Sánchez-Prieto, C. Sosa, J. A. Abecia. Nutritional level of the receptor ewe, but not of the donor, determines the embryo fate when good quality embryos are transferred. (*En preparación*).
- III.** V. de Brun, J. A. Abecia, A. Fernandez-Foren, M. Carriquiry, F. Forcada, M. I. Vazquez, A. Meikle and C. Sosa. Undernutrition and laterality of the corpus luteum affects gene expression in oviduct and uterus of pregnant ewes. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2013: 11(4), 989-996.

## ABREVIATURAS

ADIPOR1	Receptor de Adiponectina 1
ADIPOR2	Receptor de Adiponectina 2
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BEN	Balance energético negativo
CC	Condición corporal
ADNc	Ácido desoxi-ribonucleico complementario
CL	Cuerpo lúteo
E	Estrógenos
E2	Estradiol
eCG	Gonadotropina coriónica equina
ER	Receptor de estrógenos
FSH	Hormona folículo-estimulante
GH	Hormona de crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
IFNt	Interferón
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBP	Proteína de unión al IGF
IGF1R	Receptor de IGF tipo 1
IGF2R	Receptor de IGF tipo 2
IRMA	Ensayo inmunorradiométrico
LH	Hormona luteinizante
M	Mantenimiento
Ob-R	Receptor de leptina
P4	Progesterona
PBS	Solución fosfato salina
PG	Prostaglandina
PR	Receptor de progesterona
PV	Peso vivo
RIA	Radioinmunoanálisis

## RESUMEN

En esta tesis se presentan los resultados derivados de la investigación de los efectos de la subnutrición sobre la fertilidad y las modificaciones endócrino-metabólicas maternas, así como la expresión génica hepática y del tracto reproductivo durante la gestación temprana o ciclo estral en ovejas adultas Rasa Aragonesa.

A partir de antecedentes evidenciando que las ovejas subnutridas presentan menores tasas de gestación, la hipótesis de partida de este trabajo fue que la fertilidad disminuida de los animales subnutridos es el resultado de efectos sobre el embrión y sobre el ambiente materno. Además, el éxito reproductivo estaría asociado al estado endócrino-metabólico, y a la expresión génica hepática y del tracto reproductivo materno. Se incluyen 3 experimentos utilizando el mismo tipo de subnutrición, (la mitad de los requerimientos diarios de mantenimiento, 0,5 M), en ovejas. En el experimento I, se estudió el perfil endócrino-metabólico materno y la expresión génica hepática durante la preñez temprana (día 7). Se encontró que los animales subnutridos presentaron menores concentraciones de insulina, IGF1 y leptina, y ARNm de *IGFBP5* y mayor ARNm de *IGFBP2* que los animales controles. Asimismo, las ovejas subnutridas preñadas presentaron mayor expresión hepática del ARNm de *IGFBP4* y *ADIPOR2* que las ovejas subnutridas no preñadas. En el experimento II, mediante un modelo de transferencia embrionaria se estudió si las fallas reproductivas asociadas a la subnutrición se deben a factores del embrión, maternos o ambos. Se encontró que cuando se transfieren embriones de buena calidad, independiente del estado nutricional de la donadora, los animales subnutridos presentan una mayor mortalidad embrionaria que los animales controles. Esto se asoció con las menores concentraciones de insulina, adiponectina y P4 encontradas en animales subnutridos que perdieron el embrión entre los días 18 y 40 de preñez. El experimento III confirmó la hipótesis de que la subnutrición afecta la expresión génica del tracto reproductivo. Se encontró una mayor expresión de *PR* y menor expresión de transcritos de *IGF2* en el oviducto e *IGF1* en el útero al día 5. Asimismo, se observó mayor expresión de transcritos de *PR*, *ER* e *IGF2* en el oviducto contralateral al cuerpo lúteo en relación al ipsilateral, lo que podría deberse a un ambiente hormonal diferencial establecido por la distribución local de esteroides ováricos.

Estos resultados reafirmaron el concepto de que la subnutrición modifica el ambiente endócrino materno (sistémico, expresión génica hepática y del tracto reproductivo), lo que podría explicar la mayor tasa de mortalidad embrionaria encontrada en animales sometidos a un período corto de restricción alimenticia.

## SUMMARY

This thesis investigated the effects of undernutrition on fertility and maternal endocrine responses, and the gene expression of the liver and the reproductive tract during early pregnancy or estrous cycle in adult Rasa Aragonesa ewes. Since literature showed that undernourished ewes presented lower pregnancy rates, the hypothesis of this thesis was that decreased fertility in undernourished animals is the result of effects on the embryo and the maternal environment. In addition, reproductive success would be associated with the endocrine-metabolic status, and the gene expression of the liver and the reproductive tract of the mother. Three experiments, using the same type of undernourishment, (half of maintenance requirements, 0.5 M) in adult ewes, were included. In experiment I, the maternal endocrine-metabolic profile and the hepatic gene expression during early pregnancy (day 7) was studied. Undernourished animals had lower levels of insulin, IGF1 and leptin and lower liver *IGFBP5* mRNA expression, and higher *IGFBP2* mRNA than control animals. Undernourished pregnant ewes had higher hepatic *IGFBP4* and *ADIPOR2* mRNA expression than undernourished non pregnant ewes. In experiment II, using a model of embryo transfer, we studied whether reproductive failure associated with undernutrition is due to effects on the embryo, on the maternal environment or both. Undernourished animals have higher embryonic mortality than control ewes when good quality embryos are transferred. This was associated with lower concentrations of insulin, adiponectin and P4 found in undernourished animals that lost their embryo between days 18 and 40 of pregnancy. Experiment III confirmed the hypothesis that undernutrition affects gene expression in the reproductive tract. Greater oviductal gene expression of *PR* and lower gene expression of *IGF1* in uterus and *IGF2* in oviduct were found on day 5. Also, increased expression of *PR*, *ER* and *IGF2* transcripts was observed in the contralateral oviduct in relation to the ipsilateral, which probably relates to different hormonal milieu established by the local distribution of ovarian products to the ipsilateral reproductive tract.

These results reaffirmed the concept that maternal undernutrition modifies endocrine environment (at systemic, hepatic gene expression and reproductive tract levels), which could explain the higher rate of embryonic mortality found in animals subjected to a short period of food restriction.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Importancia de la eficiencia reproductiva**

La eficiencia reproductiva, definida como el número de descendientes viables producidos anualmente por cada hembra destinada a la reproducción, es uno de los factores más importantes que determina la eficiencia productiva y por lo tanto económica de los sistemas de explotación ovina (Azzarini, 2002). La nutrición, el fotoperíodo y el estrés ejercen efectos profundos sobre la actividad reproductiva (Martín, 1995). A pesar de los esfuerzos y recursos puestos históricamente en el manejo reproductivo, las pérdidas por fallas reproductivas siguen siendo considerables (Kleemann y Walker, 2005). En la especie ovina, hasta un 40% de las ovulaciones no se corresponden con embriones viables el día 12 de gestación (Ashworth, 1995). De hecho, se ha observado que entre un 25 y un 55 % de todos los embriones mamíferos se pierden durante la gestación temprana (Niswender y Nett, 1994). Se ha postulado que la mortalidad embrionaria en la etapa de pre-implantación se debe a problemas en la señalización entre el embrión y la madre (Goff, 2002). Hasta la implantación, el embrión se desarrolla libremente en el oviducto y en el útero y depende de sus secreciones (Ashworth, 1995; Fleming *y col.*, 2004; Spencer *y col.*, 2004a). Una sincronía estricta entre el ambiente materno y el embrión es esencial para asegurar la supervivencia embrionaria: tanto el endometrio como el embrión, sintetizan y secretan a la interfase embrio-maternal una miríada de factores de crecimiento, proteínas, citoquinas, hormonas y otras sustancias que afectan a ambas partes, ya sea en forma autócrina o parácrina, y que determinan dicha sincronía (Martal *y col.*, 1997).

### **Ciclos reproductivos en la oveja**

La función reproductiva en la hembra está dominada por dos ritmos diferentes: uno anual, que es el período en el cual la oveja está receptiva desde el punto de vista reproductivo (este episodio es dependiente del fotoperíodo de día corto), y otro que se da durante la estación reproductiva en períodos sucesivos cortos en forma de ciclos sexuales o estrales de aproximadamente 17 días. La oveja es receptiva únicamente en un período de tiempo de 24 a 36 horas (celo), y de no quedar preñada repetirá todo el ciclo mientras dure el fotoperíodo corto.

### Ciclo estral

Los ciclos estrales ocurren en base a una secuencia de acontecimientos endócrinos principales en los que participan varios órganos y hormonas por ellos secretadas: el hipotálamo, con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); la hipófisis, con la hormona luteinizante (LH) y la folículo-estimulante (FSH); los ovarios, secretando estrógenos (E); la progesterona (P4) y la oxitocina en el cuerpo lúteo (CL); y el útero, liberando prostaglandina (PG) F2 $\alpha$  (Goodman, 1994). La GnRH hipotalámica estimula el aumento de frecuencia de LH hipofisaria, la cual induce al crecimiento del folículo ovulatorio productor de E que permite la ovulación y la formación del CL. La P4 producida por el CL se mantiene elevada durante 12-14 días determinando la fase luteal. El predominio de la P4 hace que al cabo de esa fase se establezca un mecanismo de retroalimentación positivo en el cual la oxitocina hipofisaria y luteal favorecen el aumento de la secreción pulsátil de PGF2 $\alpha$  endometrial que por la anastomosis vena uterina-arteria ovárica – mecanismo de contracorriente- llega al ovario y desencadena la regresión del CL o luteólisis en los días 14 a 16 del ciclo sexual, (con la subsiguiente caída en las concentraciones de P4). En este momento comienza nuevamente el predominio estrogénico durante 2-3 días, determinando la fase folicular del ciclo sexual. De esta manera, la oveja retorna al celo completando su ciclo estral de 17 días (Goodman, 1994). Sin embargo, si tras la ovulación se produce la fertilización y el reconocimiento materno, el interferón tau (IFNt) secretado por el embrión inhibe la liberación pulsátil de PGF2 $\alpha$  a través de la inhibición de la expresión de receptores de oxitocina, impidiendo que ocurra la luteólisis, promoviendo de esta manera el desarrollo embrionario (Spencer y col., 2004a).

El control de la función del tracto reproductivo está finamente regulado, principalmente por las hormonas esteroideas sexuales. El oviducto sufre alteraciones estructurales (modificaciones en la altura, forma y secreción de las células) que están acorde a la funcionalidad específica de las diferentes partes del mismo (Murray, 1995). Cuando ovejas ovariectomizadas son tratadas con estradiol (E2), los organelos de las células secretoras del oviducto se hipertrofian, y este evento es revertido con el posterior tratamiento con P4 (Murray, 1992; Leese y col., 2001). El fluido existente en la luz del tracto reproductivo es un medio complejo formado por trasudado de la sangre y por secreción activa de las células epiteliales (Walker y col., 1996). En el oviducto, el producto de secreción más abundante es un grupo de glicoproteínas de alto peso molecular, específico del oviducto, aunque también se secretan factores de crecimiento y citoquinas. Las glicoproteínas se unen a la zona pelúcida y a las

membranas de los gametos y son esenciales para la capacitación, motilidad y viabilidad espermáticas y para el correcto desarrollo embrionario temprano (Murray y *col.*, 1995; Leese y *col.*, 2001; Buhi, 2002). Se ha demostrado que su secreción está regida por ambas hormonas esteroideas, siendo aumentada por los E y disminuida por la P4 (Murray y *col.*, 1995; Buhi, 2002). Esto asegura una sincronización con la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Los esteroides ováricos también pueden regular la composición de las secreciones, ya que el fluido del oviducto de la fase folicular tiene diferentes efectos sobre la capacidad y motilidad de los espermatozoides y la penetrabilidad de los oocitos (Killian, 2004). También están presentes en el fluido del oviducto factores embriotróficos y mitogénicos, como los factores de crecimiento, en cantidades variables (Gandolfi y *col.*, 1989). Potencialmente, estos factores actúan de manera autócrina o parácrina para regular la función del oviducto y/o el desarrollo embrionario (Buhi y *col.*, 1997). Stevenson y Wathes (1996) demostraron que el oviducto ovino sintetiza el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1) y que éste aumenta en el período peri-ovulatorio. Asimismo, se ha propuesto que el IGF2 podría tener un papel más predominante en etapas tempranas (día 5) del desarrollo embrionario y no ser tan relevante en etapas tardías (Kaye, 1997).

El endometrio también sufre una serie de transformaciones cíclicas en respuesta a la fluctuación de los niveles sanguíneos de las hormonas ováricas (Fawcett, 1988; Hafez, 1996). Los E producen un notable crecimiento uterino. Durante la fase folicular, las glándulas crecen, penetran profundamente en el estroma y comienzan a enrollarse, pero su capacidad secretoria plena se da bajo la influencia de la P4 (Niswender y Nett, 1994). La P4 actúa en el útero asegurando su quiescencia, estimulando y manteniendo las funciones secretorias endometriales esenciales para el desarrollo temprano del embrión, implantación, placentación y un correcto desarrollo fetoplacentario hasta el término de la gestación (Graham y Clarke, 1997). Si bien la P4 circula de forma sistémica, se ha reportado que puede pasar de la vena a la arteria ovárica por un mecanismo de contracorriente (Einer-Jensen y McCracken, 1981), y así alcanzar directamente al oviducto y al útero (Hunter y *col.*, 1987). Esto resulta en un gradiente de P4 a lo largo del tracto reproductivo: es decir, la región más cercana al CL presenta una concentración mayor de P4 (Weems y *col.*, 1989), pudiendo influenciar el desarrollo embrionario temprano de forma diferencial acorde a la localización del embrión en el tracto reproductivo (ipsi o contralateral al CL). Esto es consistente con reportes donde la fertilidad es mayor cuando los embriones se transfieren en el cuerno uterino adyacente al CL que cuando son transferidos al cuerno

uterino contralateral (Del Campo y col., 1979). Es interesante remarcar que si bien estos hallazgos están establecidos desde hace tiempo, hay escasa información respecto a la funcionalidad del tracto reproductivo acorde a la posición del CL. *Más aún, si bien existe abundante información acerca de la expresión génica oviductal y uterina en rumiantes y su regulación, numerosos trabajos no informan sobre la localización de la muestra de estudio respecto el CL y se desconoce la importancia del mismo sobre la regulación de la expresión génica.*

Se han descrito numerosos factores que el endometrio secreta a su luz que son muy importantes para el correcto desarrollo del embrión. El IGF1, secretado en forma endócrina por el hígado pero también parácrina por el útero, es uno de los principales factores que incrementan el desarrollo embrionario (Wathes y col., 1998; Watson y col., 1999). También el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2) se asocia al desarrollo embrionario en la etapa de pre-implantación y al desarrollo placentario (Wathes y col., 1998). Estos factores de crecimiento podrían estimular el desarrollo embrionario directamente, o indirectamente, estimulando la secreción endometrial. La composición del fluido uterino es compleja y aún se está dilucidando, pero lo que parece ser más importante para el correcto desarrollo del embrión es que éste sea sincrónico con la etapa de la gestación en que el útero se encuentre.

### Gestación temprana

Tras la fertilización, el embrión sufre sus primeras divisiones celulares en el oviducto y alcanza el útero alrededor del día 4 post-celo, como mórula compacta (Spencer y col., 2004b). Hacia el día 6 se forma el blastocisto por compactación de la mórula compacta y entrada de líquido extracelular tras lo cual se forma una cavidad rodeada por células trofoblásticas. El blastocisto, en su forma esférica, eclosiona de la zona pelúcida en los días 8 a 9 (Spencer y col., 2004b). Hacia el día 11 va adoptando una forma tubular y luego se elonga convirtiéndose en un embrión filamentoso entre los días 12 y 16 (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). La elongación del blastocisto marca el comienzo de la implantación, aunque la adhesión firme al endometrio no ocurre hasta el día 16 (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). Hasta la implantación, el embrión se desarrolla libremente en el oviducto y en el útero y depende de sus secreciones (Ashworth, 1995; Fleming y col., 2004; Spencer y col., 2004b). La importancia de esta etapa en la supervivencia embrionaria se pone de manifiesto en la alta incidencia de mortalidad embrionaria que ocurre en este momento de la gestación (Roche y col., 1981; Goff, 2002).

Durante el ciclo reproductivo, los órganos sexuales de los mamíferos sufren cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, que tienden a establecer un microambiente que es esencial para la maduración final de los gametos, capacitación de los espermatozoides, transporte de los gametos y embriones, fertilización y divisiones tempranas en el desarrollo embrionario (Nancarrow y Hill, 1995; Buhi, 2002). Si bien se acepta que los embriones en la etapa de pre-implantación son relativamente autónomos, durante la última década se han acumulado numerosas evidencias sobre la participación en esta etapa de muchas hormonas y factores de crecimiento que determinan la viabilidad futura del embrión (Kaye, 1997). Más aún, un ambiente perturbado puede no afectar al embrión inmediatamente, pero comprometer su desarrollo en etapas posteriores (Leese, 2005). Esta puntualización debe ser tomada en cuenta ya que la mortalidad embrionaria en la etapa de pre-implantación tardía (en útero) puede haberse determinado en etapas anteriores (en oviducto).

### **Mecanismos de acción hormonal**

Las hormonas producidas por los diferentes órganos son secretadas al torrente sanguíneo, donde se distribuyen a todos los tejidos. A pesar de que las hormonas llegan a todo el organismo, sólo algunos tejidos tienen la capacidad de responder a ellas; éstos son los tejidos diana. Esta especificidad tisular se debe a que las hormonas se unen a receptores específicos ubicados en las células de los tejidos diana. La respuesta celular a la hormona (o sensibilidad) está dada en parte por la concentración de receptores específicos en dicho tejido (Katznellbogen, 1980). Por tanto, la modulación de la concentración de estas proteínas constituye el paso más probable en el control de las respuestas celulares (Clark y Mani, 1994). Las proteínas receptoras se unen a la hormona (ligando) con alta afinidad (en el rango de las concentraciones circulantes de hormona), tienen una capacidad de unión limitada (es decir, son saturables), y su interacción con la hormona induce una respuesta biológica en los tejidos sensibles. Sin embargo, el mecanismo de señalización hormonal dentro de la célula es diferente dependiendo de la naturaleza química de las hormonas.

Por ejemplo, las hormonas esteroideas, como la P4 y los E, se unen a receptores específicos de localización nuclear (PR y ER, respectivamente), así como el resto de los receptores de hormonas esteroideas, forman parte de una gran familia de factores de transcripción activados por el ligando y comparten características estructurales. La unión de la hormona a su receptor conlleva cambios de conformación que convierten

al complejo hormona-receptor inactivo en activo (lo cual implica su dimerización), y posibilita la unión a sitios específicos en el ADN, activando genes y estimulando su transcripción para producir ARN mensajeros (ARNm). Los ARNm son traducidos en los ribosomas citoplásmicos produciendo proteínas que influyen en la función celular. En algunos casos la interacción del receptor con los genes puede ser represiva. Una vez que el complejo hormona-receptor interactuó con un gen, el receptor sufre reacciones que resultan en su reciclaje o destrucción (Clark y Mani, 1994). Se ha descrito que esta acción del receptor nuclear como factor de transcripción (acción genómica) también puede ser causada en ausencia del ligando, por otras moléculas, por ejemplo, factores de crecimiento o neurotransmisores capaces de activar a los receptores (Auger, 2001; Flint y *col.*, 2002).

Además de este mecanismo de acción a nivel genómico (“clásico”), existe un mecanismo de acción no genómica por unión de las hormonas esteroideas a receptores ubicados en la membrana celular y desencadenamiento de cascadas de segundos mensajeros (Revelli y *col.*, 1998; Dunlap y Stormshak, 2004; Nadal y *col.*, 2004; Ashley y *col.*, 2006). Las acciones no genómicas son rápidas, inmediatas, mientras que las acciones genómicas tardan minutos, horas o días.

Los factores de crecimiento son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. Su mecanismo de acción siempre comienza al unirse a receptores específicos de membrana. Para cada clase de factor de crecimiento existe un receptor o conjunto de receptores específicos de tal forma que las células responden a un factor de crecimiento sólo si disponen de la proteína receptora apropiada. En el caso de los IGFs, la mayor parte de las acciones de ambos están mediadas por IGF1R, que tiene alta afinidad por IGF1 e IGF2. El IGF2R (con una alta afinidad principalmente por el IGF2) no tiene una función de señalización y se considera que elimina el exceso de IGF2 de la circulación (Wathes y *col.*, 1998). Estos factores son el estímulo necesario para iniciar una cadena de eventos celulares que tienen como resultado distintas funciones. El proceso está mediado por un sistema de segundos mensajeros en el que interviene una proteína tirosínquinasa. La activación de esta proteína desencadena una señalización intracelular donde se produce la activación, mediante fosforilación, de otras proteínas involucradas en las acciones de IGF.

## Nutrición y reproducción

El estado metabólico puede definirse como la cantidad de nutrientes y energía que están disponibles para el animal en un determinado momento, y depende de la cantidad de alimento consumido, de la cantidad de reservas corporales y del ritmo de utilización de la energía (Blache y *col.*, 2006). Los cambios en el estado metabólico son un regulador importante de la actividad reproductiva, pudiendo actuar a diferentes niveles en el eje reproductivo.

Aunque se sabe que la nutrición tiene influencia sobre la función reproductiva en los rumiantes, esta relación es compleja, y ha sido ampliamente revisada (Rhind, 1992; Chilliard y *col.*, 1998; O'Callaghan y Boland, 1999; Abecia y *col.*, 2006). Las diferentes aproximaciones al estudio de la relación entre la nutrición y la reproducción (diferencias en el ambiente, edad y raza de los animales, composición de las dietas, duración de los tratamientos nutricionales y el momento de su implementación con respecto al ciclo sexual) hacen que los múltiples resultados publicados a veces parezcan contradictorios y que su comparación e interpretación sea difícil. En ovinos, uno de los aspectos más estudiados quizá sea el efecto de la sobrealimentación o suplementación (flushing), como herramienta para incrementar la tasa de ovulación. Sin embargo, es la subnutrición (la alimentación por debajo de los requerimientos para el mantenimiento del peso vivo) la que se presenta como problema en los rebaños comerciales, principalmente en lugares donde la alimentación está basada en el pastoreo. En los sistemas extensivos, el esquema nutricional al que están sometidos los animales presenta grandes fluctuaciones a lo largo del año y entre años (Lindsay y *col.*, 1993). A pesar de que los requerimientos energéticos para el crecimiento folicular, la ovulación y la gestación temprana son muy bajos comparados con los requerimientos para el mantenimiento, una nutrición inadecuada puede tener efectos deletéreos importantes en la reproducción (O'Callaghan y Boland, 1999).

Una forma de conocer el estado de las reservas corporales de un animal es a través de la evaluación de su peso vivo (PV) y de su condición corporal (CC). La CC se determina evaluando manualmente el grado de cobertura grasa del proceso espinal y las apófisis transversas de las vértebras lumbares, asignando a cada estado un valor (Russel, 1969). Si bien la composición corporal varía según la raza, la edad y el estado fisiológico, cuando los animales están bajo las mismas condiciones, el uso del PV y la CC para evaluar su estado de reservas corporales es muy conveniente.

Los efectos de la nutrición sobre las variables reproductivas pueden ser “agudos” cuando no están reflejados por cambios en el PV o CC; “estáticos” cuando reflejan diferencias mantenidas en el PV o la CC debido a la historia nutricional o fisiológica de las semanas/meses previos, o “dinámicos” cuando obedecen a cambios de PV o CC en períodos más cortos (días/semanas) (Chilliard y col., 1998; Scaramuzzi y col., 2006).

#### *Mediadores entre el estado metabólico y el sistema reproductivo*

En la oveja, las mayores demandas energéticas ocurren durante el crecimiento, la gestación avanzada y la lactación. Scaramuzzi y col., (2006) sugirieron que los requerimientos energéticos para la foliculogénesis y gametogénesis no son significativos, comparados con las necesidades generales del organismo. Es posible que tampoco lo sean durante la gestación temprana. Es más probable que los efectos de los cambios en el estado metabólico sobre la gestación temprana se ejerzan más debido a una señalización diferencial de las hormonas metabólicas, que a una falta de nutrientes *per se*.

El sistema endócrino regula el metabolismo, afinando los procesos de entrega de información, que tienen como finalidad mantener la homeostasis. Las vías de señalización son complejas, e involucran varios metabolitos y hormonas, como la hormona de crecimiento (GH), los factores de crecimiento que comprenden el sistema IGF, insulina, leptina y adiponectina.

La familia IGF está integrada por IGF1 e IGF2 que son sintetizados principalmente en el hígado, pero también pueden ser sintetizados localmente en la mayoría de los órganos por lo que pueden actuar de forma endócrina, parácrina y autócrina (Thissen y col., 1994). Durante la subnutrición, el eje GH-IGF se desacopla en el hígado, resultando en una reducción del IGF1 circulante, a pesar de las altas concentraciones de GH (Thissen y col., 1994; Chilliard y col., 1998; Kobayashi y col., 1999). Este desacoplamiento puede ser el resultado de un estado de resistencia a la GH (por una expresión hepática de receptor de GH disminuida, especialmente el 1A), que ocurre durante una restricción en el consumo (Ketelslegers y col., 1995; Breier, 1999). Además, se ha reportado que las bajas concentraciones de insulina se asocian al desacoplamiento GH-IGF1, ya que su aumento restablece la sensibilidad hepática a la GH (Kobayashi y col., 1999). Por otro lado, las modificaciones en la dieta cambian la abundancia sérica de las proteínas de unión a IGF (IGFBP) en animales y humanos (Thissen y col., 1994). La actividad de los IGFs está modulada por seis proteínas de

unión a IGF (IGFBPs). En el tracto reproductivo ovino se ha demostrado la expresión del ARNm de IGF1, IGF2 y sus receptores, y algunas de las IGFBPs (Stevenson y *col.*, 1994; Stevenson y Wathes, 1996; Reynolds y *col.*, 1997). Además de estimular la proliferación y diferenciación uterina, ambos IGFs estimulan el desarrollo de los embriones durante la pre-implantación, actúan en el desarrollo fetal y controlan el desarrollo placentario (Wathes y *col.*, 1998; Keller y *col.*, 1998).

La insulina tiene múltiples efectos en el metabolismo; entre los más importantes está el facilitar la entrada de glucosa a las células desde la circulación general y estimular el almacenamiento de lípidos. El incremento de la entrada de glucosa a las células ha sido relacionado positivamente con los aumentos en la tasa ovulatoria en ovejas (Downing y *col.*, 1995). Durante la subnutrición, la disminución en las concentraciones de glucosa es acompañada por una disminución en las concentraciones de insulina (Sosa y *col.*, 2006). Así, el anabolismo es inhibido directamente por la disminución en las concentraciones de insulina, e indirectamente por la falta de efecto estimulador de la insulina sobre la sensibilidad de GH (receptores de GH) que limita la síntesis hepática de IGF1.

Por otro lado, las adipoquinas también presentan un papel fundamental en el metabolismo. Entre ellas se encuentra la leptina, péptido sintetizado principalmente por el tejido adiposo, aunque también se expresa (en menor medida) en otros tejidos como el hígado, páncreas y tracto reproductivo (González y *col.*, 2000, Chilliard y *col.*, 2005). Esta hormona se asoció en un principio con el control central del apetito, pero con el tiempo se ha demostrado que está implicada en múltiples procesos fisiológicos, tales como la inflamación, la hematopoyesis, la actividad inmune y la reproducción (Moschos y *col.*, 2002). Las concentraciones plasmáticas de leptina decrecen durante períodos de balance energético negativo (BEN) en rumiantes y se asocian a la disminución de la tasa metabólica, y el aumento del apetito (Meikle y *col.*, 2004; Chilliard y *col.*, 2005; Sosa y *col.*, 2009; Fernández-Foren y *col.*, 2011). Los receptores de leptina (Ob-R) han sido localizados en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y en el tracto reproductivo, vinculando así, indiscutiblemente, a la leptina con la reproducción (Moschos y *col.*, 2002). La síntesis de leptina y de su receptor ha sido demostrada en el endometrio de mujeres, ratas y bovinos (González y *col.*, 2000; Kawamura y *col.*, 2002; Sosa y *col.*, 2010a), y en ratas, se demostró que la leptina añadida al medio de cultivo promueve el crecimiento del embrión en la etapa de pre-implantación (Kawamura y *col.*, 2002).

Si bien ya hace 20 años de la existencia de la primera evidencia de una proteína altamente expresada por los adipocitos denominada adiponectina (Scherer y col., 1995) y de la abundante literatura reciente de su rol en el metabolismo y la reproducción, hay muy escasa información respecto del rol de adiponectina en ovinos (Kasimanickam y Kasimanickam, 2011). La adiponectina sensibiliza los tejidos periféricos a la insulina, aumentando el consumo de glucosa y la oxidación de ácidos grasos muscular (Ye y col., 2013; Saremi y col., 2014). La adiponectina también promueve la secreción de insulina estimulada por la glucosa. Además, la adiponectina también tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis energética, específicamente de lípidos y el metabolismo de la glucosa (Berg y col., 2001). Se han identificado dos tipos de receptores de adiponectina, (ADIPOR1 y ADIPOR2; Yamauchi y col., 2003), con funciones diferentes. ADIPOR1 está altamente expresado en el músculo esquelético, mientras que ADIPOR2 está altamente expresado en el hígado (Yamauchi y col., 2007). Se ha reportado que la adiponectina disminuye durante la lactación temprana, donde las vacas se encuentran en balance energético negativo (Giesy y col., 2012), *pero no se han encontrado reportes de adiponectina y/o la expresión de sus receptores específicos en ovejas sometidas a bajos planos de alimentación.*

#### *Efectos de la subnutrición sobre el desarrollo folicular y calidad del oocito*

En algunos trabajos se ha encontrado una menor tasa de ovulación en ovejas con una CC baja o subnutridas (McNeilly y col., 1987; Rhind y col., 1989c), mientras que en otros no se han encontrado diferencias en este parámetro (Lozano y col., 2003; Peura y col., 2003; Kakar y col., 2005). Las ovejas subnutridas tienen un menor número de folículos grandes (> 3 mm) que sus controles (McNeilly y col., 1987), aunque en otro trabajo esa diferencia se observó en ovejas superovuladas pero no en las no estimuladas (O'Callaghan y col., 2000b). Sosa y col., (2010b) observaron que un período corto de subnutrición se asocia con la presencia de grandes folículos en fase de crecimiento estática, sugiriendo un efecto deletéreo de la subnutrición sobre la funcionalidad de los folículos pre-ovulatorios, pudiendo comprometer la fertilidad. Viñoles y col. (2002) encontraron que la CC afecta los patrones de la dinámica folicular: ovejas con una CC alta mostraron más ondas foliculares en el período inter-ovulatorio y tuvieron más folículos antrales pequeños que ovejas con una CC baja. Cuando se estudió el efecto de la subnutrición sobre el número de folículos estrogénicos (los que secretan >500 pg de E2 por hora), no se encontró diferencia entre ovejas subnutridas y controles (Abecia y col., 1995; Abecia y col., 1997). Se ha

descrito que la calidad de los ovocitos (en cuanto a su morfología) de ovejas subnutridas es similar (O'Callaghan y col., 2000b; Boland y col., 2001), o inferior a las controles (Lozano y col., 2003). También se ha observado que los ovocitos de animales subnutridos tienen una menor tasa de fertilización que los obtenidos de ovejas alimentadas según sus requerimientos diarios de mantenimiento (O'Callaghan y col., 2000a; Lozano y col., 2003).

#### *Efectos de la subnutrición sobre las concentraciones de progesterona*

La literatura internacional es consistente que en ovinos, las concentraciones plasmáticas de P4 están inversamente relacionadas con el nivel nutricional (Williams y Cumming, 1982; Parr y col., 1987; Rhind y col., 1989b; Lozano y col., 1998; O'Callaghan y col., 2000b). Sin embargo, la producción in vitro de P4 por el CL no se ha visto afectada por la subnutrición (Abecia y col., 1995; 1997; 1999b), por lo que los mayores niveles plasmáticos de P4 no se explicarían por una mayor síntesis. Parr (1992) propuso que este fenómeno se debía a una mayor metabolización hepática de la hormona, más que a cambios en la tasa de secreción por el CL, dado que las ovejas mejor nutridas presentaban hígados más pesados y un mayor flujo sanguíneo en la vena porta. Además, los esteroides se almacenan selectivamente en el tejido adiposo, por lo que se ha sugerido que un régimen de alimentación que resulte en la lipólisis, llevará aparejado una liberación del esteroide almacenado (Boland y col., 2001).

Mientras que no se encontró un efecto de una mayor concentración plasmática de P4 sobre la calidad de los oocitos en ovejas sobrealimentadas (Parr y col., 1987; O'Callaghan y col., 2000b), en ovejas subnutridas se la ha asociado con mayores niveles de pérdidas embrionarias (Brien y col., 1981). La relación errática entre el nivel nutricional, las concentraciones plasmáticas de P4 y la supervivencia embrionaria, sugirieron que quizá la medición de P4 circulante no era suficiente como reflejo de la situación en el tracto reproductivo, y que deberían medirse las concentraciones de la hormona a nivel local (Rhind y col., 1989c). De hecho, como la P4 de la vena ovárica puede pasar a la arteria uterina por un mecanismo contracorriente (Einer-Jensen y McCracken, 1981), la llegada de la hormona al útero puede no estar reflejada por sus concentraciones circulantes. En este sentido, se ha observado que ovejas subnutridas tienen similares niveles de P4 en la vena ovárica y en la arteria uterina que ovejas controles en los días 5 y 10 del ciclo sexual o en el día 8 de la gestación (Abecia y col., 1997; Lozano y col., 1998). Las concentraciones similares de P4 en la vena ovárica y en la arteria uterina en ovejas subnutridas y controles, apoyan la teoría de una menor metabolización hepática en ovejas subnutridas. A pesar de que se encontraron niveles

plasmáticos de P4 mayores, Lozano y col. (1998) observaron que ovejas subnutridas tenían menores concentraciones de P4 en el tejido endometrial que las ovejas controles el día 5 del ciclo sexual. Como se ha discutido anteriormente, la P4 tiene un papel fundamental preparando al útero para una posible gestación, por lo que los autores sugirieron que los menores contenidos de P4 endometrial podrían estar relacionados con el retraso en el desarrollo de los embriones y las menores tasas de gestación que se han observado en ovejas subnutridas.

#### *Influencia de la subnutrición sobre el desarrollo embrionario y el ambiente uterino*

Comparado con la cantidad de estudios que investigan los efectos de la subnutrición sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, los estudios que investigan sus efectos sobre el desarrollo embrionario y el ambiente uterino son escasos.

En ovinos se ha demostrado que la subnutrición aumenta la mortalidad de los embriones el día 11 de la gestación tras 25 días de subnutrición (Rhind y col., 1989a). En otros trabajos con tratamientos nutricionales comparables, se ha recuperado un porcentaje similar de embriones en ovejas subnutridas y controles los días 4, 8 y 9, aunque los de ovejas subnutridas presentaban un retraso en su desarrollo (Abecia y col., 1997; 1999a; Lozano y col., 2003). Abecia y col. (1995; 1997; 1999b) no encontraron diferencias en las tasas de gestación debidas a la subnutrición en los días 8 y 9, pero sí en los días 14 y 15 de gestación. Se ha observado que aunque no hubo diferencia en la tasa de recuperación de embriones de día 5 en ovejas subnutridas y controles que partían de diferente CC (alta y baja), sí se observó que las ovejas que partían de una CC más alta presentaban mayores tasas de viabilidad embrionaria *in vitro* (Vázquez y col., 2009). Recientemente, hemos demostrado que en animales con una dieta de 0.5 de mantenimiento, se produce una reducción en el número de embriones totales y embriones transferibles viables, en comparación con animales en dieta de mantenimiento (Abecia y col., 2013).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha demostrado que las menores concentraciones de P4 endometrial observadas (Lozano y col., 1998) eran consistentes con menores contenidos de receptores de progesterona en útero (Sosa y col., 2004). Además, se observaron menor cantidad de receptores de estrógenos en útero que ovejas controles a día 5 del ciclo sexual, no encontrando diferencias en los días 10 o 14 del ciclo (Sosa y col., 2004; Sosa y col., 2006). Tampoco se observó un efecto de la subnutrición sobre la sensibilidad uterina a esteroides cuando se estudió ovejas gestantes de día 14 de gestación (Sosa y col., 2009). Una sensibilidad

disminuida del útero a los esteroides ováricos, como la encontrada a día 5, podría comprometer la viabilidad del embrión en momentos iniciales de la gestación. Sin embargo, a la luz de nuestros hallazgos, los efectos de la subnutrición sobre la expresión génica uterina parecen ejercerse en la fase luteal temprana (Día 5) más que en la fase luteal tardía (Día 10 o 14), por lo que los efectos de la subnutrición sobre el desarrollo embrionario observados los días 14 y 15 de gestación (Abecia y col., 1997) podrían ser reflejo de un ambiente materno inadecuado en el momento en que el embrión llega al útero, y que por lo tanto establezca una relación asincrónica entre la madre y el embrión.

Por otro lado, y como se mencionó anteriormente, IGF1 e IGF2 estimulan la proliferación y diferenciación uterina, y el desarrollo de los embriones durante la pre y post implantación (Wathes y col., 1998; Keller y col., 1998). *A pesar de que se acepta internacionalmente la importancia de los IGFs en la actividad uterina y el crecimiento embrionario, al momento de realizar esta tesis no encontramos información disponible respecto efectos de la subnutrición o balance energético negativo sobre la expresión de alguno de estos factores en el oviducto o en el útero ovino.*

## **Planteo de la presente tesis**

De lo expuesto anteriormente se desprende que, si bien están descritos los efectos causados por la subnutrición sobre la fertilidad, la viabilidad embrionaria y –en menor medida- sobre el ambiente uterino en ovinos, aún se desconocen los mecanismos por los que estos efectos se producen.

En primera instancia, no puede descartarse que los embriones producidos por ovejas subnutridas sean de una calidad inferior a los de ovejas controles debido a una calidad inferior del oocito que resulte en menores tasas de fertilización o en la producción de embriones con problemas de desarrollo, así como tampoco los efectos de la subnutrición sobre el ambiente endócrino sistémico y local del tracto reproductivo. Así, se hace imprescindible testear el impacto de la subnutrición sobre las tasas de preñez: ¿es a nivel del embrión, del ambiente materno o ambos? Para ello se busca aislar los efectos de la subnutrición sobre el embrión (madre donadora) o sobre la madre receptora, usando un modelo de múltiple ovulación y transferencia embrionaria. Además, es necesario ahondar en los efectos producidos a nivel de la expresión génica, tanto endometrial como hepática, así como también investigar integralmente las modificaciones del sistema endócrino materno que pueden desencadenar tales efectos. Por otro lado, la subnutrición está asociada a perfiles endócrinos metabólicos y una expresión génica hepática diferencial, pero aquellos animales subnutridos que han sido exitosos en gestar o en mantener la preñez, ¿difieren en la estrategia metabólica para afrontar la subnutrición de los que no?.

## **HIPÓTESIS**

La fertilidad disminuida asociada a la subnutrición es el resultado de efectos sobre el embrión y el ambiente materno. El éxito reproductivo está asociado al estado endócrino-metabólico materno y la expresión génica hepática y del tracto reproductivo.

## **OBJETIVOS**

### ***General***

Contribuir al conocimiento respecto de los mecanismos endócrino-moleculares de la subnutrición sobre los procesos reproductivos.

### ***Específicos***

- I. Determinar los efectos de la subnutrición sobre los perfiles metabólicos y endócrinos y sobre la expresión génica hepática del eje somatotrópico y de receptores de adipoquinas al día 7 de la preñez (Artículo I).
- II. Evaluar el efecto de la presencia de embrión sobre el estado metabólico y expresión génica hepática en ovejas subnutridas (Artículo I).
- III. Indagar respecto del origen en las reducciones en las tasas de preñez: ¿es debido a efectos producidos por el embrión, el ambiente materno o ambos? (Artículo II).
- IV. Investigar si existen diferencias en las señales metabólicas entre los animales subnutridos que fueron exitosos en mantener la preñez, y los animales que presentaron mortalidad embrionaria tardía (Artículo II).
- V. Determinar el efecto de la subnutrición y el efecto local del cuerpo lúteo (ispilateral vs. contralateral) sobre la expresión génica de receptores de estrógenos y progesterona y factores de crecimiento similares a insulina 1 y 2 en oviductos y cuernos uterinos (Artículo III).

## METODOLOGÍA

### Diseños experimentales

#### Aspectos generales

Todos los experimentos de esta tesis se realizaron en el Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España (Latitud 41°41'N), utilizando ovejas adultas de la raza Rasa Aragonesa durante la estación reproductiva descrita en cada uno de los artículos, para esta raza en esta latitud (Forcada y col.,1992). Los protocolos fueron aprobados por la Comisión Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

Para sincronizar los celos se utilizó un tratamiento intravaginal de 14 días con esponjas impregnadas en progestágenos (Acetato de Fluorogestona, 40mg, Intervet S.A., Salamanca, España), al cabo del cual se administraron entre 285 y 300 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) por vía intramuscular. Los celos (identificados como día 0 del ciclo sexual o de la gestación) se detectaron cada 8 horas.

Los animales se alimentaron una vez al día (por la mañana) en base a una dieta compuesta por concentrado y paja de cebada, con libre acceso al agua. El concentrado estuvo compuesto por cebada (85%) y soja (15%). En todos los experimentos los animales se alimentaron con dietas para proveer 1,5 o 0,5 veces los requerimientos diarios de mantenimiento (M) (AFRC, 1993). La dieta 1,5 M ofrecida colectivamente asegura un mantenimiento del PV y la CC (grupo control), mientras que la dieta 0,5 M provoca una disminución en el mismo período de tiempo de aproximadamente un 10% tanto en el PV como en la CC (grupo bajo) como ha sido demostrado anteriormente (Abecia y col., 1995; 1997; Lozano y col., 1998).

El PV y la CC de los animales se controlaron periódicamente durante los experimentos. La CC fue determinada por un único observador por palpación de las apófisis vertebrales en la región del lomo en una escala de 0 (emaciada) a 5 (obesa) (Russel, 1969).

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos con heparina. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 1000 g y el plasma se almacenó a -20°C hasta su análisis.

En la Figura 1 se muestra una representación esquemática de los tres experimentos

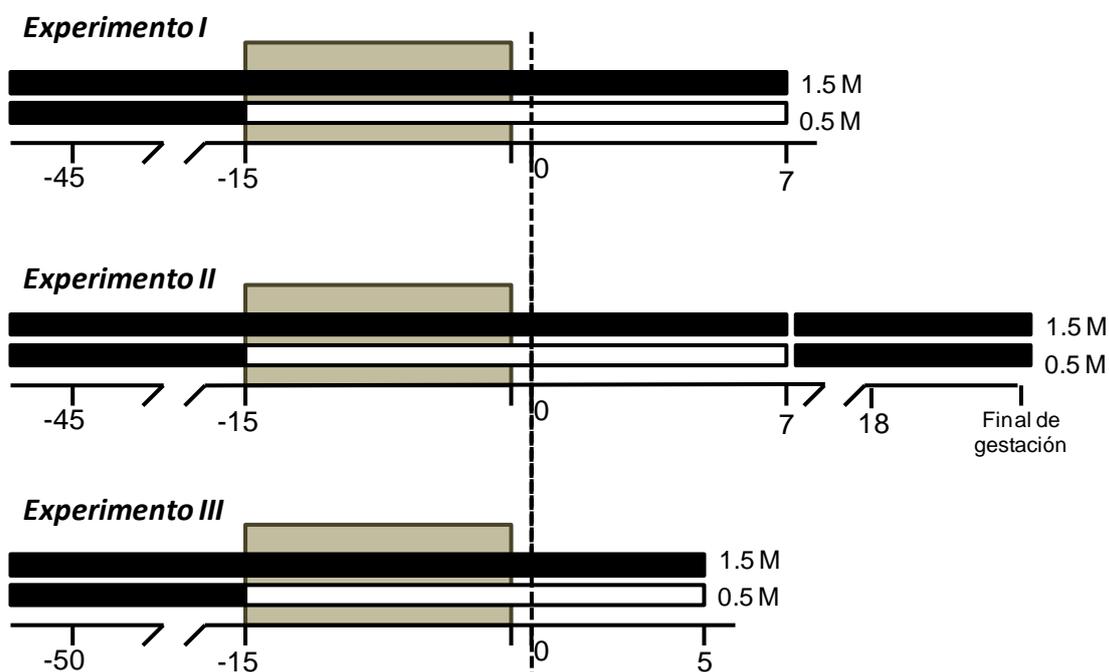


Figura 1. Representación esquemática de los diseños experimentales. Grupo control (barras negras); grupo bajo (barras blancas). El área sombreada de gris indica el período del tratamiento con progestágenos para la sincronización de celos. La línea punteada indica el día del celo (día 0) previo al sacrificio los días 5 y 7 (Experimentos I y III).

*Experimento I (Artículo I): “Periconceptional undernutrition modifies endocrine profiles and hepatic gene expression in sheep”.*

Se utilizaron 25 ovejas Rasa Aragonesa con un PV medio ( $\pm$  SEM) de  $67.1 \pm 8.6$  kg y una CC por encima de 3 (escala de 0 a 5; Russel, 1969). Los animales fueron categorizados en preñados o no preñados acorde a la presencia de embrión o no, al momento del sacrificio. Por lo tanto los grupos experimentales finales fueron: 9 animales controles preñados, 6 subnutridos preñados y 7 subnutridos no preñados. Tres animales controles no preñados fueron excluidos del análisis. El día 7 post-estro, luego de la colecta de embriones, se procedió al sacrificio eutanásico de los animales para la recuperación de muestras de hígado (Artículo I).

Experimento II (Artículo II): *“Nutritional level of the receptor ewe, but not of the donor, determines the embryo fate when good quality embryos are transferred”*.

Se utilizaron 97 ovejas Rasa Aragonesa, de las cuales 45 fueron utilizadas como donadoras (20 Control y 25 Subnutridas) y 52 (25 Control y 27 Subnutridas) como receptoras. Las dietas diferenciales se mantuvieron hasta el día de la colecta de embriones (día 7). Las ovejas donadoras fueron superovuladas previo a la remoción de las esponjas impregnadas con progestágenos para la sincronización de celos. Los detalles de las dosis de hormonas para el tratamiento de superovulación y de procedimiento experimental se describen en el Artículo II.

Las ovejas receptoras recibieron al día 7 dos embriones de buena calidad (mórulas compactas y blastocitos tempranos y expandidos) mediante laparotomía ventral media. Los efectos del nivel de energía recibido por las ovejas donantes sobre las performance embrionarias y niveles hormonales y metabólicos se han descrito previamente (Abecia y col., 2013).

Experimento III (Artículo III): *“Undernutrition and laterality of the corpus luteum affects gene expression in oviduct and uterus of pregnant ewes”*

Se utilizaron 14 ovejas adultas. El día 5 tras la retirada de las esponjas, se expuso el tracto reproductivo mediante laparotomía ventral media y se determinó el número de CL. Los cuernos uterinos fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS) y se realizó el diagnóstico de preñez determinando la presencia de embriones. Luego de la recuperación de embriones, los animales fueron sacrificados y se extrajo el útero y oviductos. De los 14 animales, 7 (4 controles y 3 subnutridos) presentaron CL sólo en un ovario, por lo que los oviductos y cuernos uterinos de estos animales fueron catalogados como ipsilateral o contralateral al CL para poder estudiar el efecto local del CL sobre la expresión génica.

## **Determinaciones en plasma, tracto reproductivo e hígado**

Todas las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de República, Uruguay.

### Metabolitos

Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) se determinaron mediante un kit comercial (AGNE-C, Wako Chemicals GmbH, Alemania) según Sosa *y col.*, (2006), en un multi-analizador (Vitalab Spectra 2, Vital Scientific) (Artículos I y II).

### Hormonas

Todas las hormonas fueron analizadas por radioinmunoanálisis (RIA) o usando un ensayo inmunoradiométrico (IRMA).

Las concentraciones de IGF1 e insulina se determinaron por IRMA en fase sólida, utilizando kits comerciales (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA) según Fernández-Foren *y col.*, (2011) y Sosa *y col.*, (2009). Las concentraciones de adiponectina y leptina se determinaron según lo descrito por Raddatz *y col.*, (2008) y Fernández-Foren *y col.*, (2011) respectivamente (Artículos I y II).

Las concentraciones de progesterona se determinaron por RIA en fase sólida utilizando kits comerciales (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA) según Sosa *y col.*, (2006).

### Transcriptos

Se extrajo ARN total de hígado, útero y oviductos utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguidos de precipitación con cloruro de litio y tratamiento con DNAsa utilizando un kit DNA-free<sup>TM</sup> (Ambion, Austin, TX, USA). Para cada muestra, se sintetizó ADN copia (ADNc) mediante transcripción reversa usando una transcriptasa SuperScript III (Invitrogen) con primers oligo-dT y 1ug de ARN total añadido como molde (Artículos I y III).

Se determinó la expresión génica mediante PCR en tiempo real o cuantitativo (qPCR), utilizando el equipo Rotor-Gene<sup>TM</sup> 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Los detalles de los procedimientos de las técnicas se describen en los artículos I y III. La

eficiencia (E) de los ensayos fue calculada acorde a la fórmula  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$  según Rutlege y Cote, (2003) (Artículos I y III). La expresión génica fue medida por cuantificación relativa al control exógeno (según Pflaffl, 2009) y normalizada a la media geométrica de los genes de control endógeno, tomando en consideración las eficiencias de amplificación respectivas.

### **Análisis estadístico**

Las concentraciones de metabolitos, hormonas plasmáticas, el PV y la CC, y la determinación de transcritos se analizaron por análisis de varianza utilizando un modelo mixto (Statistical Analysis System, SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA) (Artículos I, II y III). La fertilidad temprana y tardía y las pérdidas embrionarias tardías fueron analizadas usando el procedimiento GENMOD. Los detalles de los análisis y modelos estadísticos de los experimentos I, II y III se encuentran descritos en los artículos.

## **RESULTADOS**

### **Subnutrición y variables reproductivas**

En el experimento I, 9 de 12 (75%) ovejas control presentaron embrión al sacrificio (7 días luego de la monta natural), mientras que sólo 6 de 13 ovejas subnutridas (46%) lo presentaron ( $p=0,12$ ) (Artículo I).

En el experimento II, la subnutrición de la oveja donadora (origen del embrión) o de la oveja receptora no afectó la fertilidad temprana (día 18 de gestación, Artículo II). Las ovejas receptoras controles presentaron una fertilidad de 79% o 91% cuando recibieron embriones de donadoras controles o subnutridas respectivamente; mientras que las ovejas receptoras subnutridas presentaron una fertilidad del 80% o 92% cuando recibieron embriones de donadoras controles o subnutridas, respectivamente. Sin embargo, si bien no se encontraron diferencias significativas en fertilidad en la ultrasonografía al día 40 ( $p=0,17$ ), las ovejas receptoras controles presentaron una fertilidad de 71% o 73% cuando recibieron embriones de ovejas donadoras controles o subnutridas, respectivamente; mientras que las ovejas receptoras subnutridas presentaron una fertilidad de 53% o 58% cuando recibieron embriones de donadoras controles o subnutridas, respectivamente. La mortalidad embrionaria tardía tendió a ser mayor en ovejas subnutridas en relación a las controles (35% vs. 14%,  $p=0,1$ ) y no se evidenciaron pérdidas de preñez luego del día 40 en ninguno de los grupos.

A modo descriptivo, en el experimento III, las tasas de preñez fueron similares a los experimentos anteriores: 71,4% (5 de 7) para animales controles y 42,9% (3 de 7) para subnutridos (Artículo III).

El tratamiento nutricional aplicado no afectó la tasa de ovulación en ningún caso.

### **Respuesta metabólica al tratamiento nutricional**

El tratamiento nutricional al que se sometió a los animales en los tres experimentos provocó la respuesta esperada en cuanto a cambios en el PV y la CC, y a la modificación de los perfiles de AGNE (Tabla 1). En todos los experimentos las ovejas subnutridas presentaron una disminución del PV (5-9%) y de la CC (9-15%) a lo largo del experimento, mientras que las ovejas de los grupos controles de los experimentos I y II mantuvieron ambos parámetros, y las del experimento III presentaron un leve incremento (Artículos I, II y III) (Tabla 1).

Tabla 1. Variaciones de peso vivo (PV) y condición corporal (CC) previo al comienzo de las dietas diferenciales (inicial) y en el momento del sacrificio (final) en ovejas alimentadas 1,5 M (Grupo Control) o 0,5 M (Grupo Subnutrido).

	Artículo I		Artículo II		Artículo III	
	Control	Subnutrido	Control	Subnutrido	Control	Subnutrido
<b>PV inicial</b>	66,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	67,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	57,3 ± 1,6 <sup>a</sup>	56,2 ± 1,4 <sup>a</sup>	63,0 ± 2,5 <sup>a</sup>	61,1 ± 2,5 <sup>a</sup>
<b>PV final</b>	67,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	63,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	57,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	51,8 ± 1,7 <sup>b</sup>	64,4 ± 2,5 <sup>b</sup>	55,9 ± 2,5 <sup>c</sup>
<b>CC inicial</b>	3,05 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>CC final</b>	3,07 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,06 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,9 ± 0,1 <sup>ax</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>by</sup>

a vs b vs. c (P < 0,05) x vs. y p<0.09 entre los valores iniciales y finales de PV y CC dentro de un mismo experimento están indicados con diferentes superíndices.

Las concentraciones plasmáticas de AGNE aumentaron en las ovejas subnutridas en relación a las controles (Artículos I y II).

Por otro lado, los animales subnutridos presentaron menores niveles plasmáticos de insulina en relación a los controles (Artículos I y II), sin embargo, sólo en el Artículo I la subnutrición provocó disminuciones en las concentraciones de IGF1 y leptina en comparación con los controles. Es importante destacar, que en el experimento I, las diferencias encontradas entre los animales controles y subnutridos en las concentraciones plasmáticas de insulina son bastante mayores a las diferencias encontradas en IGF1.

En el experimento II, el tratamiento nutricional no afectó las concentraciones de progesterona al día 7, sin embargo, en la comparación de las medias cuadráticas, se encontró que las ovejas receptoras preñadas subnutridas presentaron mayores concentraciones de progesterona en relación a las controles preñadas (p<0.05) (Artículo II).

En cuanto a la expresión génica en el hígado, se encontró que los animales subnutridos presentaron mayor expresión de ARNm de *IGFBP2* en relación a los controles, mientras que la expresión hepática del ARNm de *IGFBP5* tendió a ser menor en los subnutridos (Artículo I).

## **Subnutrición, variables endócrino-metabólicas y estado reproductivo**

En el experimento I, para estudiar si la presencia del embrión al día 7 tras la monta natural se asocia a perfiles endócrinos o metabólicos diferentes, se consideraron únicamente tres grupos (control preñado, subnutrido preñado y no preñado) dado el bajo número de animales controles sin embrión (Artículo I). No se observaron diferencias en PV, CC y/o concentraciones plasmáticas de AGNE ni tampoco en las concentraciones plasmáticas de insulina, IGF1 o leptina entre las ovejas subnutridas preñadas y no preñadas (Tabla 2). Sin embargo, las ovejas subnutridas preñadas al día 7 presentaron una mayor expresión del ARNm hepático de *IGFBP4* y *ADIPOR2* en relación a las subnutridas no preñadas ( $p=0,04$  y  $p=0,02$ , respectivamente) (Artículo I).

En el experimento II, se analizó si las pérdidas embrionarias tardías (días 18 al 40) cuando se transfieren embriones de buena calidad a ovejas receptoras controles y subnutridas, están asociadas a diferentes perfiles endócrinos metabólicos. Para esto se consideraron los grupos control preñado, subnutrido no preñado y subnutrido con mortalidad embrionaria tardía, dado el bajo número de receptoras controles con pérdidas embrionarias tardías este grupo no fue considerado (Tabla 2). Las ovejas receptoras subnutridas preñadas presentaron o tendieron a presentar mayor PV y CC que las ovejas subnutridas que sufrieron pérdidas embrionarias tardías (Artículo II), pero no se encontraron diferencias en las concentraciones plasmáticas de AGNE.

Las receptoras subnutridas preñadas tendieron a presentar mayores concentraciones de P4 al día 7 que las subnutridas que perdieron el embrión entre el día 18 y 40 ( $p=0,1$ ), mientras que no se observaron diferencias en las concentraciones de P4 al día 18 (Artículo II). Las receptoras subnutridas preñadas o controles preñadas presentaron o tendieron a presentar mayores concentraciones plasmáticas de insulina y adiponectina respectivamente, que las receptoras subnutridas que sufrieron mortalidad embrionaria.

Tabla 2. Peso vivo (PV, Kg), condición corporal (CC), ácidos grasos no esterificados (AGNE), concentraciones plasmáticas de progesterona (P4, ng/mL) al día 7 y concentraciones plasmáticas del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1; ng/mL), insulina ( $\mu$ IU/mL), leptina (ng/mL) y adiponectina (ng/mL) en ovejas controles preñadas, subnutridas preñadas (Artículos I y II), subnutridas no preñadas al día 7 (Artículo I) y con mortalidad embrionaria tardía (Artículo II).

	<i>Artículo I</i>			<i>Artículo II</i>		
	Controles preñadas n= 9	Subnutridas preñadas n=6	Subnutridas no preñadas n=7	Controles preñadas n= 15	Subnutridas preñadas n=7	Subnutridas Mortalidad embrionaria n=8
PV	67,3 <sup>a</sup>	64,3 <sup>b</sup>	63,7 <sup>b</sup>	57,7 <sup>a</sup>	55,7 <sup>b</sup>	49,3 <sup>c</sup>
CC	3,07 <sup>a</sup>	2,87 <sup>b</sup>	2,82 <sup>b</sup>	2,66	2,54 <sup>x</sup>	2,27 <sup>y</sup>
NEFA	0,37 <sup>a</sup>	0,53 <sup>b</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,20 <sup>b</sup>
P4 día 7	...	...	...	5,73 <sup>x</sup>	9,62 <sup>y</sup>	5,12 <sup>x</sup>
IGF1	320,8 <sup>a</sup>	243,7 <sup>b</sup>	191,75 <sup>b</sup>	305,74	294,2	297,2
Insulina	42,17 <sup>a</sup>	27,86 <sup>b</sup>	29,28 <sup>b</sup>	35,32 <sup>a</sup>	33,46 <sup>a</sup>	29,27 <sup>b</sup>
Leptina	3,20 <sup>a</sup>	2,30 <sup>b</sup>	2,28 <sup>b</sup>	0,91	0,84	0,79
Adiponectina	...	...	...	20,27 <sup>x</sup>	18,55 <sup>xy</sup>	17,60 <sup>y</sup>

Diferentes superíndices difieren, a vs. b vs. c,  $p < 0,05$ ; x vs. y,  $p < 0,1$ .

En el experimento II, no se observaron diferencias en PV, CC y concentraciones plasmáticas de AGNE entre las ovejas receptoras preñadas y no preñadas (Artículo II). Por otro lado, las concentraciones de insulina en las ovejas receptoras subnutridas no preñadas tendieron a ser menores en relación a las ovejas subnutridas preñadas (29,7 vs. 32,5  $\mu$ IU/mL;  $p = 0,07$ ; respectivamente) (Artículo II).

Las ovejas receptoras subnutridas preñadas presentaron mayores niveles de P4 plasmática al día 7 (9,61 vs. 5,23 ng/mL;  $p < 0,05$ ) y tendieron a presentar mayor tasa ovulatoria (1,58 vs. 1,22) en relación a las subnutridas no preñadas ( $p < 0,1$ ) (Artículo II).

### **Subnutrición y expresión génica en el tracto reproductivo**

Los animales subnutridos presentaron mayor expresión de *PR* en los oviductos en relación a los controles, sin embargo no se observaron diferencias en el útero (Figura 2a) (Artículo III).

El efecto de la subnutrición sobre la expresión de los transcritos de la familia IGF dependió del órgano: la subnutrición disminuyó la expresión de ARNm de *IGF1* en el útero y de *IGF2* en el oviducto. Asimismo, el útero presentó una mayor expresión de

ARNm de *IGF1* en relación a los oviductos y lo contrario ocurrió para *IGF2* (Figura 2c y d) (Artículo III)

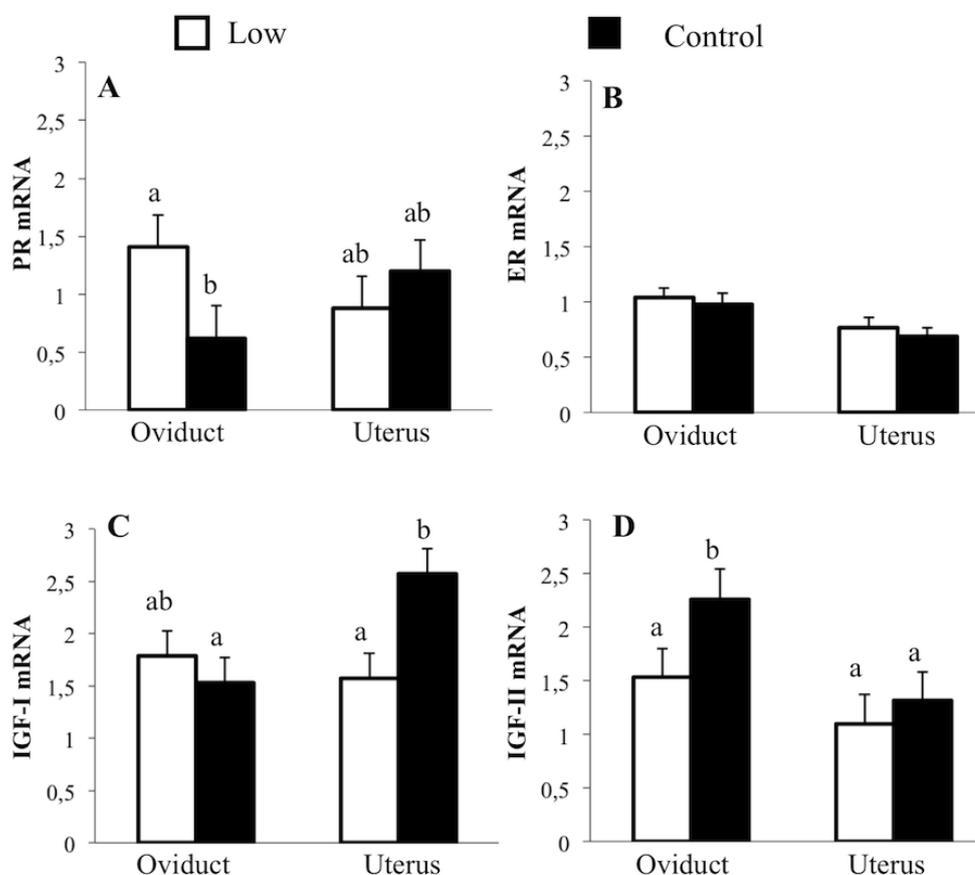


Figura 2. Expresión relativa de transcritos de *PR* (A), *ERα* (B), *IGF1* (C) e *IGF2* (D) en oviducto y útero de ovejas alimentadas 0,5 (Low, n=7) o 1,5 (Control, n=7) veces los requerimientos de mantenimiento diarios al día 5 post-estro. Los datos son presentados como cuadrados medios mínimos  $\pm$  error estándar. Diferentes superíndices dentro de la misma gráfica indican diferencias significativas, a,b:  $p < 0,05$ .

### Efecto local del Cuerpo Lúteo

En el experimento III, se observó que el oviducto contralateral presentó aproximadamente una vez y media a dos veces más de ARNm de *PR* y *ERα*, y aproximadamente tres veces más de expresión de ARNm de *IGF2*, en relación al oviducto ipsilateral, pero no se encontró diferencias para *IGF1*. Por el contrario, en el útero no se encontraron diferencias de expresión respecto al lado del CL para ninguno de los genes. En la comparación entre órganos, el oviducto contralateral presentó mayor expresión de *ERα* e *IGF2* en relación al cuerno uterino contralateral, pero no se encontraron diferencias en el lado ipsilateral.

## **DISCUSIÓN**

### **Subnutrición y variables reproductivas**

Es importante destacar, que si bien los tres experimentos se realizaron en distintos momentos de manera independiente, considerando diferentes días de gestación y diferentes tratamientos, y pese al bajo número de animales, el desenlace reproductivo que se observa luego de un período de subnutrición de 20 a 22 días (dependiendo del día de sacrificio) es similar en todos los experimentos (39% más de preñez en animales controles de los experimentos I y III y 23% en animales del experimento II). Se ha demostrado previamente en ovejas (Abecia y col., 2013) que una dieta que proporciona la mitad de los requerimientos nutricionales diarios de mantenimiento, produce una disminución significativa de la performance reproductivas de las ovejas. Además, Abecia y col., (2013) observaron que en el grupo subnutrido, la tasa de fertilización fue 27% menor y la de tasa de transferibilidad fue de 30% menor en relación a animales que se alimentan con una dieta de mantenimiento. Dado que se buscó investigar si las fallas reproductivas asociadas a la subnutrición se debían a factores del embrión maternos o de ambos, se aislaron los efectos de la subnutrición en el embrión o la madre utilizando un modelo de transferencia embrionaria. Sólo embriones de buena calidad al día 7 de gestación (mórulas compactas y blastocistos expandidos) de madres donadoras controles y subnutridas fueron transferidos a receptoras controles y subnutridas (Artículo II). No se encontraron diferencias en fertilidad al día 18 y 40, pero la mortalidad embrionaria tardía encontrada en las receptoras subnutridas fue mayor que en las receptoras controles (35% vs. 14%, Artículo II). Estos datos obtenidos del experimento II sugieren que cuando embriones de buena calidad (desde el punto de vista morfológico) son transferidos a receptoras subnutridas o controles, la supervivencia embrionaria es dependiente principalmente del ambiente materno en el que se desarrolla el embrión, siendo independiente de la historia nutricional previa del mismo.

### **Respuesta metabólica al tratamiento nutricional**

En los tres experimentos, cuando ovejas adultas se sometieron a períodos cortos de subnutrición de entre 20 y 22 días (dependiendo del día de sacrificio), se produjo una disminución del PV y de la CC desde el comienzo de la nutrición diferencial.

Los animales del experimento II presentaron diferentes PV y CC que los de los experimentos I y III al inicio de los tratamientos nutricionales (entre 15% menos de PV y 9% menos de CC). Los valores finales de PV de las ovejas subnutridas del experimento I y III fueron más altos o similares que los de las ovejas controles del experimento II. Esta es una puntualización relevante, ya que al observar las variables metabólicas y endócrinas, se reafirma la importancia del efecto “estático” de la nutrición y la interrelación de ambos efectos (estático y dinámico) sobre los parámetros metabólicos y reproductivos, efectos que se abordarán más adelante en esta discusión. La subnutrición provocó una movilización de las reservas grasas como lo demuestran las concentraciones elevadas de AGNE (Artículos I y II). Esto es esperable ya que cuando los aportes no satisfacen los requerimientos energéticos, el animal dispone de sus reservas de triglicéridos para su utilización por los diferentes tejidos (Chilliard y *col.*, 1998).

La subnutrición disminuyó las concentraciones plasmáticas de insulina en los animales de los experimentos I y II, lo que es consistente con lo reportado previamente por Sosa y *col.*, (2006) y Abecia y *col.*, (2013). Esta disminución de insulina en animales subnutridos se conoce como una estrategia para disminuir los requerimientos de energía cuando la disponibilidad de nutrientes es baja.

Los niveles plasmáticos de IGF1 disminuyeron con la subnutrición en los animales del experimento I, lo que es consistente con lo reportado previamente por Sosa y *col.*, (2006). La reducción en los niveles circulantes de IGF1 luego de una restricción alimenticia, ha sido reportada para varias especies (Thissen y *col.*, 1994), y es un mecanismo que asegura la distribución de nutrientes a los diferentes tejidos cuando la energía disponible es limitada (e.j. limitado consumo de energía por los tejidos periféricos). Asimismo, IGF1 es un mediador de crecimiento que también afecta al hígado (Hayden y *col.*, 1993; Demori y *col.*, 2000), y la disminución en las concentraciones plasmáticas de IGF1 en ovejas subnutridas puede asociarse a una reducción en la masa hepática que ocurre en estos animales durante la subnutrición (de Brun y *col.*, en revisión). Sin embargo, en el experimento II, la subnutrición no produjo cambios en las concentraciones plasmáticas de IGF1. Es probable que los cambios metabólicos del organismo para adaptarse al nuevo estado fisiológico, no hayan sido de la misma índole en los dos experimentos, debido a que el estado de las reservas corporales iniciales de las ovejas fue diferente entre los experimentos (mayor en el experimento I). De hecho, Fernández-Foren y *col.*, (2011) reportaron, frente a una subnutrición, respuestas endócrinas diferentes, acorde al grado de reservas corporales en ovinos. En el mismo sentido, Soca y *col.*, (2013) en vacas de cría,

demonstraron que el aumento de IGF1 luego de una suplementación es dependiente de las reservas corporales de los animales al inicio del tratamiento.

Asimismo, la subnutrición provocó una reducción en las concentraciones plasmáticas de leptina en los animales del experimento I, reflejando el rápido aumento en la actividad lipolítica, como ha sido reportado previamente para rumiantes (Meikle y col., 2004; Fernández-Foren y col., 2011). La reducción en las concentraciones de leptina durante la subnutrición, puede actuar como señal para aumentar el apetito, disminuir los gastos de energía y la actividad reproductiva (Chilliard y col., 2000). Sin embargo, el tratamiento nutricional no provocó cambios en las concentraciones de leptina en los animales del experimento II. Como se ha discutido previamente, esto puede deberse a que los animales del experimento II presentaron menores reservas grasas que los animales del experimento I. En el mismo sentido, Fernández-Foren y col., (2011) reportaron que animales con alta CC presentan una caída drástica en las concentraciones de leptina frente a una subnutrición, y que es muy reducida en animales de una CC más baja.

Como ha sido mencionado, estos efectos podrían ser el reflejo de la acción de varias hormonas metabólicas que son consideradas mediadoras entre el estado metabólico del animal y su actividad reproductiva. La respuesta del organismo a la leptina, por ejemplo, puede depender de la historia metabólica reciente (nivel de nutrición, efecto dinámico) pero también a una más antigua (reservas corporales, efecto estático), lo cual ha sido llamado "memoria metabólica" (Chilliard y col., 2005; Blache y col., 2006). Se ha demostrado previamente que ovejas lactantes alimentadas a la mitad de los requerimientos para el mantenimiento pero con una alta CC al parto ( $> 2,75$ ) presentan períodos de anestros posparto similares a las ovejas controles, mientras que las ovejas subnutridas con baja CC al parto ( $< 2,75$ ), presentan anestros más largos (45 vs. 36 días) y pesos de corderos al destete menores (Sosa y col., 2006). Esto resalta la importancia de tener en cuenta las reservas corporales previas de los animales a la hora de comparar los efectos dinámicos de la nutrición sobre las funciones reproductivas.

La disminución encontrada en las concentraciones de IGF1 en animales subnutridos del experimento I, contrasta con la falta de efecto sobre la expresión hepática de transcriptos de IGF1 (Artículo I) y de la proteína de IGF1 determinada por inmunohistoquímica (de Brun y col., en revisión). Sin embargo, los animales subnutridos presentaron mayor expresión génica de *IGFBP2* y menor de *IGFBP5*. La *IGFBP2* actúa normalmente como regulador negativo de IGF, limitando la

disponibilidad de este factor. Esto es consistente con otros autores que reportaron un aumento del ARNm de IGFBP2 durante el ayuno en el hígado (Thissen y col., 1994; Kita y col., 2002), como alternativa para disminuir las señales anabólicas (IGF) durante períodos de restricción energética. Además, debido a que IGFBP2 se une preferencialmente a IGF2 (Reynolds y col., 1997), y que IGF2 tiene un papel predominante en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Kaye, 1997), la elevada expresión del ARNm encontrada en el hígado de los animales con restricción alimenticia, puede alterar esta interacción con IGF2 y por tanto actuar provocando efectos deletéreos sobre la reproducción (Han y col., 1996). Por otro lado, se ha demostrado que la IGFBP5 estimula la acción de los IGF (Thissen y col., 1994), por lo que la menor expresión del ARNm de *IGFBP5* hepático en animales subnutridos, puede provocar una disminución de la actividad de IGF1, y comprometer por lo tanto el desarrollo embrionario normal (Robinson y col., 2000). En conjunto, observamos que los efectos deletéreos de la subnutrición a nivel de la expresión génica hepática, podrían comprometer la supervivencia embrionaria por interferencia con la familia de IGFs.

### **Subnutrición, variables endocrino-metabólicas y estado reproductivo**

Como vimos anteriormente, la subnutrición altera el éxito reproductivo, y esto puede estar causado por las señales que se producen entre el embrión y el ambiente uterino, en respuesta a un ambiente hostil. Por lo tanto, alteraciones en este sistema de señales resulta en fallas en la implantación, pérdida embrionaria temprana, desarrollo y crecimiento retardado o acelerado del embrión (Barnes, 2000). El desarrollo embrionario durante el período de pre-implantación es afectado, en parte, por un conjunto de hormonas, factores de crecimiento y sus receptores (Kaye, 1997). Entre los factores que influyen en el ambiente materno se encuentran, las concentraciones plasmáticas de AGNE, insulina, leptina, IGF1 y adiponectina, los cuales han sido descritos como índices del estado metabólico, así como señales metabólicas en el sistema reproductivo (Blache y col., 2000).

La presencia de un embrión al día 7 no se asoció con las modificaciones en las concentraciones plasmáticas de insulina, IGF1 y leptina (Artículo I). Sin embargo, las ovejas receptoras subnutridas preñadas presentaron o tendieron a presentar mayores concentraciones plasmáticas de insulina y adiponectina respectivamente, que las receptoras subnutridas que sufrieron mortalidad embrionaria entre los días 18 y 40

(Artículo II). A pesar de que en el experimento I no se observaron cambios en las hormonas metabólicas asociados a la preñez en animales subnutridos, se observaron modificaciones en la expresión génica hepática. Se observó que los animales subnutridos preñados presentaron mayor expresión de los transcritos de *IGFBP4* y *ADIPOR2* en relación a los no preñados. Se ha reportado similar expresión de *IGFBP4* tanto en hígado como en útero luego de un tratamiento nutricional (Carter y col., 2005); la mayor expresión de la *IGFBP4* encontrada en los animales subnutridos preñados puede actuar potenciando la acción de IGF2, esencial para un crecimiento normal durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Artículo I). Por otro lado, se ha propuesto que *ADIPOR2* presenta un rol protector frente al estrés oxidativo cuando hay una importante oxidación de AGNE durante el BEN (Saremi y col., 2014), por lo que la mayor expresión de ARNm de *ADIPOR2* en ovejas sunutridas preñadas, en relación con las no preñadas, podrían reflejar una mejor adaptación metabólica a la subnutrición en estos animales. Además, la adiponectina también presenta acciones reguladoras específicas sobre el eje hipotálamo-gonadal, y por lo tanto se encuentra involucrada tanto en el control metabólico, como en la reproducción (Ye y col., 2013). La acción de *ADIPOR2* sobre el sistema reproductivo es indiscutible, ya que se ha reportado la presencia de este receptor en oviductos, endometrio y embriones de vacas y roedores (Mao y col., 2006; Tabandeh y col., 2010; Konstantinos, 2012). Por lo tanto, las acciones de la adiponectina sobre el metabolismo y/o la reproducción pueden contribuir al éxito de la preñez, sin embargo, la falta de estudios en este tema principalmente en ovejas limita la interpretación de los resultados de este trabajo.

Por otro lado, en el experimento II cuando se analizó si las pérdidas embrionarias tardías, luego de una transferencia embrionaria, están asociadas a diferentes perfiles endócrinos metabólicos (Artículo II), se observó que las ovejas receptoras subnutridas preñadas presentaron mayores concentraciones plasmáticas de P4 al día 7 que las subnutridas que perdieron el embrión entre los días 18 y 40. La progesterona tiene la habilidad de modificar la relación embrio-maternal estimulando los cambios en el estado fisiológico del útero para influir sobre la sobrevivencia embrionaria (Lawson y Cahill, 1983). De hecho, altos niveles plasmáticos de P4 post concepción, se han asociado con la promoción de la elongación del embrión, aumentos en la producción de IFNt y mayores tasas de preñez en ovejas (Ashworth y col., 1989; Satterfield y col., 2006). Los altos niveles plasmáticos de P4 encontrados al día 7 en estas ovejas receptoras subnutridas preñadas, se asocian con la mayor tasa de ovulación en estos animales (Artículo II). Asimismo, las receptoras subnutridas que sufrieron mortalidad embrionaria tardía, presentaron menores concentraciones plasmáticas de insulina y

adiponectina que los animales subnutridos preñados (Artículo II). La menor concentración de insulina en las receptoras con mortalidad embrionaria muestra que esta hormona tiene un efecto importante en el éxito de la preñez, actuando tal vez, a través de receptores de insulina presentes en el endometrio de la oveja y/o a través de receptores de IGF1 y/o regulando la función uterina (Fowden y col., 1989; Gluckman y Pinal, 2003; Dupont y col., 2014). Además, se ha demostrado que la síntesis de P4 en las células luteales es estimulada por la insulina (Wathes y col., 1995). Estos mecanismos propuestos también podrían explicar el éxito de preñez en ovejas subnutridas. Por otro lado, la adiponectina sensibiliza los tejidos periféricos a la insulina mediante el aumento de la captación de glucosa y la oxidación de los ácidos grasos en el músculo (Ye y col., 2013; Saremi y col., 2014), por lo que las bajas concentraciones de adiponectina en ovejas subnutridas que sufrieron pérdidas embrionarias, son consistentes con las bajas concentraciones de insulina en ese grupo. La disminución de esta hormona anabólica en los animales subnutridos puede ser una estrategia para disminuir los requerimientos de energía (Artículo II).

Es interesante notar que no se encontraron diferencias en las concentraciones de insulina ni de progesterona al día 18 entre las ovejas preñadas subnutridas y ovejas subnutridas con mortalidad embrionaria tardía, lo que sugiere que el ambiente endocrino temprano (día 7) podría haber condicionado el desarrollo del embrión en ovejas subnutridas, lo que llevaría a la pérdida del embrión después del día 18 de preñez.

### **Subnutrición y expresión génica en el tracto reproductivo**

La mayor expresión génica de *PR* encontrada en los oviductos de los animales subnutridos del experimento III, puede ser el resultado de una disminución en la regulación negativa de la P4 de su propio receptor, ya que un menor contenido del PR determinado por inmunohistoquímica y por ensayos de unión ha sido reportado sistemáticamente en útero (Sosa y col., 2004; 2006). Los animales subnutridos presentaron una menor expresión génica de *IGF1* en útero e *IGF2* en oviductos, lo que podría comprometer la supervivencia embrionaria. El IGF1 se encuentra implicado en el aumento de secreción de proteínas y nutrientes del endometrio, que ocurre alrededor del estro (Miller y col., 1977). Por otro lado, como el ARNm de *IGF2* se encuentra localizado principalmente en la pared muscular (Wathes y col., 1998), la menor expresión del transcripto de IGF2 encontrada en el oviducto de las ovejas subnutridas puede alterar la motilidad y prevenir al embrión que sea transferido al útero. Tomando en cuenta que la expresión el ARNm de IGF1 en útero fue mayor que

en oviducto y la expresión del ARNm de IGF2 fue mayor en el oviducto que en el útero, y que el efecto de la subnutrición sobre estos transcritos fue dependiente del órgano (IGF1 en útero e IGF2 en oviducto), se sugiere un rol más importante de IGF1 en el útero y de IGF2 en el oviducto (Artículo III).

### **Efecto local del Cuerpo Lúteo**

La expresión génica diferencial entre el lado ipsilateral y contralateral al CL probablemente se debe al ambiente hormonal diferencial establecido por la distribución local de productos ováricos al tracto reproductivo ipsilateral (Einer-Jensen y McCracken, 1981; Weems y col., 1989; Wijayagunawardane y col., 1997). Como la progesterona modula la acción de los estrógenos y su propia acción mediante una rápida reducción de las concentraciones de *ER* y *PR* (Evans, y col., 1980), los bajos niveles del ARNm de *ER* y *PR* encontrados en el oviducto ipsilateral, pueden deberse a una alta concentración local de P4. Los niveles de transcritos de *IGF2* también fueron bajos en el oviducto ipsilateral, indicando una regulación similar a la de los ARNm de *PR* y *ER*, aunque una regulación por factores locales también se ha sugerido (Stevenson y Wathes, 1996). Estos cambios en la expresión génica pueden ser importantes para la modulación de la contracción y secreción oviductal, actuando directamente o interactuando con varios otros genes expresados de manera diferente en los oviductos ipsilateral y contralateral (Bauersachs y col., 2003).

## CONCLUSIONES

- La mortalidad embrionaria asociada a la subnutrición (cuando embriones de buena calidad son transferidos) se debe principalmente a efectos sobre el ambiente materno, y no depende de la historia nutricional previa del embrión (Artículo II).
- Alteraciones en el estado metabólico-materno y la expresión génica hepática debido a la subnutrición están asociadas al éxito reproductivo en ovejas (Artículos I y II).
- La expresión de los *IGF* (*IGF1* e *IGF2*) y *PR* en el tracto reproductivo varía con la subnutrición y se encuentra afectado por la región y el lado del tracto reproductivo respecto al cuerpo lúteo (Artículo III).

## CONSIDERACIONES FINALES

El principal hallazgo de la presente tesis es que cuando se transfieren embriones de buena calidad, las fallas reproductivas en los animales subnutridos se asocian principalmente a factores maternos, y no a factores provenientes del embrión. De acuerdo a nuestros resultados, un ambiente materno alterado en etapas tempranas del desarrollo embrionario (al día 7 post-estro), afecta las tasas de preñez en etapas posteriores del desarrollo (luego del día 18). Nuestros resultados son consistentes en señalar cambios muy tempranos en la expresión génica de *IGF1*, *IGF2* y *PR* en el tracto reproductivo frente a un tratamiento nutricional, posiblemente mediados por las modificaciones endócrinas causadas por la subnutrición. Por tanto, estos resultados comprueban que el tracto reproductivo ovino, es sensible a cambios nutricionales en etapas tempranas del desarrollo embrionario, que pueden estar causando las fallas reproductivas.

Si bien los resultados de esta tesis, logran responder algunas preguntas interesantes, los resultados obtenidos son un punto de partida para nuevos estudios sobre los efectos de la subnutrición sobre la interrelación entre el ambiente materno y el embrión. A pesar de no haber encontrado diferencias en las tasas de preñez debido a la historia nutricional del embrión (madre donadora), sería relevante determinar si la subnutrición afecta la expresión de genes embrionarios, tanto relacionados a su desarrollo como su metabolismo. La asociación encontrada entre la mortalidad embrionaria tardía y los menores niveles de progesterona e insulina durante la fase luteal temprana, abren nuevas interrogantes: pasado el reconocimiento materno, ¿difiere la morfología y la biología molecular del embrión y el ambiente uterino entre animales que logran mantener la preñez y animales que sufren mortalidad embrionaria?.

Comprender las bases moleculares de las alteraciones en la comunicación madre-embrión durante la subnutrición, podría contribuir en un futuro a desarrollar estrategias para asegurar una sincronía entre el ambiente materno y el embrión durante ese período, y mejorar las tasas de supervivencia embrionaria, y la eficiencia productiva ovina.

## REFERENCIAS

Abecia, J.A., Rhind, S.M., Bramley, T.A., Mcmillen, S.R. (1995). Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Anim Sci* 61, 57-62.

Abecia, J.A., Lozano, J.M., Forcada, F., Zarazaga, L. (1997). Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim Reprod Sci* 48, 209-18.

Abecia, J.A., Forcada, F., Lozano, J.M. (1999a). A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F2 alpha production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. *Theriogenology* 52, 1203-13.

Abecia, J.A., Lozano, J.M., Forcada, F. (1999b). A preliminary study on the effects of dietary energy and melatonin on the ex vivo production of progesterone and prostaglandin F2Y by the corpora lutea and endometrial tissue of ewes. *Vet Res Comm* 23, 115-121.

Abecia, J.A., Sosa, C., Forcada, F., Meikle, A. (2006). The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 46, 367-78.

Abecia, J.A., Forcada, F., Palacín, I., Sanchez-Prieto, L., Sosa, C., Fernández-Foren, A., Meikle, A., (2013). Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Zygote* 9, 1-9

Agricultural and Food Research Council (AFRC) (1993). Energy and protein requirements of ruminants. An advisor manual prepared by the ARFC technical committee on responses to nutrients. Wallingford, UK, CAB International.

Ashley, R.L., Clay, C.M., Farmerie, T.A., Niswender, G.D., Nett, T.M. (2006). Cloning and Characterization of an Ovine Intracellular Seven Transmembrane Receptor for Progesterone that Mediates Calcium Mobilization. *Endocrinol* 147, 4151-4159.

Ashworth, C.J., Bazer, F.W. (1989). Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. *Biol Reprod* 40, 425-33.

- Ashworth, C.J. (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livest Prod Sci* 44, 99-105.
- Auger, A.P. (2001). Ligand-independent activation of progesterin receptors: relevance for female sexual behaviour. *Reprod.* 122, 847-55.
- Azzarini, M. (2002). Potencial reproductivo de los ovinos. In 'X Congreso Latinoamericano de Buiatría'. Paysandú, Uruguay pp. 123-130.
- Barnes FL. (2000). The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Therio* 15; 53(2):649-58.
- Bauersachs, S., Blum, H., Mallokm, S., Wenigerkind, H., Rief, S., Prella, K., Wolf, E. (2003). Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomic approach. *Biol Reprod* 68: 1170-1177.
- Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M., Scherer, P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7, 947-953.
- Blache, D., Chagas, L.M., Blackberry, M.A., Vercoe, P.E., and Martin, G.B. (2000). Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. *J Reprod Fertil* 120, 1-11
- Blache, D., Zhang, S., Martin, G.B. (2006). Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev* 46, 379-90.
- Breier, B. (1999). Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. *Domest Anim Endocrinol* 17, 209-218.
- Brien, F.D., Cumming, I.A., Clarke, I.J., Cocks, C.S. (1981). Role of plasma progesterone concentration in early-pregnancy of the ewe. *Aust J Exp Agr* 21, 562-565.
- Boland, M.P., Lonergan, P. and O'Callaghan, D. (2001). Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Therio* 55, 1323-1340
- Buhi, W.C., Alvarez, I.M., Kouba, A.J. (1997). Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* 52, 285-300.

- Buhi, W.C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reprod* 123, 355-62.
- Carter, A.M., Kingston, M.J., Han, K.K., Mazzuca, D.M., Nygard, K., Han, V.K. (2005). Altered expression of IGFs and IGF-binding proteins during intrauterine growth restriction in guinea pigs. *J Endocrinol* 184, 179-189.
- Chilliard, Y., Bocquier, F., Doreau, M. (1998). Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev* 38, 131-52.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bonnet, M., Rouel, J., Bocquier, F. (2000). Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc Nutr Soc* 59, 127-134.
- Chilliard, Y., Delavaud, C., Bonnet, M. (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 29, 3-22.
- Clark, J.H., Mani, S.K. (1994). Actions of ovarian steroid hormones. In '*Physiol Reprod*'. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) pp. 1011-1046. (RavenPress: New York).
- de Brun, V., Meikle, A., Casal, A., Carriquiry, M., Menezes, C., Forcada, F., Sosa, C., Abecia, J.A. (En revisión). Hepatic expression of insulin-like growth factor-I in pregnant underfed and well-fed ewes. Enviado a la revista: *Livest Sci*.
- Del Campo, M.R., Rowe, R.F., Ginther, O.J. (1979). Relationship between side of embryo transfer and pregnancy rate in cattle. *J Anim Sci* 152: 290.
- Demori, I., Balocco, S., Voci, A., Fugassa E. (2000). Increased insulin-like growth factor binding protein-4 expression after partial hepatectomy in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 278(3),G 384-9.
- Downing, J.A., Joss, J., Scaramuzzi, R.J. (1995). Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol* 146, 403-10.
- Dunlap, K.A., Stormshak, F. (2004). Nongenomic Inhibition of Oxytocin Binding by Progesterone in the Ovine Uterus. *Biol Reprod* 70, 65-69.

- Dupont, J., Scaramuzzi, R.J., Reverchon, M. (2014). The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Anim* 28:1-14.
- Einer-Jensen, N., McCracken, J.A. (1981). The transfer of progesterone in the ovarian vascular pedicle of the sheep. *Endocrinol* 109, 685-90.
- Evans, R.W., Chen, T.J., Hendry, III WJ., Leavit, W.W. (1980). Progesterone regulation of estrogen receptor in the hamster uterus during the estrous cycle. *Endocrinol* 107, 383-390
- Fawcett, D.W. (1988). Sistema reproductor femenino. In '*Tratado de histología*' pp. 909-912. (Interamericana-McGraw Hill: Madrid).
- Fernández-Foren, A., Abecia, J.A., Vázquez, M.I., Forcada, F., Sartore, I., Carriquiri, M., Meikle, A., Sosa, C. (2011). Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales. *ITEA* 170, 1-15.
- Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., Fisher, P.A. (2002). Ligand-independent activation of steroid receptors. *Domest Anim Endocrinol* 23, 13-24.
- Fleming, T.P., Kwong, W.Y., Porter, R., Ursell, E., Fesenko, I., Wilkins, A., Miller, D.J., Watkins, A.J., Eckert, J.J. (2004). The embryo and its future. *Biol Reprod* 71,1046-54.
- Forcada, F., Abecia, J.A., Sierra, I. (1992). Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at to different body condition levels. *S Rum Res* 8, 313-324.
- Fowden, A. L., Hughes, P., Comline, R. S. (1989). The effects of insulin on the growth rate of the sheep fetus during late gestation. *Q. J. Exp. Physiol.* 74, 703–714.
- Gandolfi, F., Brevini, T.A., Moor, R.M. (1989). Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* 38, 107-15.
- Giesy, S.L., Yoon, B., Currie, W.B., Kim, J.W., Boisclair, Y.R. (2012). Adiponectin deficit during the precarious glucose economy of early lactation in dairy cows. *Endocrinol* 153, 5834-5844.
- Gluckman, P.D., Pinal, C.S. (2003). Regulation of fetal growth by the somatotrophic axis. *J Nutr.* 133 (5 Suppl 2):1741S-1746S

- Gonzalez, R., Caballero-Campo, P., Jasper, M., Mercader, A., Devoto, L., Pellicer, A., y col. (2000). Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4883-4888.
- Goodman, R.L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In '*Physiol Reprod*'. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) pp. 659-709. (Raven Press:New York).
- Goff, A.K. (2002). Embryonic signals and survival. *Reprod Domest Anim* 37, 133-9.
- Graham, J.D., Clarke, C.L. (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocr Rev* 18, 502-519.
- Hafez, E.S. (1996). Anatomía del aparato reproductor femenino. In '*Reproducción e inseminación artificial en animales*' pp. 20-52. (Interamericana-McGraw Hill: Madrid).
- Han, V.K.M., Bassett, N., Walton, J., Challis, J.R.G. (1996). The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes, evidence for IGF-IGFBP interactions at the fetomaternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2680-2693.
- Hayden, J.M., Williams, J.E., Collier, R.J. (1993). Plasma growth hormone, insulin-like growth factor, insulin, and thyroid hormone association with body protein and fat accretion in steers undergoing compensatory gain after dietary energy restriction. *J Anim Sci* 71(12), 3327-38.
- Hunter, R.E., Longcope, C., Keough, P. (1987). Steroid hormone receptors in carcinoma of the cervix. *Cancer* 1;60(3):392-6.
- Kakar, M.A., Maddocks, S., Lorimer, M.F., Kleemann, D.O., Rudiger, S.R., Hartwich, K.M., Walker, S.K. (2005). The effect of peri-conception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe. *Therio* 64, 1090-1103.
- Kasimanickam, R.K., Kasimanickam, V.R. (2011). Effect of tocopherol supplementation on serum 8-epi-prostaglandin F2 alpha and adiponectin concentrations, and mRNA expression of PPARγ and related genes in ovine placenta and uterus. *Therio* 76(3):482-91.
- Katznellobogen, B.S. (1980). Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol* 42, 17-35.
- Kaye, P.L. (1997). Preimplantation growth factor physiology. *Rev Reprod* 2, 121-7.

- Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A., Tanaka, T. (2002). Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinol* 143, 1922-31.
- Keller, M.L., Roberts, A.J., Seidel, G.E. (1998). Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in the uterus and conceptus during early conceptus elongation in cattle. *Biol Reprod* 59(3):632-42.
- Ketelslegers, J.M., Maiter, D., Maes, M., Underwood, L.E., Thissen, J.P. (1995). Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I. *Metabol* 44, 50-57.
- Killian, G.J. (2004). Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 82-83, 141-53.
- Kita, K., Nagao, K., Taneda, N., Inagaki, Y., Hirano, K., Shibata, T., Yaman, A., Conlon, M., Okumura, J. (2002). Insulin-like growth factor binding protein-2 gene expression can be regulated by diet manipulation in several tissues of young chickens. *J Nutr* 132, 145-151.
- Kleemann, D.O., Walker, S.K. (2005). Fertility in South Australian commercial Merino flocks: sources of reproductive wastage. *Therio* 63, 2075-2088.
- Kobayashi, Y., Boyd, C., Bracken, C., Lamberson, W., Keisler, D., Lucy, M. (1999). Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinol* 140, 3947-3954.
- Konstantinos, D. (2012). The role of adiponectin in regulation of metabolisms in dairy cows. Thesis submitted to the University of Nottingham for the Degree of Doctor of Philosophy.
- Lawson, R.A., Cahill, L.P. (1983). Modification of the embryo-maternal relationship in ewes by progesterone treatment early in the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 67(2):473-5.
- Leese, H.J., Tay, J.I., Reischl, J., Downing, S.J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reprod* 121, 339-46.
- Leese, H.J. (2005). Rewards and risks of human embryo creation: a personal view. *Reprod Fertil Dev* 17, 387-91.

- Lindsay, D., Martin, G., Williams, I. (1993). Nutrition and reproduction. In '*Reprod Domest Anim*' pp. 459-491. (Elsevier Science: Amsterdam).
- Lozano, J.M., Abecia, J.A., Forcada, F., Zarazaga, L., Alfaro, B. (1998). Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Therio* 49, 539-546.
- Lozano, J.M., Lonergan, P., Boland, M.P., O'callaghan, D. (2003). Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reprod* 125, 543-553.
- Mao, X., Kikani, C.K., Riojas, R. A., Langlais, P., Wang, L., Ramos, F.J., Fang, Q., Christ-Roberts, C.Y., Hong, J.Y., Kim, R.Y., Liu, F., Dong, L.Q. (2006). APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 8, 516-523.
- Martin, G.B. (1995). Reproductive research on farm animals for Australia –some long-distance goals. *Reprod Fertil Dev* 7, 967-982.
- Martal, J., Chene, N., Camous, S., Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P., L'haridon, R., Charpigny, G., Charlier, M., Chaouat, G. (1997). Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev* 9, 355-80.
- Mcneilly, A.S., Jonassen, J.A., Rhind, S.M. (1987). Reduced ovarian follicular development as a consequence of low body condition in ewes. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115, 75-83.
- Meikle, A., Tasende, C., Sosa, C., Garofalo, E.G. (2004). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* 16, 385-94.
- Miller, B.G., Murphy, L., Stone, G.M. (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *J Endocrinol* 73, 91-98.
- Moschos, S., Chan, J.L., Mantzoros, C.S. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 77, 433-44.
- Murray, M.K. (1992). Biosynthesis and immunocytochemical localization of an estrogen-dependent glycoprotein and associated morphological alterations in the sheep ampulla oviduct. *Biol Reprod* 47, 889-902.

- Murray, M.K. (1995). Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol Reprod* 53, 653-63.
- Murray, M.K., Desouza, M.M., Messinger, S.M. (1995). Oviduct during early pregnancy: hormonal regulation and interactions with the fertilized ovum. *Microsc Res Tech* 31, 497-506.
- Nadal, A., Ropero, A.B., Fuentes, E., Soria, B., Ripoll, C. (2004). Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. *Steroids* 69, 531-6.
- Nancarrow, C.D., Hill, J.L. (1995). Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. *J Reprod Fertil Suppl* 49, 3-13.
- Niswender, G.D., Nett, T.M. (1994). Corpus luteum and its control in infraprimate species. In '*Physiol Reprod*'. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) pp. 781- 816. (Raven Press: New York).
- O'callaghan, D., Boland, M.P. (1999). Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim Sci* 68, 299-314.
- O'callaghan, D., Lozano, J.M., Fahey, J., Gath, V., Snidjers, S., Boland, M.P. (2000a). Recent developments in the effect of nutrition on fertility in dairy cows. *Irish Veterinary Journal* 53, 417-426.
- O'callaghan, D., Yaakub, H., Hyttel, P., Spicer, L.J., Boland, M.P. (2000b). Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil* 118, 303-313.
- Parr, R.A., Davis, I.F., Fairclough, R.J., Miles, M.A. (1987). Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J Reprod Fertil* 80, 317-320.
- Parr, R.A. (1992). Nutrition-progesterone interactions during early pregnancy in sheep. *Fertil Develop* 4, 297-300.
- Peura, T.T., Kleemann, D.O., Rudiger, S.R., Natrass, G.S., Mclaughlan, C.J., Walker, S.K. (2003). Effect of Nutrition of Oocyte Donor on the Outcomes of Somatic Cell Nuclear Transfer in the Sheep. *Biol Reprod* 68, 45-50.

- Pflaffl, M.W. (2009). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Raddatz, J., Elias, A., Whisnant, C. (2008). Measurements of Adiponectin in lactating dairy cows. *J Anim. Sci* 86.
- Revelli, A., Massobrio, M., Tesarik, J. (1998). Nongenomic Actions of Steroid Hormones in Reproductive Tissues. *Endocr Rev* 19, 3-17.
- Reynolds, T.S., Stevenson, K.R., Wathes, D.C. (1997). Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system during earlyplacental development in the ewe. *Endocrinol* 138, 886-97
- Rhind, S.M., Martin, G.B., Mcmillen, S., Tsonis, C.G., Mcneilly, A.S. (1989a). Effect of level of food intake of ewes on the secretion of LH and FSH and on the pituitaryresponse to gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes. *J Endocrinol* 121, 325-30.
- Rhind, S.M., Mckelvey, W.A.C., Mcmillen, S., Gunn, R.G., Elston, D.A. (1989b). Effect of restricted food-intake, before and or after mating, on the reproductive performance of grey face ewes. *Anim Prod* 48, 149-155.
- Rhind, S.M., Mcmillen, S., Wetherill, G.Z., Mckelvey, W.A.C., Gunn, R.G. (1989c). Effects of low levels of food intake before and/or after mating on gonadotrophin and progesterone profiles in Greyface ewes. *Anim Prod* 49, 267-273.
- Rhind, S.M. (1992). Nutrition: its effect on reproductive performance and its control in female sheep and goats. In '*Progres in sheep and goat research*'. (Ed. Speedy,A.W.) pp. 25-52. (CAB International: Wallingford).
- Robinson, R.S., Mann, G.E., Gadd, T.S., Lamming, G.E., Wathes, D.C. (2000). The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the oestrous cycle and early pregnancy. *J Endocrinol* 165, 231-243.
- Roche, J.F., Bolandl, M.P., Mcgeady, T.A. (1981). Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *Vet Rec.*109, 401-404.
- Russel, A.J.F., Doney, J.M., Gunn, R.G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 72, 451-454.
- Rutledge, R.G and Cote, C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31, e93.

Saremi, B., Winand, S., Friedrichs, P., Kinoshita, A., Rehage, J., Danicke, S., Haussler, S., Breves, G., Mielenz, M., Sauerwein, H. (2014). Longitudinal profiling of the tissue-specific expression of genes related with insulin sensitivity in dairy cows during lactation focusing on different fat depots. *PLoS One* 9, e86211.

Satterfield, M.C., Bazer, F.W., Spencer, T.E. (2006). Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod.* 75(2):289-96.

Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Munoz-Gutierrez, M., Somchit, A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* 46, 339-54.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 10;270 (45):26746-9.

Soca, P., Carriquiry, M., Claramun, M., Gestido, V., Meikle, A. (2013). Metabolic and endocrine profiles of primiparous beef cows grazing native grassland. 1. Relationships between body condition score at calving and metabolic profiles during the transition period. *Anim Prod Sci*. <http://dx.doi.org/10.1071/AN13250>

Sosa, C., Lozano, J., Viñoles, C., Acuna, S., Abecia, J.A., Forcada, F., Forsberg, M., Meikle, A. (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim Reprod Sci* 84, 337-348.

Sosa, C., Abecia, J.A., Forcada, F., Viñoles, C., Tasende, C., Valares, J.A., Palacin, I., Martin, G.B., Meikle, A. (2006). Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 18,447-458.

Sosa, C., Abecia, J.A., Carriquiry, M., Forcada, F., Martin, G.B., Palacin, I., Meikle, A. (2009). Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 36,13-23.

Sosa, C., Carriquiry, M., Chalar, C., Crespi, D., Sanguinetti, C., Cavestany, D., Meikle, A., 2010a. Endometrial expression of leptin receptor and members of the growth hormone-Insulin-like growth factor system throughout the estrous cycle in heifers. *Anim Reprod Sci*, 122 (3-4):208-14.

- Sosa, C., González-Bulnes, A., Abecia, J.A., Forcada, F., Meikle, A., (2010b). Short-term undernutrition affects final development of ovulatory follicles in sheep synchronized for ovulation. *Reprod Dom Anim*, 45, 1033-1038.
- Spencer, T.E., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Bazer, F.W. (2004a). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 82-83, 537-50.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C. (2004b). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reprod* 128, 657-68.
- Stevenson, K.R., Gilmour, R.S., Wathes, D.C. (1994). Localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and -II messenger ribonucleic acid and type 1 IGF receptors in the ovine uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinol* 134, 1655-1664.
- Stevenson, K.R., Wathes, D.C. (1996). Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 108, 31-40.
- Tabandeh, M., Hosseini, A., Saeb, M., Kafi, M., Saeb, S. (2010). Changes in the gene expression of adiponectin and adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at different stages of development. *Therio* 73, 659-656.
- Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15, 80-101.
- Vázquez, M.I., Forcada, F., Casao, A., Sosa, C., Palacín, I., Abecia, J.A. (2009). Effects of melatonin and undernutrition on the viability of ovine embryos during anestrus and the breeding season. *Anim Reprod Sci.* 112(1-2):83-94.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchero, G., Rubianes, E. (2002). Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Anim Sci* 74, 539-545.
- Walker, S.K., Hill, J.L., Kleemann, D.O., Nancarrow, C.D. (1996). Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod* 55, 703-8.
- Wathes, D.C., Perks, C.M., Davis, A.J., Denning-Kendall, P.A. (1995). Regulation of insulin-like growth factor-I and progesterone synthesis by insulin and growth hormone in the ovine ovary. *Biol Reprod.* 53(4):882-9.

- Wathes, D.C., Reynolds, T.S., Robinson, R.S., Stevenson, K.R. (1998). Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Dairy Sci* 81, 1778-89.
- Watson, A.J., Westhusin, M.E., Winger, Q.A. (1999). IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil Suppl* 54, 303-15.
- Weems, C.W., Weems, Y.C., Lee, C.N., Vicent, D.L. (1989). Progesterone in uterine and arterial tissue and in jugular and uterine venous plasma of sheep. *Biol Reprod* 49, 1-6.
- Wijayagunawardane, M.P.B., Miyamoto, A., Cerbito, W.A., Acosta, T.J., Takagi, M., Sato, K. (1997). Local distribution of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Therio* 49, 607-618.
- Williams, A.H., Cumming, I.A. (1982). Inverse relationship between concentration of progesterone and nutrition in ewes. *J Agr Sci* 98, 517-522.
- Wintenberger-Torres, S., Flechon, J.E. (1974). Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *J Anat* 118, 143-53.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., *et al.* (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769.
- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., Kamon, J., Tsuchida, A., *et al.* (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13(3):332-9
- Ye, Y., Pu, D., Liu, J., Li, F., Cui, Y., Wu, J. (2013). Adiponectin gene polymorphisms may not be associated with idiopathic premature ovarian failure. *Gene* 15; 518(2):262-6.