

# TÍTULO: FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DURANTE LA GESTACIÓN TEMPRANA EN OVINOS

AUTOR: MSc Victoria de Brun

DIRECTOR DE TESIS: Ana Meikle

CO-DIRECTORES: Alejo Menchaca, Alfonso Abecia, Juan Loor

ORIENTACIÓN: Producción Animal

## RESUMEN

La finalidad de este proyecto es contribuir al conocimiento respecto algunos factores que afectan la sobrevivencia embrionaria haciendo énfasis en endocrinología metabólica y expresión génica embrionaria y del tracto reproductivo durante la gestación temprana. El objetivo del primer experimento es determinar el efecto de la presencia del embrión y subnutrición sobre la expresión génica en hígado, tejido adiposo y tracto reproductivo, utilizando para ello microarreglos en ovejas cíclicas y gestadas sometidas o no a subnutrición. En el segundo experimento nos proponemos dilucidar si los perfiles endócrino metabólicos difieren entre ovejas que recibieron o no un embrión y que fueron sometidas o no a subnutrición. El tercer y cuarto experimento tienen como objetivo profundizar en la comunicación entre el ovario, el útero y el embrión. En el tercer experimento se determinará la receptividad del oviducto así como el desarrollo y expresión génica embrionaria al Día 6 colocando embriones al Día 1 de desarrollo en el oviducto ipsi o contralateral a la ovulación. . En el cuarto experimento se determinará el desarrollo y expresión génica del *conceptus* al Día 14 de desarrollo luego de transferir embriones al Día 6 en el cuerno ipsi o contralateral al cuerpo lúteo (CL). En ambos experimentos se analizará la expresión génica y los fluidos de oviductos y cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL. Para estudiar la expresión génica embrionaria se realizará un análisis masivo mediante RNAseq, y para tejidos se utilizarán microarreglos. Para la validación de algunos genes relevantes se realizará PCR en tiempo real. La determinación de hormonas se realizará mediante RIA, y el análisis de proteínas del fluido oviductal y uterino mediante electroforesis bidimensional y espectrofotometría de masas. Se considera que en conjunto estos resultados contribuirán a la comprensión de los mecanismos de señalización entre la madre y embrión, y qué señales son las que se encuentran vinculadas a las pérdidas embrionarias en ovinos.

## 1) INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### **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 (Martin, 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).

### **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 del 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 del estado metabólico

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 (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). Sin embargo, ovejas subnutridas a la mitad de los requerimientos energéticos (0.5 M) a pesar de presentar menor concentración de IGF1 plasmática respecto de los controles, no presentaron diferencias en la expresión de ARNm de GHR1A o IGF1 en hígado (de Brun y col. 2014).

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). Recientemente hemos demostrado que animales subnutridos presentan alteraciones en el ARNm de IGFBP2 e IGFBP5 en el hígado (de Brun y col., 2014). Esta internacionalmente aceptado que IGFBP2 aumenta con el ayuno en diferentes especies (Thissen y col., 1994; Kita y col., 2002) y que inhibe a IGF1, por lo que el aumento del transcrito hepático de IGFBP2 estaría asociado a la disminución en la concentración de IGF1 plasmática. De forma simultánea, la disminución de IGFBP5 mRNA en animales subnutridos es consistente con el rol estimulador de la misma (Thissen y col., 1994).

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. 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 (Kobayashi y col., 1999).

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). 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).

### Hormonas metabólicas y éxito 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*.

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, de Brun y col., 2013). 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). 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 (de Brun y col., 2014). Por otro lado, animales subnutridos preñados presentaron mayores concentraciones de *IGFBP4* en hígado en relación a subnutridos no preñados (de Brun y col., 2014), y esto es consistente con reportes tanto en hígado como en útero luego de un tratamiento nutricional (Carter y col., 2005). 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), pero no encontramos reportes en ovinos. 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). Respecto de la adiponectina, se ha reportado que la adiponectina disminuye durante la lactación temprana, donde las vacas se encuentran en balance energético negativo (Giesy y col., 2012). Recientemente, hemos demostrado que la expresión génica de ADIPOR2 en hígado se ve afectada por el estatus reproductivo, ya que animales subnutridos

preñados presentan mayores concentraciones del transcripto en relación a subnutridos no preñados (de Brun y col., 2014).

Por lo tanto, hay evidencia de un rol directo de las hormonas metabólicas en eje reproductivo. Además se ha encontrado que el éxito reproductivo (mantenimiento de la gestación) en situaciones de subnutrición, está asociado a una expresión génica diferencial en tejidos metabólicos (de Brun y col., 2014). Por otro lado, la señal embrionaria (IFNt) además de mantener la preñez, induce la expresión de genes (e.j., ISG15) en células sanguíneas periféricas durante el reconocimiento materno (día 14) (Green y col., 2010). Estos hallazgos han sido foco de la investigación reciente para el desarrollo de métodos diagnósticos de preñez temprana (Han y col., 2006; Yang y col., 2010), sin embargo se desconoce si esta señalización periférica inducida por el embrión puede alterar el metabolismo materno y si está asociada al éxito reproductivo en ovejas. Sosa y col., (2009), reportaron que la expresión génica de leptina en tejido adiposo fue mayor en ovejas preñadas al día 14 post estro, respecto a las cíclicas, lo que nos sugiere que muy temprano en el desarrollo, el embrión podría modificar el metabolismo materno, pero no hemos encontrado información al respecto.

### *Efecto de la subnutrición sobre la calidad embrionaria y expresión génica del tracto reproductivo*

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 si en los días 14 y 15 de gestación. 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).

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), y ovejas subnutridas tienen similares niveles de P4 en la vena ovárica y en la arteria uterina que ovejas controles (Abecia y col., 1997; Lozano y col., 1998). Por ello, se ha reportado que los mayores niveles plasmáticos de P4 en la subnutrición no se explicarían por una mayor síntesis sino por una mayor metabolización hepática de la hormona, dado que las ovejas mejor nutridas presentaban hígados más pesados y un mayor flujo sanguíneo en la vena porta (Parr, 1992). 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, lo que fue consistente con los menores contenidos de receptores de progesterona en útero (Sosa y col., 2004). 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.

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). Recientemente, hemos demostrado que la expresión de factores de crecimiento y receptores esteroideos varían con la subnutrición, ya que los animales subnutridos presentan menor expresión génica de *IGF1* en el útero e *IGF2* en el oviducto (de Brun y col., 2013). Es conocido que la alimentación por debajo de los requerimientos de mantenimiento puede desencadenar pérdidas embrionarias y retrasos en el desarrollo del embrión ovino (Abecia y col., 2006). Modificaciones en el patrón de expresión génica donde el embrión será albergado, puede comprometer el desarrollo embrionario, debido al importante rol de los IGFs en el desarrollo embrionario y fetal en mamíferos (Pantaleon y col., 2003). Una menor expresión de estos factores en el oviducto de animales subnutridos puede alterar la motilidad del mismo, y prevenir que el embrión sea transferido al útero.

### **Importancia de la localización del tracto reproductivo respecto del Cuerpo Lúteo sobre variables reproductivas**

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 a través de una rama de la arteria ovárica directamente al oviducto y la porción craneal del cuerno uterino (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). Esto ha sido vinculado al efecto local de señalización desde el *conceptus* hacia el CL a través del mecanismo contracorriente entre la vena uterina y la arteria ovárica que evita la luteólisis previo al reconocimiento materno de la gestación (Einer-Jensen y McCracken, 1981). Sin embargo es interesante remarcar que si bien estos mecanismos de contracorriente están establecidos desde hace décadas, en general se ha puesto énfasis en el transporte desde la vena uterina a la arteria ovárica y en cambio el rol de la comunicación entre la vena y arteria ovárica no ha sido muy estudiada. Teniendo esto en cuenta, es posible que el efecto local no sólo se limite a la acción de la progesterona luego de la ovulación, sino también a la exposición del oviducto y porción craneal del cuerno ipsilateral al estradiol previo a la ovulación. Asimismo hay escasa información respecto a la funcionalidad del tracto reproductivo acorde a la posición del folículo ovulatorio y del CL.

Recientemente hemos reportado que la expresión oviductal de *PR*, *ER* e *IGF2* es menor en el lado ipsilateral en relación al contralateral al cuerpo lúteo (CL) (de Brun y col., 2013). Esta expresión dependiente del lado refiere probablemente a un ambiente hormonal diferente, 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 P4 modula su propia acción y

la de los estrógenos, mediante una rápida reducción de la concentración de sus receptores (Evans y col., 1980), los menores niveles de ARNm de *ER* y *PR* en el oviducto ipsilateral (de Brun y col., 2013) puede ser debido a una alta concentración local de P4. Estos cambios en expresión génica pueden ser importantes para la modulación de la contracción y secreción oviductal, actuando directamente o interaccionando con otros genes expresados de manera diferente en los oviductos ipsilateral y contralateral al CL (Bauersachs y col., 2013). Si bien se ha reportado que la sobrevivencia de embriones transferidos en el lado ipsilateral al CL es mayor que en el contralateral (Del Campo y col., 1979), no se sabe si el desarrollo y expresión génica embrionaria, difiere acorde al lado del tracto reproductivo respecto al CL donde el embrión es transferido.

## 2) CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Como se mencionó, las pérdidas embrionarias (25 - 55 %) se concentran en la gestación temprana (Niswender y Nett, 1994) y se ha propuesto a que se debe a problemas en la señalización entre el embrión y la madre (Goff, 2002). La nutrición es el principal factor que afecta la eficiencia reproductiva, siendo la subnutrición lo más frecuente en ovinos. El hígado y el tejido adiposo son no sólo reguladores de la homeostasis frente a situaciones de crisis energética, sino poderosos moduladores del eje reproductivo. A pesar de que se conoce que la subnutrición aumenta la mortalidad embrionaria (Abecia y col., 2006), no están claro los mecanismos moleculares que están en su base, ni tampoco como ovejas aún en subnutrición sean capaces de mantener la gestación. En el presente proyecto se busca contribuir con el conocimiento respecto de los efectos de la subnutrición y la presencia del embrión sobre la expresión génica de hígado, tejido adiposo y tracto reproductivo.

Por otro lado, si bien esta ampliamente estudiado el mecanismo de reconocimiento materno en ovinos a través de la secreción de IFNt y su acción parácrina para evitar la luteólisis y mantener la preñez (Spencer y Bazer, 2004), son pocos los estudios que se han focalizado en los efectos de ésta señal embrionaria a nivel sistémico (Godking y col., 1982). Las diferencias encontradas en la expresión génica de leptina en tejido adiposo en ovejas cíclicas y preñadas ya al día 14 post estro (Sosa y col. 2009), nos sugiere que muy temprano en el desarrollo, el embrión podría modificar el metabolismo materno, pero no hemos encontrado más información al respecto.

Por otro lado, nuestro grupo ha estudiado los efectos de la subnutrición sobre la expresión génica oviductal y uterina (Sosa y col., 2004, 2006, 2009). Recientemente, hemos reportado (de Brun y col., 2013) que la subnutrición disminuye la expresión de IGF-I e IGF-II en el útero y oviducto respectivamente. Un hallazgo interesante de éste trabajo fue que la expresión génica oviductal estaba afectada acorde a la localización del oviducto respecto del cuerpo lúteo (ipsi vs contralateral), lo que es consistente con trabajos que demuestran que existe un gradiente de esteroides a lo largo del tracto reproductivo, siendo mayor del lado ovulatorio y en las regiones más cercanas a éste (Weems y col., 1989). Esto es consistente con reportes que muestra que las tasas de preñez de embriones transferidos en el lado ipsilateral al CL es mayor que en el contralateral (del Campo y col., 1988), pero no se ha demostrado aún si el desarrollo y expresión génica embrionaria, difiere acorde al lado del tracto reproductivo respecto al CL donde el embrión es transferido, aspecto en el que se focaliza este trabajo de tesis.

En resumen, se busca determinar los efectos de la presencia del embrión y de la subnutrición sobre la endocrinología metabólica y expresión del tracto reproductivo, así como el efecto de la localización del tracto reproductivo respecto al CL sobre el desarrollo y expresión génica embrionaria y materna.

### 3) HIPÓTESIS

La presencia del embrión modifica la expresión génica en el tejido adiposo, hígado y tracto reproductivo, alrededor del reconocimiento materno y estos efectos dependen del plano nutricional.

El éxito en mantener la preñez en ovejas subnutridas a las que se les transfiere un embrión se asocia con perfiles endócrinos metabólicos y expresión de ISG15 en células sanguíneas diferenciales respecto de ovejas subnutridas que pierden el embrión.

El desarrollo embrionario temprano (morfología del embrión y expresión génica) se ve afectado por la acción local del cuerpo lúteo sobre el oviducto y el cuerno ipsilateral y esto está asociado a una funcionalidad diferencial del tracto reproductivo dependiendo de su localización. Efectos muy tempranos (anterior al Día 7) afectan la capacidad del embrión de continuar su desarrollo, aún cuando son transferidos al cuerno contralateral al CL.

### 4) OBJETIVOS

#### Objetivo General

Contribuir al conocimiento respecto los factores que afectan la sobrevivencia embrionaria haciendo énfasis en endocrinología metabólica y expresión génica embrionaria y del tracto reproductivo durante la gestación temprana.

#### Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de la presencia del embrión y la subnutrición sobre la expresión génica en hígado, tejido adiposo y tracto reproductivo alrededor del momento del reconocimiento materno de la preñez (Experimento 1).
2. Determinar los perfiles endócrino metabólicos en ovejas cíclicas y receptoras que mantienen o no la preñez luego de ser transferidas con embriones de buena calidad bajo dos planos de alimentación (Experimento 2).
3. Investigar si la expresión de ISG15 en células sanguíneas está asociada a los perfiles endócrino-metabólicos y al éxito reproductivo (Experimentos 2 y 4).
4. Determinar la calidad y expresión génica embrionaria al día 6 en embriones transferidos al día 1 al oviducto ipsi o contralateral al cuerpo lúteo (Experimento 3).
5. Determinar el desarrollo y expresión génica del *conceptus* al día 14 luego de transferir los embriones al día 6 en el cuerno ipsi o contralateral al CL (Experimento 4).
6. Determinar la expresión génica al Día 1, 6 y 14 en oviductos y cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL (Experimentos 3 y 4).

## 5) ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Para responder la interrogantes respecto los efectos de la subnutrición y la presencia del embrión sobre tejidos metabólicos (hígado y adiposo) y reproductivos (oviducto y útero) se utilizarán ovejas preñadas y cíclicas sometidas o no a subnutrición. Para realizar un screening de que genes se encuentran con expresión alterada acorde a estos dos efectos se utilizarán microarreglos (Experimento 1). Para estudiar si los perfiles endócrinos metabólicos están asociados al éxito reproductivo en ovejas subnutridas, se dispondrá de un grupo de hembras cíclicas (no receptoras) y otro de receptoras que resultaron gestantes o no y fueron sometidas a dietas de mantenimiento o subnutrición (Experimento 2). Para analizar los efectos locales del cuerpo lúteo sobre el desarrollo embrionario y expresión génica embrionaria – por RNAseq-, se transferirán embriones al oviducto (Experimento 3) o al útero (Experimento 4) ipsi y contralateral al cuerpo lúteo y se estudiarán unos días más tarde. Para visualizar si los efectos durante el desarrollo en el oviducto tienen un impacto en el desarrollo posteriori, se transferirán embriones al cuerno uterino ipsi o contralateral al CL que se desarrollaron en oviductos ipsi o contralateral al mismo.

## 6) MATERIALES Y METODOS

Los detalles de los análisis hormonales y transcriptos se encuentran descriptos más adelante en esta sección.

Experimento 1: *Determinar el efecto de la presencia del embrión y la subnutrición sobre la expresión génica en hígado, tejido adiposo y tracto reproductivo alrededor del momento del reconocimiento materno de la preñez*

Este experimento ya ha sido realizado y parte de los resultados han sido publicados (Sosa et al., 2009a, b). Ovejas Rasa Aragonesa con un peso vivo de aproximadamente 55 kg y una condición corporal alrededor de 3 fueron sincronizadas con esponjas de progestágenos por 14 días. El día de la colocación de las esponjas, las ovejas fueron divididas en 2 grupos para ser alimentadas con 1,5 o 0,5 de los requerimientos de mantenimiento diario hasta el sacrificio (Grupo Control, n=20 y Grupo Bajo, n=20). Al día 0, se detectó el estro usando machos vasectomizados. Las ovejas fueron o no sometidas a monta natural con machos intactos generando así un grupo preñado y un grupo cíclico. Al día 14 de gestación o ciclo estral los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de hígado, tejido adiposo, útero y oviducto. Las muestras se encuentran almacenadas en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, para análisis de expresión génica mediante microarrays. Se validarán algunos genes como ObR, InsR, ADIPOR1, ADIPOR2, GH, GHR, IGF1R, IGF1, IGF2, IGFBP 1-6, ER, PR mediante qPCR.

En los estudios de microarrays se combinan las técnicas de hibridización de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. De esta manera, sólo en los puntos del portaobjeto donde haya ocurrido hibridización habrá fluorescencia y la intensidad de la fluorescencia detectada será proporcional al nivel de expresión del gen en estudio.

Es así que el análisis de microarrays nos permitirá hacer un estudio comparativo de la expresión de los genes marcados. Podremos distinguir y comparar los genes que se estén sub-expresando o sobre-expresando entre las ovejas cíclicas y preñadas, y las ovejas subnutridas y controles, en cada situación fisiológica o en los diferentes tejidos mencionados previamente.

Experimento 2: *Determinar los perfiles endócrino metabólicos en ovejas cíclicas y receptoras que mantienen o no la preñez luego de ser transferidas con embriones de buena calidad bajo dos planos de alimentación. Investigar si la expresión de ISG15 en células sanguíneas está asociada a los perfiles endócrino-metabólicos y al mantenimiento de la gestación.*

Se utilizarán 80 ovejas Rasa Aragonesa que serán sometidas (n=40) o no (n=40) a subnutrición con la misma metodología que el experimento 1 y hasta el día 7 del ciclo estral. En cada grupo 30 ovejas recibirán dos embriones al día 7 luego del estro y 10 ovejas no serán transferidas continuando con el ciclo estral. Los embriones serán producidos por superovulación con FSH de ovejas donantes (Abecia y col., 2013). Sólo se transferirán embriones de calidad excelente clasificados de acuerdo a las normas de la *International Embryo Transfer Society* (2009).

Se tomarán muestras de sangre el día de sincronización de celos, a la retirada de las esponjas, el día de la transferencia de embriones y al día 18 y 40 de preñez para estudios de hormonas como insulina, leptina, adiponectina, IGF1 e IGF2, así como también sangre entera para determinación de transcritos de ISG15, factor inducido por IFNt en leucocitos.

Experimento 3: *Determinar la calidad y expresión génica embrionaria al día 6 en embriones transferidos al día 1 al oviducto ipsi o contralateral al cuerpo lúteo. Determinar la expresión génica al Día 1, 6 y 14 en oviductos y cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL.*

Se utilizarán 20 ovejas Corriedale como receptoras con un peso aproximado de 55 kg y una condición corporal cercana a 3. Se producirán 400 embriones *in vitro* de acuerdo a la metodología utilizada en el Laboratorio de IRAUy y el Intitut Pasteur en el cual participo. Diez ovejas recibirán 20 embriones en el oviducto ipsilateral y 20 en el contralateral a la ovulación al Día 1 de desarrollo (Día 0: día de la fertilización *in vitro*, ovulación), y otras 10 ovejas se utilizarán para la toma de muestras de oviductos en el mismo día. La ovulación será sincronizada de acuerdo a Menchaca y Rubianes (2004). Se utilizarán animales que hayan ovulado un folículo en un solo ovario. Al Día 6 se realizarán lavados de los cuernos uterinos y los embriones y el fluido uterino serán recuperados. Los embriones serán evaluados y clasificados morfológicamente de acuerdo a las normas de la IETS (2009) y almacenados para posteriores estudios de expresión génica por RNAseq. Se tomarán muestras de sangre al Día 1 y Día 6. Al momento de la recuperación de los embriones una porción de los oviductos y del tercio superior de los cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL serán colectados y fijados en paraformaldehído al 4% para su estudio por inmunohistoquímica y otra porción será congelada en N2 líquido y almacenada a -80°C hasta su procesamiento para estudios de expresión génica. Se caracterizarán las mismas variables en el oviducto ipsi y contralateral al folículo ovulado al Día 1. El contenido proteico de P4, E2, IGF1 e IGF2 del suero oviductal y uterino será determinado acorde a (Rodnight y col., 1988). Las muestras serán sometidas a electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (Rodnight y col., 1988) y se identificarán las proteínas por espectrometría de masas.

Se determinarán concentraciones plasmáticas de P4 y E2, y en el endometrio y oviductos se determinaran transcritos de ER $\alpha$ , PR, IGF 1 y 2, IGF1-R, INSR, GHR, IGFBP1-6, AdipoR1 y 2, ObR e intensidad de tinción de ER $\alpha$ , PR, IGF 1, IGF1-R, AdipoR1 y 2.

Además se realizará un estudio de expresión génica masiva en embriones obtenidos y colectados al Día 6 por RNAseq y luego se realizará la validación de genes relevantes mediante PCR en Tiempo Real.

Experimento 4: *Determinar el desarrollo y expresión génica del conceptus al día 14 luego de transferir los embriones al día 6 en el cuerno ipsi o contralateral al CL. Investigar si la expresión de ISG15 en células sanguíneas está asociada a los perfiles endócrino-metabólicos y al éxito reproductivo. Determinar la expresión génica al Día 6 y 14 en oviductos y cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL*

Se utilizarán ovejas Corriedale (n=40) con un peso vivo de aproximadamente 55 kg y una condición corporal cercana a 3, las cuales serán transferidas con embriones de 6 días de desarrollo. Se transferirán embriones provenientes del oviducto ipsi o contralateral al CL (producidos en el Experimento 3) al cuerno ipsi o contralateral al Día 6 del desarrollo, generando así un diseño factorial 2x2. Se transferirá un embrión por oveja en hembras con un solo CL. Estos embriones se dejarán crecer hasta el Día 14 de gestación, donde serán evaluados de acuerdo al desarrollo del *conceptus*, y almacenados para posteriores estudios de expresión génica por RNAseq. Se tomarán muestras de sangre al Día 6 y 14, para la determinación de P4. Las ovejas serán sacrificadas y una porción del tercio superior de los cuernos uterinos serán colectados y fijados utilizando el mismo procedimiento que en el experimento 3.

En el fluido uterino, se determinarán por RIA las mismas hormonas y transcriptos que en el experimento 3, y además se determinará IFNt (día 14).

En el endometrio se determinará intensidad de tinción de ER, PR, IGF1, IGF1R, AdipoR1 y 2 e IFNtR al día 14 y transcriptos de ER $\alpha$ , PR, IGF 1 y 2, IGF1-R, INSR, GHR, IGFBP1-6, AdipoR1 y 2, ObR.

### ***Determinaciones en plasma, tracto reproductivo hígado y tejido adiposo***

Todas las determinaciones se realizaran en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de República, Uruguay. Los análisis de microarrays y RNAseq serán realizados en cooperación con el Departamento de Ciencia Animal, de la Universidad de Illinois, a cargo del Prof. Juan Loor, quien es co-orientador de esta tesis.

### **Hormonas**

Todas las hormonas serán analizadas por radioinmunoanálisis (RIA) o usando un ensayo inmunoradiométrico (IRMA). Las concentraciones de IGF1 e insulina se determinarán por IRMA en fase sólida, utilizando kits comerciales según Fernández-Foren y col., (2011) y Sosa y col., (2009). Las concentraciones de adiponectina y leptina se determinarán según lo descrito por Raddatz y col., (2008) y Fernández-Foren y col., (2011) respectivamente (Artículos I y II).

Las concentraciones de progesterona se determinarán por RIA en fase sólida utilizando kits comerciales según Sosa y col., (2006).

### **Transcriptos**

Se extraerá ARN total de hígado, tejido adiposo, 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 sintetizará ADN copia (ADNc) mediante transcripción reversa usando una transcriptasa SuperScript III (Invitrogen) con primers oligo-dT y 1 $\mu$ g de ARN total como molde.

Se determinará 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). La eficiencia (E) de los ensayos

será calculada acorde a la fórmula  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$  según Rutlege y Cote, (2003). La expresión génica será 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.

### Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica (avidina-biotina-peroxidasa), previamente descrita por Meikle y col., (2000) será utilizada para visualizar la tinción proteica. Los controles negativos serán obtenidos reemplazando el anticuerpo primario con un IgG de ratón no inmune, en iguales concentraciones. La evaluación será realizada por dos observadores independientes, quienes no conocen los tratamientos asignados. La tinción específica será clasificada como negativo (-), leve (+), moderada (++) o intensa (+++), y el grado de tinción será expresado en una escala de 0-10 (Thatcher y col., 2003). La tinción media se calculará acorde a Boss y col., (1996). Todas las metodologías se encuentran desarrolladas y contamos con los anticuerpos específicos para cada proteína.

### Microarrays y RNAseq

Los microarrays de ADN son ampliamente utilizados para determinar la expresión de los niveles de ARNm en tejidos específicos. Se utilizará la Plataforma comercial Agilent (Westerhoff y Palsson, 2004), la cual contiene 43,803 sondas que representan 17,123 genes. La amplificación, marcado de sondas e hibridación será llevado a cabo por el protocolo específico de fabricante “Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis” (Quick Amp Labeling, G4140-9004; Agilent Technologies Santa Clara, CA). Cada placa de microarray contiene un número fijo de puntos, y cada punto representa un gen particular. El experimento será realizado acorde a protocolos estándares que involucran principalmente la síntesis de cDNA mediante transcripción reversa, marcado con fluoróforos (ej. Cy3 y Cy5), hibridación a las placas de arrays, lavados y escaneos de los arrays usando láser confocales. Luego del escaneo de las imágenes, los datos se encuentran listos para normalización y análisis estadísticos.

RNA-seq es una metodología de perfiles de ARN basado en secuenciación de última generación, que permite medir y comparar patrones de expresión génica con una resolución sin precedentes.

### Análisis estadístico:

Todos los análisis estadísticos se realizarán utilizando el Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1989). El nivel de probabilidad de significación estadística se fijará en  $P < 0.05$ , y  $P < 0.1$  para tendencia.

Para microarray, las redes, funciones, y las vías de análisis se generarán usando IPA (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>, Redwood City, CA). Se basa en la agrupación de genes expresados diferencialmente (DEG) en las funciones conocidas, vías y redes, basadas principalmente en estudios humanos y con roedores (Moyes y col., 2009).

Para el análisis de medidas repetidas (hormonas), se incluirá en el modelo estadístico el tratamiento, el día (observaciones) y el estatus (preñez o no), y las interacciones entre ellos. Los datos de los días previos al inicio del tratamiento nutricional serán incluidos como covariables (Sosa y col., 2009).

Todos los transcritos determinados por PCR en tiempo real se analizarán por un procedimiento mixto. Se utilizará el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , lo que implica normalización a un control endógeno (housekeeping)

( $\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ housekeeping}$ ) (Livak y Schmittgen, 2001), se incluirá en el modelo la nutrición, el estatus y la interacción entre ellos.

Para inmunohistoquímica, el promedio de intensidad de tinción de 10 campos se analizará mediante un procedimiento mixto y se incluirá en el modelo el efecto del observador y el lado ipsi o contralateral (de oviductos y útero) al CL y el tipo celular, y la interacción entre ellos.

Las variables del fluido uterino se analizarán mediante un análisis de varianza para comparar la densidad óptica relativa de cada banda de proteína. Se incluirá en el modelo el lado ipsi o contralateral (de oviductos y útero) al CL. Se utilizarán dos geles de buena resolución por muestra. Se determinará la frecuencia de bandas de proteínas por la prueba de chi cuadrado.

El análisis funcional de genes expresados diferencialmente en el contexto de las vías biológicas por RNAseq, se realizará utilizando el Método de Impacto Dinámico (Bionaz y col., 2012) con la base de datos para anotación, y Visualización Integrada Discovery (Huang y col., 2009) y el Kyoto Enciclopedia de genes y genomas (KEGG) (Kanehisa y col., 2014).

## 7) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 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. *Therio* 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.
- Ashworth, C.J. (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livest Prod Sci* 44, 99-105.
- Azzarini, M. (2002). Potencial reproductivo de los ovinos. In 'X Congreso Latinoamericano de Buiatría'. Paysandú, Uruguay pp. 123-130.
- 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.
- Bionaz, M., Loor, J.J. (2012). Ruminant metabolic systems biology: reconstruction and integration of transcriptome dynamics underlying functional responses of tissues to nutrition and physiological state. *Gene Reg Syst Bio* 6, 109-125.
- 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.
- Boos, A., Meyer, W., Schwarz, R., Grunert, E., 1996. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 44, 11-21.
- Breier, B. (1999). Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domest Anim Endocrinol* 17, 209-218.
- 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., Delavaud, C., Bonnet, M. (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 29, 3-22.
- de Brun, V., Abecia, J.A., Fernández-Foren, A., Carriquiry, M., Forcada, F., Vazquez, I., Meikle, A., Sosa, C. (2013). Undernutrition and laterality of the corpus luteum affects 461 gene expression in oviduct and uterus of pregnant ewes. *S J Agric Res* 11.
- de Brun, V., Meikle, A., Casal, A., Sequeira, M., Contreras-Solís, I., Carriquiry, M., Forcada, F., Sosa, C., Abecia, J.A. (2014). Periconceptional undernutrition modifies endocrine profiles and hepatic gene expression in sheep. *J Anim Phy Nutr* DOI: 10.1111/jpn.12261.
- Del Campo, M.R., Rowe, R.F., French, L.R., Ginther, O.J. (1977). Unilateral relationship of embryos and the corpus luteum in cattle. *Biol Reprod* 16, 580-585.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- Green, J.C., Okamura, C.S., Poock, S.E., Lucy, M.C. (2010). Measurement of interferon-tau (IFN tau) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20d after insemination in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 121(1-2), 24-33.
- Godking, J.D., Bazer, F.W., Moffatt, J., Sessions, F., Roberts, R.M. (1982). Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. *J Reprod Fert* 65, 141-150.
- Goff, A.K. (2002). Embryonic signals and survival. *Reprod Domest Anim* 37, 133-9.
- 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.
- Han, H., Austin, K.J., Rempel, L.A., Hansen, T.R. (2006). Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *J Endocrinol* 191(2), 505-12.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Prot* 4, 44-57.
- Hunter, R.E., Longcope, C., Keough, P. (1987). Steroid hormone receptors in carcinoma of the cervix. *Cancer* 1;60(3), 392-6.

- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M. (2014). Data information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *N Acid Res* 42 (Database issue): D199-205. doi: 10.1093/nar/gkt1076.
- 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 PPAR $\gamma$  and related genes in ovine placenta and uterus. *Therio* 76(3), 482-91.
- 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.
- 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.
- Livak, K. & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- 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.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-75.
- 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.
- Martin, G.B. (1995). Reproductive research on farm animals for Australia –some long-distance goals. *Reprod Fertil Dev* 7, 967-982.
- 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.
- Menchaca, A., Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 16(4), 403-13.
- Moschos, S., Chan, J.L., Mantzoros, C.S. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 77, 433-44.
- Moyes, K.M., Drackley, J.K., Morin, D.E., Bionaz, M., Rodriguez-Zas, S.L., Everts, R.E., Lewin, H.A., JJ, L.

- (2009). Gene network and pathway analysis of bovine mammary tissue challenged with *Streptococcus uberis* reveals induction of cell proliferation and inhibition of PPAR $\gamma$  signaling as potential mechanism for the negative relationships between immune response and lipid metabolism. *BMC Genomics* 10, 542.
- Niswender, G.D., Nett, T.M. (1994). Corpus luteum and its control in infraprimates 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., 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.
- Pantaleon, M., Jericho, H., Rabnott, G., Kaye, P.L. (2003). The role of insulin-like growth factor II and its receptor in mouse preimplantation development. *Reprod Fertil Dev* 15, 37-45.
- 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.
- 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.
- 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. (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).
- Rodnight, R., Zamani, R., Tweedale, A. (1988). An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. *J Neurosci Methods*. 24(1), 27-38.
- 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.
- 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.

- 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.
- Spencer, T.E., Bazer, F.W. (2004). Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci*, 82(E. Suppl.): E4-E13.
- 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.
- 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.
- Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Meikle, A., Kamimura, S., Bibly, T., Kowalski, A.A., Bandinga, L., Pershing, R., Bartolome, J., Santos, J.E. (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reprod Suppl.* 61, 253-266.
- 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.
- 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.
- 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.
- Westerhoff, H.V., Palsson, B.O. (2004). The evolution of molecular biology into systems biology. *Nat Biotechnol*, 22(10), 1249-1252.
- 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.
- 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., y col. (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., y col. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13(3), 332-9
- Yang, L., Wang, X.L., Wan, P.C., Zhang, L.Y., Wu, Y., Tang, D.W., Zeng, S.M. (2010). Up-regulation

of expression of interferon-stimulated gene 15 in the bovine corpus luteum during early pregnancy. *J Dairy Sci.* 93(3), 1000-11.

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), 262-266.

## **8) RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO**

La eficiencia productiva y por lo tanto económica de los sistemas de explotación ovina está determinada por varios factores, siendo la eficiencia reproductiva uno de los más importantes. En rumiantes, hasta un 40% de las ovulaciones se corresponden con embriones no viables y aproximadamente dos tercios de estas pérdidas ocurren durante el período de pre-implantación. En este sentido, se ha determinado que la mayor parte de las pérdidas reproductivas en rumiantes se producen en el periodo embrionario temprano. Los fallos reproductivos se ven agravados, entre otros factores, por la subnutrición o déficit energético, por lo que el manejo nutricional es fundamental a la hora de determinar la rentabilidad de las explotaciones ovinas y bovinas, siendo ambas, especies de gran impacto económico en nuestro país. Los conocimientos generados en este tipo de estudios tiene el valor agregado de ser extrapolables a la especie humana ya que el modelo ovino ha sido clásicamente un referente en Medicina humana. Específicamente, el proyecto que se presenta, puede tener gran relevancia en el entendimiento de los efectos producidos a nivel reproductivo por desórdenes alimentarios como anorexia y bulimia en mujeres. Esto es aun de mayor relevancia si tenemos en cuenta el aumento en la infertilidad humana, causante del incremento exponencial en la utilización de trasplantes embrionarios.

En nuestra opinión, el Proyecto que se solicita va a producir una serie de resultados de interés tanto desde el punto de vista científico como técnico. Desde la óptica estrictamente científica, los resultados esperables van a aportar una exhaustiva información acerca de la regulación génica de los diferentes mecanismos que determinan la viabilidad embrionaria, particularmente en las etapas iniciales de la gestación, que parece ser el momento crítico en el que actúan los factores que pueden comprometer el desarrollo de la gestación, como la subnutrición. Se espera contribuir en el desarrollo de un área relevante e incipiente en nuestro país: mortalidad embrionaria en rumiantes. Además, los resultados del proyecto también son interesantes desde el punto de vista técnico, ya que en el ámbito comercial ovino no son infrecuentes los periodos de subnutrición.

Esta sería la primer tesis a realizarse en el tema de mortalidad embrionaria en el país, involucrando el desarrollo de metodologías importantes, necesarias para resolver e investigar en el tema.

## **9) CAPACIDADES DE INVESTIGACIÓN DEL ASPIRANTE**

La formación para el doctorado se iniciará en Setiembre del presente año y se prevé una duración de aproximadamente 42 meses, finalizando por tanto en Febrero de 2018. El trabajo de campo correspondiente al primer experimento de este proyecto de doctorado ya fue realizado en la granja experimental de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, a cargo del Prof. PhD. Alfonso Abecia, quien será co-orientador de este doctorado, sin embargo no se han realizado aún los análisis de laboratorio. En cuanto a los demás experimentos, aún no han sido realizados. Se prevé que durante el primer año del doctorado se lleven a cabo los experimentos 1 y 2 planteados en el presente proyecto, el segundo año, el experimento 3 y el tercer año el experimento 4, completando así los 4 experimentos propuestos para este doctorado.

En lo que resta de este año y principios del 2015 planeo realizar un entrenamiento, bajo la supervisión de mi co-orientador Alejo Menchaca, en diversas técnicas vinculadas con la reproducción, como es fertilización in vitro, cultivo de oocitos y embriones, producción de embriones, transferencias de embriones, evaluación de calidad de oocitos y embriones, entre otras. Estos entrenamientos también servirán para poner a punto la técnica y estar prontos para comenzar con el experimento definitivo.

Además se prevé también realizar una pasantía en la Universidad de Illinois, en el Departamento de Ciencia Animal, a cargo del Prof. Phd. Juan Loor, de una duración aproximada de 3 meses. Esta pasantía me permitirá entrenarme en técnicas de bioinformática, necesarias para la interpretación de resultados de técnicas de última tecnología como son el microarray y el RNAseq, ensayos que planeo realizar para cumplir con algunos de los objetivos de este proyecto. Considero sumamente importante un entrenamiento de este carácter, ya que en nuestro país hay pocos recursos humanos capacitados para realizar esta tarea.

## **10) EQUIPOS, INFRAESTRUCTURA Y RECURSOS MATERIALES**

Este proyecto se llevará a cabo principalmente en el laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, el cual presenta el equipamiento y reactivos necesarios para las determinaciones de transcritos por PCR en tiempo Real y los análisis hormonales en plasma y fluido uterino, los cuales se realizarán utilizando los equipo Gamma contador (LB 2111 Multi Crystal Gamma Counter). Berthold Thecnologies y Vitalab Selectra 2 (perfiles metabólicos), disponibles en el laboratorio.

Los análisis de expresión génica en tejidos y embriones por microarrays y RNAseq se realizarán en la Universidad de Illinois, Laboratorio de Ciencia Animal, a cargo del Prof. PhD. Juan Loor, quien es co-orientador de este proyecto.

La producción de embriones y trabajo de campo de parte los experimentos de este proyecto se llevarán a cabo en el Instituto de Reproducción Animal Uruguay (IRAU) a cargo del Prof. PhD. Alejo Menchaca, quien es co-orientador de este proyecto.