



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**INTERACCIONES EMBRIO-MATERNALES Y SU
IMPACTO EN LA CALIDAD Y DESARROLLO
EMBRIONARIO TEMPRANO**

Andrea Graña Baumgartner

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2019



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**INTERACCIONES EMBRIO-MATERNALES Y SU
IMPACTO EN LA CALIDAD Y DESARROLLO
EMBRIONARIO TEMPRANO**

Andrea Graña Baumgartner

**Dra. Victoria de Brun
Directora de Tesis**

**Dr. Alejo Menchaca
Co-director de Tesis**

2019

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Paula Nicolini; Lic, MSc, PhD

Instituto Superior de la Carne

Centro Universitario de Tacuarembó

Universidad de la República – Uruguay

Carolina Viñoles; DMV, MSc, PhD

Centro de Salud Reproductiva de Rumiantes en Sistemas Agroforestales

Casa de la Universidad de Cerro Largo

Universidad de la República - Uruguay

Ana Laura Astessiano; Ing. Agr., MSc, PhD

Departamento de Producción Animal y Pasturas

Facultad de Agronomía

Universidad de la República – Uruguay



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

"INTERACCIONES EMBRIO-MATERNALES Y SU IMPACTO EN
LA CALIDAD Y DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO"

Por: Lic. Andrea GRAÑA BAUMGARTNER

Directora de Tesis: Dra. Victoria de Brun
Codirector de Tesis: Dr. Alejo Menchaca

Tribunal

Presidente: Dra. Paula Nicolini

Segundo Miembro: Dra. Carolina Viñoles

Tercer Miembro: Dra. Laura Astessiano

Fallo del Tribunal: APROBADA CON MENCIÓN

Salón de Posgrados
Viernes 5 de julio de 2019

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

“Wholehearted living requires courage in the face of uncertainty”

Brené Brown

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a la gran mujer detrás de todo este esfuerzo, mi tutora y madre académica Vicky. Estoy segura de que aunque el tiempo pase y nos hagamos viejitas, tú serás una de las mujeres más importantes de mi vida, quién siempre estuvo al frente y apoyándome en cada paso. Gracias por haberme acompañado en esta etapa, por ayudarme a ser una mejor persona y científica.

Ana, gracias por haberme abierto una ventana en mi mente a esta hermosa ciencia. Por ayudarme a creer que si se puede, por tu pasión y amor incondicional a lo que haces, que al transmitirlo me llegó al corazón y pude sentirme libre de amar y vivir en este mundo científico.

Gracias a las bellísimas del LEMA; Andre, Isa, Claudieitor, Gretelcilla, Paulini, Chiqui, Ro y Mati, francamente no se me ocurre, ni viví, el pertenecer a un equipo tan glorioso como este!. Son familia en mi corazón.

Alejo, gracias por mostrarme el mágico mundo de la vida embrionaria. Por apoyarme y ayudarme en esta etapa, por enseñarme cosas nuevas y hacerme sentir que estoy en el camino correcto.

A Batzi, por ser el mejor compañero que un ser vivo podría tener. Tu paciencia y amor sin reservas, gracias por ayudarme a seguir adelante, por acompañarme siempre e inspirarme con tu visión brillante de la vida. No imagino persona más hermosa que tú para compartir esta vida.

A mi familia y amigos, quienes siempre estuvieron ahí para darme ánimos, para acompañarme y apoyarme siempre en cada etapa. Gracias por estar ahí, son una parte de mí.

Lograr llegar a este punto equivale a un esfuerzo impresionante de muchísimas personas, muchas más de las que están aquí nombradas. Gracias a todas ellas, por su esfuerzo y paciencia, por la garra que le metieron para que este proyecto salga adelante. Gracias!!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	10
SUMMARY	11
LISTA DE TABLAS	13
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	15
El ciclo sexual en el ovino	15
<i>Fase folicular</i>	16
<i>Fase luteal</i>	17
Desarrollo embrionario temprano	18
Regulación endocrina y de la expresión génica sobre la función oviductal y uterina	20
Importancia sobre la localización del CL sobre el tracto reproductivo ipsilateral	25
2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	26
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos específicos	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
Diseño experimental	29
<i>Manejo animal y toma de muestras</i>	29
<i>Producción de embriones in vitro</i>	32
Determinaciones en plasma, fluido uterino y tejido reproductivo	32
<i>Ensayos hormonales</i>	32
<i>Aislamiento de ARN y transcripción reversa</i>	34
<i>Cuantificación de ADNc por PCR en Tiempo Real</i>	35
Análisis estadístico	37
6. RESULTADOS	38
Recuperación y calidad embrionaria	38
Concentraciones hormonales	38
<i>Concentraciones plasmáticas</i>	38

<i>En macerados de tejido oviductal</i> _____	38
<i>En macerados de tejido uterino</i> _____	39
<i>En fluido uterino</i> _____	40
Efecto local del CL sobre la expresión génica del tejido oviductal ipsi y contralateral _____	40
Efecto local del CL sobre la expresión génica del tejido uterino ipsi y contralateral _____	41
7. DISCUSIÓN _____	43
8. CONCLUSIONES _____	51
9. CONSIDERACIONES FINALES _____	52
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	54

RESUMEN

Se conoce que entre un 25 y un 55% de los embriones mamíferos se pierden durante la gestación temprana, y aproximadamente dos tercios de estas pérdidas ocurren durante el período de pre-implantación. Si bien se ha estudiado que el sitio donde se transfieren los embriones respecto al cuerpo lúteo (CL) impacta sobre el desarrollo y supervivencia embrionaria y el establecimiento de la preñez, hay escasa información respecto a la funcionalidad del tracto reproductivo acorde a la posición del CL. Este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto local del CL sobre la funcionalidad oviductal-uterina y el desarrollo embrionario en la oveja, mediante un modelo de transferencia embrionaria ipsi y contralateral al CL. Fueron transferidos 499 cigotos producidos *in vitro* a oviductos ipsilaterales y contralaterales al CL en 12 ovejas que se encontraban en el día siguiente a la ovulación (18-20 embriones por oviducto). El Día 0 fue definido como el día de la fertilización *in vitro* de los embriones, y el día de la ovulación en las ovejas receptoras. Al Día 6, se recuperaron los tractos reproductivos para el estudio de la funcionalidad y para la recuperación de los embriones. Se encontró una tendencia a presentar mayores tasas de recuperación embrionaria ($P=0,09$), tendencia a mayor proporción de blastocistos ($P=0,07$) y una mayor proporción de embriones viables ($P=0,002$) cuando los cigotos fueron transferidos al oviducto ipsilateral respecto al contralateral al CL. El oviducto ipsilateral tuvo casi cinco veces más alta la concentración de progesterona ($P<0,001$) y presentó menores concentraciones de estradiol ($P=0,05$) con respecto al oviducto contralateral, lo que indica un mejor ambiente uterino para el desarrollo embrionario. Asimismo, se observó una mayor concentración de adiponectina en los macerados de tejido uterino del lado ipsilateral respecto al contralateral al CL. En el fluido uterino se observó una menor concentración de insulina en el lado ipsilateral con respecto al fluido uterino contralateral al CL ($P=0,05$), lo que sugiere una mayor captación de esta hormona por los embriones y/o el útero. No se encontraron diferencias en las concentraciones de progesterona y estradiol entre los fluidos ipsi y contralaterales, como tampoco para las hormonas medidas en útero. En el

tejido oviductal se encontró una menor expresión de *PR* e *IGFBP5* y una mayor expresión de *ADIPOR1* en el lado ipsilateral respecto al oviducto contralateral. En útero, la expresión de *ERalfa*, *LEPR* y *IGFBP3* e *IGFBP5* fue mayor del lado ipsilateral. En conclusión, esta tesis muestra que hay una tendencia a una mayor tasa de recuperación de embriones y mayor proporción de embriones viables, cuando los cigotos se transfieren del lado ipsilateral al CL, lo que estuvo asociado con mayores concentraciones de P4, una concentración diferencial de insulina y adiponectina, y una expresión diferencial de *PR*, *ERalfa*, *IGFBP3,5*, *LEPR* y *ADIPOR1*, genes relevantes para la adaptación del útero a la preñez, entre el lado ipsi y contralateral al CL. Los resultados nos permiten sugerir que al Día 6 después de la ovulación, el oviducto/cuerno uterino ipsilateral al CL presentan un entorno más adecuado para el desarrollo embrionario temprano con respecto al lado contralateral.

SUMMARY

It is known that between 25 and 55% of mammalian embryos are lost during early pregnancy, and approximately two thirds of these losses occur during the pre-implantation period. Although, it has been studied that the site where embryos are transferred with respect to the corpus luteum (CL) impacts on embryonic development, survival and the establishment of pregnancy, there is little information regarding the functionality of the reproductive tract according to the position of the CL. The objective of this study is to evaluate the local effect of CL on oviductal-uterine functionality and embryonic development in sheep, using an embryonic transfer ipsi and contralateral to CL model. 499 zygotes produced *in vitro* were transferred to ipsilateral and contralateral oviducts to CL in 12 ewes that were on the day after ovulation (18-20 embryos per oviduct). Day 0 was defined as the day of *in vitro* fertilization of the embryos, and the day of ovulation in the recipient ewe. On Day 6, reproductive tracts were recovered for the study of functionality and for the recovery of embryos. We found a tendency to present higher rates of embryonic recovery ($P=0.09$), a tendency of a higher

proportion of blastocysts ($P=0.07$) and a higher proportion of viable embryos ($P=0.002$) when the zygotes were transferred to the ipsilateral oviduct with respect to the contralateral one of the CL. The ipsilateral oviduct had almost five times higher progesterone concentration ($P<0.001$) and had lower concentrations of estradiol ($P=0.05$) with respect to the contralateral oviduct, indicating a better uterine environment for embryonic development. Likewise, a higher concentration of adiponectin was observed in uterine tissue macerates on the ipsilateral side with respect to the contralateral to CL. In the uterine fluid, a lower concentration of insulin was observed on the ipsilateral side with respect to the uterine fluid contralateral to the CL ($P=0.05$), which suggests a greater uptake of this hormone by the embryos and/or the uterus. No differences were found in the concentrations of progesterone and estradiol between the ipsi and contralateral fluids, nor for the hormones measured in the uterus. In the oviductal tissue there was a lower expression of *PR* and *IGFBP5* and a higher expression of *ADIPOR1* on the ipsilateral side with respect to the contralateral oviduct. In the uterus, the expression of *ERalpha*, *LEPR*, *IGFBP3* and *IGFBP5* was greater on the ipsilateral side. In conclusion, this thesis shows that there is a trend towards a higher embryo recovery rate and a higher proportion of viable embryos when the zygotes are transferred from the ipsilateral side to the CL, which was associated with higher concentrations of P4, a differential concentration of insulin and adiponectin, and a differential expression of *PR*, *ERalpha*, *IGFBP3,5*, *LEPR* and *ADIPOR1*, relevant genes for the adaptation of the uterus to pregnancy, between the ipsi and contralateral side to CL. The results allow us to suggest that at Day 6 after ovulation, the uterine oviduct/horn ipsilateral to CL presents a more adequate environment for early embryonic development with respect to the contralateral side.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Representación esquemática del diseño experimental para estudiar el efecto local del cuerpo lúteo (CL) en el oviducto ipsilateral y contralateral/cuerno uterino en ovejas. El Día 0 se definió como el día de la fertilización *in vitro* para los embriones (panel A) y como el día de la ovulación para las ovejas receptoras (panel B). En el Día 1 (panel C), se transfirieron 18-20 embriones al oviducto ipsi y contralateral al CL (36-40 embriones por oveja). Las hembras fueron sacrificadas en el Día 6 para la recuperación de los embriones del cuerno uterino y para el análisis de oviducto/útero (hormonas y expresión génica).

Tabla 1 Secuencias de los primers utilizados (F: forward, R: reverse) para la cuantificación relativa de ARNm de los genes de interés y endógenos para ovinos.

Tabla 2 Desarrollo y viabilidad embrionaria de embriones producidos *in vitro* y transferidos al oviducto ipsilateral y contralateral al cuerpo lúteo. Los embriones se transfirieron el Día 1 luego de la fertilización *in vitro* y fueron recuperados el Día 6.

Tabla 3 Efecto de la lateralidad del cuerpo lúteo sobre las concentraciones (media \pm SEM) de progesterona (ng/g), estradiol (pg/g), relación progesterona:estradiol, insulina (μ UI/g), IGF1 (ng/g), leptina (ng/g) y adiponectina (ng/g) en el tejido oviductal, en el Día 6 luego de la ovulación en ovejas.

Tabla 4 Efecto de la lateralidad del cuerpo lúteo sobre las concentraciones (media \pm SEM) de progesterona (ng/g), insulina (μ UI/g), IGF1 (ng/g), leptina (ng/g) y adiponectina (ng/g) en el tejido uterino, en el Día 6 luego de la ovulación en ovejas.

Tabla 5 Efecto local del cuerpo lúteo sobre la expresión génica diferencial, ipsi y contralateral, (media \pm SEM) oviductal del receptor de progesterona (*PR*), el receptor de estrógeno alfa (*ERalfa*), el factor de crecimiento tipo insulina 1 (*IGF1*), el receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (*IGF1R*), receptor de insulina (*INSR*), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1-6 (*IGFBP1-6*), receptor de leptina (*LEPR*), receptor 1-2 de adiponectina (*ADIPOR1-2*) en el Día 6 de preñez en ovejas.

Tabla 6 Efecto local del cuerpo lúteo sobre la expresión génica diferencial, ipsi y contralateral, (media \pm SEM) uterina del receptor de progesterona (*PR*), el receptor de estrógeno alfa (*ERalfa*), el factor de crecimiento tipo insulina 1 (*IGF1*), el receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (*IGF1R*), receptor de insulina (*INSR*), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1-6 (*IGFBP1-6*), receptor de leptina (*LEPR*), receptor 1-2 de adiponectina (*ADIPOR1-2*) en el Día 6 de preñez en ovejas.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La eficiencia reproductiva impacta de manera significativa sobre la eficiencia productiva y económica de los animales de producción. Hasta un 60% de las tasas de gestación se pierden en el período de peri-implantación, de hecho, se conoce que sólo un 40% de las ovulaciones se corresponden con embriones viables al día 12 de gestación en ovinos (Ashworth, 1995). Dentro de los posibles motivos de estas pérdidas se incluyen las anomalías del ovocito, espermatozoide o del embrión, insuficiencia lútea y/o falla en el suministro de progesterona (P4) al oviducto y útero (Takahashi y col., 2016). Más allá de esto, una estricta sincronía entre el ambiente materno y el embrión en etapas tempranas del desarrollo, es sumamente esencial para asegurar la supervivencia del embrión (Goff 2002; Martal y col., 1997; Rizos y col., 2016; Maillo y col., 2016). Esta sincronía se encuentra determinada por diversos factores de crecimiento, proteínas, citoquinas, hormonas y otras sustancias sintetizadas tanto por el endometrio como por el embrión a la interfase embrio-maternal (Martal y col., 1997).

El ciclo sexual en el ovino

La actividad sexual y reproductiva del ovino está influenciada por el fotoperiodo vinculado con la variación de las horas de luz u oscuridad a lo largo del año. De esta manera, en aquellas regiones donde existe variación en la duración de las horas de luz de cada día, en las ovejas hay una estacionalidad sexual y reproductiva. Por encima de 30° de latitud sur o norte, la mayor actividad sexual de esta especie se encuentra al final del verano y al comienzo del otoño, así los partos ocurrirían durante la primavera ya que este es el mejor momento para que los corderos tengan mejores posibilidades para sobrevivir. Dentro de esta actividad reproductiva, la oveja presenta una continuidad de ciclos sexuales de una duración aproximada de 17 días, variando entre los 16 y 19 días. El ciclo sexual se puede dividir en dos fases, folicular y luteal.

Fase Folicular

Los rumiantes se caracterizan por presentar dos a cuatro ondas de crecimiento folicular, siendo la última onda la que resultará en ovulación (Bartlewski y col., 1999). En cada onda de crecimiento, varios folículos antrales son reclutados para el desarrollo, los cuales son sometidos a un proceso de selección, y en especies mono-ovulatorias un sólo folículo adquirirá dominancia, mientras que los otros degeneraran gradualmente (Aerts y Bols, 2010). Los folículos más grandes de la cohorte secretan altos niveles de estradiol, lo que causa una disminución de las concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH). La caída en los niveles de FSH causa la atresia de los folículos más pequeños, mientras que un folículo dominante evita su propia regresión al cambiar su dependencia de FSH a la hormona luteinizante (LH). En ovejas que desarrollan 3 ondas por ciclo, la primera onda emerge alrededor del Día 0 del ciclo, la segunda alrededor del Día 6 y la tercera alrededor del Día 11 del ciclo (Abecia y Forcada, 2010; Gordon, 2003).

El momento en que la hembra acepta la monta del macho marca el comienzo del celo, el cual dura entre 24 y 40 horas dependiendo de la raza, la edad y la época del año. Entre las 2 y 6 horas del comienzo del celo, se da un pico de la LH tras la cual se dará la ovulación a las 24-32 horas de inicio del mismo (Abecia y Forcada, 2010). El pico de LH, inducido por la hipófisis a través del hipotálamo, desencadena los eventos de maduración del folículo preovulatorio dominante. En las 24 horas que le siguen a este pico, el ovocito primario experimenta la progresión de la meiosis hacia la metafase II, como también varios cambios a nivel citoplasmático, como el alineamiento de los gránulos corticales (modifican la zona pelúcida y evitan la poliespermia), rearreglos de las mitocondrias y el desarrollo del almacenamiento lipídico (como fuente de energía) (Gordon, 2003). Durante la maduración final del ovocito, el folículo también sufre una serie de cambios. Las células de la membrana granulosa dejan de sintetizar estradiol y la pared del folículo se luteiniza, tanto la capa de las células de la granulosa como la de la teca antes de ocurrir la ovulación; esta luteinización, para la formación posterior del CL, coincide con un

incremento marcado de síntesis de progesterona (P4) y una expansión importante de las células del cúmulo. Las células de la teca son aquellas que van a producir la P4, inmediatamente después de ocurrido el pico de LH. Además, ese pico preovulatorio de LH se asocia con un incremento importante del flujo sanguíneo al ovario y al folículo dominante aumentando la presión folicular, como también los niveles de prostaglandinas, los cuales son compuestos de lípidos activos que están asociados al incremento de las contracciones de la musculatura lisa ovárica (Abecia y Forcada, 2010).

Fase luteal

Previamente a que el ovocito sea liberado del folículo en la ovulación, las células foliculares de la teca comienzan a transformarse en células luteales pequeñas, mientras que las de la granulosa pasan a ser células luteales grandes para formar el CL, en donde el producto principal de secreción deja de ser el estradiol y pasa a ser otro esteroide, la P4, marcando el comienzo de la fase lútea. Al liberarse el ovocito con las células del cúmulo que lo rodean al oviducto luego de la ovulación, el ovocito sigue en estrecho vínculo con las células del cumulus hasta que ocurre la fertilización, luego comienza el desmontaje del complejo cúmulo-ovocito dejando así al ovocito desnudo. Se cree que esta degradación de la matriz posterior a la ovulación está promovida por las secreciones del ovocito las cuales activan la expresión de genes en las células del cúmulo (Gordon, 2003).

Existen muchos reportes que indican que la competencia del desarrollo del ovocito del rumiante se adquiere de manera gradual (Gandolfi, 1994, 1998). Un ovocito totalmente competente es capaz de mantener el desarrollo embrionario y llegar al término de la preñez. El intervalo de tiempo entre la síntesis y el uso de ARN y proteínas moleculares podría llevar varias semanas; lo que quiere decir esto, es que el ovocito debe poseer la manera de poder almacenar varias moléculas en el estado de quiescencia hasta que llegue el momento en donde estas se activan durante la maduración o el desarrollo embrionario temprano. Se conoce que en los rumiantes, los factores maternos esenciales para sostener el desarrollo y estos podrían

actuar más allá de la etapa de transición madre-embrión, la cual se alcanza entre el estadio de 8 a 16 células (Gandolfi y Gandolfi, 2001).

Desarrollo embrionario temprano

La fecundación es un proceso complejo que ocurre dentro del ambiente controlado del oviducto, en donde una de las funciones del fluido oviductal es la modulación de la fisiología espermática (Killian, 2004). En estudios anteriores se ha formulado la idea de que la fertilización ocurre en la ampolla del oviducto, en donde existe una sincronización entre la ovulación y el movimiento espermático, el cual tiene el efecto de atraer una porción baja de espermatozoides del reservorio en el istmo hacia la ampolla del oviducto (Hunter, 1994, 1996; Nancarrow y Hill, 1995; Hunter y col., 1998). Las contracciones del músculo y la acción de las cilias contribuyen al transporte hacia arriba de los espermatozoides y hacia abajo de los ovocitos hacia el sitio de fertilización. Lo que ocurre naturalmente, es que el macho sirve a la hembra en el período de estro y los espermatozoides se encontrarán presentes por lo general varias horas en el tracto reproductivo antes de que ocurra la ovulación. El período de vida de los espermatozoides en el oviducto se cree que está en el orden de las 24-48 horas en el rumiante cuando hablamos de semen fresco, pero si este es sometido al proceso de congelado-descongelado, el tiempo disminuiría a 12-24 horas. La fertilización involucra la activación del ovocito por los espermatozoides, sin este estímulo el ovocito no sería capaz de formar el pronúcleo y desarrollarse en un cigoto (Gordon, 2003).

Luego de la fertilización, el embrión sufre sus primeras divisiones celulares en el oviducto, y en el ovino alcanza el útero como mórula alrededor del día 4 post-ovulación (Spencer y col., 2013). Durante este período el embrión sufre varios cambios morfológicos y bioquímicos, los cuales son afectados por el entorno en el cual se encuentra. Entre estos cambios, se ha demostrado que durante los primeros días del desarrollo embrionario en rumiantes se da lo que se conoce como activación de genoma embrionario (EGA), donde el embrión cambia la utilización del ARNm derivado del genoma materno a la utilización de su propio ARNm (Memili y First, 2000).

Se considera que la activación del genoma embrionario es el momento más crítico para la viabilidad durante el desarrollo temprano (Meirelles y col., 2004) y se asocia con eventos tempranos de diferenciación, el éxito en la implantación del embrión y el desarrollo fetal (Niemann y Wrenzycki, 2000). Gad y col. (2012) encontraron que la modificación de las condiciones de cultivo *in vivo* a partir de *in vitro*, o viceversa, en el momento de EGA influye críticamente sobre los patrones de expresión génica de los blastocitos resultantes. Si continuamos con la línea de tiempo del desarrollo embrionario, el blastocisto se forma hacia el Día 6 del desarrollo por compactación de la mórula y formación del blastocele, a través de la secreción de líquido producido por las blastómeras, formando una cavidad rodeada por células trofoblásticas. Este, en su forma esférica, eclosiona de la zona pelúcida entre los días 7 y 8 (Spencer y col., 2004) y hacia el Día 11 va adoptando una forma tubular que luego se elonga convirtiéndose en un embrión filamentososo entre los días 12 y 16 en el rumiante (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). Es entre los días 10-12 de gestación, donde comienza la secreción del interferón tau embrionario, que provoca cambios en el tracto reproductivo determinando el destino del CL (luteólisis o mantenimiento del CL: reconocimiento materno de la preñez al Día 14, en ovinos). Es ampliamente aceptado que este reconocimiento materno ocurre en el útero, sin embargo, existen estudios que indican que incluso en el oviducto el embrión es capaz de secretar una señal que la madre puede reconocer y que el oviducto mismo puede responder específicamente acorde a la presencia o no del embrión (Maillo y col., 2016). La elongación del blastocisto marca el comienzo de la implantación, aunque la adhesión firme al endometrio en ovinos no ocurre hasta el Día 16 (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). Sin embargo, el destino del embrión se decide antes de la implantación y es allí donde hay una alta incidencia de mortalidad embrionaria (Roche y col., 1981; Goff, 2002).

Si bien se acepta que los embriones en la etapa de pre-implantación son relativamente autónomos, el ambiente materno donde se desarrolla el embrión, a través de la secreción de diversas hormonas y factores de crecimiento, determina la viabilidad futura del mismo (Kaye, 1997; Mann y

Lamming, 2001). Más aún, un ambiente perturbado puede no afectar al embrión inmediatamente, pero si 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 (por ejemplo en oviducto), de hecho, existe evidencia que sugiere la influencia positiva del oviducto en la calidad del embrión temprano. Anteriormente se han realizado estudios en bovinos en donde embriones cultivados *in vitro*, en los que se realizó un pasaje por el oviducto mostraron un mejor desarrollo y calidad en términos morfológicos, de expresión génica, criotolerancia y mejores tasas de preñez luego de ser transferidos Enright y col., 2000; Rizos y col., 2002). Por lo tanto, se conoce que el embrión en el oviducto sufre cambios epigenéticos responsables de su desarrollo posterior, la implantación y el fenotipo posnatal (Wrenzycki y col., 2005). Estudios previos han demostrado que la presencia de un único embrión en el oviducto no produce una respuesta detectable en términos de cambios en el transcriptoma, sin embargo, la presencia de múltiples embriones creciendo en el ambiente oviductal sí logra provocar cambios detectables en el transcriptoma oviductal (Maillo y col., 2015) demostrando la comunicación desde el embrión hacia el oviducto en etapas muy tempranas.

Regulación endocrina y de la expresión génica sobre la función oviductal y uterina

El control de la función del tracto reproductivo está finamente regulado, principalmente por las hormonas esteroideas sexuales, P4 y estradiol (E2). 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 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, lo que asegura una sincronización con la fertilización y el desarrollo temprano del embrión (Murray y col.,1995; Buhi, 2002; Killian, 2004). Además, se conoce que la P4 y E2 son los principales moduladores del transporte de los embriones a través del oviducto mediante la acción de las células ciliares y la contracción del músculo oviductal (Wijayagunawardane y col., 1998).

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 estrógenos promueven la proliferación celular en el endometrio (Murray, 1992, 1997; Comer y col., 1998), provocan un rápido aumento en el número de células epiteliales sensibles a los esteroides y preparan el epitelio uterino y el estroma para la acción de la P4 (Niswender y Nett, 1994; Maslar, 1988). La P4 actúa en el útero asegurando su quiescencia, estimulando y manteniendo las funciones secretoras endometriales esenciales para el desarrollo temprano del embrión, implantación, placentación y un correcto desarrollo feto-placentario hasta el término de la gestación (Graham y Clarke, 1997). Una porción considerable de las pérdidas embrionarias son atribuidas a una circulación inadecuada de la concentración de P4 o a la baja expresión génica de sus receptores en el endometrio (Lonergan, 2011). Mientras que las bajas concentraciones de P4 están implicadas en menores tasas de preñez (Diskin y Morris, 2008), las altas concentraciones de P4 circulante en el período de post-concepción se asocian a un desarrollo avanzado en la elongación del concepto (Garrett y col., 1988; Carter y col., 2008; Satterfield y col., 2006), en un incremento de la producción del interferón tau (Mann y Lamming, 1999; Mann y Lamming, 2001) y en mayores tasas

de preñez en los ovinos (Stronge y col., 2005; Ashworth y col., 1989; McNeill y col., 2006). Asimismo, el tejido secretor epitelial del oviducto y el útero se diferencian en respuesta al E2 y la P4, modificando las concentraciones de ciertas proteínas en estos tejidos (Murray y Sower 1992; Murray 1995; Yániz y col., 2000; Gray y col., 2001).

La P4 y E2 ejercen sus efectos a través de dos grandes mecanismos de acción. El mecanismo genómico -el clásico- que involucra la unión de la hormona a su receptor intracelular, que luego se dimeriza y se une como un factor de transcripción a los elementos sensibles a P4 o E2 en el promotor de los genes diana (Binelli y col., 2018). El mecanismo no genómico o no clásico, sin embargo, tiene lugar de manera rápida, en unos minutos inicia la activación de canales iónicos, segundos mensajeros y quinasas, antes de cualquier efecto genómico. Este mecanismo no clásico se ha asociado con interacciones de hormonas esteroideas con moléculas unidas a la membrana, mostrando la respuesta inducida por la hormona esteroide ovárica por parte de las células que carecen de expresión de los receptores intracelulares clásicos (Binelli y col., 2018).

Por otro lado, factores embriotróficos y mitogénicos, como los factores de crecimiento también están presentes en el fluido del oviducto y del útero en cantidades variables (Gandolfi y col., 1989). Potencialmente, estos factores actúan de manera autócrina o parácrina para regular la función del oviducto, útero y/o el desarrollo embrionario (Bui 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. La existencia de estos receptores y las proteínas relacionadas con la insulina se pueden tomar como posibles mediadores de la acción del oviducto en el desarrollo embrionario. También es interesante observar que las proteínas secretadas por el oviducto ovino y bovino presentan una fuerte sinergia con la insulina para estimular la mitosis de los fibroblastos embrionarios (Gandolfi, 1992). Esto podría representar el enlace funcional entre las moléculas específicas del oviducto que se unen estrechamente al embrión y a los diversos factores de crecimiento presentes en el fluido oviductal (Gandolfi, 1995). En un estudio de Schmidt

y col. (1994), encontraron un aumento significativo de los niveles de ARNm de *IGF1* en el oviducto bovino después de la ovulación, como también detectaron mayores concentraciones de IGF1 en el momento en que el óvulo fertilizado pasa a través del oviducto. Este grupo de estudio sugiere que IGF1 podría modular el clivaje y la diferenciación de las células oviductales durante la ovulación, lo que influye en la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.

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). Estos factores de crecimiento podrían estimular el desarrollo embrionario directamente, o indirectamente, estimulando la secreción endometrial. En el endometrio ovino, se ha demostrado la expresión del ARNm de *IGF1*, *IGF2* y sus receptores (Stevenson y col., 1994; Thissen y col., 1994; Stevenson y Wathes, 1996; Reynolds y col., 1997, de Brun y col., 2013).

La actividad de los IGFs y sus concentraciones están moduladas por al menos seis proteínas de unión a IGF (IGFBPs) y por enzimas proteolíticas (BP-Pr). Estas proteínas de unión a IGF tienen varias funciones, las cuales incluyen el transporte de IGF en la circulación, la localización de las IGF a tipos celulares específicos y la modulación de la unión de IGF a los receptores, así como también, acciones independientes a IGF (Clemmons, 1993). La proteína de unión IGFBP3 es el principal transportador de IGF1 e IGF2 en suero formando un complejo ternario con una subunidad ácido lábil, se cree que el 95% de la concentración total de ambos IGF se encuentra unido a ella. El resto está vinculado a IGFBP1-2 y 4, en donde menos del 1% del total permanece libre en condiciones fisiológicamente normales (Baxter y col., 1989).

La insulina también presenta un rol importante en la regulación del crecimiento embrionario durante la preimplantación, promoviendo la proliferación celular y la diferenciación morfológica de embriones, ya que se ha descrito la presencia de receptores de insulina tanto en el endometrio como en el embrión (Harvey y Kaye, 1990, Gardner y Kaye, 1991). De

hecho, Heyner y col. (1989) reportaron que la insulina puede ser internalizada por los embriones en etapa previa a la implantación, mediante endocitosis mediada por el receptor, los cuales se conoce que se expresan en los embriones tempranos. La insulina estimula la síntesis de proteínas en embriones compactados de 8 células, blastocistos y blastocistos expandidos (Harvey y Kaye, 1988; Wales y col., 1985). Esta instancia se corresponde con el aumento de la capacidad de los embriones para metabolizar la glucosa y a la aparición de receptores de insulina en la membrana vitelina (Harvey y Kaye, 1991; Mattson y col., 1988).

Por otro lado, también existe evidencia de un rol directo de las hormonas metabólicas, como la leptina y adiponectina en el eje reproductivo (Downing y col., 1995; Keller y col., 1998; Wathes y col., 1998; Kawamura y col., 2002; Moschos y col., 2002). La leptina, un péptido sintetizado principalmente por el tejido adiposo, aunque también se expresa en otros tejidos como el hígado, páncreas y tracto reproductivo (González y col., 2000; Chilliard y col., 2005). De hecho, la síntesis de leptina y de su receptor ha sido demostrada en el endometrio de mujeres (González y col., 2000), roedores (Kawamura y col., 2002) y ovejas (Sosa y col., 2010). Se han identificado receptores de leptina en embriones (Kawamura y col., 2003) y se ha registrado la expresión génica de la misma en embriones previos a la implantación, asociando la presencia de esta hormona con el crecimiento del embrión (Antczak y Van Blerkom, 1997; González y col., 2000; Kawamura y col., 2002). Aunque el significado fisiológico de esta hormona aún no se ha aclarado del todo, parece plausible que esta pueda tener funciones locales importantes en el tracto reproductivo, desde el transporte y la maduración de los ovocitos y espermatozoides, hasta la fertilización y el desarrollo de los embriones (Archanco y col., 2007).

Existe escasa información respecto a la adiponectina y su rol en ovinos, sin embargo, esta ha sido vinculada con la reproducción (Scherer y col., 1995; Kasimanickam y Kasimanickam, 2011). Se han identificado dos tipos de receptores de adiponectina ADIPOR1 y ADIPOR2, cada uno con funciones diferentes (Hug y col., 2004; Yamauchi y col., 2007). La identificación de los receptores de adiponectina, así como su amplia distribución en tejidos y

órganos periféricos sugiere que esta hormona ejerce efectos pleiotrópicos en el metabolismo de todo el organismo (Nishida y col., 2007; Hug y col., 2004). Estos receptores se han reportado en diversos tejidos periféricos como placenta (Caminos y col., 2005), ovario (Michalakis y Segars, 2010), y recientemente se ha demostrado la presencia de estos receptores en el útero ovino durante la preñez temprana (Sequeira y col., 2016). En ratones se observó la existencia de adiponectina en los gránulos secretores de las células epiteliales oviductales, lo que indica que esta podría tener un papel clave durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Archanco y col., 2007). En el bovino, la expresión proteica de *ADIPOR1* y *ADIPOR2* en blastocistos apoya la idea de una acción directa de la adiponectina sobre las células embrionarias y un papel potencial de esta adipoquina en el desarrollo del embrión (Maillard y col., 2010).

Importancia de la localización del CL sobre el tracto reproductivo ipsilateral

La vena oviductal adyacente al CL es una posible vía para la administración local de progesterona u otros productos ováricos hacia la primera rama de sangre venosa, que drena a la porción craneal del cuerno uterino. Las concentraciones de progesterona son mayores en la rama de la vena uterina que drena la parte craneal que en la rama que drena la porción caudal del cuerno uterino al Día 4 luego de la ovulación (Weems y col., 1989). La vena oviductal se origina alrededor del ovario y generalmente continúa como la primera rama venosa, drenando el oviducto y la porción craneal del cuerno uterino (Del Campo y Ginther, 1973). También se ha demostrado que la concentración de progesterona es mayor en la linfa uterina adyacente al CL que en la sangre periférica de las ovejas (Staples y col., 1982). Por lo tanto, las diferencias regionales en los niveles de progesterona en el tejido uterino en los rumiantes podrían deberse a contribuciones de la linfa ovárica o de la vena oviductal adyacente.

Por lo tanto, gracias a estos reportes podemos comprender de que la región más cercana al CL presenta una concentración mayor de P4 y esto resulta en un gradiente de P4 a lo largo del tracto reproductivo pudiendo influenciar el desarrollo embrionario temprano de forma diferencial acorde a la localización del embrión en el tracto reproductivo (ipsi o contralateral al

CL). En la década de 1970, Del Campo y col. (1977) realizaron un estudio en bovinos donde transfirieron embriones a los cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL y demostraron que el lugar donde se transfieren los embriones respecto al CL de hecho impacta en el mantenimiento del CL y el establecimiento de la gestación. Sin embargo, a partir de estos trabajos pioneros que dieron lugar al conocimiento actual sobre la relación entre el embrión y el CL ipsilateral, *nunca se ha propuesto un mecanismo inverso y previo a este, es decir que surja desde el CL hacia el embrión en la etapa más temprana del desarrollo.*

Se ha reportado en ovinos que a los 5 días luego del estro o preñez, la expresión oviductal de *PR*, *ERalfa* e *IGF2* es menor en el lado ipsilateral en relación al contralateral al CL (Sosa y col., 2006; de Brun y col., 2013, respectivamente), lo que refiere probablemente a un ambiente hormonal diferente, establecido por la distribución local de productos ováricos al tracto reproductivo (Einer-Jensen y McCracken, 1981; Weems y col., 1989; Wijayagunawardane y col., 1998). Estos cambios en expresión génica pueden ser importantes para la modulación de la secreción uterina, actuando directamente o interaccionando con otros genes expresados de manera diferente en los cuernos uterinos ipsilateral y contralateral al CL (Bauersachs y col., 2003).

En esta propuesta se estudiarán los mecanismos de señalización entre la madre y los embriones, desde el CL al oviducto y cuerno uterino ipsilateral, y qué señales son las que se encuentran vinculadas a las pérdidas embrionarias en ovinos. *Es importante destacar que no se encuentran estudios de este porte, ya que no es posible hacerlo en condiciones in vivo. Para esto aplicamos un modelo experimental en el que se realiza la transferencia de embriones producidos in vitro a oviductos ipsi y contralaterales al CL, evaluando además la acción de hormonas vinculadas a la preñez, así como también el estudio de la expresión génica en el tracto reproductivo durante la preñez temprana en el ovino.*

2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

El desarrollo embrionario temprano es probablemente el período más crítico en el desarrollo de los mamíferos, en donde ocurren importantes cambios morfológicos y bioquímicos (Maillo y col., 2015). En rumiantes existe una comunicación de señales desde el embrión a la madre mediante un mecanismo bastante particular propio de estas especies, dado que existe un sistema de contracorriente sanguínea a través de un paquete vascular arteriovenoso uterino y ovárico. Si bien se ha estudiado previamente que el lugar donde se transfieren los embriones respecto al CL impacta sobre el mantenimiento del CL, hay escasa información respecto a algún vínculo más temprano que pueda ejercerse desde el CL hacia el embrión.

Más aún, si bien existe abundante información acerca de la expresión génica uterina en rumiantes y su regulación, la información sobre la importancia del efecto local del CL sobre la regulación de la expresión génica en el tracto reproductivo es escasa (de Brun y col., 2013). En este sentido, un hallazgo interesante de nuestro grupo de investigación (de Brun y col., 2013) indicó que la expresión génica oviductal se encuentra afectada acorde a la localización del oviducto respecto al CL (ipsi vs contralateral). Esto es consistente con trabajos anteriores, en los cuales han demostrado que de hecho 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). En efecto, un estudio de Bauersachs y col. (2003) describió una expresión diferencial de 35 genes al comparar los oviductos ipsilaterales con los contralaterales al CL en el bovino.

Para estudiar estos mecanismos descritos, hemos planteado un modelo experimental en ovinos en el que se transfieren cigotos recién fecundados al oviducto ipsi y contralateral al CL en el primer día luego de la ovulación, con el fin de evaluar el efecto del CL a nivel local sobre el desarrollo embrionario temprano y la funcionalidad del tracto reproductivo.

3. HIPÓTESIS

El ambiente materno dentro de los 6 días posteriores a la ovulación se ve afectado por el CL, el cual influye en el desarrollo de embriones producidos *in vitro* mediante un efecto local ipsilateral al ovario en el que se encuentra dicho CL.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la localización del CL (ipsi vs. contralateral) sobre el ambiente oviductal y uterino a través de expresión génica y concentraciones hormonales, y el subsiguiente desarrollo *in vivo* de embriones tempranos producidos *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos

Determinar:

1. La viabilidad, desarrollo y recuperación de embriones de Día 6, transferidos al Día 1 de desarrollo al oviducto ipsi y contralateral al cuerpo lúteo.
2. Las concentraciones hormonales al Día 6 y los efectos del CL sobre P4, E2, IGF1, insulina, leptina y adiponectina en plasma, fluido uterino, tejido oviductal y uterino del lado ipsi y contralateral.
3. El efecto del CL sobre la expresión génica, en macerados de tejido uterino y oviductal ipsi y contralaterales al Día 6 luego de la ovulación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Manejo animal y toma de muestras

Este experimento se llevó a cabo con ovejas cíclicas durante la temporada reproductiva (Abril-Mayo 33^o S, Uruguay) en la Fundación IRAUy (Instituto de Reproducción Animal Uruguay), el Instituto Pasteur de Montevideo y el Campo Experimental No. 1 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Ruta 108, Km 11.91, Migues, Canelones, Uruguay). El experimento fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria (Exp-111130-001236 / 14).

La estrategia para este estudio incluyó la producción de embriones *in vitro* para ser transferidos a hembras receptoras al Día 1 del desarrollo embrionario/ovulación en cantidades iguales a los oviductos ipsi y contralaterales con respecto al CL (el Día 0 fue definido como el día de la fertilización *in vitro* para los embriones, y el día de la ovulación en las receptoras) (Figura 1). Los embriones fueron recuperados al Día 6 para evaluar su estado de desarrollo y su viabilidad. La funcionalidad del tracto reproductivo se evaluó el Día 6 en términos de concentraciones hormonales y expresión génica en los oviductos y cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL. Adicionalmente, se determinaron las concentraciones hormonales en plasma y fluido uterino.

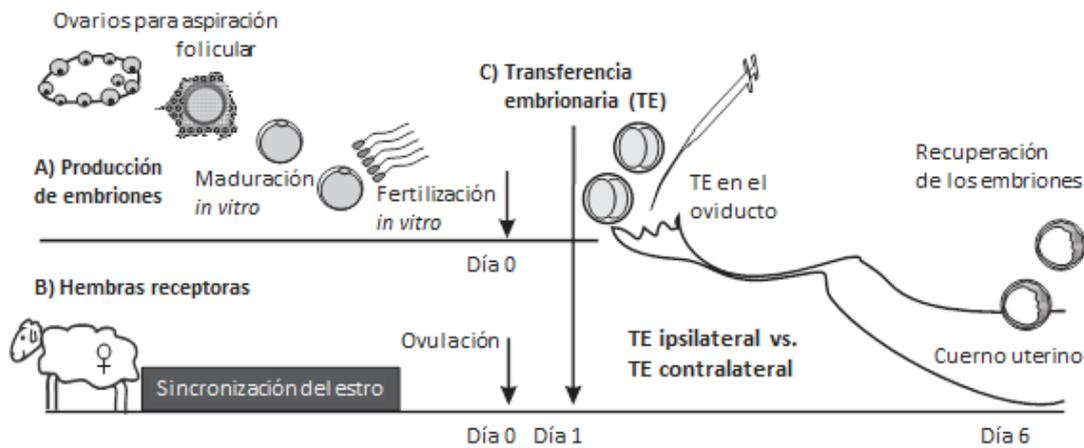


Figura 1. Representación esquemática del diseño experimental para estudiar el efecto local del cuerpo lúteo (CL) en el oviducto ipsilateral y contralateral/cuerno uterino en ovejas. El Día 0 se definió como el día de la fertilización *in vitro* para los embriones (panel A) y como el día de la ovulación para las ovejas receptoras (panel B). En el Día 1 (panel C), se transfirieron 18-20 embriones al oviducto ipsi y contralateral al CL (36-40 embriones por oveja). Las hembras fueron sacrificadas en el Día 6 para la recuperación de los embriones del cuerno uterino y para el análisis de oviducto/útero (hormonas y expresión génica).

Se seleccionaron 50 ovejas multíparas de la raza Corriedale, con un peso corporal medio (\pm SEM) de $57,7 \pm 4,4$ kg y una condición corporal de $3,3 \pm 0,4$ en una escala de 0 a 5 (Russel, 1969), lo deseable para un adecuado funcionamiento reproductivo a largo plazo. Para sincronizar el estro, se utilizó un tratamiento de 7 días con esponjas intravaginales impregnadas en medroxiprogesterona (Progespon, Syntex SA, Bs As, Argentina), según Menchaca y Rubianes (2004). Inmediatamente después de la remoción de la esponja, se administró por vía intramuscular 200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Novormon 5000, Syntex SA) y una dosis luteolítica de PGF2alfa (Cloprostenol sódico 125 μ g, Cyclase DL, Syntex SA). El estro se detectó dos veces diarias durante 48 horas luego de la remoción de las esponjas, mediante el uso de machos vasectomizados. Se seleccionaron únicamente aquellas ovejas que tuvieron el inicio del estro dentro de un rango de 12 h (es decir, de 24 a 36 h después de la extracción de la esponja) asumiendo que alcanzaron la ovulación sincronizada 36 h más tarde (es decir, de 60 a 72 h desde la extracción de la esponja, Día 0 del

ciclo ovulatorio). La ovulación fue confirmada por laparoscopia al Día 1 y solo se utilizaron aquellas hembras que tenían un solo cuerpo hemorrágico (n=12). El Día 0 del experimento se definió como el día de la fertilización *in vitro* para los embriones, coincidiendo con el día de la ovulación en las ovejas receptoras.

Los embriones producidos luego de la fertilización *in vitro* se transfirieron en el Día 1 al oviducto ipsi y contralateral al CL, ingresando suavemente a través del infundíbulo 3 a 4 cm para depositarlos próximo al ampulla (18 a 20 embriones por oviducto). La transferencia embrionaria se realizó mediante un procedimiento quirúrgico, en donde el acceso al alimento y agua se restringió durante 24 h previas a la misma.

En el Día 6 del desarrollo embrionario, antes de la recuperación de los embriones, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos de heparina y se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 g, el plasma obtenido se almacenó a -20°C hasta su procesamiento. En ese mismo día, los animales fueron sedados mediante anestesia general inducida por tiopental sódico (Tiobarbital, Braun Medical) y se eutanasiaron (T-61®, Intervet, Salamanca, España). Inmediatamente se obtuvo el tracto reproductivo y se realizó un lavado de los cuernos uterinos en forma retrógrada, es decir, desde la porción craneal a la caudal, para recuperar los embriones. Primero, el cuerno uterino ipsilateral se lavó con 2 mL de una solución salina para recuperar el fluido uterino. En estos 2 mL se recuperó el mayor número de embriones, los cuales fueron seleccionados y recuperados. Posteriormente, se realizó un lavado con 20 mL adicionales para recoger el resto de los embriones que hayan quedado en el cuerno uterino. Se aplicó el mismo procedimiento para el cuerno uterino ipsi y contralateral a CL. Los embriones recuperados fueron evaluados y clasificados morfológicamente de acuerdo con los estándares de la IETS (2010), basado en las calidades I (85% del espacio dentro de la zona pelúcida, ocupado por el macizo celular) y II (50% del espacio ocupado por el macizo celular) para blastocistos y calidad I (blastómeros de igual tamaño, sin fragmentación citoplasmática) y calidad II (blastómeros de igual tamaño, con leve fragmentación citoplasmática) para mórulas. Entre los

parámetros evaluados se tomaron en cuenta la tasa de recuperación, tasa de desarrollo embrionario y la proporción de embriones viables.

Una vez que se colectaron los embriones, también se colectaron los oviductos y una porción del tercio superior de los cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL. Parte de estos tejidos fueron utilizados para la determinación hormonal, y otra parte de los cuernos uterinos y oviductos se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento para expresión génica.

Producción de embriones *in vitro*

Todos los procedimientos de laboratorio correspondientes a la producción de embriones se llevaron a cabo en la Fundación IRAUy (Instituto de Reproducción Animal Uruguay), como también en el Instituto Pasteur de Montevideo. Los embriones fueron producidos de acuerdo a la técnica descrita por Menchaca y col. (2016). Se colectaron ovarios de ovejas de matadero y se transportaron al laboratorio en una solución salina con 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina a 35–37°C. Los complejos cúmulo-ovocitos (COCs) fueron aspirados de los folículos antrales (2 a 6 mm) utilizando una aguja y una jeringa de 5 mL que contenía 0,5 mL de medio de recolección con HEPES, medio de cultivo tisular 199 (TCM 199), suplementado con 5 UI/mL de heparina, 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina. Solo los COCs rodeados con tres o más capas de células de la granulosa y con citoplasma homogéneo se seleccionaron para la maduración. Los COCs seleccionados se colocaron en gotas de 100 µL de medio de maduración bajo aceite mineral durante 22 a 24 h, en donde luego se procedió a la realización de la fertilización *in vitro*, con medio SOF (líquido oviductal sintético), utilizando semen congelado de un solo carnero. Al día siguiente luego de la fertilización (Día 1), los embriones se acondicionaron en pajuelas de 0,25 mL con medio SOF con HEPES para luego transportarse al campo experimental para ser transferidos dentro de las 4 horas siguientes.

Determinaciones en plasma, fluido uterino y tejido reproductivo

Las determinaciones hormonales y de expresión génica se llevaron a cabo en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

Ensayos hormonales

Las concentraciones de P4, IGF1, insulina, leptina y adiponectina fueron determinadas en macerados de tejido oviductal y uterino, como también en fluido uterino. La concentración de estradiol se determinó en macerados de oviducto. En plasma, se determinaron las concentraciones de P4, estradiol, insulina e IGF1. Estas hormonas se analizaron con ensayos que utilizan anticuerpos radiomarcados, según Rodnight y col. (1988).

Para el análisis hormonal en el tejido uterino, se cortaron aproximadamente 500 mg de la porción craneal de los cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL y se homogeneizaron con un buffer isotónico, utilizando un homogeneizador de tejidos (PRO200) a 9500-13500 rpm durante 45 segundos (Sosa y col., 2009). Para el análisis del tejido oviductal, todo el tejido se maceró para homogeneizar la muestra y luego se seleccionaron entre 300 y 500 mg de tejido para el análisis hormonal. Una vez macerado el tejido oviductal y uterino, se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos para obtener el sobrenadante. Para hormonas peptídicas tales como IGF1, insulina, leptina y adiponectina, el sobrenadante se utilizó para realizar un radioinmunoensayo (RIA). Sin embargo, para las hormonas esteroides, como P4 y estradiol, se realizaron cuatro extracciones sucesivas con éter y luego se resuspendieron en 300 µL de buffer para el análisis por RIA. La concentración de P4, estradiol, IGF1, insulina, leptina y adiponectina medida en el útero y oviducto se expresaron en relación con los gramos de tejido utilizados en la maceración.

Las concentraciones de P4 se determinaron mediante RIA en fase sólida utilizando un kit comercial (MP Biomedicals, Diagnostics, Santa Ana, CA, EE. UU.), según Sosa y col. (2006). La sensibilidad del ensayo para P4 en

plasma, tejido uterino y oviductal fue de 0,3 ng/mL, 0,09 ng/mL y 0,04 ng/mL, respectivamente. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo para plasma (0,5 ng/mL), tejido uterino (3,6 ng/mL) y tejido oviductal (5,0 ng/mL) fueron 28,3%, 15,1% y 2,3%, respectivamente. La concentración de P4 no fue detectada en el fluido uterino por RIA.

Las concentraciones de estradiol se determinaron mediante un radioinmunoensayo en fase líquida utilizando kits de MP (MP Biomedicals, EE. UU.). La sensibilidad del ensayo para el tejido oviductal fue de 3,0 ng/mL y para plasma de 0,3 ng/mL. El CV intraensayo para el tejido oviductal (16,5 ng/mL) y plasma (7,2 ng/mL) fue de 4,1% y 13,4%, respectivamente. El volumen de la muestra obtenida no fue suficiente para la determinación de estradiol en el fluido uterino.

La concentración de IGF1 e insulina se determinó mediante un ensayo inmunorradiométrico (IRMA) en fase sólida, utilizando un kit comercial (Diagnostic Product Co., Los Ángeles, CA, EE. UU.) según Sosa y col. (2009) y Fernández-Foren y col. (2011). Para IGF1, la sensibilidad del ensayo en plasma, tejido oviductal, uterino y fluido uterino fue de 1,2 ng/mL, 0,4 ng/mL, 0,5 ng/mL y 0,4 ng/mL, respectivamente. El CV intraensayo para plasma (637,5 ng/mL), tejido oviductal (40,0 ng/mL), tejido uterino (417,4 ng/mL) y fluido uterino (47,6 ng/mL) fue de 0,03%, 0,3%, 4,2% y 11,6% respectivamente. Para la insulina, la sensibilidad del ensayo en plasma y fluido uterino fue de 1,3 μ UI/mL, en tejido oviductal fue de 3,1 μ UI/mL y en tejido uterino fue de 4,3 μ UI/mL, el CV intraensayo para plasma (18,7 μ UI/mL), tejido oviductal (13,1 μ UI/mL), tejido uterino (62,8 μ UI/mL) y fluido uterino (18,7 μ UI/mL) fue de 6%, 1,3%, 0,2% y 6%, respectivamente.

La leptina y la adiponectina fueron determinadas por RIA de acuerdo a Raddatz y col. (2008) como lo describe Fernández-Foren y col., (2011). Para la leptina, la sensibilidad del ensayo en el tejido oviductal fue de 5,2 ng/mL y en tejido uterino de 2,9 ng/mL. El CV intraensayo para el tejido oviductal (76,4 ng/mL) y tejido uterino (14,2 ng/mL) fue de 7,2% y 15,5%,

respectivamente. La concentración de leptina no se detectó en el fluido uterino por RIA. Además, la concentración de esta hormona en plasma no se pudo determinar debido a que el volumen de la muestra restante no fue suficiente para el análisis. Para adiponectina, la sensibilidad del ensayo en tejido oviductal y fluido uterino fue de 2,4 ng/mL y en el tejido uterino de 2,5 ng/mL. El CV intraensayo para el tejido oviductal y fluido uterino (100,0 ng/mL) y para el tejido uterino (12,1 ng/mL) fue de 1% y 13,7%, respectivamente. Al igual que la leptina, el volumen de la muestra obtenida no fue suficiente para la determinación de adiponectina en plasma.

Aislamiento de ARN y transcripción reversa

Para la extracción de ARN del tejido oviductal y uterino, se utilizó TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), seguido de una precipitación con cloruro de litio y tratamiento con DNAsa utilizando un kit DNA-freeTM (Invitrogen). La concentración de ARN se determinó al medir la absorbancia a 260 nm y su pureza se evaluó en un radio de absorción de 260 a 280 nm. Para cada muestra, se sintetizó ADNc por transcripción reversa utilizando una transcriptasa SuperScript III (Invitrogen) con primers oligo-dT y 1 µg de ARN total como molde.

Cuantificación de ADNc por PCR en Tiempo Real

La expresión génica se cuantificó en el tejido uterino y oviductal ipsi y contralateral a la ovulación mediante PCR en Tiempo Real (qPCR) de los siguientes genes de interés: *PR*, *ERalfa*, *IGF-1*, *IGF-1R*, *IGFBP1-6*, *INSR*, *LEPR* y receptor de adiponectina 1 y 2 (*ADIPOR1* y *ADIPOR2*), con *HPRT* (Carriquiry y col., 2009) y *RPL19* (Chen y col., 2006) como controles endógenos (housekeeping) (Tabla 1). La expresión de *IGBP1* no se logró determinar en útero debido a falta de muestras.

Las reacciones a ser utilizadas para el PCR en Tiempo Real se prepararon utilizando una mezcla de 7,5 µL de SYBR®Green master-mix (kit Quantimix EASY SYG, Biotools B & M Labs, Madrid, España), cantidades equimolares de los primer forward y reverse (10 µM, Biotecnologías Operon GmbH,

Cologne, Alemania), 2 μL de la muestra de ADNc y 4,5 μL de agua libre de ARNasa/ADNasa en un volumen final de 15 μL .

Las muestras se analizaron por duplicado en un rotor de 72 pocillos Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Las condiciones de amplificación estándar fueron de: 5 min a 95°C y 40 ciclos de 15s a 95°C, 45s a 60°C y 20s a 72°C. Al final de cada corrida, se analizaron las curvas de disociación para asegurar de que el amplicón deseado estuviera siendo detectado y para descartar dímeros de primer contaminantes, también se utilizó un control sin molde, control negativo NTC, (No Template Control) para corroborar la ausencia de ADN contaminante.

Un total de 13 muestras de ADNc se agruparon para proporcionar un control exógeno, además se utilizaron cinco diluciones (100, 50, 25, 12,5 y 6,25 ng/tubo) de este pool para realizar una regresión lineal para cada gen. La eficiencia (E) de las pruebas se calculó de acuerdo a la fórmula $E = 10^{(-1/\text{pendiente}) - 1}$ de acuerdo a Rutledge y Cote (2003).

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados (F: forward, R: reverse) para la cuantificación relativa de ARNm de los genes de interés y endógenos para ovinos.

Gen	Número de acceso	Secuencia del primer	Largo del amplicón (pb)	Eficiencia oviducto	Eficiencia útero	Fuente
<i>HPRT</i>	XM_590802	F TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG R CACAGAGGGCCACAATGTGA	105	1,15	1,08	(Carriquiry y col., 2009)
<i>RPL19</i>	NM_001040516.1	F CCCCAATGAGACCAATGAAATC R CTGGAGACCCCTTCTGAG	119	1,05	1,05	(Chen y col., 2006)
<i>PR</i>	Z66555	F GACAGCACTTTCTAGGCGACAT R TGTGCTGGAAGAAACGATTGC	79	1,15	1,21	(Sosa y col., 2009)
<i>ERalfa</i>	AYO33393	F AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC R CGGTGGATGTGGCTCTCTCT	234	1,42	1,10	(Sosa y col., 2009)
<i>IGF1</i>	NM_001009774.3	F TTGCACTTCAGAAGCAATGG R ACTGGAGAGCATCCACCAAC	209	0,78	0,87	(de Brun y col., 2015)
<i>IGF1R</i>	NM_001244612.1	F GACCATCAAAGCTGGGAAAA R TTATGTCCCCTTTGCTCTGG	116	1,04	0,87	(de Brun y col., 2015)
<i>IGFBP1</i>	NM_174554.3	F TCAAGAAGTGAAGGAGCCCT R AATCCATTCTTGTGTCAGTTT	127	0,43	—	(Fenwick y col., 2008)
<i>IGFBP2</i>	NM_174555.1	F ATGCGCCTTCCGGATGA R GTTGACAGGCCATGCTTGCA	74	1,05	1,07	(Astessiano y col., 2012)
<i>IGFBP3</i>	AF305199.1	F AGCACAGACACCCAGAACTTCT R TTCAGCGTGTCTCCATTCC	86	1,15	1,12	(Pinotti y Rosi., 2006)
<i>IGFBP4</i>	S77394.1	F ATGTGCCTGATGGAGAAAGG R AAGGCAGAGCCACAGACAGT	98	1,42	0,82	(de Brun y col., 2015)
<i>IGFBP5</i>	NM_001129733.1	F GGTTCCTGAACGAAAAGA R CTGGGTCAGCTTCTTCTGC	193	1,05	0,81	(de Brun y col., 2015)
<i>IGFBP6</i>	AY197339	F GGAGAGAATCCCAAGGAGAGTAA R GAGTGGTAGAGTCCCGAGT	100	1,01	1,20	(Fenwick y col., 2008)
<i>INSR</i>	XM:004008038.1	F TGGCTCCTACAGCTGGACAGT R TCAGCACCCAGGATGGTT	86	1,01	0,77	(de Brun y col., 2015)
<i>LEPR</i>	NM_001009763.1	F CAGCGTTGGTCTAACATT R GCAGCAGTACACTGCGTCAT	215	1,15	1,04	(de Brun y col., 2015)
<i>ADIPOR1</i>	NM_001034055.1	F GGCTCTACTACTCCTTCTAC R ACACCCCTGCTCTTGTCTG	154	1,15	0,65	(de Brun y col., 2015)
<i>ADIPOR2</i>	NM_001040499.2	F GGCAACATCTGGACACATC R CTGGAGACCCCTTCTGAG	203	1,05	1,12	(de Brun y col., 2015)

HPRT = Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa, *RPL19* = Proteína ribosomal L19, *PR* = Receptor de progesterona, *ERalfa* = Receptor de estrógenos alfa, *IGF1* = Factor de crecimiento similar a la insulina 1, *IGF1R* = Receptor de IGF tipo 1, *IGFBP1-6* = Proteínas de unión al factor similar a la insulina, *INSR* = Receptor de insulina, *LEPR* = Receptor de leptina, *ADIPOR1* = Receptor de adiponectina 1, *ADIPOR2* = Receptor de adiponectina 2.

*Secuencias ovinas de GeneBank

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.), con el procedimiento PROC MIXED para las variables hormonales, transcriptos y embriones. La normalidad de los datos fue chequeada para todos los análisis. En el caso que los datos no cumplieron con el criterio de normalidad, se realizó el logaritmo para proceder al análisis estadístico. Para determinar la recuperación, el desarrollo y la viabilidad embrionaria, el lado (ipsi vs. contralateral) se consideró como factor fijo, utilizando el número de embriones transferidos como covariable, y el animal como efecto aleatorio. Para el análisis de la concentración hormonal en el fluido uterino, el tejido uterino y oviductal, se incluyó en el modelo estadístico la lateralidad (ipsi o contralateral) al CL. Todos los transcriptos determinados por PCR en tiempo real se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, lo que implica la normalización a la media geométrica de los genes, tomando en consideración las eficiencias de amplificación respectivas. ($\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ housekeeping}$) (Livak y Schmittgen, 2001). Para el análisis de la expresión génica, el modelo incluyó el lado ipsi o contralateral al CL, como también se utilizó la concentración de P4 en plasma como covariable. El nivel de probabilidad de significancia estadística se fijó en $P \leq 0,05$, y $P \leq 0,1$ para tendencia.

6. RESULTADOS

Recuperación y calidad embrionaria

Al Día 6, de los 18-20 embriones transferidos por oviducto, se tendió a recuperar una mayor proporción estructuras del cuerno uterino ipsilateral respecto al contralateral al CL (Tabla 2). De estos embriones recuperados, el cuerno uterino ipsilateral presentó una mayor proporción de embriones viables respecto al cuerno contralateral al CL (Tabla 2). Asimismo, se tendió a encontrar una mayor proporción de blastocistos respecto a los embriones recuperados, del cuerno ipsilateral en comparación con embriones transferidos al lado contralateral al CL (Tabla 2).

Tabla 2. Desarrollo y viabilidad embrionaria de embriones producidos *in vitro* y transferidos al oviducto ipsilateral y contralateral al cuerpo lúteo. Los embriones se transfirieron el Día 1 luego de la fertilización *in vitro* y fueron recuperados el Día 6.

	Ipsilateral	Contralateral	P
N° embriones recuperados (estructuras recuperadas/embriones transferidos)	8,8 ± 1,2	6,3 ± 1,2	0,09
Desarrollo embrionario (blastocistos /embriones recuperados)	2,1 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,07
Embriones viables (viables/embriones recuperados)	6,8 ± 0,9	3,6 ± 0,9	0,002

Concentraciones hormonales

Concentraciones plasmáticas

La concentración plasmática de P4, estradiol, IGF1 e insulina en el momento de la recuperación de embriones (Día 6) fue de 0,8 ± 0,4 ng/mL, 6,2 ± 1,7 pg/mL, 274,5 ± 62,5 ng/mL y 20,7 ± 6,6 µUI/mL, respectivamente.

En macerados de tejido oviductal

Las concentraciones de progesterona fueron casi 5 veces más altas en los macerados del oviducto ipsilateral que en el oviducto contralateral (Tabla 3). Las concentraciones de estradiol fueron más altas en el lado contralateral que en el oviducto ipsilateral (Tabla 3). Consistentemente, la relación progesterona:estradiol fue 3.5 veces mayor en el oviducto ipsilateral respecto al oviducto contralateral (Tabla 3). Por otro lado, la ubicación del oviducto de acuerdo con el CL no afectó la concentración de IGF1, insulina, leptina o adiponectina (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la lateralidad del cuerpo lúteo sobre las concentraciones (media \pm SEM) de progesterona (ng/g), estradiol (pg/g), relación progesterona:estradiol, insulina (μ UI/g), IGF1 (ng/g), leptina (ng/g) y adiponectina (ng/g) en el tejido oviductal, en el Día 6 luego de la ovulación en ovejas.

	Ipsilateral	Contralateral	P
Progesterona (ng/g)	57,3 \pm 15,1	11,6 \pm 4,8	<0,001
Estradiol (pg/g)	99,1 \pm 10,4	122,7 \pm 10,1	0,05
Progesterona:Estradiol	499 \pm 61	144 \pm 55	0,002
Insulina (μ UI/g)	14,3 \pm 1,8	14,8 \pm 1,8	NS
IGF1 (ng/g)	6,0 \pm 0,3	5,9 \pm 0,2	NS
Leptina (ng/g)	40,7 \pm 5,1	41,9 \pm 5,1	NS
Adiponectina (ng/g)	142,5 \pm 17,3	160,3 \pm 16,6	NS

En macerados de tejido uterino

La ubicación del tracto reproductivo de acuerdo al CL afectó solamente las concentraciones de adiponectina entre los cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL, observándose una mayor concentración de la misma del lado ipsilateral al CL (Tabla 4). No se afectaron las concentraciones del resto de las hormonas medidas en útero, entre los cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la lateralidad del cuerpo lúteo sobre las concentraciones (media \pm SEM) de progesterona (ng/g), insulina (μ UI/g), IGF1 (ng/g), leptina (ng/g) y adiponectina (ng/g) en el tejido uterino, en el Día 6 luego de la ovulación en ovejas.

	Ipsilateral	Contralateral	P
Progesterona (ng/g)	8,2 \pm 1,7	6,4 \pm 1,6	NS
Insulina (μ UI/g)	35,1 \pm 3,0	29,6 \pm 3,0	NS
IGF1 (ng/g)	157,7 \pm 12,7	130,9 \pm 13,3	NS
Leptina (ng/g)	66,8 \pm 9,7	74,7 \pm 10,9	NS
Adiponectina (ng/g)	153,3 \pm 9,5	124,3 \pm 9,5	0,04

En fluido uterino

Las concentraciones de insulina fueron menores en el fluido uterino ipsilateral con respecto al contralateral (3,9 \pm 0,3 vs. 4,6 \pm 0,2 μ UI/mL; P=0,05). Sin embargo, la ubicación de los cuernos uterinos con respecto al CL no afectó las concentraciones de IGF1 (1,6 \pm 0,3 vs. 1,7 \pm 0,3 ng/ml) o adiponectina (6,3 \pm 0,5 vs. 6,9 \pm 0,4 ng/ml) entre los fluidos uterinos ipsi o contralaterales al CL.

Efecto del CL sobre la expresión génica del tejido oviductal ipsi y contralateral

El tejido oviductal ipsilateral presentó una menor expresión de *PR* e *IGFBP5* y una mayor expresión de *ADIPOR1* con respecto al tejido oviductal contralateral al CL (Tabla 5). No se encontraron diferencias para ninguno de los otros genes medidos en oviducto (*ERalfa*, *IGF-1*, *IGF-1R*, *INSR*, *IGFBP1-4*, *6*, *LEPR* y *ADIPOR2*).

Tabla 5. Efecto local del cuerpo lúteo sobre la expresión génica diferencial, ipsi y contralateral, (media \pm SEM) oviductal del receptor de progesterona (*PR*), el receptor de estrógeno alfa (*ERalfa*), el factor de crecimiento tipo insulina 1 (*IGF1*), el receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (*IGF1R*), receptor de insulina (*INSR*), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1-6 (*IGFBP1-6*), receptor de leptina (*LEPR*), receptor 1-2 de adiponectina (*ADIPOR1-2*) en el Día 6 de preñez en ovejas.

Gen	Ipsilateral	Contralateral	P
<i>PR</i>	1,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	0,05
<i>ERalfa</i>	1,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	NS
<i>IGF1</i>	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	NS
<i>IGF1R</i>	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	NS
<i>INSR</i>	0,8 \pm 0,04	0,8 \pm 0,04	NS
<i>IGFBP1</i>	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	NS
<i>IGFBP2</i>	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	NS
<i>IGFBP3</i>	1,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	NS
<i>IGFBP4</i>	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	NS
<i>IGFBP5</i>	0,9 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	0,03
<i>IGFBP6</i>	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	NS
<i>LEPR</i>	1,0 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	NS
<i>ADIPOR1</i>	0,9 \pm 0,03	0,8 \pm 0,03	0,05
<i>ADIPOR2</i>	1,1 \pm 0,04	1,1 \pm 0,04	NS

Efecto del CL sobre la expresión génica del tejido uterino ipsi y contralateral

El tejido uterino ipsilateral al CL presentó una mayor expresión de ARNm de *ERalfa*, *LEPR* e *IGFBP3* y una tendencia a una mayor expresión de *IGFBP5*, en relación al tejido uterino contralateral (Tabla 6). No se encontraron diferencias para ninguno de los otros genes analizados en útero (*PR*, *IGF-1*, *IGF-1R*, *INSR*, *IGFBP2,4* y *6*, y *ADIPOR1-2*).

Tabla 6. Efecto local del cuerpo lúteo sobre la expresión génica diferencial, ipsi y contralateral, (media \pm SEM) uterina del receptor de progesterona (*PR*), el receptor de estrógeno alfa (*ERalfa*), el factor de crecimiento tipo insulina 1 (*IGF1*), el receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (*IGF1R*), receptor de insulina (*INSR*), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1-6 (*IGFBP1-6*), receptor de leptina (*LEPR*), receptor 1-2 de adiponectina (*ADIPOR1-2*) en el Día 6 de preñez en ovejas.

Gen	Ipsilateral	Contralateral	P
<i>PR</i>	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	NS
<i>ERalfa</i>	1,8 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3	0,006
<i>IGF1</i>	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	NS
<i>IGF1R</i>	2,8 \pm 0,4	2,5 \pm 0,4	NS
<i>INSR</i>	1,8 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3	NS
<i>IGFBP1</i>	-	-	-
<i>IGFBP2</i>	0,6 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	NS
<i>IGFBP3</i>	1,1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,03
<i>IGFBP4</i>	6,5 \pm 1,1	6,9 \pm 1,1	NS
<i>IGFBP5</i>	0,09 \pm 0,007	0,06 \pm 0,009	0,06
<i>IGFBP6</i>	2,7 \pm 0,6	3,8 \pm 0,7	NS
<i>LEPR</i>	1,3 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2	0,03
<i>ADIPOR1</i>	1,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	NS
<i>ADIPOR2</i>	0,8 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	NS

7. DISCUSIÓN

Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte que demuestra la relevancia de la localización del tracto reproductivo (oviducto/útero) respecto del ovario donde ocurrió la ovulación y/o presenta el CL asociando el desarrollo embrionario con la funcionalidad del tracto reproductivo. Es importante destacar que este experimento se realizó durante los primeros días del desarrollo embrionario, antes del Día 6, siendo este un experimento innovador al recaudar información del desarrollo en un período tan temprano. Dentro de los resultados obtenidos, el hallazgo más interesante fue que la acción local del CL y/o del folículo pre-ovulatorio afecta el desarrollo embrionario temprano. Este efecto del CL, en el contexto en el que se realizó este trabajo, estuvo asociado con la presencia de mayores concentraciones de progesterona en el oviducto del lado ipsilateral al CL, mayor concentración de adiponectina en macerados de tejido uterino del lado ipsilateral, menor concentración de insulina en el fluido uterino ipsilateral y la expresión diferencial de *PR*, *ERalfa*, *IGFBP3*, *IGFBP5*, *LEPR* y *ADIPOR1* en el tracto reproductivo ipsilateral respecto al contralateral al CL.

Este trabajo también innova en el modelo experimental para poder estudiar el efecto local del CL sobre el desarrollo embrionario ipsilateral. Para esto se produjeron embriones *in vitro* y se transfirieron simultáneamente a los oviductos ipsi y contralaterales al CL, con el fin de evaluar el efecto local del mismo en el desarrollo embrionario y la funcionalidad del tracto reproductivo.

En este trabajo, fueron transferidos entre 18 y 20 embriones de Día 1 por oviducto, para evaluar la calidad embrionaria acorde a la localización del oviducto/útero, como también la funcionalidad del tracto reproductivo en la preñez temprana. Experimentos anteriores han observado que la presencia de un único embrión de 8 células en el istmo del oviducto ipsilateral al CL no produce una respuesta detectable en términos de un cambio en el

transcriptoma oviductal, sin embargo, la presencia de múltiples embriones en el oviducto resultó en una expresión diferencial de cientos de genes en el epitelio oviductal (Maillo y col., 2015). Por lo tanto, para poder detectar cambios a nivel funcional del tracto reproductivo durante la preñez, en algunos estudios en vacas se han transferido, por ejemplo, hasta cincuenta embriones por hembra (Tesfaye y col., 2007; Gad y col., 2012; Carter y col., 2010). Todos estos trabajos se han focalizado en el estudio del efecto del embrión sobre la madre (oviducto y útero), pero no del efecto local del CL sobre los embriones como lo hemos abordado en este experimento que lo hace novedoso. Si bien la presencia de 36-40 embriones por animal claramente no es lo que normalmente ocurre en la oveja, no hay evidencia de que el desarrollo de múltiples embriones durante este corto tiempo afecte a los mismos o al tracto reproductivo de tal manera que invalide el diseño experimental. Lejos de esto, el cultivo *in vivo* en oviducto de ovejas fue una opción utilizada en varias especies hace una par de décadas antes que el cultivo *in vitro* de embriones tuviera el desarrollo y el éxito que tiene actualmente (Loneragan, 2007; Paramio e Izquierdo, 2016). En ese entonces, el desarrollo de embriones en el oviducto generaba resultados de desarrollo embrionario y tasas de preñez similares a los obtenidos con embriones producidos *in vivo* (Galli y col., 2001), mostrando que no se generan problemas evidentes sobre los embriones. Más aún, en la producción de embriones *in vivo* es frecuente que una hembra que ha sido manejada con tratamientos de superovulación tenga esa cantidad de embriones en el útero hasta su colecta, que normalmente se realiza al Día 6 o 7, sin ningún efecto sobre la sobrevivencia de los embriones y su tasa de gestación posterior (Carney y Foote, 1990; Kanitz y col., 2002). El modelo experimental utilizado tiene la fortaleza de disminuir la variabilidad individual, ya que la misma cantidad de embriones se transfieren al oviducto ipsi y contralateral de la misma hembra. Además, debe considerarse que para realizar la transferencia y recuperación de 500 embriones en forma individual (es decir, un único embrión producido *in vitro* y transferido a una sola oveja receptora), es obviamente poco práctico y técnicamente no es factible. Por lo tanto, este estudio muestra un modelo

experimental interesante para evaluar el efecto local del CL en el desarrollo temprano de los embriones.

El desarrollo embrionario temprano es probablemente el período más crítico del desarrollo en los mamíferos (Maillo y col., 2015). En un corto período de tiempo, ocurren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos sobre el embrión, los cuales consecuentemente tienen un impacto sobre su desarrollo. Como mencionamos previamente, luego de la ovulación, el ovocito es fertilizado en el ámpula oviductal formando el cigoto, el embrión resultante pasa los primeros 4 días de vida en el oviducto mientras comienza a experimentar las primeras divisiones celulares y es transportado a través del istmo oviductal hasta el útero, donde ingresa aproximadamente en el Día 4 (Li y Winuthayanon, 2017). Teniendo en cuenta que en este estudio los cigotos fueron colocados en el ámpula oviductal al Día 1 del desarrollo y fueron recuperados al Día 6 de los cuernos uterinos, podemos considerar que la mayor parte del tiempo estuvieron en el oviducto, o que para alcanzar este estadio de mórula o blastocisto debieron desarrollarse de manera correcta previamente en el oviducto. Esto nos permite sugerir que en este experimento, el desarrollo en el oviducto podría ser el principal responsable de las diferencias encontradas entre los embriones colectados en los cuernos uterinos ipsi y contralateral al CL. Bajo condiciones fisiológicas normales, el desarrollo y transporte simultáneos del embrión a través del oviducto son mecanismos inseparables. Existen tres grandes elementos en la regulación del transporte de los embriones hacia el útero, la contracción del músculo oviductal; el flujo generado por el fluido oviductal, y el movimiento del epitelio ciliar del istmo (el cual genera el movimiento del fluido en el oviducto favoreciendo el movimiento del embrión) (Li y Winuthayanon, 2017). En este sentido, el istmo, contiene un gran número de células epiteliales secretoras, las cuales sufren cambios morfológicos para nutrir y dar soporte al embrión en su desarrollo a través del oviducto, a medida que el embrión se desarrolla desde que es un cigoto de 1 célula y se transforma en un blastocisto multicelular (Hugentobler y col., 2007; 2008). De hecho, en estudios anteriores se observaron efectos beneficiosos del oviducto en

el posterior desarrollo embrionario, los cuales comienzan a suceder antes de la fertilización (Boatman y col., 1994). No obstante, no existían estudios previos que mostraran la importancia del CL sobre el desarrollo embrionario y su asociación con el ambiente oviductal ipsilateral.

Respecto a la recuperación de embriones, al Día 6 se tendió a obtener una mayor proporción de embriones del cuerno ipsilateral respecto al contralateral. Si bien no se han reportado estudios con un diseño metodológico similar de manera de poder comparar las tasas de recuperación en los cuernos uterinos ipsi y contralaterales, en un trabajo realizado por Maílo y col. (2015), encuentran un 40,2% de embriones recuperados al Día 3 en el oviducto ipsilateral, luego de haber transferido 50 embriones al Día 1,5, porcentaje similar a lo encontrado en este trabajo, para el Día 6 (8,8 embriones recuperados de 18-20 embriones transferidos al lado ipsilateral, equivalen a un 44,4%). Este porcentaje también es el esperable comparado con la tasa de desarrollo en embriones cultivados *in vitro* que es cercana al 30-40% (blastocistos), incluso utilizando las mismas condiciones de producción, maduración y fertilización que en este estudio (Menchaca y col., 2016). Cuando evaluamos en este estudio la proporción de blastocistos en el total de estructuras recuperadas, encontramos 2,3 veces más blastocistos en el cuerno ipsilateral respecto al contralateral al CL. Considerando que al Día 6 esperamos encontrar una gran proporción de embriones en estadio de blastocistos, estos resultados indicarían un mejor desarrollo embrionario en el cuerno ipsilateral. En el mismo sentido, encontramos una gran diferencia significativa a la hora de analizar los embriones viables, es decir de calidad I y II, en donde encontramos casi el doble de embriones de esta categoría en el lado de la ovulación, comparados con aquellos recuperados del lado contralateral al CL, marcando este hito como uno de los hallazgos más relevantes de este experimento. Por lo tanto, queda clara la diferencia que reciben en beneficio de su desarrollo aquellos embriones transferidos del lado ipsilateral al CL, en donde se encontró una mayor proporción de embriones viables y una tendencia a recuperar un número mayor de embriones de mejor desarrollo.

Se conoce que la concentración de esteroides sexuales a los cuales se exponen las células del oviducto, varían acorde a la relación espacial con el ovario que tiene el CL (ipsilateral vs. contralateral). En este sentido, existe sólida evidencia sobre la regulación de las mencionadas funciones oviductales por los esteroides ováricos, P4 y E2, en el transporte de los gametos y el embrión, al influir en el movimiento ciliar, la contracción del músculo liso y la actividad secretora (Mahmood y col., 1998; Croxatto, 2002; Bylander y col., 2010; Binelli y col., 2018). Encontramos casi 5 veces mayores concentraciones de P4 en el oviducto ipsilateral respecto al oviducto contralateral al CL, un valor bastante notorio. Debido a que se conoce que la P4 disminuye la velocidad de transporte de embriones, lo que permite la exposición del embrión a las secreciones ampulares que pueden incidir positivamente en su desarrollo (Aguilar y Reyley, 2005; Leese y col., 2001; Binelli y col., 2018), podemos sugerir que la tendencia a la mayor recuperación de embriones y al mejor desarrollo embrionario obtenido del cuerno ipsilateral al CL puede deberse a las altas concentraciones de P4 en el oviducto ipsilateral. En el mismo sentido, la relación Progesterona:Estradiol fue 3,5 veces mayor en el oviducto ipsilateral respecto al oviducto contralateral, indicando un alto predominio de P4 en el lado de la ovulación.

De estos resultados podemos sugerir que el ambiente oviductal ipsilateral es más beneficioso para el desarrollo del embrión respecto al contralateral, y que existe un desfase en los tiempos de maduración entre los oviductos, siendo el lado contralateral más retrasado en desarrollo. Esto perjudicaría la sincronía entre el desarrollo del embrión y el ambiente materno, lo cual es consistente con la menor proporción de embriones recuperados y la menor proporción de embriones viables encontrados del lado contralateral respecto al ipsilateral.

Si bien en el oviducto encontramos mayores concentraciones de P4 y menores concentraciones de E2 en el lado ipsi respecto al contralateral al CL, no observamos diferencias en la concentración de progesterona entre los cuernos uterinos. Weems y col. (1989), previamente han reportado

diferencias en las concentraciones de P4 en las distintas porciones del cuerno uterino acorde a la localización del CL, sin embargo, estas diferencias de concentración de P4 a lo largo del útero se van haciendo más marcadas acorde avanzan los días. Por ejemplo, Weems y col., (1989) al Día 4 sólo encuentran diferencias en las concentraciones de P4 en la parte craneal del cuerno ipsi respecto al contralateral al CL, y hacia el Día 9 comienzan a aparecer diferencias de P4 en las porciones media y baja de los cuernos uterinos. Esto se debe a que, como se explicó anteriormente, existe un gradiente de concentración de P4 a lo largo del tracto reproductivo. Podemos sugerir, que la falta de resultados significativos en la concentración de esta hormona entre los cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL al Día 6, podría ser debido un desfase en los tiempos fisiológicos del tracto reproductivo (no sólo del lado contralateral), y que el gradiente de concentración de P4 en los oviductos, aún no haya alcanzado el útero. Estos niveles uterinos de progesterona por debajo de lo reportado para Día 6 (Takahashi y col., 2016), probablemente sean reflejo de las bajas concentraciones plasmáticas de P4 encontradas en nuestros animales respecto de numerosos reportes (Smith y col., 1975; Viñoles y col., 2003; Crowe y Mullen, 2013). No encontramos una explicación obvia para estos niveles subluteales de P4 en plasma el día 6 del ciclo estral, pero podrían ser consecuencia de una respuesta inflamatoria aguda desencadenada a partir la manipulación durante la transferencia embrionaria, provocando efectos en el CL y afectando así la producción y niveles de progesterona circulante. De hecho, se ha observado que una respuesta inflamatoria aguda debido a un daño local puede tardar hasta 5 días en resolverse (Kohl y Deutschman, 2006). Tampoco deberían descartarse otros factores vinculados a la dificultad de la propia técnica al colocar los embriones en la profundidad del oviducto, o la cantidad de embriones colocados por oviducto (20 aproximadamente). Por otro lado, las concentraciones de P4 oviductales confirman la existencia de tejido luteal activo en todos los animales.

Por otro lado, la adiponectina presentó una concentración diferencial entre los cuernos uterinos ipsi y contralaterales al CL. Si bien la información acerca de adiponectina y su rol en ovinos es escasa, se conoce que el

sistema de adiponectina influencia la función reproductiva no sólo a nivel central a través del eje hipófisis-hipotálamo-gonadal, sino también localmente a través de acciones hormonales en el tracto reproductivo (Dobrzyn y col., 2017). De hecho, se ha observado que esta adipoquina contribuye a la decidualización del endometrio durante la preñez, y que su ausencia resulta en una menor adaptación del útero para mantener la preñez (Kim y col., 2010). Por lo tanto, podemos sugerir, que la mayor proporción de embriones viables y tendencia a recuperar más embriones del cuerno uterino ipsilateral se debe en parte, a las acciones de la adiponectina, la cual estaría preparando el endometrio ipsilateral para favorecer el desarrollo de los embriones.

Como mencionamos, la P4 estimula las secreciones de nutrientes hacia la luz oviductal y uterina (Ashworth, 1995), como proteínas, vitaminas y minerales, y es probable que dichas proteínas sean responsables de la transferencia de los nutrientes maternos necesarios para el desarrollo del embrión (Buhi, 2002; Muñoz y col., 2011). En este sentido, en el presente estudio encontramos una menor concentración de insulina en el fluido uterino en el lado ipsilateral en comparación con el contralateral. Se sabe que la insulina desempeña un papel importante en la proliferación y diferenciación celular durante las etapas primarias del desarrollo de los embriones en mamíferos (Harvey y Kaye 1990; Gardner y Kaye 1991). Teniendo en cuenta que el embrión puede internalizar la insulina materna a través de la endocitosis del receptor (Fleming y Pickering, 1985; Harvey y Kaye, 1990), es posible que las concentraciones más bajas de insulina en el fluido uterino ipsilateral reflejen la mayor captación de esta hormona por parte de los embriones, coherente con la mayor proporción de embriones viables y la tendencia a una mayor proporción de blastocistos recuperados del cuerno ipsilateral.

La sensibilidad de un tejido a las hormonas depende del número y de la afinidad de los receptores de las hormonas correspondientes presentes en el mismo (Katznellbogen, 1980). Por lo tanto, los factores que afecten la

expresión o la función de los receptores pueden afectar la función del tejido. En este estudio, encontramos una menor expresión de *PR* en el oviducto ipsilateral, lo que es consistente con la mayor concentración de progesterona encontrada en este tejido. Como la P4 modula su propia acción mediante una rápida reducción de las concentraciones de PR (Evans, y col., 1980), los bajos niveles del ARNm de *PR* encontrados en el oviducto ipsilateral, podrían deberse a la alta concentración local de P4, como ha sido previamente reportado (de Brun y col., 2013).

El oviducto ipsilateral presentó una menor expresión de *IGFBP5* en comparación con el lado contrario. Como se mencionó previamente, el sistema IGF es un complejo sistema biológico que se compone de hormonas peptídicas como IGF1, IGF2 e insulina, sus receptores de membrana y las proteínas de unión a IGF (IGFBP), las cuales además de controlar la biodisponibilidad de los IGFs, regulan numerosos procesos biológicos como la diferenciación celular y proliferación, procesos relevantes para la adaptación del tracto reproductivo a la preñez, y el crecimiento embrionario (Rechler, 1993; Clemmons, 1998; Wathes y col., 1998; Denley y col., 2005; Satterfield y col., 2008; Velázquez y col., 2009). Se ha reportado que IGFBP5 es una de las proteínas de unión más conservadas, sin embargo, la información acerca de su rol es muchas veces contradictoria. Por un lado, se ha postulado que esta proteína de unión puede contribuir a potenciar las acciones de IGF (Bach, 2018), y en otros trabajos se ha demostrado que IGFBP5 se une a IGFs con gran afinidad e inhibe la actividad de IGF impidiendo la interacción con su receptor (Miese-Looy y col., 2012; Tripathi y col., 2009). Asimismo, se ha reportado que IGFBP5 disminuye la expresión de VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), involucrado en la irrigación sanguínea, el cual es importante para aumentar el flujo de nutrientes hacia el tracto reproductivo durante la preñez temprana (Wang y col., 2016), comprometiendo así la supervivencia y el crecimiento de los embriones. Por lo tanto, podemos sugerir que la menor expresión de *IGFBP5* en el oviducto ipsilateral, sería beneficioso para el desarrollo embrionario y la remodelación uterina, lo cual es consistente con las mayores proporciones

de embriones viables y de mejor desarrollo encontrados en el cuerno uterino ipsilateral al CL.

Por otro lado, encontramos una mayor expresión de *ADIPOR1* en el oviducto ipsilateral con respecto al contralateral al CL. En coherencia con nuestros resultados, la expresión de adiponectina ha sido reportada previamente en el oviducto de rumiantes (Sequeira y col., 2016), como también en roedores (Archanco y col., 2007), sugiriendo que esta juega un papel importante durante la preñez temprana. Además, se ha demostrado la presencia de receptores de adiponectina en embriones y por lo tanto se ha sugerido que el sistema de adiponectina se encuentra implicado en la comunicación entre el embrión y la madre durante el período de pre y peri-implantación (Schmidt y col., 2008; Gamundi-Segura y col., 2015).

Al analizar los transcritos en macerados de tejido uterino encontramos una alta expresión de *ERalfa* en el cuerno uterino ipsilateral, este resultado asociado con la falta de diferencias en las concentraciones de P4 en el útero, puede indicar que el útero aún se encuentra bajo un predominio estrogénico. Además, se ha demostrado que el receptor epitelial de E2 es requerido para modular el sistema inmune innato modificando la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria durante la preñez temprana (Li y Winuthayanon, 2017), pudiendo relacionar la mayor expresión de este gen el cuerno ipsilateral, con la modulación del ambiente uterino para mantener la preñez.

El cuerno uterino ipsilateral presentó una mayor expresión de *IGFBP3* y una tendencia a una mayor expresión de *IGFBP5* al compararlo con el lado contralateral al CL. Se conoce que IGBP3 es la principal proteína de unión a IGF, modulando su biodisponibilidad. Asimismo, tanto IGFBP3 como otras proteínas de unión presentan acciones independientes de IGF y se ha observado que la misma induce apoptosis, proceso requerido para la remodelación del endometrio durante la preñez (Joswig y col., 2003), en varios tipos celulares de manera independiente de IGF (Gill y col., 1997). Por lo tanto, es posible que la mayor expresión de este transcrito en el útero ipsilateral se encuentre asociado a la mejor performance embrionaria encontrada en los embriones recuperados de este cuerno. Por otra parte, la

mayor expresión de *IGFBP5* en el cuerno uterino ipsilateral, a simple vista parece contradictorio con la menor expresión de este transcrito en el oviducto ipsilateral. Sin embargo, se conoce que existe una asociación entre esta proteína de unión y la funcionalidad de ER, en donde las células que presentan mayor proporción de estos receptores, aumentan la expresión del *IGFBP5* (Figuroa y col., 1993). De hecho, se ha reportado que el E2 estimula la expresión de *IGFBP5* en el útero de roedores, por lo que la mayor expresión de *IGFBP5* en el útero sería consistente con el predominio estrogénico propuesto para este tejido.

El ARNm de *LEPR* se vio incrementado en el lado ipsilateral frente al contralateral en macerados de tejido uterino. Además de su conocido rol en la regulación del apetito (Chilliard y col., 2005), la presencia de leptina y de su receptor en tejidos reproductivos han vinculado la acción de esta hormona en la reproducción y se ha llegado a postular que puede esta funcionar como mediador entre el estado metabólico y la función reproductiva (Clarke y Henry, 1999). Se ha reportado una alta sensibilidad a la leptina en el útero durante la fase luteal temprana, lo que sugiere que esta hormona presenta un rol importante en la preparación del endometrio para una posible preñez. De hecho, en roedores, se ha demostrado que *LEPR* se expresa principalmente en los sitios de implantación (González y col., 2000; Yoon y col., 2005). Por consiguiente, las acciones de la leptina en útero sobre el metabolismo y/o sobre la fisiología reproductiva puede contribuir al éxito de la preñez y la mayor expresión de este transcrito en el útero ipsilateral corresponde con las mejores performances de los embriones recuperados en este cuerno.

8. CONCLUSIONES

En conclusión, el ambiente materno dentro de los 6 días posteriores a la ovulación se ve afectado por el CL, el cual influye en el desarrollo del embrión mediante un efecto local ipsilateral al ovario en el que se encuentra dicho CL. Este mecanismo se vio asociado a la presencia diferencial de P4, E2, insulina y adiponectina sobre el tracto reproductivo ipsilateral vs. contralateral, como también por la expresión diferencial de *PR*, *ERalfa*, *IGFBP3,5*, *LEPR* y *ADIPOR1* los cuales podrían influir positivamente en el útero para la adaptación a la preñez y potenciar el desarrollo embrionario temprano.

9. CONSIDERACIONES FINALES

En nuestra opinión, este experimento tiene la fortaleza de englobar una gran variedad de técnicas y metodologías que nos permiten entender a mayor escala la comunicación embrio-maternal y como se ve afectada la funcionalidad del tracto reproductivo en este momento del desarrollo. Desde la óptica científica, los resultados adquiridos a través de este estudio esperan aportar una visión novedosa acerca de la regulación génica y hormonal de los diferentes mecanismos que determinan la viabilidad embrionaria, en etapas iniciales de la gestación, las cuales marcan un momento crítico en el que actúan los factores que pueden comprometer el desarrollo embrionario.

El estudio sobre las dinámicas de desarrollo de los embriones es de gran importancia para lograr una mejora en la eficiencia reproductiva, preservación de las especies animales de interés y en riesgo de extinción, entre otras. La producción de embriones *in vitro* tiene un papel fundamental en la investigación científica para el estudio de la reproducción en rumiantes, y es un modelo de gran alcance para el estudio de la fertilidad y

desarrollo en humanos (Chohan y Hunter, 2004; Hasler, 2003, 2006). Si bien el desarrollo de la técnica de transferencia de embriones, ha adquirido mucho peso en los últimos tiempos, aún quedan muchos aspectos a mejorar, ya que por ejemplo en la producción de embriones *in vitro* no mucho más del 30% llegan a estadio de blastocisto, en la producción de embriones convencional este valor no es superior al 50-60% aproximadamente. Por lo tanto, con este trabajo se espera contribuir en la temática vinculada a la sobrevivencia y mortalidad embrionaria en rumiantes. Además, el modelo experimental utilizado es novedoso y puede contribuir a incrementar el conocimiento actual.

Como nota final, queda enmarcado en este proyecto para estudios futuros la evaluación de los cambios que ocurren a nivel del embrión como una unidad en sí misma. Poder llevar a cabo un análisis de la regulación hormonal y de expresión génica con el estudio de sus receptores en el embrión, sería de suma importancia para poder determinar de manera holística los procesos que dan lugar a la comunicación embrión-madre.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecia Martínez, A., & Forcada Miranda, F. (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino. Servet.

Aerts, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010). Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in domestic animals*, 45(1), 171-179.

Aguilar, J., & Reyley, M. (2005). The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Anim Reprod*, 2(2), 91-105.

Antczak, M., & Van Blerkom, J. (1997). Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Molecular Human Reproduction*, 3(12), 1067-1086.

Archanco, M., Gomez-Ambrosi, J., Tena-Sempere, M., Frühbeck, G., & Burrell, M. A. (2007). Expression of leptin and adiponectin in the rat oviduct. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(10), 1027-1037.

Astessiano, A. L., Pérez-Clariget, R., Quintans, G., Soca, P., Carriquiry, M. (2012). Effects of a short-term increase in the nutritional plane before the mating period on metabolic and endocrine parameters, hepatic gene expression and reproduction in primiparous beef cows on grazing conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(3), 535-544.

Ashworth, C.J. (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livestock Production Science* 44, 99-105.

Ashworth, C. J., Sales, D. I., & Wilmut, I. (1989). Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87(1), 23-32.

Bach, J. F. (2018). The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 105.

Bartlewski, P. M., Beard, A. P., & Rawlings, N. C. (1999). Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. *Animal reproduction science*, 57(1-2), 51-66.

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. *Biology of Reproduction* 68 1170-1177.

Baxter, R. C., & Martin, J. L. (1989). Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18), 6898-6902.

Binelli, M., Gonella-Diaza, A., Mesquita, F., & Membrive, C. (2018). Sex steroid-mediated control of oviductal function in cattle. *Biology*, 7(1), 15.

Boatman, D. E., Felson, S. E., & Kimura, J. (1994). Changes in morphology, sperm penetration and fertilization of ovulated hamster eggs induced by oviductal exposure. *Human Reproduction*, 9(3), 519-526.

Buhi, W. C., Alvarez, I. M., Kouba, A. J. (1997). Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 52, 285-300.

Buhi, W. C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction*, 123(3), 355-362.

Bylander, A., Nutu, M., Wellander, R., Goksör, M., Billig, H., & Larsson, D. J. (2010). Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 48.

Camino, J. E., Nogueiras, R., Gallego, R., Bravo, S., Tovar, S., García-Caballero, T., ... & Diéguez, C. (2005). Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(7), 4276-4286.

Carney, E. W., & Foote, R. H. (1990). Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. *Reproduction*, 89(2), 543-551.

Carrquiry, M., Weber, W. J., Fahrenkrug, S. C., Crooker, B. A. (2009). Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4889-4900.

Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M. A., ... & Lonergan, P. (2008). Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(3), 368-375.

Carter, F., Rings, F., Mamo, S., Holker, M., Kuzmany, A., Besenfelder, U., ... & Lonergan, P. (2010). Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. *Biology of reproduction*, 83(5), 707-719.

Chen, Y., Green, J. A., Antoniou, E., Ealy, A. D., Mathialagan, N., Walker, A. M., Avelle, M. P., Rosenfeld, C. S., Hearne, L. B., Roberts, R. M. (2006). Effect of interferon- τ administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*, 147(5), 2127-2137.

Chilliard, Y., Delavaud, C., Bonnet, M. (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 3–22.

Chohan, K. R., Hunter, A. G. (2004). In vitro maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology*, 61(2), 373-380.

Clarke, I. J., & Henry, B. A. (1999). Leptin and reproduction. *Reviews of reproduction*, 4(1), 48-55.

Clemmons, D. R. (1993). IGF binding proteins and their functions. *Molecular reproduction and development*, 35(4), 368-375.

Clemmons, D. R. (1998). Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 140(1), 19-24.

Comer, M. T., Leese, H. J., & Southgate, J. (1998). Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(11), 3114-3120.

Croxatto, H. B. (2002). Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reproductive biomedicine online*, 4(2), 160-169.

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 gene expression in oviduct and uterus of pregnant ewes. *Spanish Journal of Agricultural Research* 11, 989–996

de Brun, V., Meikle, A., Casal, A., Sequeira, M., Contreras-Solís, I., Carriquiry, M., Forcada, F., Sosa, C., Abecia, J.A. (2015). Periconceptional undernutrition modifies endocrine profiles and hepatic gene expression in sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), 710-718.

Del Campo, C. H., & Ginther, O. J. (1973). Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: horses, sheep, and swine. *American Journal of Veterinary Research*, 34(3), 305.

Del Campo, M.R., Rowe, R.F., French, L.R., Ginther, O.J. (1977). Unilateral relationship of embryos and the corpus luteum in cattle. *Biology of Reproduction* 16, 580-585.

Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C., & Forbes, B. E. (2005). Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(4-5), 421-439.

Diskin, M. G., & Morris, D. G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 260-267.

Dobrzyn, K., Smolinska, N., Kiezun, M., Szeszko, K., Maleszka, A., & Kaminski, T. (2017). The effect of estrone and estradiol on the expression of the adiponectin system in the porcine uterus during early pregnancy. *Theriogenology*, 88, 183-196.

Downing, J. A., Joss, J., Connell, P., Scaramuzzi, R. J. (1995). Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103(1), 137-145.

Einer-Jensen, N., McCracken, J.A. (1981). The transfer of progesterone in the ovarian vascular pedicle of the sheep. *Endocrinology* 109, 685-90.

Enright, B. P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F. A., Yang, X., & Boland, M. P. (2000). Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs

in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 54(5), 659-673.

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., Carriquiry, M., Meikle, A., Sosa, C. (2011). Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales. *ITEA* 170, 1-15.

Fenwick, M. A., Fitzpatrick, R., Kenny, D. A., Diskin, M. G., Patton, J., Murphy, J. J., Wathes, D. C. (2008). Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 34(1), 31-44.

Figuroa, J. A., Jackson, J. G., McGuire, W. L., Krywicki, R. F., & Yee, D. (1993). Expression of insulin-like growth factor binding proteins in human breast cancer correlates with estrogen receptor status. *Journal of cellular biochemistry*, 52(2), 196-205.

Fleming, T. P., Pickering, S. J. (1985). Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *Development*, 89(1), 175-208.

Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, Held E, Dufort I, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. (2012). Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biol Reprod*; 87:100.

Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55(6), 1341-1357.

Gamundi-Segura, S., Serna, J., Oehninger, S., Horcajadas, J. A., & Arbones-Mainar, J. M. (2015). Effects of adipocyte-secreted factors on decidualized endometrial cells: modulation of endometrial receptivity in vitro. *Journal of physiology and biochemistry*, 71(3), 537-546.

Gandolfi, F., Brevini, T. A., Richardson, L., Brown, C. R., Moor, R. M. (1989). Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development*, 106(2), 303-312.

Gandolfi, F., Brevini, T. A. L., Modena, S., & Passoni, L. (1992). Early embryonic signals: embryo-maternal interactions before implantation. *Animal reproduction science*, 28(1-4), 269-276.

Gandolfi, F. (1994). Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology*, 41(1), 95-100.

Gandolfi, F. (1995). Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. *Microscopy research and technique*, 32(1), 1-12.

Gandolfi, F. (1998). Embryonic development as a function of oocyte competence. In *Serono Symposia* (pp. 337-353). Serono Symposia.

Gandolfi, T. B., & Gandolfi, F. (2001). The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, 55(6), 1255-1276.

Gardner, H. G., Kaye, R. L. (1991). Insulin stimulates mitosis and morphological development in preimplantation mouse embryos. *Reproduction Fertility and Development*, 3 (1) 79-91.

Garrett, J. E., Geisert, R. D., Zavy, M. T., & Morgan, G. L. (1988). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 84(2), 437-446.

Gill, Z. P., Perks, C. M., Newcomb, P. V., & Holly, J. M. (1997). Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-3) predisposes breast cancer cells to programmed cell death in a non-IGF-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25602-25607.

Goff, A.K. (2002). Embryonic signals and survival. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 133-9.

González, R. R., Caballero-Campo, P., Jasper, M., Mercader, A., Devoto, L., Pellicer, A., & Simon, C. (2000). Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(12), 4883-4888.

Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos* (Vol. 27). CABI.

Graham, J. D., Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine reviews*, 18(4), 502-519.

Gray, C. A., Taylor, K. M., Ramsey, W. S., Hill, J. R., Bazer, F. W., Bartol, F. F., & Spencer, T. E. (2001). Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biology of reproduction*, 64(6), 1608-1613.

Hafez, E. S. E., Tsutsumi, Y. (1996). Changes in endometrial vascularity during implantation and pregnancy in the rabbit. *Developmental Dynamics*, 118(1), 249-281.

Harvey, M. B., & Kaye, P. L. (1988). Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. *Endocrinology*, 122(3), 1182-1184.

Harvey, M. B., Kaye, P. L. (1990). Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts in vitro. *Development*, 110(3), 963-967.

Harvey, M. B., & Kaye, P. L. (1991). Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-1 through the insulin receptor. *Molecular reproduction and development*, 29(3), 253-258.

Hasler, J. F. (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal reproduction science*, 79(3), 245-264.

Hasler, J. F. (2006). The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology*, 65(1), 4-16.

Heyner, S., Rao, L. V., Jarett, L., Smith, R. M. (1989). Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Developmental biology*, 134(1), 48-58.

Hug, C., Wang, J., Ahmad, N. S., Bogan, J. S., Tsao, T. S., & Lodish, H. F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(28), 10308-10313.

Hunter, R. H. F. (1994). Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Molecular reproduction and development*, 39(2), 176-181.

Hunter, R. H. F. (1996). Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 44(3), 417-422.

Hunter, R. H. F., Hagbard Petersen, H., & Greve, T. (1998). Progesterone and Ca² ion influences on sperm release from the fallopian tube reservoir. In *J Reprod Fertil Abstr Ser* (No. 22, pp. 16-17).

IETS (International Embryo Transfer Society), (2010). *Manual*. 4th Edition.

Joswig, A., Gabriel, H. D., Kibschull, M., & Winterhager, E. (2003). Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 44.

Kanitz, W., Becker, F., Schneider, F., Kanitz, E., Leiding, C., Nohner, H. P., & Pöhland, R. (2002). Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reproduction Nutrition Development*, 42(6), 587-599.

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 γ and related genes in ovine placenta and uterus. *Theriogenology*, 76(3), 482-491.

Katznellobogen, B.S. (1980). Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol* 42, 17-35.

Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., ... & Tanaka, T. (2003). Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology*, 144(6), 2623-2633.

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. *Endocrinology* 143, 1922-31.

Kaye P.L. (1997). Preimplantation growth factor physiology. *Reviews of Reproduction*, 2, 121-127.

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. *Biology of Reproduction* 59(3), 632-42.

Killian, G. J. (2004). Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Animal reproduction science*, 82, 141-153.

Kim, S. T., Marquard, K., Stephens, S., Loudon, E., Allsworth, J., & Moley, K. H. (2010). Adiponectin and adiponectin receptors in the mouse preimplantation embryo and uterus. *Human reproduction*, 26(1), 82-95.

Leese, H. J., Tay, J. I., Reischl, J., & Downing, S. J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction*, 121(3), 339-346.

Leese, H.J. (2005). Rewards and risks of human embryo creation: a personal view. *Reprod Fertil Dev* 17, 387-91.

Li, S., & Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J Endocrinol*, 232(1), R1-R26.

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.

Lonergan, P. (2007). State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, 315-325.

Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76(9), 1594-1601.

Mahmood, T., Saridogan, E., Smutna, S., Habib, A. M., & Djahanbakhch, O. (1998). The effect of ovarian steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human Fallopian tube. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(11), 2991-2994.

Maillard, V., Uzbekova, S., Guignot, F., Perreau, C., Ramé, C., Coyral-Castel, S., & Dupont, J. (2010). Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 23.

Maillo V, Gaora PÓ, Forde N, Besenfelder U, Havlicek V, Burns GW, Spencer TE, Gutierrez-Adan A, Lonergan P and Rizos D (2015) Oviduct-Embryo Interactions in Cattle: Two-Way Traffic or a One-Way Street?1. *Biology of Reproduction* 92 (6): 144, 1–8.

Maillo, V., Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., Rizos, D. (2016). Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*, 86(1), 443-450.

Mann, G. E., & Lamming, G. E. (1999). The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(3-4), 269-274.

Mann, G. E., & Lamming, G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121(1), 175-180.

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. *Reproduction, Fertility and Development* 9, 355-80.

Maslar, I. A. (1988). The progesterational endometrium. In *Seminars in Reproductive Endocrinology* (Vol. 6, No. 02, pp. 115-128). Thieme Medical Publishers, Inc..

Mattson, B. A., Rosenblum, I. Y., Smith, R. M., & Heyner, S. (1988). Autoradiographic evidence for insulin and insulin-like growth factor binding to early mouse embryos. *Diabetes*, 37(5), 585-589.

Moschos, S., Chan, J.L., Mantzoros, C.S. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertility and Sterility* 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.

McNeill, R. E., Diskin, M. G., Sreenan, J. M., & Morris, D. G. (2006). Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology*, 65(7), 1435-1441.

Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, Garcia SM.(2004). Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci*; 82-83:13–20.

Memili E, First NL. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*; 8:87–96.

Menchaca, A., Barrera, N., dos Santos Neto, P. C., Cuadro, F., Crispo, M. (2016). Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats. *Animal Reproduction*, 13(3), 273-278.

Menchaca, A., Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* 16(4), 403-13.

Michalakis, K. G., & Segars, J. H. (2010). The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertility and sterility*, 94(6), 1949-1957.

Miese-Looy, G., Van den Heuvel, M. J., Edwards, A. K., Lamarre, J., & Tayade, C. (2012). Expression of insulin-like growth factor (IGF) family members in porcine pregnancy. *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 51-60.

Muñoz, M., Corrales, F. J., Caamaño, J. N., Díez, C., Trigal, B., Mora, M. I., ... & Gómez, E. (2011). Proteome of the early embryo–maternal dialogue in the cattle uterus. *Journal of proteome research*, 11(2), 751-766.

Murray, M. K., & Sower, S. A. (1992). Estrogen-and progesterone-dependent secretory changes in the uterus of the sheep. *Biology of reproduction*, 47(6), 917-924.

Murray, M. K. (1995). Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biology of Reproduction*, 53(3), 653-663.

Murray, M. K. (1997). Morphological features of epithelial cells in the sheep isthmus oviduct during early pregnancy. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 247(3), 368-378.

Nancarrow, C. D., & Hill, J. L. (1995). Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement, 49, 3-13.

Niemann H, Wrenzycki C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Therio*; 53:21–34.

Nishida, M., Funahashi, T., & Shimomura, I. (2007). Pathophysiological significance of adiponectin. *Medical molecular morphology*, 40(2), 55-67.

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).

Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2016). Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, 86(1), 152-159.

Pinotti, L., Rosi, F. (2006). Leptin in bovine colostrum and milk. *Hormone and Metabolic Research*, 38(02), 89-93.

Raddatz, J., Elias, A., Whisnant, C. (2008). Measurements of Adiponectin in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science* 86.

Rechler, M. M. (1993). Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitamins & Hormones*, 47, 1-114.

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. *Endocrinology* 138, 886-97.

Rizos D, Maillo V and Lonergan P (2016) Role of the oviduct and oviduct-derived products in ruminant embryo development. *Animal Reproduction* 13 160–167.

Rizos, D., Ward, F., Duffy, P. A. T., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*, 61(2), 234-248.

Roche, J. F., Bolandl, M. P., & McGeady, T. A. (1981). Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *The Veterinary Record*, 109(18), 401-404.

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. *Journal of Neuroscience Methods*. 24(1), 27-38.

Russel, A. J. F., Doney, J. M., & Gunn, R. G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 72(3), 451-454.

Rutledge, R.G and Cote, C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research* 31, e93.

Satterfield, M. C., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2006). Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biology of reproduction*, 75(2), 289-296.

Satterfield, M. C., Hayashi, K., Song, G., Black, S. G., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2008). Progesterone regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the endometrium of the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, 79(6), 1226-1236.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (45), 26746-9.

Schmidt, A., Einspanier, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., & Schams, D. (1994). Expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 102(05), 364-369.

Schmidt, T., Fischer, S., Tsikolia, N., Santos, A. N., Rohrbach, S., Ramin, N., ... & Fischer, B. (2008). Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochemistry and cell biology*, 129(6), 817-825.

Sequeira, M., Pain, S. J., de Brun, V., Meikle, A., Kenyon, P. R., Blair, H. T. (2016). Gestation-related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation Day 19, after transfer of Suffolk or Cheviot embryos. *Theriogenology*, 86(6), 1557-1565.

Smolinska, N., Dobrzyn, K., Maleszka, A., Kiezun, M., Szeszko, K., & Kaminski, T. (2014). Expression of adiponectin and adiponectin receptors 1 (AdipoR1) and 2 (AdipoR2) in the porcine uterus during the oestrous cycle. *Animal reproduction science*, 146(1-2), 42-54.

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. *Reproduction, Fertility and Development*, 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. *Domestic Animal Endocrinology*, 36,13-23.

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

Spencer, T.E., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Bazer, F.W. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 537-50.

Spencer, T. E., Forde, N., Dorniak, P., Hansen, T. R., Romero, J. J., & Lonergan, P. (2013). Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction (Cambridge, England)*, 146(4), 377.

Staples, L. D., Fleet, I. R., & Heap, R. B. (1982). Anatomy of the utero-ovarian lymphatic network and the composition of afferent lymph in relation to the establishment of pregnancy in the sheep and goat. *Reproduction*, 64(2), 409-420.

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. *Endocrinology* 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. *Journal of Reproduction and Fertility* 108, 31-40.

Stronge, A. J. H., Sreenan, J. M., Diskin, M. G., Mee, J. F., Kenny, D. A., & Morris, D. G. (2005). Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*, 64(5), 1212-1224.

Takahashi, H., Haneda, S., Kayano, M., Matsui, M. (2016). Differences in progesterone concentrations and mRNA expressions of progesterone receptors in bovine endometrial tissue between the uterine horns ipsilateral and contralateral to the corpus luteum. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(4), 613-618.

Tesfaye, D., Lonergan, P., Hoelker, M., Rings, F., Nganvongpanit, K., Havlicek, V., ... & Schellander, K. (2007). Suppression of connexin 43 and E-cadherin transcripts in in vitro derived bovine embryos following culture in vitro or in vivo in the homologous bovine oviduct. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 74(8), 978-988.

Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews* 15, 80-101.

Tripathi, G., Salih, D. A., Drozd, A. C., Cosgrove, R. A., Cobb, L. J., & Pell, J. M. (2009). IGF-independent effects of insulin-like growth factor binding protein-5 (Igfbp5) in vivo. *The FASEB Journal*, 23(8), 2616-2626.

Velazquez, M. A., Zaraza, J., Oropeza, A., Webb, R., & Niemann, H. (2009). The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction*, 137(2), 161.

Wales, R. G., Khurana, N. K., Edirisinghe, W. R., & Pike, I. L. (1985). Metabolism of glucose by preimplantation mouse embryos in the presence of glucagon, insulin, epinephrine, cAMP, theophylline and caffeine. *Australian journal of biological sciences*, 38(4), 421-428.

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. *Journal of Dairy Science* 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.

Walker, S. K., Hartwich, K. M., Seamark, R. F. (1996). The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*, 45(1), 111-120.

Wang, L., Xu, G. L., Gao, K., Wilkinson, J., Zhang, F., Yu, L., ... & Chen, W. (2016). Development of a robust reporter-based assay for the bioactivity determination of anti-VEGF therapeutic antibodies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 125, 212-218.

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. *Biology of Reproduction* 49, 1-6.

Wijayagunawardane, M. P. B., Miyamoto, A., Cerbito, W. A., Acosta, T. J., Takagi, M., & Sato, K. (1998). Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology*, 49(3), 607-618.

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. *Journal of Anatomy*, 118, 143-53.

Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Gebert, C., Korsawe, K., Lemme, E., ... & Niemann, H. (2005). Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 75(1), 1-9.

Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., y col.,

(2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine*, 13(3), 332-339.

Yániz, J. L., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., & Mullins, K. J. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 260(3), 268-278.

Yoon, S. J., Cha, K. Y., & Lee, K. A. (2005). Leptin receptors are down-regulated in uterine implantation sites compared to interimplantation sites. *Molecular and cellular endocrinology*, 232(1-2), 27-35.