



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**RESTRICCIÓN ALIMENTICIA EN OVINOS: FUNCIONALIDAD UTERINA EN  
OVEJAS CON DIFERENTES RESERVAS CORPORALES DURANTE LA  
GESTACIÓN TEMPRANA**

**ANDREA FERNÁNDEZ FOREN**

**TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY**

**2018**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**RESTRICCIÓN ALIMENTICIA EN OVINOS: FUNCIONALIDAD UTERINA EN  
OVEJAS CON DIFERENTES RESERVAS CORPORALES DURANTE LA  
GESTACIÓN TEMPRANA**

**ANDREA FERNÁNDEZ FOREN**

---

**Ana Meikle, DVM. MSc. PhD.**

**Director de Tesis**

---

**Cecilia Sosa, DVM. MSc. PhD.**

**Co-director**

**2018**

## **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS**

# **ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

## **INFORME DEL TRIBUNAL**



## AGRADECIMIENTOS

Culminando esta linda etapa de formación, tengo muchas personas a las que agradecer por formar parte de todo este recorrido y de mi vida.

Agradezco a mi papá por siempre estar a mi lado impulsándome para seguir y por siempre creer en mí, te quiero con todo mi corazón.

A mi mamá que de alguna forma me acompaña siempre, compañera inseparable, el mejor refugio, las palabras más dulces y tiernas que me hacían sentir en paz. Gracias mamá, gracias por ser la mejor, te extraño y te quiero siempre y con todo mi corazón.

A mis hermanos Martín y Lucía, siempre apoyándonos los tres, siempre juntos, un amor inexplicable. Agradezco a la vida tenerlos. Los quiero.

A Ale, mi amor, mi compañero, que siempre está a mi lado dando lo mejor. Mi gran apoyo en todo, mi gran amor.

A lo más hermoso que la vida me dio, mis hijos, Juan y Lola, que formaron parte de todo este camino y que todos los días me demuestran que vale la pena seguir. Los amo.

A mi querida tía Mary que siempre está ahí para mí y para mi familia, cuanto te quiero y que importante sos en mi vida y en la de mis hijos.

A mis amigas Pica, Anita, Marisus, Clau, Manu, Marilin. Hermosas personas que me encontré en los primeros tiempos de mi carrera y que fueron formando parte de mi vida. Hoy seguimos juntas como el primer día. Ustedes saben, "amigas de toda la vida".

A Natalie y Magali, juntas hace ya casi 27 años, hermanas que la vida me dio. Las quiero.

A Lu y Euge Carrion, una amistad increíble, hermosas personas. Gracias por tanto.



A Santiago y Alejandra, gracias por siempre una palabra de aliento, gracias por el aguante, gracias por siempre estar. Gracias amigos.

A todas mis compañeros del laboratorio que siempre tienen una mano tendida y una oreja para escuchar. Paula P, Gretel, Isa, Clau, Vicky, Andre G, Rosina, Matilde, Sofía y Paula N.

A Cecilia Sosa que junto a ella di mis primeros pasos en la ciencia y por su gran generosidad.

A Ana Meikle, gracias por estar siempre, en cada decisión, en cada caída y en cada triunfo. Gracias por estar a mi lado en mis peores y mejores momentos. Gracias de todo corazón.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....</b>	<b>2</b>
<b>Mediadores entre el estado metabólico y el sistema reproductivo .....</b>	<b>2</b>
<b>Mecanismos de acción hormonal.....</b>	<b>6</b>
<i>Insulina e IGF-1.....</i>	<i>6</i>
<i>Leptina y hormona del crecimiento .....</i>	<i>7</i>
<i>Adiponectina.....</i>	<i>7</i>
<i>Progesterona y estrógenos.....</i>	<i>7</i>
<b>Subnutrición, funcionalidad del tracto reproductivo y gestación temprana .....</b>	<b>8</b>
<b>Respuestas a la subnutrición acorde al grado de reserva corporal.....</b>	<b>10</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>11</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>Animales y tratamientos.....</b>	<b>14</b>
<b>Determinación hormonal .....</b>	<b>16</b>

<b>Localización y abundancia de los receptores de progesterona y estrógenos</b>	
<b>endometriales .....</b>	<b>17</b>
<b>Cuantificación génica uterina.....</b>	<b>18</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>21</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>Peso vivo, hormonas plasmáticas metabólicas y concentración de IGF-1 en el</b>	
<b>útero.....</b>	<b>22</b>
<b>Tasa ovulatoria, calidad embrionaria y concentración de hormonas sexuales en</b>	
<b>plasma y útero.....</b>	<b>24</b>
<b>Localización y abundancia de receptores de estrógenos y progesterona .....</b>	<b>24</b>
<b>Expresión génica del útero.....</b>	<b>28</b>
<b>DISCUSIÓN.. .....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>49</b>

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue caracterizar los perfiles de insulina, leptina e IGF-1, y la funcionalidad uterina luego de una subnutrición en ovejas gestantes con diferentes reservas corporales iniciales (CCi), y vincularlos con la calidad embrionaria durante la gestación temprana. Treinta y seis ovejas Rasa Aragonesa se dividieron en 2 grupos con diferentes CC:  $CC > 2.75$  (alto, A,  $n = 19$ ) y  $CC < 2.25$  (bajo, B,  $n = 17$ ) y se asignaron al azar a dos tratamientos nutricionales: 1.5 (control, C) o 0.5 (subnutridas, S) veces los requerimientos de mantenimiento diario. Al día 5 de gestación se recuperaron los embriones y sólo las ovejas gestantes permanecieron en el experimento, estableciendo cuatro grupos: alta-CCi control (AC,  $n = 6$ ), alta-CCi subnutridas (AS,  $n = 7$ ), baja-CCi control (BC,  $n = 9$ ) y baja-CCi subnutridas (BS,  $n = 7$ ). Las ovejas de alta-CCi presentaron una mayor concentración de insulina, leptina e IGF-1, lo que refleja un mejor estado metabólico en estos animales. Hubo una mayor proporción de ovejas de alta-CCi que presentaron más de un CL ( $P < 0.05$ ), y asociado, una mayor concentración plasmática de P4, mayor número de embriones recuperados y mayor tasa de viabilidad embrionaria. En el útero, las ovejas subnutridas tendieron a presentar menor P4 ( $P = 0.09$ ) y mayor concentración de E2 ( $P = 0.10$ ). La inmunotinción de los receptores de progesterona (PR) y estrógenos ( $ER\alpha$ ) uterinos no se vio afectada por la CCi ni por el tratamiento nutricional. Las ovejas de baja-CCi tendieron a presentar mayor expresión de ARNm de INSR ( $P=0.07$ ), y las ovejas subnutridas tendieron a presentar mayor expresión de ARNm de IGFBP2 ( $P=0.08$ ). Un hallazgo interesante fue que la respuesta uterina a la subnutrición fue dependiente de la CCi: se encontró una mayor expresión de ARNm de GHR ( $P < 0.05$ ) e IGFBP5 ( $P = 0.09$ )

en las ovejas subnutridas respecto a las controles, solo en el grupo de alta-CCi. En conclusión, el presente estudio demuestra que la respuesta endocrina y la expresión génica uterina a la subnutrición dependen de las reservas corporales iniciales y se asocian con una calidad embrionaria diferencial.

## SUMMARY

The aim of this study was to characterize insulin, leptin and IGF-1 profiles, and uterine functionality after undernutrition in pregnant ewes with different initial body condition (iBCS), and to relate them with embryo quality during early gestation. Thirty-six Rasa Aragonesa ewes were divided into 2 groups with different BCS: BCS > 2.75 (high, H, n=19) and BCS < 2.25 (low, L, n=17) and they were randomly assigned to two nutritional treatments: 1.5 (control, C) or 0.5 (undernourishment, U) times the daily maintenance requirements. On day 5 of gestation the embryo was recovered and only ewes presented it remained in the experiment, establishing four groups: high-iBCS control (HC, n=6), high-iBCS undernourished (HU, n=7), low-iBCS control (LC, n=9) and low-iBCS undernourished (LU, n=7). High-iBCS ewes presented higher concentration of insulin, leptin and IGF-1, reflecting a better metabolic status in these animals. There was a greater proportion of high-iBCS ewes presenting more than one CL ( $P < 0.05$ ), and associated greater P4 plasma concentration, number of recovered embryo and higher embryo viability rate. In uterus, undernourished ewes tended to have lower P4 ( $P = 0.09$ ) and higher E2 concentration ( $P = 0.10$ ). Immunostaining of uterine progesterone and estrogen receptors (PR and ER $\alpha$ ) was not affected by iBCS or nutritional treatment. Ewes with low-iBCS tended to have more INSR mRNA ( $P = 0.07$ ), and undernourished ewes tended to have more IGFBP2 mRNA expression ( $P = 0.08$ ). An interesting finding was that the uterine response to

undernutrition was dependent on iBCS: a higher expression of GHR ( $P < 0.05$ ) and IGFBP5 ( $P = 0.09$ ) mRNA was found in undernourished than control ewes only in high-iBCS group. In summary, the present study demonstrates that the endocrine response and the uterine gene expression to undernutrition depend on the initial body energy reserves (iBCS) and is associated with a differential embryo quality.

## INTRODUCCIÓN

La nutrición es uno de los factores más importantes que afectan el ciclo reproductivo de los rumiantes, por lo que es clave cubrir los requerimientos de los animales a los efectos de optimizar su rendimiento productivo (Martin et al. 2004). En ovinos, uno de los aspectos más estudiados quizá sea el efecto de la sobrealimentación o suplementación (flushing), como herramienta para incrementar la tasa de ovulación. Sin embargo, es la subnutrición (la alimentación por debajo de los requerimientos para el mantenimiento del peso vivo) la que se presenta como problema en los rebaños comerciales, principalmente en lugares donde la alimentación está basada en el pastoreo. En países de clima templado donde los animales pastorean pastos naturales durante todo el año, las variaciones estacionales en la cantidad y calidad de los pastos modifican las ganancias de peso a lo largo del año lo que se ha asociado a la eficiencia reproductiva global (Viñoles et al. 2009).

El estado metabólico puede definirse como la cantidad de nutrientes y energía que están disponibles para el animal en un determinado momento, y depende de la cantidad de alimento consumido, de la cantidad de reservas corporales y del ritmo de utilización de la energía (Blache et al. 2006). La cantidad de energía disponible incluye la energía derivada de la nutrición y también la energía almacenada en los tejidos corporales, especialmente el tejido adiposo, el cual es un sistema de almacenamiento altamente eficiente (Renaville et al. 2002). La cantidad de energía gastada varía de acuerdo a la edad y el estado fisiológico del animal y comprende la energía utilizada en funciones que son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis y la energía utilizada en necesidades fisiológicas adicionales, tales como el crecimiento y la reproducción (Blache et al. 2006). Las reservas corporales se movilizan en períodos de altas necesidades metabólicas (por ejemplo, al final de la gestación, lactancia) (Chilliard et al. 1998; Friggens et al. 2007) o de muy baja disponibilidad de alimento (por ejemplo, las estaciones secas) (Soca et al. 2013). Una forma de conocer el estado de las reservas corporales de un animal es a través de la evaluación de su peso vivo (PV) y de su condición corporal (CC). Si bien la composición corporal varía según la raza, la edad y el estado fisiológico, cuando los animales están bajo las mismas

condiciones, el uso del PV y la CC para evaluar su estado de reservas corporales es muy conveniente.

Los cambios en el estado metabólico son un regulador importante de la actividad reproductiva, pudiendo actuar a diferentes niveles en el eje reproductivo. A pesar de que los requerimientos energéticos para el crecimiento folicular, la ovulación y la gestación temprana son muy bajos comparados con los requerimientos para el mantenimiento, una nutrición inadecuada puede tener efectos deletéreos importantes en la reproducción (O'Callaghan y Boland, 1999). Los efectos de la nutrición sobre las variables reproductivas pueden ser “agudos” cuando no están reflejados por cambios en el PV o la CC; “estáticos” cuando reflejan diferencias mantenidas en el PV o la CC debido a la historia nutricional de las semanas/meses previos, o “dinámicos” cuando obedecen a cambios de PV o CC en períodos más cortos (días/semanas) (Chilliard et al. 1998; Scaramuzzi et al. 2006).

## **ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

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

Los períodos de balance energético negativo (BEN) están caracterizados por la movilización grasa que se refleja en un aumento de la concentración circulante de ácidos grasos no esterificados (AGNE) (Pedron et al. 1993; Ingvarsen y Andersen, 2000; Burke y Roche, 2007), que a menudo se acompaña con el incremento en la producción de cuerpos cetónicos, como el  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) (Whitaker et al. 1999). También, durante el BEN, ocurre una redistribución y utilización diferencial de nutrientes, por lo que los tejidos periféricos pueden utilizar otros nutrientes en lugar de la glucosa, permitiendo así una mayor disponibilidad de glucosa en los tejidos periféricos para otras funciones vitales (Bell y Bauman, 1997).

El sistema endocrino regula el metabolismo, afinando los procesos de entrega de información, que tienen como finalidad mantener la homeostasis. Las vías de señalización son complejas, e involucran varios metabolitos y hormonas, como la hormona de



crecimiento (GH), la familia IGF, insulina, leptina y adiponectina, entre otros. Para lograr mantener el equilibrio del medio interno y las funciones vitales durante una subnutrición, se dan numerosos cambios en las concentraciones hormonales y en su sensibilidad tisular (Chilliard et al. 1998). La GH juega un papel clave en la subnutrición regulando la utilización de glucosa (Renaville et al. 2002; Flint et al. 2003). En períodos de subnutrición, existe un desacoplamiento hepático en el eje GH-IGF-1, es decir, el hígado es menos sensible a la GH (menor contenido del receptor de GH, especialmente el subtipo 1A), resultando en una reducción de la concentración circulante de IGF-1 (Thissen et al. 1994; Chilliard et al. 1998; Kobayashi et al. 1999). Esto repercute en varios órganos y tejidos, ya que el IGF-1 es anabólico y estimula el crecimiento, pero se destaca además que la falta de retroalimentación negativa sobre la GH, promueve una mayor concentración circulante de esta hormona y por lo tanto, una mayor acción teleoforética (Meikle et al. 2010). Los IGFs (IGF-1 e IGF-2) son sintetizados principalmente en el hígado, pero también son sintetizados localmente en la mayoría de los órganos, por lo que pueden actuar de forma endócrina, parácrina y autócrina (Thissen et al. 1994). En el útero, ambos IGFs estimulan el desarrollo de los embriones pre-implantación, actúan en el desarrollo fetal y controlan el desarrollo placentario (Wathes et al. 1998). La actividad de los IGFs está modulada por al menos seis proteínas de unión a IGF (IGFBPs). En el tracto reproductivo ovino se ha demostrado la expresión del ARNm de IGF-1, IGF-2 y su receptor (IGFR1), y de las IGFBPs (Stevenson et al. 1994; Stevenson y Wathes, 1996; Reynolds et al. 1997; Sequeira et al. 2015). La ingesta de nutrientes es un importante regulador de las concentraciones plasmáticas de estos IGFBPs y las manipulaciones de la dieta cambian la abundancia sérica de IGFBPs en seres humanos y animales (Thissen et al. 1994). Los períodos de BEN se asocian con disminución de IGFBP3 (a la cual se une la mayor parte de IGF-1 en condiciones normales) y aumento de IGFBP2, formando el complejo IGF-1/IGFBP2 y disminuyendo la vida media de IGF-1 (Jones y Clemmons, 1995). A su vez, niveles altos de insulina actúan de manera indirecta aumentando los niveles de IGF-1 libre y disminuyendo la síntesis hepática de IGFBP-2 (Clemmons, 2016).

Si bien se considera que el desacoplamiento del eje somatotropo en períodos de subnutrición es una estrategia del rumiante para enfrentar la crisis energética, existen otras

señales hormonales que tienen un papel clave. La insulina tiene múltiples efectos en el metabolismo; entre los más importantes está el de facilitar la entrada de glucosa a las células desde la circulación general y estimular el almacenamiento de lípidos (Bell, 1995; Etherton, 2004). En períodos de subnutrición la concentración de insulina disminuye, y por lo tanto, la estimulación del anabolismo está disminuida. Simultáneamente, la GH aumenta la lipólisis y disminuye los eventos regulados por la insulina, como son el transporte de la glucosa y la lipogénesis (Flint et al. 2003). Así, el anabolismo es inhibido directamente por la disminución en las concentraciones de insulina, e indirectamente por la falta de efecto estimulador de la insulina sobre la sensibilidad de GH (GHR) que limita la síntesis hepática de IGF-1 (Rhoads et al. 2004). La insulina es uno de los indicadores metabólicos más eficientes en reflejar el estado nutricional de las ovejas, mostrando variaciones significativas según el grado de alimentación y la condición corporal (Caldeira et al. 2007).

Por otro lado, las adipoquinas también presentan un papel fundamental en el metabolismo. Entre ellas se encuentra la leptina, péptido sintetizado principalmente por el tejido adiposo, aunque también se sintetiza (en menor medida) en otros tejidos como el hígado, páncreas y tracto reproductivo (González et al. 2000; Chilliard et al. 2005). Esta hormona se asoció en un principio con el control central del apetito, inhibiendo el mismo y aumentando la tasa metabólica, pero con el tiempo se ha demostrado que está implicada también en múltiples procesos fisiológicos, tales como la inflamación, la hematopoyesis, la actividad inmune y la reproducción (Moschos et al. 2002). La subnutrición provoca una movilización de las reservas grasas, ya que cuando los aportes no satisfacen los requerimientos energéticos, el animal dispone de sus reservas de triacilglicéridos para su utilización por los diferentes tejidos (Chilliard et al. 1998). La menor concentración de leptina en los animales subnutridos podría actuar como una señal para aumentar el apetito y disminuir el gasto de energía, lo que sugiere que es una señal para las adaptaciones endocrinas, metabólicas y de comportamiento dirigidas a restaurar la homeostasis (Chilliard et al. 2000; Chilliard et al. 2001). El receptor de la leptina es un miembro de la familia de receptores de citoquinas, del que existen tres formas: la forma corta (Ra), la forma soluble del anterior (Re) y la forma larga (Rb) (Tartaglia et al. 1995). La presencia de la leptina y la de su receptor en el tracto reproductivo la ha involucrado en los procesos reproductivos y se ha sugerido que puede

actuar como mediador entre el estado metabólico y la reproducción (Clarke y Henry, 1999). La leptina se ha asociado con el desarrollo embrionario temprano en suinos (Chappaz et al. 2008), y la presencia de su receptor ha sido descrita en el útero bovino (Sosa et al. 2010) y ovino (Sequeira et al. 2015).

Otra adipoquina expresada por los adipocitos es la adiponectina (Scherer et al. 1995), proteína con un importante rol en el metabolismo y la reproducción, de la cual hay muy escasa información respecto a su rol en ovinos (Kasimanickam y Kasimanickam, 2011). La adiponectina sensibiliza los tejidos periféricos a la insulina, aumentando el consumo de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en el músculo, y promueve la secreción de insulina estimulada por la glucosa (Ye et al. 2013; Saremi et al. 2014). Además, la adiponectina también tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis energética, específicamente de lípidos y del metabolismo de la glucosa (Berg et al. 2001). Se han identificado dos tipos de receptores de adiponectina, (ADIPOR1 y ADIPOR2; Yamauchi et al. 2003), con funciones diferentes; ADIPOR1 está altamente expresado en el músculo esquelético, mientras que ADIPOR2 está altamente expresado en el hígado (Yamauchi et al. 2007). Se ha propuesto que ADIPOR2 presenta un rol protector frente al estrés oxidativo cuando hay una importante oxidación de AGNE durante el BEN (Saremi et al. 2014). Además, la adiponectina también presenta acciones reguladoras específicas sobre el eje hipotálamo-gonadal, y por lo tanto se encuentra involucrada tanto en el control metabólico, como en la reproducción (Ye et al. 2013). En este sentido, existe un solo reporte referido a la expresión uterina de ARNm de ADIPOR1 y ADIPOR2 durante la preñez temprana en ovejas (Sequeira et al. 2015), en el cual no encontraron diferencias acorde a la raza y los autores plantean el hecho de no haber incluido ovejas cíclicas en el experimento que les hubiera permitido estudiar el rol que tiene esta hormona en la implantación.

Todas estas señales endócrinas que se modifican en plasma frente a una restricción alimenticia o a un BEN, repercuten directamente en el útero, lo que podría comprometer la supervivencia embrionaria. En este sentido, en un estudio reciente en vacas lecheras en lactación, Astessiano et al. (2017) reportaron una mayor expresión de ARNm endometrial de IGF-1, IGFBP3 y receptores de adiponectina en el día 7 del ciclo estral, al final del

período de espera voluntaria, en vacas alimentadas con ración totalmente mezclada (TMR) o con una alta disponibilidad de pastura en comparación con vacas alimentadas con disponibilidad media o baja. Por lo tanto, se ha sugerido que el endometrio de los rumiantes parece ser capaz de detectar el estado metabólico y adaptar su fisiología en consecuencia, determinando así el posible éxito o fracaso de la preñez (Meikle et al. 2018).

### **Mecanismos de acción hormonal**

Las hormonas producidas por los diferentes órganos son secretadas al torrente sanguíneo, donde se distribuyen a todos los tejidos, aunque sólo algunos tejidos tienen la capacidad de responder a ellas (tejidos diana). Esta especificidad tisular se debe a que las hormonas se unen a receptores específicos ubicados en las células de los tejidos diana. Las proteínas receptoras se unen a la hormona con alta afinidad y esta interacción induce una respuesta biológica en los tejidos sensibles. Sin embargo, el mecanismo de señalización hormonal dentro de la célula es diferente dependiendo de la naturaleza química de las hormonas.

#### *Insulina e IGF-1*

La insulina y el IGF-1 comparten el mismo mecanismo de acción dado que son hormonas con similar estructura molecular (péptidos hidrosolubles). Como los receptores de otras hormonas proteicas, los receptores para insulina e IGF-1 son proteínas integrales de la membrana plasmática. El receptor es una proteína tetramérica con dos subunidades alfa extracelulares y dos subunidades beta que tienen una pequeña porción extracelular, una porción transmembrana y una porción intracelular (Mendivil y Sierra, 2005). Este receptor es una tirosin-kinasa, funciona como una enzima que transfiere grupos fosfato desde el ATP hacia los residuos tirosina en las proteínas diana intracelulares. Cuando la hormona se une a la porción N-terminal de la subunidad alfa, la actividad inhibitoria de ésta sobre las subunidades beta se pierde y se genera un cambio conformacional de la subunidad beta que estimula la actividad kinasa del receptor. En ese momento las subunidades beta ejercen su acción catalítica de tirosin-kinasas, las dos subunidades se transfosforilan (la una fosforila a la otra y viceversa) en 6-7 residuos de tirosina activando de este modo la actividad

catalítica del receptor. El receptor activado, luego fosforila un número de proteínas intracelulares generando la respuesta biológica.

#### *Leptina y hormona del crecimiento*

El receptor de la leptina y de GH, miembros de la familia de receptores de citoquinas, carecen de actividad enzimática en su dominio intracelular. En vez de ello, están ligados a miembros de la familia de las quinasas *janus* (Jak), que pertenecen a una clase de tirosin-kinasas. La unión del ligando activa la quinasa Jak y lleva a la fosforilación de determinadas proteínas citoplasmáticas. Dentro de estas proteínas existen una clase de factores de transcripción citoplasmáticos llamados transductores de señal y activadores de transcripción (STAT). Se han identificado seis miembros de esta familia. La fosforilación de los STAT induce una dimerización y translocación en el núcleo y acaba produciendo la activación de la transcripción de determinados genes produciendo el efecto biológico final (Tartaglia et al. 1995).

#### *Adiponectina*

ADIPOR1 y ADIPOR2 presentan siete dominios transmembrana. Su extremo C-terminal se encuentra hacia el exterior celular, y su extremo N-terminal está orientado hacia el interior, por lo que difiere estructuralmente de la familia de receptores acoplados a proteínas G (Yamauchi et al. 2003). La unión de la adiponectina al receptor provoca la fosforilación de AMP Kinasa, y este sistema de señalización termina, entre otros procesos biológicos, en proliferación celular.

#### *Progesterona y estrógenos*

Debido a que la progesterona (P4) y los estrógenos (E) tienen naturaleza lipídica y tienen bajo peso molecular, entran a las células por difusión, y se unen a receptores específicos (proteínas) de localización nuclear. Los receptores esteroideos son macromoléculas que se encuentran en el núcleo de la célula y que tienen sitios o dominios específicos de unión a las hormonas y dominios de unión al ADN que interactúan con secuencias específicas de

éste (elementos de respuesta a esteroides, ERE) (Tsai y O'Malley, 1994). La unión de la hormona esteroidea a su receptor conlleva cambios de conformación que convierten al complejo hormona-receptor inactivo en activo (lo cual implica su dimerización), y posibilita la unión a los ERE activando genes y estimulando su transcripción para producir ARN mensajeros (ARNm). Los ARNm son traducidos en los ribosomas citoplásmicos produciendo proteínas que influyen en la función celular. Una vez que el complejo hormona-receptor interactúa con un gen, el receptor sufre reacciones que resultan en su reciclaje o destrucción (Clark y Mani, 1994).

Existen dos tipos de receptores de estrógenos (ER) productos de dos genes diferentes; el ER $\alpha$  es el receptor clásico y predominante en el tracto reproductivo (Meikle et al. 2004a), y el ER $\beta$  también reportado en el endometrio (Hapangama et al. 2015). Ambos receptores presentan una alta homología en sus ERE y en sus sitios de unión al ligando, por lo que se asume que tienen un mismo mecanismo de acción. Por otro lado, al menos dos isoformas del PR han sido descritas en ratas: A y B (Conneely et al. 2001). Los PR-A y PR-B son expresados por diferentes promotores sobre el mismo gen y ambos se unen a la P4 con similar afinidad e interactúan con los mismos ERE.

### **Subnutrición, funcionalidad del tracto reproductivo y gestación temprana**

Se ha demostrado previamente en ovejas (Abecia et al. 2013) que una dieta que proporciona la mitad de los requerimientos nutricionales diarios de mantenimiento, produce una disminución significativa de la performance reproductiva. Abecia et al. (1995; 1997; 1999) comunicaron que la cantidad de embriones recuperados los días 8 y 9 de gestación era similar en ovejas subnutridas y controles, pero encontraban diferentes tasas de gestación los días 14 y 15. Además, los embriones recuperados de las ovejas subnutridas presentaban retraso en el desarrollo con respecto a los de las ovejas bien alimentadas. Un ambiente materno alterado puede no afectar al embrión inmediatamente, pero sí comprometer su desarrollo en etapas posteriores (Leese, 2005).

Las hormonas esteroideas son esenciales para modular la fisiología del oviducto y del útero, y estimular sus secreciones (Geisert et al. 1992; Buhi et al. 1997). Cualquier cambio en la capacidad de respuesta del útero a las hormonas esteroideas podría resultar en un ambiente uterino alterado o no preparado de manera óptima para sustentar el desarrollo de un posible embrión. En subnutrición, Sosa et al. (2004, 2006, 2008) reportan que las ovejas presentan alteraciones en la expresión génica del tracto reproductivo. Se ha demostrado que las ovejas subnutridas presentan una sensibilidad reducida a los esteroides el día 5 del ciclo sexual: menor contenido endometrial de PR (Sosa et al. 2004) y ER $\alpha$  (Sosa et al. 2006), menor capacidad de unión de PR y ER endometriales (Sosa et al. 2006) y menor expresión en el oviducto ipsilateral al cuerpo lúteo (CL) del ARNm de PR y ER $\alpha$  (Sosa et al. 2008). Este hallazgo de que las ovejas subnutridas tienen una menor sensibilidad a los esteroides ováricos el día 5, podría traducirse en un inadecuado sustento de las necesidades de un embrión en crecimiento y podría explicar el aumento de mortalidad embrionaria asociada a la subnutrición. En estos mismos trabajos no se encontraron diferencias en la expresión o inmunotinción de PR y ER los días 10 o 14 del ciclo estral, por lo que los autores sugirieron que una funcionalidad uterina alterada durante la fase luteal temprana (día 5), podría ser la causa del retraso en el desarrollo embrionario y consecuentes pérdidas de preñez durante la gestación temprana.

A su vez, varias de las hormonas metabólicas que ayudan a mantener la homeostasis del organismo y cuyas concentraciones plasmáticas varían con los cambios en el estado metabólico han sido postuladas como posibles mediadores entre éste, el sistema reproductor y el embrión. Entre los candidatos más probables de mediar entre los cambios nutricionales y el ambiente uterino se encuentran la insulina, los IGF y la leptina (Meikle et al. 2018). De hecho, en rumiantes, el tracto reproductivo de la hembra y el embrión tienen receptores para estas hormonas (Dupont et al. 2014, Sequeira et al. 2015), y algunas de estas hormonas son producidas por el propio tejido uterino, como IGF-1 e IGF-2 (Thissen et al. 1994). Se ha reportado que ambos IGFs promueven el desarrollo embrionario (Byrne et al. 2002), y de Brun et al. (2013) reportaron que animales subnutridos presentaron una menor expresión génica de IGF-1 en útero e IGF-2 en oviducto al día 5 de gestación, lo que podría comprometer la supervivencia embrionaria. El IGF-1 se encuentra implicado en el aumento

de secreción de proteínas y nutrientes del endometrio, que ocurre alrededor del estro (Miller et al. 1977). Por otro lado, como el ARNm de IGF-2 se encuentra localizado principalmente en la pared muscular (Wathes et al. 1998), la menor expresión del transcripto de IGF-2 encontrada en el oviducto de las ovejas subnutridas podría alterar la motilidad y evitar que el embrión sea transferido al útero (de Brun et al. 2013).

### **Respuestas a la subnutrición acorde al grado de reserva corporal**

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado metabólico podrían depender de la historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático), concepto denominado “memoria metabólica” (Chilliard et al. 2005; Blache et al. 2006). Se ha sugerido que el impacto de la subnutrición varía de acuerdo con el estado fisiológico del animal y de acuerdo con su condición corporal (Blanc et al. 2006).

En experimentos realizados por nuestro grupo (Sosa et al. 2006; Sosa et al. 2009), ovejas adultas fueron sometidas a similares períodos de subnutrición (mitad de mantenimiento), siendo el tratamiento nutricional eficaz y produciendo los cambios deseados: disminución del PV y de la CC, con la alteración de perfiles metabólicos como consecuencia del estado de déficit energético. Sin embargo, las respuestas endocrino-metabólicas a la restricción no fueron similares entre los experimentos, y se observaron diferencias principalmente en las concentraciones de glucosa, insulina e IGF-1. Como el PV y la CC inicial de los animales entre ambos experimentos variaron en un 10%, se postuló que estas respuestas diferenciales al mismo tratamiento subnutricional podrían deberse al grado de reservas corporales. En experimentos conceptualmente similares realizados por Soca et al. (2013) con vacas de cría sometidas a tratamientos con suplementación (afrechillo de arroz por 22 días) o no dos meses posparto, se observó que la respuesta endocrino-metabólica (IGF-1 e insulina) a la suplementación dependía de la CC al parto, dado que se observaron aumentos de estas hormonas sólo en los animales con mejor CC. En vaca lechera, Meikle et al. (2004b) y Adrien et al. (2012) reportan mayor concentración de hormonas metabólicas (IGF-1 y leptina) en animales que tienen mejor CC al parto.



En relación a las variables reproductivas, Soca et al. (2013) observaron mayores tasas de preñez temprana y global en vacas de CC moderada en relación a las de CC baja y en animales expuestos a la suplementación en relación a los controles. Este resultado es consistente con el concepto de que el cerebro integra tanto la información de las reservas corporales (memoria metabólica) como las señales de la ingesta actual de energía para poder soportar los futuros desafíos medioambientales del ciclo reproductivo (Blanc et al. 2006). A su vez, Meikle et al. (2004b) reportan que las señales endócrinas que mejor informaron al eje reproductivo respecto al BEN y/o al nivel de reservas corporales y que pudieron explicar el rendimiento reproductivo (reinicio de actividad ovárica) fueron IGF-1 y leptina. En el trabajo de Adrien et al. (2012), los resultados de ciclicidad ovárica van en el mismo sentido, reportando que la probabilidad de ciclar de las vacas se vio afectada por la CC de los animales 30 días antes del parto, siendo las vacas de menor CC las que presentan anestros más largos.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la hembra rumiante, las respuestas endocrino-metabólicas a una restricción alimenticia podrían estar afectadas por las reservas corporales y esto estaría en la base de la variabilidad productiva y/o reproductiva observada en los animales. Como se mencionó anteriormente, existen numerosos antecedentes respecto a los efectos de la subnutrición sobre la reproducción (calidad de oocito y tasa de ovulación, calidad y mortalidad embrionaria, duración de anestro y parámetros reproductivos entre otras) en rumiantes, pero no existen trabajos que vinculen el efecto de la subnutrición en ovejas con distintos grados de reservas corporales. Además, no hemos encontrado reportes que estudien la funcionalidad uterina al momento en el cual el embrión llega al útero y es totalmente dependiente del ambiente materno en ovejas subnutridas. En este sentido, es muy importante entender si esta diferencia en las reservas corporales (“memoria metabólica”) de los animales influye en el ambiente uterino (expresión génica, concentración de esteroides en el útero y la sensibilidad tisular a los mismos) cuando estos están sometidos a una restricción alimenticia. Sumado a esto, la asociación de los cambios en las hormonas

metabólicas (insulina, leptina e IGF-1), la funcionalidad uterina y la calidad embrionaria durante la gestación temprana, permitiría vislumbrar mecanismos biológicos que puedan explicar la mortalidad embrionaria que se concentra en este período.

## **HIPÓTESIS**

La respuesta endócrina a una subnutrición depende de las reservas corporales iniciales (CCi, efecto estático) de los animales, y se refleja en el ambiente uterino y en la calidad embrionaria.

### **OBJETIVO GENERAL**

Investigar la respuesta endócrina (insulina, leptina y factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1)) y reproductiva (calidad embrionaria y ambiente uterino), a una restricción nutricional de 20 días, en ovejas con diferentes reservas corporales iniciales (CCi) durante la gestación temprana.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

En ovejas durante la gestación temprana, con reservas corporales bajas y moderadas al inicio del experimento y que fueron sometidas a un tratamiento nutricional (control y subnutridas) se determinarán:

- 1) el peso vivo y la condición corporal de los animales
- 2) las concentraciones de insulina, leptina, IGF-1 y progesterona (P4) en plasma.
- 3) la tasa ovulatoria y la calidad embrionaria en términos de número de embriones recuperados y tasa de viabilidad embrionaria.
- 4) las concentraciones de IGF-1, P4 y estradiol (E2) en útero.
- 5) la localización y abundancia de los receptores de progesterona (PR) y receptores de estrógenos (ER $\alpha$ ) endometriales.
- 6) La expresión relativa de ARNm de PR, ER $\alpha$ , receptor de hormona del crecimiento (GHR), IGF-1, IGF-2, IGFbps, ADIPOR2, receptor de insulina (IR) y receptor de leptina (LEPR) en útero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales y tratamientos

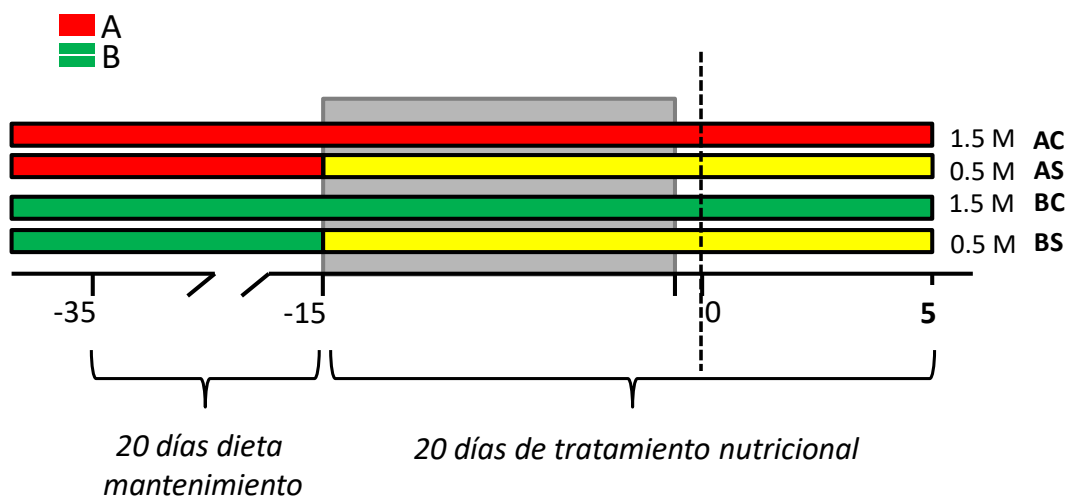
Este experimento se llevó a cabo en la granja experimental de la Universidad de Zaragoza, España, bajo la supervisión del Comité de Ética de la Universidad de Zaragoza y de acuerdo a las exigencias de la Unión Europea para la experimentación animal.

Durante la estación reproductiva, 36 ovejas adultas Rasa Aragonesa fueron separadas en 2 grupos con diferente CC (CC inicial, CCI) (CC, escala de 0 a 5; Russel et al. 1969): CCI > 2.75 (n=19, moderadamente alta, A) y CCI < 2.25 (n=17, moderadamente baja, B, Figura 1). El PV al inicio del experimento fue de  $61.9 \pm 1.6$  kg y  $50.9 \pm 1.7$  kg para el grupo A y B, respectivamente; y la CCI fue de  $2.9 \pm 0.04$  para el grupo A y  $2.1 \pm 0.04$  para el B. Durante 20 días, ambos grupos recibieron una dieta para cubrir los requerimientos de mantenimiento en energía y proteína (AFRC, 1993). Las dietas consistieron en: 0.45 kg de materia fresca (MF) de concentrado (pienso) y 0.55 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo A, y en 0.40 kg MF de concentrado y 0.50 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo B. Ambas dietas proporcionaron 2 Mcal EM/kg MF y 9% de PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja, en una relación porcentual de 85:15. Tras este período, cada grupo se dividió en 2 subgrupos para proporcionar 1.5 (control, C) o 0.5 (subnutrición, S) veces los requerimientos diarios de mantenimiento durante 20 días, de acuerdo a nuestros trabajos previos (Abecia et al. 1993; Abecia et al. 1995; Lozano et al. 1998; Sosa et al. 2006) hasta el sacrificio (Figura 1). Las dietas consistieron en 0.60 kg (MF) de pienso y 0.9 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 1.5M (grupo C) y 0.20 kg MF de pienso y 0.30 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 0.5 M (grupo S). Ambas dietas proporcionaron 2.1Mcal EM/kg MF y 11% de PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja en una relación de 66:34 y el consumo fue realizado de manera grupal. Por lo tanto, los 4 grupos experimentales fueron: ovejas con alta CCI control (AC), ovejas con alta CCI subnutridas (AS), ovejas con baja CCI control (BC) y ovejas con baja CCI subnutridas (BS).

Al comienzo del tratamiento con las diferentes dietas, todas las ovejas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas de progestágeno (acetato de fluorogestona, 40 mg; ISPAH, Salamanca, España) durante 14 días. Al momento de la retirada de las esponjas, las

ovejas fueron inyectadas i.m. con 300 UI de gonadotropina coriónica equina (Sincropart® PMSG, Ceva Salud Animal, Barcelona, España). El estro (Día 0) se detectó cada 8 horas a partir de las 24 horas de retiradas las esponjas, y las ovejas fueron cubiertas por 10 carneros de la misma raza de fertilidad probada. El día 5 después del celo, los animales de cada grupo fueron sacrificados y se utilizaron para este estudio solo las ovejas preñadas. Los cuernos uterinos fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS) y la preñez se definió por la presencia de un embrión. La tasa ovulatoria se determinó cuantificando el número de cuerpos lúteos funcionales presentes en los ovarios. Los embriones fueron examinados y clasificados (Winterberger-Torres y Sevellec, 1987). Las mórulas y las mórulas compactas se consideraron embriones viables, según lo esperado para el día 5 de gestación (Winterberger-Torres y Sevellec, 1987). La tasa de viabilidad embrionaria fue definida como número de embriones viables/número de embriones recuperados. Los grupos experimentales finales fueron: AC (n=6), AS (n=7), BC (n=9) y BS (n=7).

El PV fue determinado los días -35, -21, -15 (inserción de esponjas e inicio de dietas diferenciales), -1 (retiro de esponjas) y 5 (sacrificio), con respecto al estro, durante la mañana (antes de ofrecerles la ración), y por lo tanto, estando los animales en ayuno. Las muestras de sangre se extrajeron cada 3 días en tubos de vacío con heparina de la vena yugular de animales en ayuno, desde el día anterior del comienzo de las dietas diferenciales (día -16) hasta el final del experimento. El plasma fue separado por centrifugación a 1000g por 10 minutos y almacenado a -20°C hasta la posterior determinación de hormonas.



**Figura 1.** Representación esquemática del diseño experimental. Ovejas con una condición corporal inicial moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. Los 4 grupos experimentales fueron: ovejas altas control (AC, barra roja), ovejas altas subnutridas (AS, barra roja y amarilla), ovejas bajas control (BC, barra verde) y ovejas bajas subnutridas (BS, barra verde y amarilla). El área sombreada de gris indica el período del tratamiento con progestágenos para la sincronización de celos. La línea punteada indica el día del celo (día 0) previo al sacrificio el día 5.

### Determinación hormonal

Las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de insulina se determinaron mediante un radioinmunoensayo en fase sólida (RIA) (Diagnostic Product Co., Los Ángeles, CA, EE. UU.). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 2.2  $\mu\text{UI} / \text{mL}$ . Los CVs intraensayos para controles bajos (2.2  $\mu\text{UI} / \text{mL}$ ) y medios (12.6  $\mu\text{UI} / \text{mL}$ ) fueron 8.2 y 9.4%, respectivamente. IGF-1 se determinó utilizando un ensayo inmunoradiométrico (IGF1-RIACT, CisBio International, GIFSR-YVETTE CEDEX, Francia), como se informó anteriormente por Adrien et al. (2012). La sensibilidad del ensayo fue de 0.7 ng / mL. El CV intraensayo para el control 1 (43.8 ng / mL) y el control 2 (521.5 ng / mL) fue de 8.2 y 7.9%. Las concentraciones de leptina se

determinaron mediante RIA en fase líquida utilizando el kit de Leptina Multi-Especies (Millipore, Chicago, EE. UU.), informado previamente en ganado bovino (Pinotti y Rosi, 2006). La sensibilidad fue de 1.8 ng / mL. Los CV intraensayos para el control 1 (5.3 ng / mL) y el control 2 (18.3 ng / mL) fueron 5.6 y 5.1%, respectivamente. Las concentraciones de progesterona se determinaron mediante un RIA directo en fase sólida (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA). El RIA tuvo una sensibilidad de 0.02 ng / mL. Los coeficientes de variación intraensayo para controles bajos (2 ng / mL) y altos (10 ng / mL) fueron 12.5% y 5.7% respectivamente.

Para la determinación hormonal en útero el tejido se procesó siguiendo la técnica de Abecia et al. (1996). Las secciones uterinas (alrededor de 500 mg) se homogeneizaron en 5 mL de buffer fosfato salino (NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01 M, pH 7,5) y el sobrenadante se recogió después de una centrifugación a 1000 g durante 10 min. El IGF-1 se determinó directamente a partir de este sobrenadante. Para la determinación de P4 y E2, los esteroides se extrajeron 4 veces a partir de 1 mL del sobrenadante, utilizando 2 mL de éter dietílico cada vez. Después de la evaporación del éter, los esteroides extraídos se resuspendieron en 300 uL de la solución tampón y se almacenaron a -20 °C. Las concentraciones de hormonas se determinaron como fue descrito para el plasma y se corrigieron por la cantidad de tejido utilizado en la extracción.

### **Localización y abundancia de los receptores de progesterona y estrógenos endometriales**

Al momento del sacrificio, se extrajeron secciones del útero, se fijaron en paraformaldehído al 4% y se montaron en parafina. La inmunoreacción de PR y ER $\alpha$  se observó en secciones uterinas transversales de 5  $\mu$ m usando la técnica inmunohistoquímica de avidina-biotina-peroxidasa (Meikle et al. 2000). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-PR monoclonal de ratón (Zymed, South San Francisco, CA, EE. UU.) y anti-ER $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.) diluidos 1:100 y 1:25 en PBS, respectivamente. Se obtuvieron controles negativos para cada receptor reemplazando el anticuerpo primario con una IgG no inmune homóloga en concentraciones equivalentes (Santa Cruz). Después

de la unión del anticuerpo primario, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotilado (IgG anti-ratón de caballo; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) diluido 1: 200 en suero normal de caballo. Para la visualización de la inmunolocalización, se utilizó un kit Vectastain Elite ABC seguido de un sustrato de peroxidasa DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finalmente, se contrastaron las secciones con hematoxilina. Para cada receptor, todas las muestras se analizaron en el mismo ensayo inmunohistoquímico.

La inmunotinción promedio y la proporción de células positivas se calcularon a partir de la evaluación de diez campos (aumento de 1000X) por tipo celular y por oveja, como se describió anteriormente (Sosa et al. 2004). Ambos receptores se evaluaron en cinco compartimentos endometriales: epitelio luminal (EL), epitelio glandular superficial y profundo (EGs y EGp) y estroma intercaruncular superficial y profundo (Es y Ep).

### **Cuantificación génica uterina**

El ARN total del útero se extrajo utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) seguido de precipitación con cloruro de litio y tratamiento con DNasa con el kit DNase I Amplification Grade (Invitrogen, EE. UU.). La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm, la pureza se evaluó con la relación de absorbancia de 260 a 280 nm y la integridad por electroforesis (gel de agarosa al 1%). Para cada muestra, el ADNc se sintetizó por transcripción reversa utilizando la transcriptasa SuperScript III (Invitrogen) con cebadores oligo-dT y 1 µg de ARN total agregado como molde.

Se determinó la expresión génica mediante PCR en tiempo real utilizando el equipo Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Se utilizaron primers diseñados específicamente para amplificar ADNc de receptores de progesterona (PR), estrógeno alfa (ER $\alpha$ ), hormona del crecimiento (GHR), insulina (INSR), leptina (LEPR), adiponectina (ADIPOR2) e IGF-1, IGF-2, las proteínas de unión a IGF (IGFBP2-5), y de los controles endógenos, proteína ribosomal L19 (PRL19) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que se presentan en el Cuadro I. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron utilizando KAPA SYBR®FAST Universal 2 $\times$ qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, inc. Woburn, MA, EE. UU.), cantidades equimolares de primers forward y



reverse (200 nM; Operon Biotechnologies GmbH, Colonia, Alemania) y 3  $\mu$ l de ADNc diluido (1: 7.5 en agua libre de ARNasa / ADNasa ) en un volumen final de 15  $\mu$ l. Las muestras se analizaron por duplicado en un Rotor-Gene<sup>TM</sup> 6000 de 72 discos (Corbett Life Sciences, Sydney, NSW, Australia). Las condiciones estándar de amplificación fueron de 3 min a 95 ° C y 40 ciclos de 15 s a 95 ° C, 40 s a 60 ° C y 10 s a 72 ° C. Al final de cada corrida, se analizaron las curvas de disociación para asegurar que se detectaba el amplicón deseado y para descartar ADN contaminante o los dímeros de cebadores. Las muestras de ADNc de once ovejas se agruparon para proporcionar un control exógeno, y se utilizaron cinco diluciones (de 100 a 6,25 ng / tubo) de este grupo para realizar la regresión lineal para cada gen. La eficiencia (E) de los ensayos se calculó de acuerdo a la fórmula  $E = (10^{-1 / \text{pendiente} - 1})$  (Cuadro I) (Rutledge y Cote, 2003). La expresión génica se midió por cuantificación relativa (Pflaffl, 2009) al control exógeno y se normalizó a la expresión media geométrica de los genes de control endógeno (GAPDH y RPL19), teniendo en cuenta las eficiencias respectivas (Pflaffl, 2009). La expresión de los housekeeping se mantuvo sin cambios entre las muestras.

**Cuadro I.** Secuencias de oligonucleótidos de los primers utilizados para la cuantificación de los genes de interés y genes de control endógeno

Gen*	Número de acceso	Secuencias de Primers	Longitud (pb)	Eficiencia	Fuente
<i>PR</i>	Z66555	F GACAGCACTTTCTAGGCGACAT R TGTGCTGGAAGAAACGATTGC	79	<b>1.01</b>	(Sosa et al. 2009)
<i>ER<math>\alpha</math></i>	AYO33393	F AGGGAAGCTCCTATTGCTCC R CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT	234	<b>1.09</b>	(Sosa et al. 2009)
<i>GHR</i>	NM_176608	F TCTGGGAATCCTAAATTCACCAA R CTGTAAACTGTGATTAGCCCCATCT	91	<b>0.89</b>	(Pinotti y Rosi, 2006)
<i>IGF-1</i>	NM_001009774.3	F TTGCACTTCAGAAGCAATGG R ACTGGAGAGCATCCACCAAC	209	<b>0.95</b>	(de Brun et al. 2015)
<i>IGF-2</i>	NM_001009311.1	F ACCCTCCAGTTTGTCTGTGG R GGGGTATGCTGTGAAGTCGT	210	<b>1.19</b>	(de Brun et al. 2015)
<i>IGFBP2</i>	NM_174555.1	F ATGCGCCTTCCGATGA R GTTGTACAGGCCATGCTTGTC	74	<b>1.22</b>	(Astessiano et al. 2012)
<i>IGFBP3</i>	AF305199.1	F AGCACAGACACCCAGAACTTCT R TTCAGCGTGTCTCCATTTC	86	<b>1.06</b>	(Pinotti y Rosi, 2006)
<i>IGFBP4</i>	S77394.1	F ATGTGCCTGATGGAGAAAGG R AAGGCAGAGCCACAGACAGT	98	<b>0.79</b>	(de Brun et al. 2015)
<i>IGFBP5</i>	NM_001129733.1	F GGTTTGCCTGAACGAAAAGA R CTGGGTCAGCTTCTTCTGC	193	<b>1.01</b>	(de Brun et al. 2015)
<i>INSR</i>	XM_004008038.1	F TGGCTCCTACAGCTGGACAGT R TCAGCACCCAGGATGGTT	86	<b>1.12</b>	(de Brun et al. 2015)
<i>LEPR</i>	NM_001009763.1	F CAGCGGTTGGGTCTAACATT R GCAGCAGTACACTGCGTCAT	215	<b>1.14</b>	(de Brun et al. 2015)
<i>ADIPOR2</i>	NM_001040499.2	F GGCAACATCTGGACACATC R CTGGAGACCCCTTCTGAG	203	<b>1.01</b>	(de Brun et al. 2015)
<i>RPL19</i>	NM_001040516.1	F CCCCAATGAGACCAATGAAATC R CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	119	<b>1.17</b>	(Chen et al. 2006)
<i>GAPDH</i>	NM_001190390.1	F GCATCGTGGAGGGACTTATGA R GGGCCATCCACAGTCTTCTG	67	<b>0.99</b>	Esta tesis

*PR*, receptor de progesterona; *ER $\alpha$* , receptor de estrógeno; *GHR*, receptor de hormona del crecimiento; *IGF-1*, factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1; *IGFBP2*, proteína de unión a IGF tipo 2; *IGFBP3*, proteína de unión a IGF tipo 3; *IGFBP4*, proteína de unión a IGF tipo 4; *IGFBP5*, proteína de unión a IGF tipo 5; *INSR*, receptor de insulina; *LEPR-b*, receptor de leptina; *ADIPOR2*, receptor de adiponectina tipo 2; *RPL19*, proteína ribosomal L19 (control génico endógeno); *GAPDH*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (control génico endógeno). \*GenBank secuencias ovinas.

## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software SAS (versión 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). La tasa ovulatoria y las variables relacionadas con el embrión se analizaron mediante el procedimiento Proc Genmod, que incluyó en el modelo estadístico la CC inicial, el tratamiento nutricional y su interacción. La proporción de ovejas que ovularon un solo cuerpo lúteo (CL) o más de uno se analizó mediante chi-cuadrado. La concentración de transcritos y la inmunolocalización se analizaron por ANOVA mediante un procedimiento mixto, y en el caso de las variables plasmáticas, se incluyó el análisis de medidas repetidas. El modelo incluyó los efectos fijos de CC inicial (alta o baja), tratamiento nutricional (control o subnutrición), días (cuando corresponda) y sus interacciones, y la estructura de covarianza autorregresiva de primer orden. Además de los efectos de la CC inicial y del tratamiento nutricional, el modelo que estudiaba los datos inmunohistoquímicos también incluyó los efectos fijos del tipo celular (epitelio luminal, epitelio glandular y estroma), la ubicación (superficial y profunda) y sus interacciones. El procedimiento de Kenward-Rogers se utilizó para ajustar los grados de libertad del denominador. La separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. Se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson para describir las relaciones entre las variables. Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados  $\pm$  errores estándar. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$ , y la tendencia cuando  $P < 0.10$ . Para los datos de embriones, se consideró la tendencia cuando  $P < 0.15$  (de Brun et al. 2016).

## RESULTADOS

### **Peso vivo, hormonas plasmáticas metabólicas y concentración de IGF-1 en el útero**

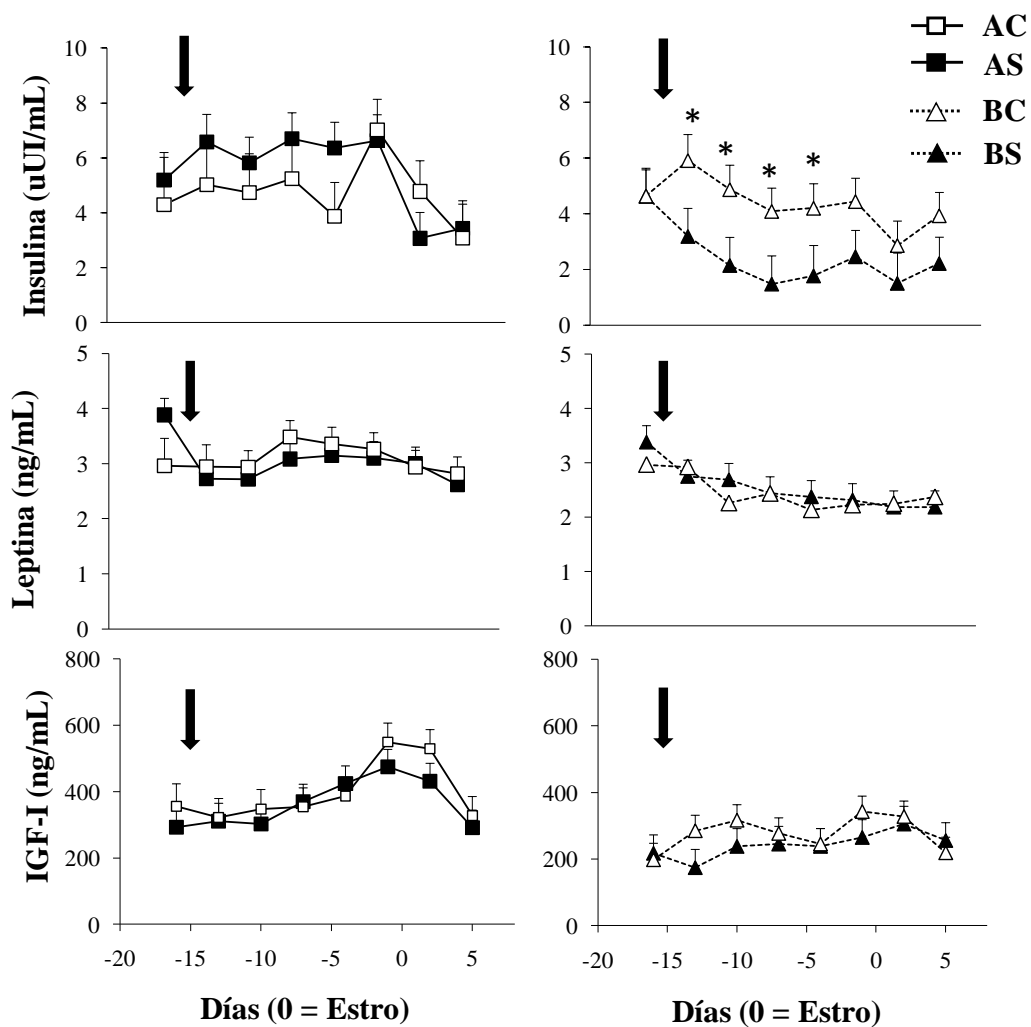
Desde el comienzo del experimento hasta el día -15 (comienzo del tratamiento nutricional), el PV fue menor en las ovejas de baja CC en comparación con las de alta CC ( $50.9 \pm 1.7$  vs  $61.9 \pm 1.6$  kg respectivamente;  $P < 0.0001$ ). Desde el día -15 hasta el día 5, las ovejas BS y AS perdieron peso vivo (6 y 7.3 kg, respectivamente;  $P < 0.05$ ), mientras que el grupo BC ganó 5.8 kg ( $P < 0.05$ ) y las ovejas AC mantuvieron su PV.

La respuesta endócrina a la restricción alimenticia de 0.5 M según la CCi se muestra en la Figura 2. Las ovejas de alta-CCi presentaron mayor concentración de insulina en comparación con las ovejas de baja-CCi ( $5.11 \pm 0.38$  vs.  $3.39 \pm 0.33$   $\mu$ UI / mL;  $P < 0.01$ ). La subnutrición no afectó las concentraciones de insulina, pero hubo una interacción entre la CCi y el tratamiento nutricional ( $P < 0.05$ ): si bien no se observó el efecto de la subnutrición en las ovejas de alta-CCi, en las ovejas de baja-CCi la concentración de insulina disminuyó inmediatamente después del inicio de la restricción alimenticia.

A su vez, las ovejas de alta-CCi tendieron a presentar concentraciones más altas de leptina que aquellas de baja-CCi ( $3.05 \pm 0.23$  vs  $2.49 \pm 0.21$  ng / mL;  $P = 0.08$ ), pero no se observó efecto del tratamiento nutricional. Hubo una tendencia en la interacción entre el tratamiento nutricional y el día ( $P = 0.09$ ), en donde la concentración de leptina disminuyó en las ovejas subnutridas inmediatamente luego del inicio del tratamiento nutricional, mientras que se mantuvo en los animales del grupo control. También hubo una interacción entre la CCi y el día ( $P < 0.05$ ), aunque en ambos grupos subnutridos las concentraciones de leptina disminuyeron después del tratamiento, en el grupo de alta-CCi la caída fue más drástica.

También para IGF-1, las concentraciones fueron más altas en las ovejas de alta-CCi en comparación con las de baja-CCi ( $379.1 \pm 32.2$  vs  $259.5 \pm 29.2$  ng / mL;  $P < 0.01$ ). Hubo una interacción entre CCi y día ( $P < 0.05$ ): mientras que en las ovejas de alta-CCi las concentraciones de IGF-1 aumentaron alrededor del estro, este aumento no se observó en

las ovejas de baja-CCi. La concentración de IGF-1 en útero no se vió afectada por la CCI ni por el tratamiento nutricional ( $104.4 \pm 7.3$  vs  $92.1 \pm 6.7$  ng / g de tejido para las ovejas de alta-CCi y baja-CCi, respectivamente,  $P > 0.05$ ).



**Figura 2.** Concentraciones plasmáticas de insulina (panel superior), leptina (panel medio) e IGF-1 (panel inferior) en ovejas con condición corporal inicial alta (A) y baja (B) alimentadas con 0.5 (subnutridas, S) o 1.5 (control, C) veces los requerimientos de mantenimiento. Las flechas negras indican el inicio de las dietas diferenciales. Los asteriscos indican diferencias entre grupos,  $p < 0.05$ .

## **Tasa ovulatoria, calidad embrionaria y concentración de hormonas sexuales en plasma y útero**

Si bien no hubo efecto de la CCI, del tratamiento nutricional o su interacción sobre el número de CL ( $P > 0.05$ ), la proporción de animales con un sólo CL o más de un CL estuvo afectada por la CCI: hubo una mayor proporción de ovejas de alta-CCI que presentaron más de un CL que de ovejas de baja-CCI (75 vs 37.5 %,  $P < 0.05$ ).

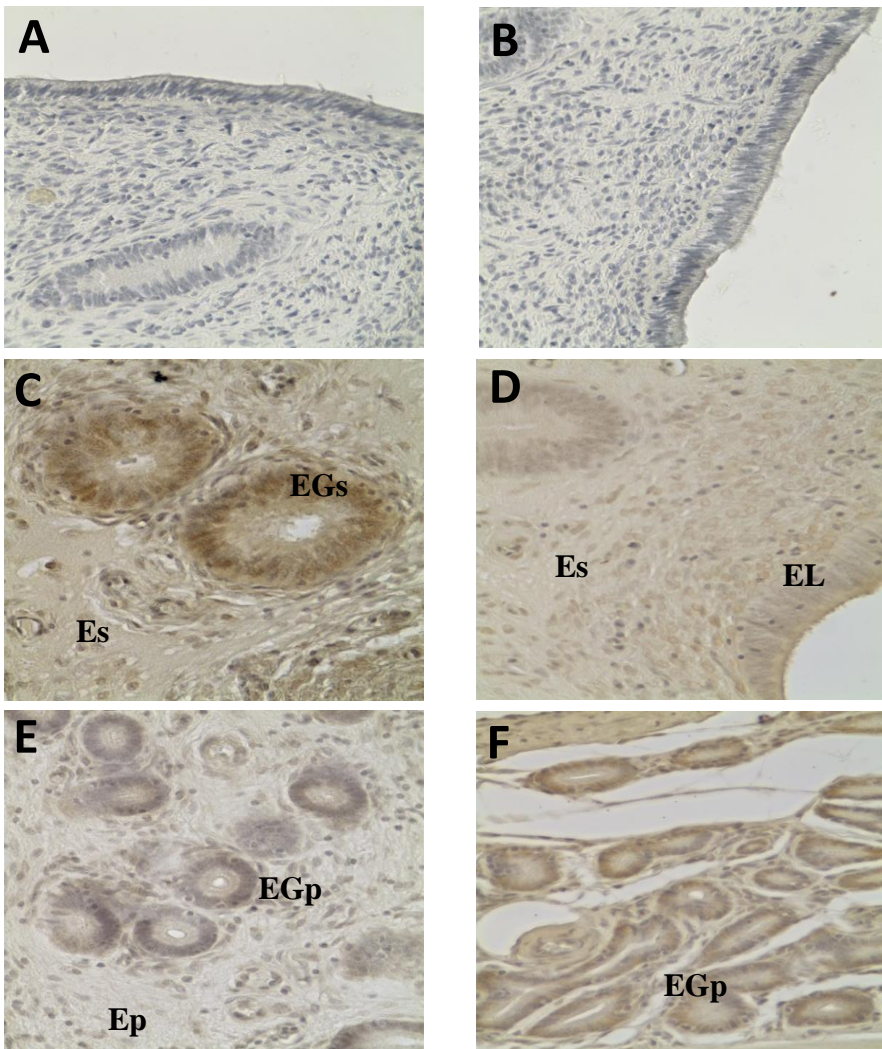
El número de embriones recuperados estuvo afectado por la CC inicial y el tratamiento nutricional ( $P < 0.05$  para ambos), pero la interacción no fue significativa. Ovejas de alta-CCI presentaron mayor número de embriones recuperados que ovejas de baja-CCI ( $1.6 \pm 0.13$  vs  $1.3 \pm 0.11$ ,  $P < 0.05$ ), y ovejas controles mayor que ovejas subnutridas ( $1.58 \pm 0.11$  vs  $1.31 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ). También, la tasa de viabilidad embrionaria tendió a ser mayor en las ovejas de alta-CCI ( $83.3 \pm 12.4$  vs  $58.3 \pm 10.8\%$ ,  $P = 0.13$ ).

Las ovejas de alta-CCI presentaron mayor concentración plasmática de P4 en comparación con las ovejas de baja-CCI el día 5 de gestación ( $3.56 \pm 0.36$  vs  $2.28 \pm 0.35$  ng / mL,  $P < 0.05$ ), mientras que no hubo efecto del tratamiento nutricional. Sin embargo, en el útero al día 5, no hubo efecto de la CCI sobre la concentración de P4 y E2, pero hubo una tendencia en las ovejas controles que presentaron mayor concentración de P4 que las ovejas subnutridas ( $21.84 \pm 2.50$  vs.  $15.44 \pm 2.57$  ng / g de tejido;  $P = 0.09$ ) y una tendencia a menor concentración de E2 ( $254.5 \pm 26.9$  vs  $318.4 \pm 27.3$  pg / g de tejido;  $P = 0.10$ ). El número de CL se correlacionó con la P4 plasmática ( $r = 0.58$ ,  $P < 0.01$ ) y con la P4 uterina ( $r = 0.40$ ,  $P < 0.05$ ).

## **Localización y abundancia de receptores de estrógenos y progesterona**

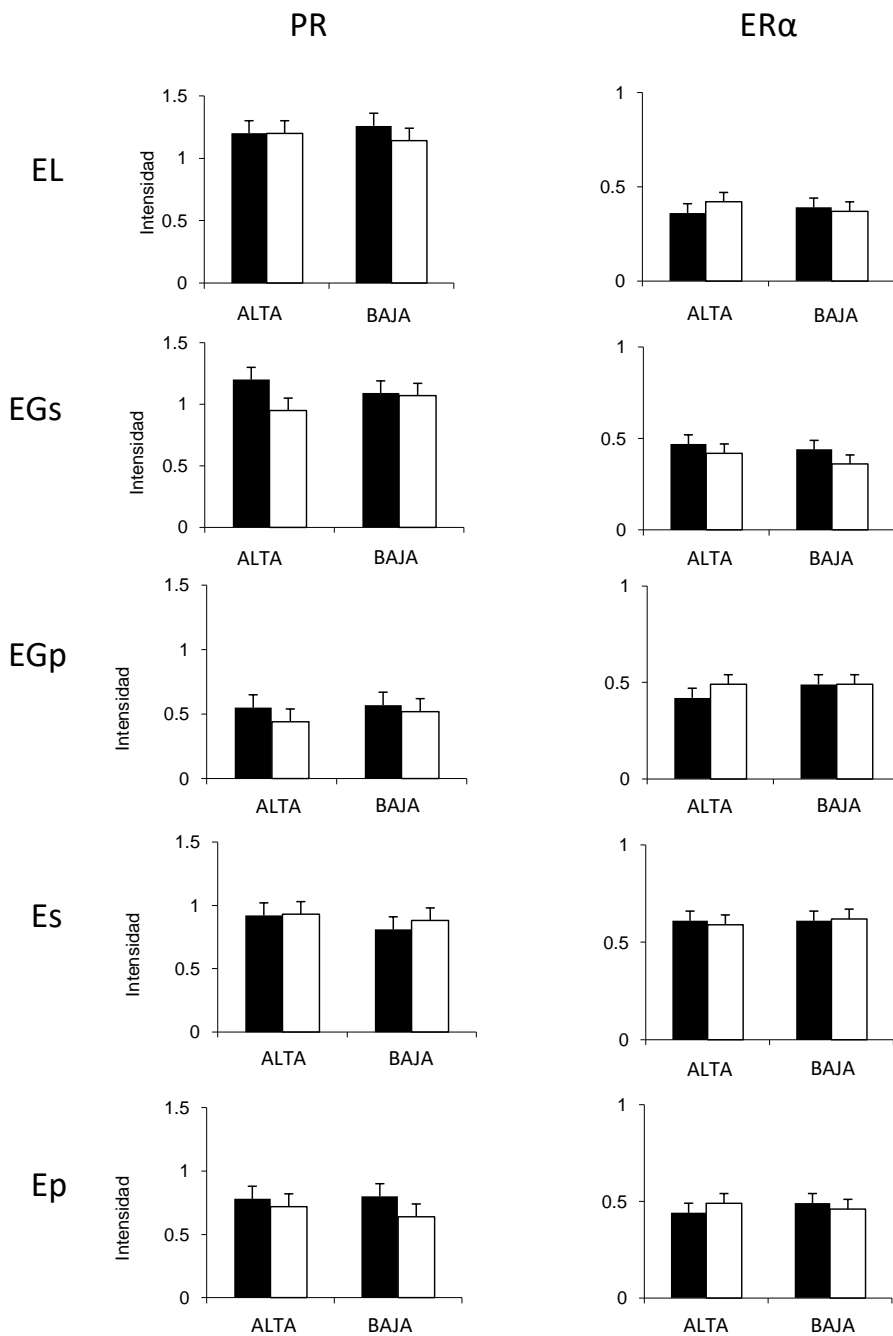
Tanto el receptor de progesterona como de estrógenos se localizaron en los núcleos de las células. Ni el área ni la intensidad de la inmunotinción para PR y ER $\alpha$  se vieron afectadas por la CCI, el tratamiento nutricional y su interacción (Figuras 3 y 4). La tinción de PR varió según el tipo celular y la ubicación (superficial o profunda): la mayor intensidad de

tinción se encontró en el EL ( $P < 0.05$ ), y se observó una disminución de la intensidad en la ubicación profunda ( $P < 0.0001$ ), siendo el EGp el compartimento endometrial que mostró la menor intensidad de tinción. El ER $\alpha$  fue afectado por el tipo celular ( $P < 0.0001$ ), siendo el Es el compartimento endometrial que presentó la mayor intensidad de tinción en comparación con EL.



**Figura 3.** Inmunomarcado de PR (C-E) y ER $\alpha$  (D-F) (Aumento: 400X). EL = epitelio luminal, EGs = epitelio glandular superficial, EGp = EG profundo, Es = estroma superficial, Ep = estroma profundo. Cuando se sustituyeron los anticuerpos específicos, la ausencia de inmunomarcado confirmó la especificidad de la tinción (A-PR y B-ER, Aumento: 400X)





**Figura 4.** Intensidad de tinción de PR y ERα en el endometrio de ovejas de alta o baja condición corporal inicial, alimentadas 0.5 (subnutridas □) o 1.5 (control ■) veces los requerimientos de mantenimiento al día 5 de gestación. EL = epitelio luminal, EGs = epitelio glandular superficial, EGp = EG profundo, Es = estroma superficial, Ep = estroma profundo.

## **Expresión génica del útero**

La expresión de la mayoría de los genes estudiados no estuvo afectada por la CCI, el tratamiento nutricional o la interacción entre estas variables (Cuadro II).

Las ovejas de baja-CCI tendieron a tener más ARNm de INSR que las ovejas de alta-iBCS ( $P = 0.07$ ). Por otro lado, el tratamiento nutricional afectó la expresión del ARNm de GHR, siendo mayor en las ovejas subnutridas que en las controles ( $1.64 \pm 0.13$  vs  $1.14 \pm 0.13$ ;  $P = 0.01$ ). A su vez, la expresión del ARNm de GHR también estuvo afectada por la interacción entre CCI y tratamiento nutricional ( $P < 0.003$ ): las ovejas subnutridas presentaron mayor expresión génica que las ovejas controles, pero esto solo se observó en las ovejas de alta-CCI. Además, este gen presentó una mayor expresión en el grupo AS que en el BS ( $P = 0.03$ ). Por otro lado, la expresión del ARNm de BP2 tendió a ser más alta en el grupo subnutrido que en el grupo control ( $1.34 \pm 0.35$  vs  $0.55 \pm 0.32$ ;  $P = 0.08$ ). La expresión del ARNm de BP5 tendió a verse afectada por la interacción entre la CCI y el tratamiento nutricional: el grupo AS tuvo mayor expresión de este gen que el grupo AC ( $P = 0.05$ ), pero no se encontraron diferencias en el grupo de baja-CCI.

**Cuadro II.** Expresión génica uterina en ovejas con alta (A) o baja (B) condición corporal inicial alimentadas con 0.5 (Subnutrido, S) o 1.5 (Control, C) veces los requerimientos de mantenimiento diario, en el día 5 de gestación.

Gen	Efectos principales (Valor P)						
	AC	AS	BC	BS	CCi	T	CCi*T
PR	0.34 ± 0.29	0.61 ± 0.27	0.91 ± 0.26	0.82 ± 0.29	.	.	.
ER $\alpha$	0.52 ± 0.41	0.80 ± 0.37	1.15 ± 0.33	0.75 ± 0.37	.	.	.
GHR	0.93 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.05 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.17 <sup>a</sup>	.	0.01	0.003
IGF-1	0.83 ± 0.29	0.72 ± 0.29	1.18 ± 0.27	1.00 ± 0.29	.	.	.
IGF-2	0.51 ± 0.27	0.68 ± 0.27	0.50 ± 0.25	0.54 ± 0.27	.	.	.
IGFBP2	0.64 ± 0.44	1.33 ± 0.44	0.45 ± 0.37	1.36 ± 0.44	.	0.08	.
IGFBP3	0.44 ± 0.24	0.58 ± 0.22	0.73 ± 0.22	0.77 ± 0.26	.	.	.
IGFBP4	0.48 ± 0.14	0.59 ± 0.14	0.79 ± 0.11	0.73 ± 0.12	.	.	.
IGFBP5	1.02 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.18	1.25 ± 0.20	.	.	0.09
INSR	0.33 ± 0.30 <sup>x</sup>	0.32 ± 0.29	1.07 ± 0.29 <sup>y</sup>	0.68 ± 0.25	0.07	.	.
LEPR-b	0.46 ± 0.34	0.58 ± 0.34	0.97 ± 0.31	0.88 ± 0.31	.	.	.
ADIPOR2	0.56 ± 0.35	0.81 ± 0.35	0.90 ± 0.32	0.62 ± 0.31	.	.	.

*PR*, receptor de progesterona; *ER $\alpha$* , receptor de estrógeno; *GHR*, receptor de la hormona del crecimiento; *IGF-1*, factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1; *IGF-2*, factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2; *IGFBP2-5*, proteínas de unión a IGF 2-5; *INSR*, receptor de insulina; *LEPR-b*, receptor de leptina de longitud completa; *ADIPOR2*, receptor de adiponectina 2.

*a vs. b*,  $P < 0.05$ . *x vs y*,  $p < 0.01$ .

## DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que vincula el efecto de la subnutrición sobre la calidad embrionaria, las hormonas metabólicas y reproductivas y el ambiente uterino en ovejas preñadas con diferentes reservas corporales al inicio del experimento. El hallazgo más interesante fue que la respuesta endocrina y la expresión génica uterina a la subnutrición fue dependiente de la CCI, siendo las ovejas de alta-CCI las que presentaron la mayor concentración de insulina, leptina, IGF-1 y P4 plasmática, el mayor número de embriones recuperados y la mayor tasa de viabilidad embrionaria. A su vez, solo las ovejas subnutridas del grupo de alta-CCI presentaron un aumento en la expresión génica uterina de GHR e IGFBP5 con respecto a sus controles, sugiriendo un mecanismo compensatorio frente a factores ambientales adversos en animales que tienen una mayor reserva corporal. Esto nos permite especular que los efectos negativos causados por una restricción alimenticia sobre la reproducción, serán menos marcados en animales que tienen una buena CCI, debido a que presentan un ambiente endocrino y uterino más favorable.

La subnutrición a mitad de los requerimientos para mantenimiento provocó una disminución de 6 kg de PV en las ovejas de alta-CCI (CCI: 2.9) y de 7.3 kg en las ovejas de baja-CCI (CCI: 2.1). Resultados similares se encontraron cuando se realizaron tratamientos de subnutrición semejantes: ovejas con mejor CC (3.4) perdieron 5 kg de PV (Sosa et al. 2009), mientras que ovejas más delgadas (CC de 2.9 y 2.8) perdieron 6.8 y 7 kg respectivamente (Sosa et al. 2004; Sosa et al. 2006). Esto podría deberse a que animales más engrasados (mayor CC y PV) presentan un mayor porcentaje de lípidos corporales (Caldeira y Portugal, 2007) obteniendo más energía por kg de PV movilizado (Williams et al. 1989) debido a la mayor concentración energética de las grasas frente a proteínas o carbohidratos (2 a 2.5 veces mayor). Por otro lado, las ovejas controles de alta-CCI mantuvieron su PV coincidiendo con trabajos previos (Sosa et al. 2004; Sosa et al. 2006). Sin embargo, las ovejas controles de baja-CCI aumentaron su PV probablemente como una respuesta compensatoria frente a la restricción alimenticia anterior.

Las ovejas de alta-CCi presentaron una mayor concentración de insulina, leptina e IGF-1, lo que refleja un mejor estado metabólico en estos animales. La concentración de insulina disminuyó inmediatamente después del inicio de la subnutrición en las ovejas de baja-CCi, mientras que el efecto de la restricción alimenticia no se observó en las ovejas de alta-CCi. Este hallazgo podría implicar una adaptación metabólica diferencial en la que las ovejas con niveles críticos de reservas energéticas responden rápidamente a la ingesta diaria, mientras que las ovejas en un mejor estado energético (reservas) tienen una mayor independencia temporal a la restricción nutricional. Los niveles más altos de IGF-1 en ovejas de alta-CCi son consistentes con los niveles más altos de insulina encontrados en estos animales como fue previamente sugerido por Mashek et al. (2001), quienes reportaron que la insulina puede tener un efecto estimulador directo sobre la producción de IGF-1. A su vez, se ha demostrado que la insulina tiene un efecto estimulador sobre la sensibilidad hepática de la GH y la consiguiente síntesis de IGF-1 (Butler et al. 2003; Rhoads et al. 2004). Además, también se puede proponer una acción recíproca entre el páncreas y el hígado, ya que se ha demostrado que existe una acción directa de IGF-1 sobre las células  $\beta$ -pancreáticas, específicamente en la activación de la glucoquinasa, paso limitante para el metabolismo de la glucosa pancreática responsable de la secreción de insulina (Yoshida et al. 2007).

El nivel de la leptina plasmática es el resultado de la reserva de adipocitos (CC), pero también se modula de una manera más rápida a través del nivel de alimentación (Delavaud et al. 2000). En el presente estudio, la leptina tendió a ser mayor en las ovejas de alta-CCi, explicado por ser el grupo que presenta mayor cantidad de grasa corporal respecto a las de baja-CCi. Por otra parte, si bien en los dos grupos subnutridos la concentración de leptina disminuyó después del inicio del tratamiento nutricional, este efecto fue más marcado en el grupo de alta-CCi. De hecho, se ha reportado que hembras vacas lecheras y de cría con mayor CC presentaron una mayor lipomobilización durante un período de balance energético negativo y, por lo tanto, la disminución de la concentración de leptina fue más marcada (Meikle et al. 2004b; Asstesiano et al. 2014).

Las reservas corporales afectaron la proporción de animales que presentaron más de un CL: se encontró una mayor proporción de ovejas de alta-CCi que presentaron más de un CL. En este sentido, se reportó una mayor tasa de ovulación y presencia de más ondas foliculares en ovejas con alta-CC (Viñoles et al. 2002). Además, las ovejas de alta-CCi presentaron mayores concentraciones de insulina e IGF-1, hormonas que potencian el crecimiento folicular y que aumentan luego de realizar una suplementación (flushing), tratamiento realizado para estimular la tasa ovulatoria (Scaramuzzi et al. 2006; Habibizad et al. 2015). El número de CL se asoció a la concentración plasmática de P4 que fue mayor en las ovejas con mayor condición corporal. En este sentido, existen estudios que reportan que el número de ovulaciones afecta significativamente los niveles de P4 en ovinos (Ashworth et al. 1989). Además, el diámetro del CL depende del tamaño del folículo preovulatorio y a su vez, la concentración de P4 depende del diámetro del CL (Pandey et al. 2018). Las mayores concentraciones plasmáticas de P4 en las ovejas de alta-CCi son consistentes con el mayor número de embriones recuperados y las mayores tasas de viabilidad embrionaria como fue reportado previamente, ya que la P4 estimula el crecimiento y desarrollo embrionario (Spencer et al. 2007). En este sentido, de Brun et al. (2016) en un experimento en el que se transfirieron embriones, reportaron que las ovejas subnutridas que mantuvieron la preñez, presentaron mayor concentración de P4 al día 7 asociado a una mayor tasa ovulatoria en comparación con ovejas subnutridas que no mantuvieron la preñez. En esta tesis, con monta natural, se puede hipotetizar que las ovejas de alta-CCi presentaron un mayor número de ondas foliculares con ovocitos más jóvenes y de mayor fertilidad, como fue sugerido anteriormente (Viñoles et al. 2010), que dieron lugar a mayor proporción de CL y concentraciones de P4, lo que favoreció la viabilidad embrionaria en este grupo.

El tratamiento nutricional no afectó el número de CL ni la concentración de P4 en plasma. Esto contrasta con estudios anteriores (Abecia et al. 2006), pero se debe tener en cuenta que el presente trabajo incluyó solo una determinación hormonal (día 5), a diferencia de los muestreos diarios realizados por otros autores donde encuentran que animales subnutridos tienen mayores concentraciones de P4 plasmática pero en la fase luteal media y tardía (Lozano et al. 1998). Curiosamente, el contenido endometrial de P4 no se vió afectado por la CCi, pero las ovejas subnutridas presentaron una concentración más baja como fue

reportado anteriormente (Lozano et al. 1998; Sosa et al. 2006). Estas concentraciones diferenciales acorde al tratamiento pueden ser explicadas debido a que ovejas subnutridas presentaron una menor capacidad de unión uterina del PR (Sosa et al. 2006), afirmando la idea de que las concentraciones periféricas de P4 son un pobre reflejo de la cantidad de P4 que hay en el útero. Dado el rol esencial que tiene la P4 en el sustento de la preñez, esto podría estar asociado con el mayor número de embriones recuperados que se encontró en las ovejas del grupo control.

Por otro lado, la concentración endometrial de E2 tendió a ser más alta en ovejas subnutridas respecto a las controles. Este resultado podría asociarse con los efectos negativos de la subnutrición sobre el desarrollo folicular como fue reportado por Sosa et al. (2010), donde se reportó que los folículos ovulatorios grandes, al momento de la retirada de las esponjas con progestágenos, persistieron estáticos si bien la mayoría alcanzó la ovulación. Es probable que el tiempo de crecimiento prolongado de estos folículos haya alterado la forma de secreción de E2 circulante – más tardía - que no se pudo comprobar en la presente tesis por no tener las determinaciones de E2 en plasma. Este mecanismo podría explicar la mayor concentración de E2 – y menor de P4 – encontrada en útero de ovejas subnutridas. Por lo expuesto anteriormente, se podría proponer un desfase en los tiempos uterinos, siendo más retrasado en las ovejas subnutridas, lo que es consistente con el menor número de embriones recuperados.

La intensidad de tinción para PR y ER $\alpha$  en el útero al día 5 de la preñez no estuvo afectada por la CCI ni por el tratamiento nutricional, y esto coincide con la ausencia de efectos encontrados en la expresión génica del ARNm del PR y ER $\alpha$  en este estudio. En este sentido, Sosa et al. (2006) reportaron que, en general, los análisis inmunohistoquímicos no revelaron diferencias en ER $\alpha$  o PR debidas al tratamiento nutricional, pero observaron una menor inmunorreactividad de ER $\alpha$  en el epitelio luminal y glandular superficial de las ovejas cíclica subnutridas en los días 5 y 14 del ciclo. Por otro lado, también en animales cíclicos, Sosa et al. (2004) reportaron una disminución en la inmunotinción de PR en la mayoría de los tipos celulares del útero en ovejas subnutridas el día 5 luego del celo y ningún cambio en ER $\alpha$ . Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que investiga

el efecto de la subnutrición sobre la expresión de estas proteínas en el útero en animales preñados en el día 5 de gestación, momento en el que el embrión llega al útero y es dependiente en gran medida de los fluidos maternos (Ashworth, 1995). La tendencia a una menor concentración de P4 en el útero de las ovejas subnutridas no podría explicarse por una menor retención por parte los receptores específicos (Katzenellenbogen, 1980), ya que el contenido de PR fue similar entre grupos. Ise et al. (2010) reportaron que sus anticuerpos reconocían solo la región que está expuesta en el receptor de la hormona de crecimiento epidérmico cuando el receptor está activado. Por otro lado, Sosa et al. (2006) reportaron una menor capacidad de unión uterina del PR en las ovejas subnutridas en el día 5 del ciclo estral, a pesar de la ausencia de efectos encontrados sobre el ARNm y la inmunotinción de PR. Por lo tanto, es posible que la menor concentración uterina de P4 encontrada en ovejas subnutridas se deba a un menor contenido de PR activado y/o a una menor capacidad de unión -no detectado por nuestro método de inmunohistoquímica-, lo que conllevaría a una funcionalidad uterina alterada, y por consiguiente, un menor número de embriones recuperados.

Sorprendentemente, la CCI y la subnutrición afectaron a pocos genes uterinos. Las ovejas de baja-CCI tendieron a tener más ARNm de INSR, y estos resultados son consistentes con el mecanismo compensatorio hormona/receptor descrito (Meikle, 2001), es decir, bajas concentraciones hormonales y alta concentración de receptores. De hecho, las ovejas de baja-CCI tuvieron una concentración plasmática de insulina más baja y una expresión génica uterina de INSR más alta que las ovejas de alta-CCI.

La tendencia a una mayor expresión de ARNm de IGFBP2 en el útero de las ovejas subnutridas es consistente con el aumento de la expresión génica en el hígado que provoca la subnutrición y/o el ayuno (Thissen et al. 1994; de Brun et al. 2014). Los mayores niveles de ARNm de IGFBP2 podrían estar relacionados con el menor número de embriones recuperados en las ovejas subnutridas, ya que se ha sugerido que la mayor expresión de ARNm de IGFBP2 podría alterar la interacción con IGF-2, lo que perjudica el desarrollo temprano del embrión (Han et al. 1996).

La mayor expresión del ARNm de GHR encontrada en ovejas subnutridas está asociada con la mayor concentración uterina de E2 en estos animales. De hecho, en vacas, el ARNm



de GHR uterino aumenta alrededor del estro (Sosa et al. 2010). Además, la mayor expresión del ARNm de GHR uterino encontrado en las ovejas del grupo subnutrido coincide con la menor concentración uterina de P4 encontrada en este grupo, ya que se ha reportado que el tratamiento con progesterona reduce la expresión uterina del ARNm de GHR en el útero de ratón (Sharara et al. 1994). Un hallazgo interesante fue que la respuesta uterina a la subnutrición fue dependiente de la CCI: solamente en las ovejas de alta-CCI, el grupo subnutrido presentó una mayor expresión de ARNm de GHR que el grupo control, sugiriendo que las ovejas con mayores reservas energéticas son capaces de modular a nivel periférico (útero) la sensibilidad hormonal en situaciones de restricción de energía.

Encontramos un perfil de respuesta similar para IGFBP5: una mayor expresión génica en útero de ovejas subnutridas únicamente en las de mayor estado corporal. Esta es la primera vez que se mide la expresión génica de IGFBP5 en el útero de ovejas subnutridas y gestadas. Se ha reportado que IGFBP5 puede contribuir a potenciar las acciones de IGF (Bach, 2018). Los datos son consistentes con la mayor expresión uterina de IGFBP5 en ovejas Suffolk en comparación con ovejas Cheviot, que a su vez tenían un mayor tamaño de embrión (Sequeira et al. 2015). Por otro lado, existen trabajos que vinculan al sistema IGF con el estradiol en el endometrio y miometrio, y reportan que IGFBP5 se vio regulado positivamente durante la administración de estrógenos en ratas ovariectomizadas (Andrade et al. 2002), y en primates (Adesanya et al. 1996). Por lo tanto, podemos especular que la mayor concentración de E2 uterinos encontrada en ovejas subnutridas, logró estimular la expresión de IGFBP5 en los animales subnutridos, pero sólo en el grupo de alta-CCI. Es posible que dado el efecto potenciador de IGFBP5 sobre las acciones de IGFs, los efectos deletéreos de la subnutrición en animales de mejores reservas corporales fueran menos marcados, evidenciado por el mayor número de embriones recuperados y la mayor tasa de viabilidad embrionaria.

A su vez, dado que en este trabajo se encontró mayor expresión de GHR e IGFBP5 en el mismo grupo de animales (ovejas cíclicas de alta-CCI), podríamos sugerir la existencia de una regulación vinculante entre estos dos genes. Por un lado, las ovejas subnutridas presentaron mayores concentraciones de E2 en útero y como se mencionó anteriormente esta hormona estimula la expresión de estos genes. Por otro lado, las ovejas de alta CCI

presentaron mayores concentraciones de IGF-1 circulante, y la disponibilidad de IGF-1 regula la expresión de IGFBP5; de hecho trabajos previos han utilizado la expresión de este gen como indicador de la señalización de IGF-1 *in vivo* (Bach et al. 1991; Adamo et al. 2006). Finalmente, Sloomweg et al. (1996) reportaron que IGFBP5 estimula los niveles de ARNm de GHR y la unión de GH en células de osteosarcoma de ratas. Por lo tanto, la mayor expresión génica uterina de GHR e IGFBP5 en animales subnutridos de alta-CCi sugiere una sumatoria de los efectos estimulatorios de IGF-1 y E2 sobre la expresión de estos genes, logrando contrarrestar los efectos negativos de la subnutrición.

La interacción encontrada entre el tratamiento y la condición corporal para la expresión uterina de GHR e IGFBP5 es relevante. La mayor expresión génica uterina de GHR e IGFBP5 encontrada en ovejas subnutridas de alta-CCi, pero no en el grupo de baja-CCi, es coherente con la mayor tasa de viabilidad embrionaria encontrada sólo en el grupo de alta-CCi. Por lo tanto, es tentador especular que en un estado metabólico más favorable (es decir, alta-CCi), GHR e IGFBP5 podrían promover un mecanismo de compensación contra los efectos tisulares negativos provocados por la subnutrición, que no se logra en un medio metabólico deficiente (es decir, baja-CCi).

## CONCLUSIONES

- Las ovejas de alta condición corporal presentaron mayor concentración plasmática de hormonas metabólicas (insulina, leptina e IGF-1) y progesterona consistente con un mayor número de embriones recuperados y viabilidad embrionaria que ovejas de baja condición corporal.
- La subnutrición a la mitad de los requerimientos de mantenimiento disminuyó la concentración de progesterona y aumentó la concentración de estradiol en el útero, lo que explica parcialmente la expresión génica diferencial encontrada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Lozano JM. (1993). Effect of plane of protein after weaning on resumption of reproductive activity in Rasa Aragonesa ewes lambing in late spring. *Theriogenology* 39(2): 463-473.
2. Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, McMillen SR. (1995). Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Animal Sci* 61: 57-62.
3. Abecia JA, Rhind SM, Goddard PJ, Mcmillen SR, Ahmadi S, Elston DA. (1996). Jugular and ovarian venous profiles of progesterone and associated endometrial progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant ewes. *Animal Sci* 63: 229-234.
4. Abecia JA, Lozano JM, Forcada F, Zarazaga L. (1997). Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim Reprod Sci* 48: 209-18.
5. Abecia JA, Forcada F, Lozano JM. (1999). A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F<sub>2</sub> alpha production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. *Theriogenology* 52: 1203-13.
6. Abecia JA, Sosa C, Forcada F, Meikle A. (2006). The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 46: 367-78.
7. Abecia JA, Forcada F, Palacín I, Sanchez-Prieto L, Sosa C, Fernández-Foren A, Meikle A. (2013). Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Zygote* 9: 1-9.
8. Adamo ML, Ma X, Ackert-Bicknell CL, Donahue LR, Beamer WG, Rosen CJ. (2006). Genetic increase in serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) in C3H/HeJ compared with C57BL/6J mice is associated with increased transcription from the IGF-I exon 2 promoter. *Endocrinology* 147:2944–2955.

9. Adesanya OO, Zhou J, Bondy CA. (1996). Cellular localization and sex steroid regulation of insulin-like growth factor binding protein messenger ribonucleic acids in the primate myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 81(7):2495-501.
10. Adrien ML, Mattiauda DA, Artegoitia V, Carriquiry M, Motta G, Bentancur O, Meikle A. (2012). Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal* 6(2): 292-299.
11. Agricultural and Food Research Council (AFRC). (1993). Energy and protein requirements of ruminants. An advisor manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. Wallingford, UK, CAB International,159p.
12. Andrade PM, Silva IDCG, Borra RC, de Lima GR, Baracat EC. (2002). Estrogen Regulation of Uterine Genes In Vivo Detected by Complementary DNA Array. *Horm Metab Res* 34: 238–244.
13. Ashworth CJ, Sales DI, Wilmut I. (1989). Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J Reprod Fert* 87: 23-32.
14. Ashworth, C.J. (1995). Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livest Prod Sci* 44: 99-105.
15. Astessiano AL, Pérez-Clariget R, Quintans G, Soca P, Meikle A, Crooker BA, Carriquiry M. (2014). Metabolic and endocrine profiles and hepatic gene expression in periparturient, grazing primiparous beef cows with different body reserves. *Livest Sci* 170: 63-71.
16. Astessiano AL, Carriquiry M, Mattiauda DA, Adrien ML, Chilibroste P, Meikle A. (2017). Endometrial gene expression in primiparous dairy cows at the end of the voluntary waiting period is affected by nutrition: Total mixed ration vs increasing levels of herbage allowance. *Reprod Domest Anim* 00:1–8.
17. Bach MA, Shen-Orr Z, Lowe WL, Roberts CT, LeRoith D. (1991). Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Mol Brain Res* 10:43–48.
18. Bach LA. (2018). IGF-binding proteins. *J Mol Endocrinol* 61: T11-T28.

19. Bell AW. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Animal Sci* 73(9): 2804-2819.
20. Bell AW, Bauman DE. (1997). Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2(3): 265-278.
21. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7: 947-953.
22. Blache D, Zhang S, Martin GB. (2006). Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev* 46(4): 379-390.
23. Blanc F, Bocquier F, Agabriel J, D'Hour P, Chilliard Y. (2006). Adaptive abilities of the females and sustainability of ruminant livestock systems. A review. *Anim Res* 55: 489-510.
24. Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ. (1997). Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fert* 52: 285-300.
25. Burke CR, Roche JR. (2007). Effects of pasture feeding during the periparturient period on postpartum anovulation in grazed dairy cows. *J Dairy Sci* 90(9): 4304-4312.
26. Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR. (2003). Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol* 176(2): 205-217.
27. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. (2002). Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 62(4): 489-495.
28. Caldeira RM, Portugal AV. (2007). Relationships of body composition and fat partition with body condition score in Serra da Estrela ewes. *Asian-Australas J Anim Sci* 20(7): 1108-1114.
29. Caldeira RM, Belo AT, Santos CC, Vazques MI, Portugal AV. (2007). The effect of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin Res* 68: 242-255.

30. Chappaz E, Albornoz MS, Campos D, Chea L, Palin MF, Murphy BD, Bordignon V. (2008). Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domest Anim Endocrinol* 35: 198–207.
31. Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M. (1998). Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev* 38(2): 131-152.
32. Chilliard Y, Ferlay A, Faulconnier Y, Bonnet M, Rouel J, Bocquier F. (2000). Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc Nutr Soc* 59(1): 127-134.
33. Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F. (2001). Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol* 21(4): 271-295.
34. Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M. (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 29(1): 3-22.
35. Clark JH, Mani SK. (1994). Actions of ovarian steroid hormones. In 'The Physiology of Reproduction'. (Eds Knobil, E. y Neill, J.D.) pp. 1011-1046. (Raven Press: New York).
36. Clarke IJ, Henry BA. (1999). Leptin and reproduction. *Reprod* 4(1):48-55.
37. Clemmons DR. (2016). Role of IGF Binding Proteins in Regulating Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 27 (6): 375-391.
38. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lyndon JP, Mayo FD. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol* 179: 97-103.
39. de Brun V, Abecia JA, Fernandez-Foren A, Carriquiry M, Forcada F, Vazquez MI, Meikle A, Sosa C. (2013). Undernutrition and laterality of the corpus luteum affects gene expression in oviduct and uterus of pregnant ewes. *Span J Agric Res* 11(4):989-996.

40. de Brun V. (2014). Efecto de la subnutrición materna sobre la gestación temprana en ovinos: énfasis endócrino-metabólico. Tesis de Maestría, PEDECIBA Biología, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
41. de Brun V, Meikle A, Fernández-Foren A, Forcada F, Palacín I, Menchaca A, Sosa C, Abecia JA. (2016). Failure to establish and maintain a pregnancy in undernourished recipient ewes is associated with a poor endocrine milieu in the early luteal phase. *Anim Reprod Sci* 173:80-6.
42. Delavaud C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G. (2000). Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol* 165(2): 519-526.
43. Dupont J, Scaramuzzi RJ, Reverchon M. (2014). The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal* 28: 1–14.
44. Etherton TD. (2004). Somatotropic function: the somatomedin hypothesis revisited. *J Anim Sci* 82: 239-244.
45. Flint DJ, Binart N, Kopchick J, Kelly P. (2003). Effects of growth hormone and prolactin on adipose tissue development and function. *Pituitary* 6(2): 97-102.
46. Friggens NC, Ridder C, Løvendahl P. (2007). On the Use of Milk Composition Measures to Predict the Energy Balance of Dairy Cows. *J Dairy Sci* 90: 5453–5467.
47. Geisert RD, Morgan GL, Short EC, Jr, Zavy MT. (1992). Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev* 4: 301-5.
48. González RR, 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. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4883-8.
49. Habibizad J, Riasi A, Kohram H, Rahmani HR. (2015). Effect of long-term or short-term supplementation of high energy or high energy-protein diets on ovarian follicles and blood metabolites and hormones in ewes. *Small Rumin Res* 132:37–43.

50. Han VKM, Bassett N, Walton J, Challis JRG. (1996). The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes—evidence for IGF-IGFBP interactions at the fetomaternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2680–2693.
51. Hapangama DK, Kamal AM, Bulmer JN. (2015). Estrogen receptor  $\beta$ : the guardian of the endometrium. *Hum Reprod Update* 21(2): 174–193.
52. Ise N, Omi K, Miwa K, Honda H, Higashiyama S, Goishi K. (2010). Novel monoclonal antibodies recognizing the active conformation of epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 685–690.
53. Ingvarstsen KL, Andersen JB. (2000). Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci* 83(7): 1573-1597.
54. Jones JJ, Clemmons DR. (1995). Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. *Endocr Rev* 16: 3-34.
55. Kasimanickam RK, Kasimanickam VR. (2011). Effect of tocopherol supplementation on serum 8-epi-prostaglandin F2 alpha and adiponectin concentrations, and mRNA expression of PPAR $\gamma$  and related genes in ovine placenta and uterus. *Theriogenology* 76(3):482-91.
56. Katzenellenbogen. (1980). Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol* 42:17-35.
57. Kobayashi Y, Boyd CK, Bracken CJ, Lamberson WR, Keisler DH, Lucy MC. (1999). Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 140(9): 3947-3954.
58. Leese HJ. (2005). Rewards and risks of human embryo creation: a personal view. *Reprod Fertil Dev* 17: 387-91.
59. Lozano JM, Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Alfaro B. (1998). Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology* 49: 539-546.



60. Martin GB, Milton JT, Davidson RH, Banchemo Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 82-83: 231-245.
61. Mashek DG, Ingvarsten KL, Andersen JB, Vestergaard M, Larsen T. (2001). Effects of a four-day hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. *Domestic Animal Endocrinology* 21(3): 169-185.
62. Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Sahlin L. (2000). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nutr Dev* 40: 587-96.
63. Meikle A. (2001). Reproductive endocrinology of prepubertal and anestrus ewes. Regulation of uterine sex steroid receptors by ovarian hormones and effects of estradiol on gonadotropin secretion and follicular growth. Tesis Doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
64. Meikle A, Tasende C, Sosa C, Garofalo EG. (2004a). The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* 16: 385-94.
65. Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilibruste P. (2004b). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*. 127: 727-737.
66. Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien L, Rupprechter G, Rovere G, Peñagaricano F, Mendoza A, Pereira I, Mattiauda D, Chilibruste P. (2010). Endocrinología metabólica en la vaca lechera durante el período de transición y su relación con el reinicio de la ciclicidad ovárica. *Agrociencia* 14(3): 89-95.
67. Meikle A, de Brun V, Carriquiry M, Soca P, Sosa C, Adrien ML, Chilibruste P, Abecia JA. (2018). Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. *Anim Reprod* 15, (Suppl.1):899-911.
68. Mendivil CO, Sierra ID. (2005). Acción insulínica y resistencia a la insulina: aspectos moleculares. *Revista Facultad Medicina, Universidad Nacional Colombia*, 53 (4):235-243.

69. Miller BG, Murphy L, Stone GM. (1977). Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *J Endocrinol* 73: 91-98.
70. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 77(3): 433-444.
71. O'Callaghan D, Boland MP. (1999). Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Sci* 68: 299-314.
72. Pandey AK, Ghuman SPS, Dhaliwal GS, Honparkhe M, Phogat JB, Kumar S. (2018). Effects of preovulatory follicle size on estradiol concentrations, corpus luteum diameter, progesterone concentrations and subsequent pregnancy rate in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 107:57-62.
73. Pedron O, Cheli F, Senatore E, Baroli D, Rizzi R. (1993). Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J Dairy Sci* 76(9): 2528-2535.
74. Pflaffl MW. (2009). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
75. Pinotti L, Rosi F. (2006). Leptin in bovine colostrums and milk. *Horm Metab Res* 38(2): 89-93.
76. Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. (2002). Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 23(1-2):351-360.
77. Reynolds TS, Stevenson KR, Wathes DC. (1997). Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system during early placental development in the ewe. *Endocrinology* 138: 886-897.
78. Rhoads RP, Kim JW, Leury BJ, Baumgard LH, Segole N, Frank SJ, Bauman DE, Boisclair YR. (2004). Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J Nutr* 134: 1020-1027.
79. Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agr Sci* 72: 451-454.

80. Rutledge RG, Cote C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31:e93.
81. Saremi B, Winand S, Friedrichs P, Kinoshita A, Rehage J, Danicke S, Haussler S, Breves G, Mielenz M, Sauerwein H. (2014). Longitudinal profiling of the tissue-specific expression of genes related with insulin sensitivity in dairy cows during lactation focusing on different fat depots. *PLoS One* 9, e86211.
82. Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Munoz-Gutierrez M, Somchit A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* 46: 339-354.
83. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270 (45):26746-9.
84. Sequeira M, Pain SJ, de Brun V, Meikle A, Kenyon PR, Blair HT. (2015). 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.
85. Sharara FI, Bhartiya D, Nieman LK. (1994). Growth hormone receptor gene expression in the mouse uterus: modulation by gonadal steroids. *J Soc Gynecol Investig* 1 (4): 285-9.
86. Sloomweg MC, Ohlsson C, van Elk EJ, Netelenbos JC, Andress DL. (1996). Growth hormone receptor activity is stimulated by insulin-like growth factor binding protein 5 in rat osteosarcoma cells. *Growth Regul* 6(4):238-46.
87. Soca P, Carriquiry M, Claramunt M, Ruprecht G, Meikle A. (2013). Metabolic and endocrine profiles of primiparous beef cows grazing native grassland. 2. Effects of body condition score at calving, type of suckling restriction and flushing on plasmatic and productive parameters. *Anim Prod Sci* 54(7):862-868.
88. Sosa C, Lozano JM, Vinales C, Acuna S, Abecia JA, Forcada F, Forsberg M, Meikle A. (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim Reprod Sci* 84(3-4): 337-348.

89. Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Vinales C, Tasende C, Valares JA, Palacin I, Martin GB, Meikle A. (2006). Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 18(4): 447-458.
90. Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Meikle A. (2008). Undernutrition reduces the oviductal mRNA expression of progesterone and oestrogen receptors in sheep. *J Vet Med Sci* 175 (3): 413 – 415.
91. Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Forcada F, Martin GB, Palacin I, Meikle A. (2009). Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 36(1): 13-23.
92. Sosa C, Gonzalez-Bulnes A, Abecia JA, Forcada F, Meikle A. (2010). Short-term undernutrition affects final development of ovulatory follicles in sheep synchronized for ovulation. *Reprod Domest Anim* 45(6):1033-8.
93. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev* 19:65-78.
94. Stevenson KR, Gilmour RS, Wathes DC. (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.
95. Stevenson KR, Wathes DC. (1996). Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. *J Reprod Fert* 108(1): 31-40.
96. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, ob-r. *Cell* 83: 1263-1271.
97. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15(1): 80-101.
98. Tsai MJ, O'malley BW. (1994). Molecular mechanisms of actions of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63: 451-486.
99. Vinales C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. (2002). Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Animal Sci* 74: 539-545.

100. Viñoles C, Banchemo G, Quintans G, Pérez-Clariget R, Soca P, Ungerfeld R, Bielli A, Fernández Abella D, Formoso D, Pereira Machín M, Meikle A. (2009). Estado actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia, Verde y Ética en Uruguay. *Agrociencia* 13(3):59–79.
101. Viñoles C, Paganoni B, Glover KMM, Milton JTB, Blache D, Blackberry MA, Martin GB. (2010). The use of a ‘first-wave’ model to study the effect of nutrition on ovarian follicular dynamics and ovulation rate in the sheep. *Reproduction* 140: 865–874.
102. Wathes DC, Reynolds TS, Robinson RS, Stevenson KR. (1998). Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Dairy Sci* 81: 1778-89.
103. Williams CB, Oltenacu PA, Sniffen CJ. (1989). Refinements in determining the energy value of body tissue reserves and tissue gains from growth. *J Dairy Sci* 72(1): 264-269.
104. Winterberger-Torres S, Sevellec C. (1987). Atlas of the early development of the sheep embryo. INRA, Paris, France.
105. Whitaker D, Goodger W, Garcia M, Perera B, Wittwer F. (1999). Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on small holder dairy farms. *Prev Vet Med* 38(2-3):119-131.
106. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769.
107. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13(3):332-9.
108. Ye Y, Pu D, Liu J, Li F, Cui Y, Wu J. (2013). Adiponectin gene polymorphisms may not be associated with idiopathic premature ovarian failure. *Gene* 15: 518(2):262-6.

109. Yoshida K, Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Li J, Ahmed RA, Kitanaka N, Wong NC, Unterman TG, Magnuson MA, Ishida T. (2007). Pancreatic glucokinase is activated by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 148(6): 2904-2913.

## ANEXO I

### **Dietary restriction in sheep: uterine functionality in ewes with different body reserves during early gestation**

**A. Fernández-Foren<sup>a,\*</sup>, C. Sosa<sup>b</sup>, J.A. Abecia<sup>b</sup>, M.I. Vázquez<sup>c</sup>, F. Forcada<sup>b</sup>, A. Meikle<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR, C/ Lasplaces 1550, Montevideo 11600, Uruguay

<sup>b</sup> Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, Spain

<sup>c</sup> Reproducción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC, Ruta Nac. 36, km 601, Río Cuarto 5800, Argentina

\* Author for correspondence: Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay, Lasplaces 1550, CP11600 Montevideo; andisff@gmail.com; +598 2 622 31 06.

## **Abstract**

The aim of this study was to characterize insulin, leptin and IGF-1 profiles after undernutrition in pregnant ewes with different initial body condition (iBCS) and to investigate embryo quality, uterine gene expression and presence and location of proteins during early gestation. Thirty-six Rasa Aragonesa ewes were divided into 2 groups with different BCS: BCS > 2.75 (high, H, n=19) and BCS < 2.25 (low, L, n=17) and they were randomly assigned to two nutritional treatments: 1.5 (control, C) or 0.5 (undernourishment, U) times the daily maintenance requirements establishing four groups: high-iBCS control (HC, n=9), high-iBCS undernourished (HU, n=10), low-iBCS control (LC, n=9) and low-iBCS undernourished (LU, n=8). High-iBCS ewes presented higher concentration of insulin, leptin and IGF-1, reflecting a better metabolic status in these animals. There was a greater proportion of high-iBCS ewes presenting more than one CL ( $P < 0.05$ ), and associated greater P4 plasma concentration, number of recovered embryo and higher embryo viability rate. In uterus, undernourished ewes presented lower P4 ( $P = 0.09$ ) and higher E2 concentration ( $P = 0.10$ ). Immunostaining of uterine progesterone and estrogen receptors (PR and ER $\alpha$ ) was not affected by iBCS and nutritional treatment. Ewes with low-iBCS tended to have more INSR mRNA, and undernourished ewes tended to have more IGFBP2 mRNA expression ( $P \leq 0.08$ ). An interesting finding was that the uterine response to undernutrition was dependent on iBCS: a higher expression of GHR ( $P < 0.05$ ) and IGFBP5 ( $P = 0.09$ ) mRNA was found in undernourished than control ewes only in high-iBCS group. In summary, the present study demonstrates that the endocrine response and the uterine gene expression to undernutrition depend on the initial body energy reserves (iBCS) and is associated with a differential embryo quality.

### **Keywords:**

Undernutrition

Uterus

Gene expression

Embryo quality

Sheep



## 1. Introduction

Changes in metabolic status are an important regulator of the reproductive activity, acting at different levels in the reproductive axis. Although the energy requirements for follicular growth, ovulation, and early pregnancy are very low compared to the requirements for maintenance, inadequate nutrition can have deleterious effects on reproduction [1]. It has been previously shown in ewes [2] that a diet that provides half of the daily nutritional maintenance requirements impairs optimum reproductive performance through retarded embryo development or inadequate uterine environment. Moreover, an altered maternal environment may not affect the embryo immediately, but compromises its development in later stages [3].

Steroid hormones are essential for modulating the physiology of the uterus [4]. Any change in the ability of the uterus to respond to steroid hormones could result in an abnormally prepared or altered uterine environment to support the development of an embryo. Sosa et al. [5,6,7] reported that undernourished cyclic ewes have a reduced sensitivity to steroids on day 5 of the sexual cycle: lower endometrial content of progesterone and/or estrogen receptors (PR and ER $\alpha$ ), lower binding capacity of endometrial PR and ER, and lower expression of PR and ER $\alpha$  mRNA in the uterine horns ipsilateral to the corpus luteum (CL). This lesser sensitivity to steroids could result in inadequate support for the needs of a growing embryo and could explain the increase in embryo mortality associated with undernutrition [8]. Since no differences were found in the expression or immunostaining of PR and ER $\alpha$  on days 10 or 14 of the estrous cycle, the authors suggested that an altered uterine functionality during the early luteal phase (day 5) could be the cause of the delay in embryo development and consequent losses during early pregnancy.

On the other hand, several metabolic hormones that maintain homeostasis have been postulated as possible mediators between the energy status, the reproductive system and the embryo. Moreover, candidates such as insulin, IGFs, and leptin have been proposed to mediate the nutritional changes on the uterine function [9]. Indeed, in ruminants, the female reproductive tract and the embryo have receptors for these hormones [10, 11], and some of these hormones are produced by the uterine tissue itself, such as IGF-1 and IGF-2 [12]. Both IGFs have been reported to promote embryo development [13] and de Brun et al. [14]

reported that undernourished ewes have a lower gene expression of IGF-1 in uterus and IGF-2 in the oviducts at day 5 of pregnancy, which could also compromise embryo survival.

Metabolic responses to changes in metabolic status may depend on recent (feeding level, dynamic effect) or previous (body reserves, static effect) metabolic history, a concept known as "metabolic memory" [15, 16]. In two identical experiments [6, 17] in which adult ewes were subjected to the same period and severity of undernutrition, the endocrine-metabolic responses to the restriction were different. Although the percentages of loss of BW and BCS were similar, the initial BW and BCS varied by 10% between experiments; thus, it was suggested that this difference was determinant in the dissimilar endocrine responses. Nevertheless, this was an unexpected outcome and the experiments had not been designed with this purpose.

Therefore, the hypothesis of the present study was that the initial body energy reserves (iBCS, static effect) determines the endocrine response to undernutrition, and that it is also reflected in a differential embryo quality and uterine functionality. Thus, our aim was to characterize insulin, IGF-I and leptin profiles after undernutrition in pregnant ewes with different iBCS and to investigate embryo quality and uterine gene and protein expression, during early gestation.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals and treatments*

This experiment was carried out in the experimental farm of the University of Zaragoza, Spain, under the supervision of the Ethics Committee of the University of Zaragoza. The animals were cared for and used in accordance with the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 2010/63 related to the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

During the breeding season (December-March), 36 Rasa Aragonesa ewes were divided into 2 groups with different BCS (initial BCS, iBCS) (BCS, scale from 0 to 5, [18]): iBCS > 2.75 (n = 19, high, H) and iBCS < 2.25 (n = 17, low, L). For 20 days, both groups received a

diet that covered energy and protein maintenance requirements in order to maintain body condition [19]. After this period, ewes from each group were randomly assigned to two nutritional treatments: 1.5 (control, C) or 0.5 (undernourishment, U) times the daily maintenance requirements until the end of the experiment, according to our previous studies [20, 21, 22, 6]. Therefore, the 4 experimental groups were: high-iBCS control (HC), high-iBCS undernourished (HU), low-iBCS control (LC), and low-iBCS undernourished (LU). At the onset of differential diets, all ewes were synchronized with intravaginal sponges impregnated with progestagen (fluorogestone acetate, 40 mg, Sincropart, Ceva Animal Health, Barcelona, Spain) for 14 days. At sponge removal ewes were injected i.m. 300 UI of equine chorionic gonadotropin (Sincropart PMSG, Ceva Animal Health, Barcelona, Spain), estrus (Day 0) was detected every 8 hours from 24 hours after sponge removal, and ewes were mated by 10 rams of the same breed of proven fertility. On day 5 after estrus, animals were euthanized and the uterine horns were flushed with phosphate buffered saline (PBS); pregnancy was defined by the presence of an embryo. Only pregnant ewes were used for this experiment. Embryos were examined and classified [23]. Morulae and compacted morulae were considered viable embryos, according to the expected for day 5 of pregnancy [23]. Viability embryo rate was defined as number of viable embryo/ number of recovered embryo. The final experimental groups were: HC (n = 6), HU (n = 7), LC (n = 9) and LU (n = 7). The BW was determined on days -35, -21, -15 (insertion of sponges and start of differential diets), -1 (removal of sponges) and 5 (sacrifice), with respect to estrus. Blood samples were extracted every 3 days in heparinized tubes from the jugular vein of fasting animals, from the day before the beginning of the differential diets (day -16) until the end of the experiment. Plasma was separated by centrifugation at 1000g for 10 minutes and stored at -20 °C until the subsequent determination of hormones.

## *2.2. Plasma hormones*

Hormonal determinations were made in the Laboratory of Animal Endocrinology and Metabolism, Faculty of Veterinary, Montevideo, Uruguay. Insulin concentrations were determined by a solid-phase radioimmunoassay (RIA) (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA). The minimum detectable concentration of the assay was 2.2  $\mu$ IU/mL. The intra-assay CVs for low (2.2  $\mu$ UI/mL) and medium (12.6  $\mu$ UI/mL) controls were 8.2

and 9.4%, respectively. IGF-1 was determined using an immuno-radiometric assay (IGF1-RIACT, CisBio International, GIFSR-YVETTE CEDEX, France), as previously reported by Adrien et al. [24]. The sensitivity of the assay was 0.7 ng/mL. The intra-assay CV for control 1 (44 ng/mL) and control 2 (521 ng/mL) were 8.2 and 7.9%. Leptin concentrations were determined by liquid-phase RIA using the Multi-Species Leptin kit (Millipore, Chicago, USA), previously reported in cattle [25]. The sensitivity was 1.8 ng/mL. The intra-assay CVs for control 1 (5.3 ng/mL) and control 2 (18.3 ng/mL) were 5.6 and 5.1%, respectively. Progesterone concentrations were determined by a direct solid-phase RIA (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA). The RIA had a sensitivity of 0.02 ng/mL. The intra-assay coefficients of variation for low (2 ng/mL), and high (10 ng/mL) controls were 12.5 % and 5.7 % respectively.

### *2.3. Endometrial hormone concentration*

For hormone determination uterine samples were processed following the technique of Abecia et al. [26]. Uterine sections (around 500 mg) were homogenized in 5 mL of an isotonic phosphate buffer saline (0.01 M, pH 7.5), and the supernatant was collected after a centrifugation at 1000g for 10 min. IGF-1 was determined directly from this supernatant. For P4 and E2 determination, steroids were extracted 4 times from 1 mL of the supernatant, using 2 mL of diethyl ether each time. After evaporation of the ether, the extracts were resuspended in 300  $\mu$ L of the buffer solution and stored at -20° C. Hormone concentrations were determined as described for plasma, and corrected for the amount of tissue used in the extraction.

### *2.4. Endometrial PR and ER $\alpha$ abundance and localization*

At the time of slaughter, sections of uterus were extracted, fixed in 4% paraformaldehyde, and paraffin-mounted. Immunoreactive PR and ER $\alpha$  were visualized in transverse 5- $\mu$ m uterine sections using an avidin–biotin–peroxidase immunohistochemical technique [27]. The primary antibodies used were mouse monoclonal anti-PR (Zymed, South San Francisco, CA, USA) and anti-ER $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:100 and 1:25 in PBS, respectively. Negative controls for each receptor were obtained by replacing the primary antibody with a homologous non-immune IgG at

equivalent concentrations (Santa Cruz). After primary antibody binding, sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (horse anti-mouse IgG; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1:200 in normal serum from horse. For visualization of the immunolocalisation, a Vectastain Elite ABC kit followed by DAB Peroxidase substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used. Finally, sections were counterstained with haematoxylin. For each receptor, all samples were analysed in the same immunohistochemical assay.

The average immunostaining and the proportion of positive cells were calculated from the evaluation of ten fields (x1000 magnification) per cell type per ewe, as previously described [5]. Both receptors were evaluated in five endometrial compartments: luminal epithelium (LE), superficial and deep glandular epithelium (sGE and dGE) and superficial and deep intercaruncular stroma (sS and dS).

### *2.5. Endometrial gene quantification*

Total RNA from uterus was extracted using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) followed by precipitation with lithium chloride and DNase treatment with DNase I, Amplification Grade Kit (Invitrogen, USA). Concentration of RNA was determined by measuring absorbance at 260 nm, and the purity of all RNA isolates was assessed from 260 to 280 absorbance ratio and the integrity by electrophoresis (1% agarose gel). For each sample, cDNA was synthesized by reverse transcription using the SuperScript III transcriptase (Invitrogen) with oligo-dT primers and 1 µg total RNA added as a template.

Sequences and the expected product lengths of primers to amplify cDNA of the target genes receptors of progesterone (PR), estrogen (ER), growth hormone (GHR), insulin (INSR), leptin (LEPR), and adiponectin (ADIPOR2), and IGF-1, IGF-2 and IGF binding proteins (IGFBP2-5), and of the endogenous controls, ribosomal protein L19 (PRL19) and GADPH are presented in Table 1. Real-time PCR reactions were performed using KAPA SYBR®FAST Universal 2×qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, inc. Woburn, MA, USA), equimolar amounts of forward and reverse primers (200 nM; Operon Biotechnologies GmbH, Cologne, Germany) and 3 µl diluted cDNA (1:7.5 in RNase/DNase free water) in a final volume of 15 µl. Samples were analysed in duplicate in a 72-

disk Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, NSW, Australia). Standard amplification conditions were 3 min at 95 °C and 40 cycles of 15 s at 95 °C, 40 s at 60 °C, and 10 s at 72 °C. At the end of each run, dissociation curves were analysed to ensure that the desired amplicon was being detected and to discard contaminating DNA or primer dimers. Samples of cDNA of eleven ewes were pooled to provide an exogenous control, and five dilutions (from 100 to 6.25 ng/tube) of this pool were used to perform linear regression for each gene. The efficiency (E) of the assays was calculated according to the formula  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$  (Table 1) [28]. Gene expression was measured by relative quantification [29] to the exogenous control and normalized to the geometric mean expression of the endogenous control genes (GAPDH and RPL19), taking into account the respective efficiencies [29]. Expression of the housekeeping genes remained unchanged among samples.

## 2.6. Statistical analysis

Ovulation rate and embryo-related variables were analyzed by the Proc Genmod procedure including in the statistical model the initial BCS, nutritional treatment and their interaction. The proportion of ewes ovulating a single or more than one corpus luteum (CL) was analyzed by chi square. Transcript concentration and immunolocalisation were analyzed by ANOVA using a mixed procedure, and in the case of plasma variables, the analysis of repeated measures was included. The model included the fixed effects of initial BCS (high or low), nutritional treatment (control or undernourishment), days (where applicable) and their interactions, and the first-order autoregressive covariance structure. In addition to the effects of initial BCS and nutritional treatment, the model studying immunohistochemical data also included the fixed effects of cell type (luminal epithelium, glandular epithelium and stroma), location (superficial and deep) and their interactions. The Kenward-Rogers procedure was used to adjust freedom degrees of the denominator. The separation of means was performed by the Tukey test. Pearson correlation coefficients were used to describe relationships between variables. The data is presented as means of least squares  $\pm$  standard errors. The differences between means were considered significant when  $P < 0.05$ , and trend when  $P < 0.10$ . For embryo data, tendency was considered when  $P < 0.15$  [30].

### 3. Results

#### 3.1. Body weight, plasma metabolic hormones and IGF-1 concentration in uterus

From the beginning of the experiment to day -15 (beginning of nutritional treatment), BW was lower in low-iBCS compared to high-iBCS ewes ( $50.9 \pm 1.7$  vs  $61.9 \pm 1.6$  kg, respectively;  $P < 0.0001$ ), and each group maintained its BW. From day -15 to day 5, LU and HU ewes lost BW ( $6 \pm 2.2$  and  $7.3 \pm 2.5$  kg, respectively;  $P < 0.05$ ), while LC group gained  $5.8 \pm 2.3$  kg ( $P < 0.05$ ) and HC ewes kept their BW.

The endocrine response to 0.5 M food restriction according to iBCS is shown in Figure 1. High-iBCS ewes presented higher mean insulin concentration in comparison with low-iBCS ewes ( $5.11 \pm 0.38$  vs  $3.39 \pm 0.33$   $\mu\text{UI/mL}$ ;  $P < 0.01$ ). There was an interaction between iBCS and nutritional treatment ( $P < 0.05$ ); while the effect of undernutrition on high-iBCS ewes was not observed, decreased insulin concentration was found in low-iBCS ewes immediately after the onset of undernutrition.

Ewes with high-iBCS tended to present higher mean leptin concentrations than those with low-iBCS ( $3.05 \pm 0.23$  vs  $2.49 \pm 0.21$  ng/mL;  $P = 0.08$ ), but no effect of undernutrition was observed. There was a trend in the interaction between nutritional treatment and day ( $P = 0.09$ ), as leptin concentration decreased in undernourished ewes immediately after the onset of the restricted diet, while it was maintained in control animals, which was more evident in high-iBCS ewes. There was an interaction between iBCS and day ( $P < 0.05$ ); even if in both undernourished groups leptin concentrations decreased after treatment, in high-iBCS group, there was a drastic drop.

Mean IGF-1 concentrations were higher in ewes with high-iBCS than in those of low-iBCS ewes ( $379.1 \pm 32.2$  vs  $259.5 \pm 29.2$  ng/mL;  $P < 0.01$ ). There was an interaction between iBCS and day ( $P < 0.05$ ): while in ewes with high-iBCS IGF-1 concentration increased around estrus, this increase was not observed in low-iBCS ewes.

There was no effect of iBCS and nutritional treatment on mean uterine IGF-1 concentration ( $104.4 \pm 7.3$  vs  $92.1 \pm 6.7$  ng/g tissue for high-iBCS and low-iBCS ewes respectively,  $P > 0.05$ ;  $99.0 \pm 6.9$  vs  $97.4 \pm 7.0$  ng/g tissue for control and undernourished ewes respectively,  $P > 0.05$ ).

### *3.2. Ovulation rate, embryo quality, plasma P4 and uterine P4 and E2 concentration*

Although there was no effect of iBCS, nutritional treatment or their interaction on the number of CLs ( $P > 0.05$ ), there was a greater proportion of high-iBCS ewes presenting more than one CL than low-iBCS ewes (75 vs 37.5 %;  $P < 0.05$ ).

The number of recovered embryos was affected by initial BCS and nutritional treatment ( $P < 0.05$  for both), but the interaction did not reach statistical significance. Animals with high-iBCS presented higher number of recovered embryos than low-iBCS ( $1.6 \pm 0.13$  vs  $1.3 \pm 0.11$ ,  $P < 0.05$ ), and control ewes greater than undernourished ( $1.58 \pm 0.11$  vs  $1.31 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ). Also, the embryo viability rate tended to be higher in ewes of high-iBCS ( $83.3 \pm 12.4$  vs  $58.3 \pm 10.8\%$ ,  $P = 0.13$ ).

High-iBCS ewes presented higher P4 plasma concentration in comparison with low-iBCS ewes at day 5 ( $3.56 \pm 0.36$  vs  $2.28 \pm 0.35$  ng/mL,  $P < 0.05$ ), disregarding the nutritional treatment. In day-5 uterus, there was no effect of iBCS in P4 and E2 concentration, but there was a trend for control ewes to present higher P4 concentration than undernourished ewes ( $21.84 \pm 2.50$  vs  $15.44 \pm 2.57$  ng/g tissue;  $P = 0.09$ ) and, for undernourished ewes to present higher E2 concentration than control ewes ( $318.4 \pm 27.3$  vs  $254.5 \pm 26.9$  pg/g tissue;  $P = 0.10$ ). The number of CL was correlated with plasma P4 ( $r = 0.58$ ,  $P < 0.01$ ) and with uterine P4 ( $r = 0.40$ ,  $P < 0.05$ ).

### *3.3. Protein localisation and abundance*

The PR and ER $\alpha$  were localised in the nuclei of cells. Immunostaining and intensity of staining for PR and ER $\alpha$  was not affected by iBCS, nutritional treatment and their interaction (Figure 2). Progesterone receptor staining varied according to cell type and location (superficial or deep): the intensity of staining was highest in the LE ( $P < 0.05$ ), and a decrease in the intensity was observed in the deep location ( $P < 0.0001$ ), with the dGE being the endometrial compartment that showed the least intensity of staining. ER $\alpha$  was affected by cell type ( $P < 0.0001$ ): sS was the endometrial compartment that presented the highest intensity of staining when comparing to LE.



### 3.4. Uterus mRNA expression

The expression of the majority of the genes selected was not affected by iBCS, nutritional treatment or the interaction of these factors (Table 2).

Ewes with low-iBCS tended to have more INSR mRNA than ewes with high-iBCS ( $P=0.07$ ). On the other hand, the nutritional treatment affected the expression of GHR mRNA, being higher in undernourished than in controls ewes ( $1.64 \pm 0.13$  vs  $1.14 \pm 0.13$ ,  $P=0.01$ ). In turn, the expression of GHR mRNA was also affected by the interaction between iBCS and nutritional treatment ( $P < 0.003$ ): undernourished ewes presented higher gene expression than control ewes, but this was only observed in the high-iBCS group. Also, this gene presented greater expression in HU ewes than LU ewes ( $P=0.03$ ). Besides, BP2 mRNA tended to be higher in undernourished than in control group ( $1.34 \pm 0.35$  vs  $0.55 \pm 0.32$ ;  $P=0.08$ ). BP5 mRNA expression tended to be affected by the interaction of initial BCS and treatment: the expression of BP5 in the HU group was higher than in the HC group ( $P=0.05$ ), but no differences were found in the low-iBCS group.

## 4. Discussion

This is the first report on the effect of undernutrition on embryo quality, metabolic and reproductive hormones, and uterine gene and protein expression, in pregnant ewes with different body condition score. The most interesting finding was that the endocrine response and the uterine gene expression to undernutrition was dependent on iBCS, with high-iBCS ewes presenting the highest hormone concentration, number of recovered embryos and embryo viability rate. In turn, only the undernourished ewes with high- iBCS group showed an increase in the uterine gene expression of GHR and IGFBP5 with respect to their controls, suggesting a compensatory mechanism against adverse environmental factors in animals that have a greater body reserve. This allows us to speculate that the negative effects caused by a food restriction on reproduction, will be less marked in animals that have a good iBCS, due to a better endocrine and uterine environment.

High-iBCS ewes presented higher concentration of insulin, leptin and IGF-1, reflecting a better metabolic status in these animals. Insulin concentration decreased immediately after the onset of undernutrition in low-iBCS ewes, while the effect of food restriction was not

observed in high-iBCS ewes. This finding could imply a differential metabolic adaptation in which ewes with critical levels of energy reserves rapidly respond to daily intake, while ewes in a higher energy state (reserves) have greater temporal independence from it. Higher IGF-1 levels in high-iBCS ewes are consistent with higher insulin levels in these animals as previously suggested by Mashek et al. [31] that insulin may have a direct stimulatory effect on IGF-1 production. Moreover, an insulin-stimulating effect on the sensitivity of hepatic GH and consequent synthesis of IGF-1 has been demonstrated [32, 33]. A reciprocal action can also be proposed between the pancreas and the liver, since it has also been shown a direct action of IGF-1 on  $\beta$ -pancreatic cells, specifically in the activation of glucokinase, a limiting step for the metabolism of the pancreatic glucose responsible for insulin secretion [34]. Even if in both undernourished groups, leptin concentration decreased after treatment, this was more marked in the high-iBCS group. Indeed, female ruminants with greater BCS presented a greater lipomobilization during a period of negative energy balance and thus, leptin decrease was more marked [35, 36].

In the current study there was a greater proportion of high-iBCS ewes presenting more than one CL and associated greater P4 plasma concentration, but these variables were not affected by the nutritional treatment. Forcada et al. [37] reported a significantly higher ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes of a moderate high BC (>2.75) than low BC ewes (<2.50) throughout two consecutive years, at the same localization than this study. A greater ovulation rate was also reported in high-iBCS ewes that also presented more follicular waves [38]. Moreover, high-iBCS ewes had the highest insulin and IGF-1 concentrations and both hormones potentiate follicular growth and are increased after a flushing treatment performed to stimulate the ovulation rate [39, 40]. The greater P4 plasma concentrations in high-iBCS ewes are consistent with the greater number of recovered embryos and the higher embryo viability rates. Thus, it can be hypothesized that high-iBCS ewes presented more number of follicular waves with younger and higher fertility oocytes, as suggested previously [41].

In contrast to previous reports [8] nutritional treatment did not affect P4 plasma concentration, but it should be considered that the present study included only one hormone determination (day 5) in contrast to the daily sampling performed by Lozano et al. [22].

Interestingly, endometrial P4 content was not affected by iBCS, but undernourished ewes presented lower concentration, as previously reported by our group [22, 6], supporting the idea that peripheral concentrations are a poor measure of the P4 supply to the uterus. Given the essential role of P4 on the support of pregnancy, this could be associated with the highest number of recovered embryos found in control ewes. On the other hand, the endometrial concentration of E2 tended to be higher in undernourished ewes than in controls. This result could be associated with the negative effects of undernutrition on follicular development as reported Sosa et al [42], where it was found that large ovulatory follicles, at progestagen withdrawal, remained static, although the majority reached ovulation. It is likely that the prolonged time of growth of these follicles altered the form of secretion of circulating plasma E2 – e.g., later - that could not be determined in the present study. This could explain the higher concentration of E2 - and less of P4 - found in the uterus of undernourished ewes. Due to the above, a differential timing of uterine functionality could be proposed, being more delayed in undernourished ewes, which is consistent with the lower number of recovered embryos.

Intensity of staining for uterine PR and ER $\alpha$  on day 5 of pregnancy was not affected by iBCS and nutritional treatment, and this coincides with the absence of effects on PR and ER $\alpha$  mRNA gene expression found in this study. Similarly, Sosa et al. [6] reported that overall, immunohistochemical assessments did not reveal differences in ER $\alpha$  or PR due to the nutritional treatment, but lower ER $\alpha$  immunoreactivity was observed in the luminal and superficial glandular epithelium of cyclic undernourished ewes on day 5 and 14 of the cycle. On the other hand, also in cyclic animals, Sosa et al. [5] reported a decrease in PR immunostaining in most uterine cell types in undernourished ewes on Day 5 post-oestrus and no changes in ER $\alpha$ . To our knowledge, this is the first study that investigates the expression of these proteins in the uterus in pregnant animals at day 5 of gestation, moment at which the embryo enters to the uterus and it is largely dependent on maternal fluids [43]. The similar PR content is not consistent with the greater P4 concentration in the uterus of control ewes, since receptors concentrate the hormones in the target tissues [44]. On the other hand, Ise et al. [45] revealed by epitope analysis that their antibodies recognized the region which is exposed only in activated epidermal growth hormone receptor. Moreover, Sosa et al. [6] reported lesser uterine binding capacity of PR in undernourished ewes on day

5 of the estrous cycle, despite the absence of effects on mRNA and protein expression. Thus, we propose that the activated PR and/or binding capacity -not detected by our immunohistochemistry method- could be lower in the uterus restricted ewes, consistent with the lower P4 concentration, an altered uterine functionality and subsequent lower number of recovered embryos.

Surprisingly, iBCS and undernutrition affected few uterine genes. Ewes with low-iBCS tended to have more INSR mRNA, and data are consistent with the hormone/receptor compensatory mechanism, i.e., low hormone concentrations and high receptor concentration [46]. Indeed, low-iBCS ewes had lower insulin plasma concentration and higher uterine INSR mRNA than high-iBCS ewes. The trend to greater IGFBP2 mRNA expression in the uterus of undernourished ewes is consistent with the increased gene liver expression provoked by undernutrition and/or fasting [12, 47]. Greater uterine levels of IGFBP2 mRNA could be related to the lesser number of embryos recovered from undernourished ewes, since it has been suggested that the greater expression of IGFBP2 mRNA could alter the interaction with IGF-2, thereby impairing the development of the early embryo [48]. The greater expression of GHR mRNA found in undernourished ewes is associated with the higher E2 uterine concentration. Indeed, uterine GHR mRNA is increased around estrus in cows [42]. Moreover, the lower uterine GHR mRNA found in control ewes is associated with the greater P4 uterine concentration in this group, as it has been reported that P4 treatment reduced GHR mRNA uterine expression in mouse uterus [49]. An interesting finding was that the uterine response to undernutrition was dependent on iBCS: a higher expression of GHR and IGFBP5 mRNA was found in undernourished than control ewes only in high-iBCS group. This is the first time that IGFBP5 is measured in the uterus of undernourished pregnant ewes. It has been suggested that IGFBP5 may potentiate IGF actions [50]. Moreover, a greater uterine IGFBP5 expression was found in Suffolk ewes when compared to Cheviot ewes that had also greater embryo size [11]. Thus, the higher uterine gene expression of GHR and IGFBP5 found in undernourished high-iBCS ewes, but not in low-iBCS, is consistent with the higher viability embryo rate found only in high-iBCS group. Therefore, it is tempting to speculate that in a more favourable metabolic status (i.e., high iBCS), GHR and IGFBP5 could drive a compensation of the

negative tisular effects of undernutrition, that is not achieved in a deficient metabolic milieu (i.e., low-iBCS).

In summary, the present study demonstrates that the endocrine response to undernutrition depends on the initial body energy reserves and is associated with a differential embryo quality and uterine gene expression. The nutritional treatment affected sex hormone concentration in uterus, which may partially explain the differential gene expression found.

### **Acknowledgments**

The present study received financial support from CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) Iniciación 1, Uruguay.

### **References**

- [1] O'callaghan D, Boland MP. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Sci* 1999; 68: 299-314.
- [2] Abecia JA, Forcada F, Palacín I, Sanchez-Prieto L, Sosa C, Fernández-Foren A, Meikle A. Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Zygote* 2013; 9: 1-9.
- [3] Leese HJ. Rewards and risks of human embryo creation: a personal view. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 387-91.
- [4] Meikle A, Tasende C, Sosa C, Garofalo EG. The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 385-94.
- [5] Sosa C, Lozano JM, Vinales C, Acuna S, Abecia JA, Forcada F, Forsberg M, Meikle A. Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Animal Reproduction Sci* 2004; 84(3-4): 337-348.
- [6] Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Vinales C, Tasende C, Valares JA, Palacin I, Martin GB, Meikle A. Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(4): 447-458.

[7] Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Meikle A. Undernutrition reduces the oviductal mRNA expression of progesterone and oestrogen receptors in sheep. *J Vet Med Sci* 2008; 175 (3): 413 – 415.

[8] Abecia JA, Sosa C, Forcada F, Meikle A. The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 2006; 46: 367-78.

[9] Meikle A, de Brun V, Carriquiry M, Soca P, Sosa C, Adrien ML, Chilibruste P, Abecia JA. Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. *Anim Reprod* 2018; 15, (Suppl.1):899-911.

[10] Dupont J, Scaramuzzi RJ, Reverchon M. The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Anim* 2014; 28: 1–14.

[11] Sequeira M, Pain SJ, de Brun V, Meikle A, Kenyon PR, Blair HT. 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* 2015; 86(6):1557-1565.

[12] Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 1994; 15(1): 80-101.

[13] Byrne AT, Southgate J, Brison DR and Leese HJ. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 2002; 62: 489–495.

[14] de Brun V, Abecia JA, Fernandez-Foren A, Carriquiry M, Forcada F, Vazquez MI, Meikle A, Sosa C. Undernutrition and laterality of the corpus luteum affects gene expression in oviduct and uterus of pregnant ewes. *Span J Agric Res* 2013; 11(4):989-996.

[15] Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29(1): 3-22.

[16] Blache D, Zhang S, Martin GB. Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev* 2006; 46(4): 379-390.

- [17] Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Forcada F, Martin GB, Palacin I, Meikle A. Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 2009; 36(1): 13-23.
- [18] Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 1969; 72: 451-454.
- [19] Agricultural and Food Research Council (AFRC). Energy and protein requirements of ruminants. An advisor manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. Wallingford, UK, CAB International, 1993; 159p.
- [20] Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Lozano JM. Effect of plane of protein after weaning on resumption of reproductive activity in Rasa Aragonesa ewes lambing in late spring. *Theriogenology* 1993; 39(2): 463-473.
- [21] Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, McMillen SR. Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Animal Sci* 1995; 61: 57-62.
- [22] Lozano JM, Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Alfaro B. Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology* 1998; 49: 539-546.
- [23] Winterberger-Torres S, Sevellec C. Atlas of the early development of the sheep embryo. INRA, Paris, France 1987.
- [24] Adrien ML, Mattiauda DA, Artegoitia V, Carriquiry M, Motta G, Bentancur O, Meikle A. Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal* 2011; 6(2): 292-299.
- [25] Pinotti L, Rosi F. Leptin in bovine colostrums and milk. *Horm Metab Res* 2006; 38(2): 89-93.

- [26] Abecia JA, Rhind SM, Goddard PJ, Mcmillen SR, Ahmadi S, Elston DA. Jugular and ovarian venous profiles of progesterone and associated endometrial progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant ewes. *Animal Sci* 1996; 63: 229-234.
- [27] Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Sahlin L. An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nutr Dev* 2000; 40: 587-96.
- [28] Rutledge RG, Cote C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:e93.
- [29] Pflaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2009; 29:e45.
- [30] de Brun V, Meikle A, Fernández-Foren A, Forcada F, Palacín I, Menchaca A, Sosa C, Abecia JA. Failure to establish and maintain a pregnancy in undernourished recipient ewes is associated with a poor endocrine milieu in the early luteal phase. *Anim Reprod Sci* 2016; 173:80-6.
- [31] Mashek DG, Ingvarlsen KL, Andersen JB, Vestergaard M, Larsen T. Effects of a four-day hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 21(3): 169-185.
- [32] Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol* 2003; 176(2): 205-217.
- [33] Rhoads RP, Kim JW, Leury BJ, Baumgard LH, Segole N, Frank SJ, Bauman DE, Boisclair YR. Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *Journal Nutr* 2004; 134: 1020–7.
- [34] Yoshida K, Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Li J, Ahmed RA, Kitanaka N, Wong NC, Unterman TG, Magnuson MA, Ishida T. Pancreatic glucokinase is activated by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 2007; 148(6): 2904-2913.



- [35] Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilbroste P. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 2004; 127: 727–737.
- [36] Astessiano AL, Pérez-Clariget R, Quintans G, Soca P, Meikle A, Crooker BA, Carriquiry M. Metabolic and endocrine profiles and hepatic gene expression in periparturient, grazing primiparous beef cows with different body reserves. *Livest Sci* 2014; 170: 63-71.
- [37] Forcada, F., Abecia, J.A., Sierra, I. Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at to different body condition levels. *Small Rumin Res* 1992; 8: 313-324.
- [38] Vinales C, Forsberg M, Banchemo G, Rubianes E. Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Animal Sci* 2002; 74: 539-545.
- [39] Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Munoz-Gutierrez M, Somchit A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* 2006; 46: 339-354.
- [40] Habibizad J, Riasi A, Kohram H, Rahmani HR. Effect of long-term or short-term supplementation of high energy or high energy-protein diets on ovarian follicles and blood metabolites and hormones in ewes. *Small Rumin Res* 2015; 132:37–43.
- [41] Viñoles C, Paganoni B, Glover KMM, Milton JTB, Blache D, Blackberry MA, Martin GB. The use of a ‘first-wave’ model to study the effect of nutrition on ovarian follicular dynamics and ovulation rate in the sheep. *Reproduction* 2010; 140: 865–874.
- [42] Sosa C, Gonzalez-Bulnes A, Abecia JA, Forcada F, Meikle A. Short-term undernutrition affects final development of ovulatory follicles in sheep synchronized for ovulation. *Reprod Domest Anim* 2010; 45(6):1033-8.

- [43] Ashworth CJ. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livest Prod Sci* 1995; 44: 99-105.
- [44] Katzenellenbogen. Dynamics of steroid hormone receptor action. *Ann Rev Physiol* 1980; 42:17-35.
- [45] Ise N, Omi K, Miwa K, Honda H, Higashiyama S, Goishi K. Novel monoclonal antibodies recognizing the active conformation of epidermal growth factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 394: 685–690.
- [46] Meikle A. Reproductive endocrinology of prepubertal and anestrous ewes. Regulation of uterine sex steroid receptors by ovarian hormones and effects of estradiol on gonadotropin secretion and follicular growth. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala 2001.
- [47] de Brun V, Meikle A, Casal A, Sequeira M, Contreras-Sol I, Carriquiry M, Forcada F, Sosa C, Abecia JA. Periconceptional undernutrition modifies endocrine profiles and hepatic gene expression in sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2015; 99: 710–718.
- [48] Han VKM, Bassett N, Walton J, Challis JRG. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes—evidence for IGF-IGFBP interactions at the fetomaternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2680–2693.
- [49] Sharara FI, Bhartiya D, Nieman LK. Growth hormone receptor gene expression in the mouse uterus: modulation by gonadal steroids. *J Soc Gynecol Investig* 1994; 1 (4): 285-9.
- [50] Bach LA. IGF-binding proteins. *J Mol Endocrinol* 2018; 61: T11-T28.

**Table 1.** Oligonucleotide primer sequences used for quantification of target and endogenous control genes.

Gene*	Accession number	Primers sequence	Amplicon length (pb)	Efficiency	Source
<i>PR</i>	Z66555	F GACAGCACTTCTAGGCGACAT R TGTGCTGGAAGAAACGATTGC	79	<b>1.01</b>	Sosa et al. (2009)
<i>ER<math>\alpha</math></i>	AYO33393	F AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC R CGGTGGATGTGGTCTTCTCT	234	<b>1.09</b>	Sosa et al. (2009)
<i>GHR</i>	NM_176608	F TCTGGGAATCCTAAATTCACCAA R CTGTAAACTGTGATTAGCCCCATCT	91	<b>0.89</b>	Pinotti and Rosi, (2006)
<i>IGF-1</i>	NM_001009774.3	F TTGCACTTCAGAAGCAATGG R ACTGGAGAGCATCCACCAAC	209	<b>0.95</b>	de Brun et al. (2015)
<i>IGF-2</i>	NM_001009311.1	F ACCCTCCAGTTTGTCTGTGG R GGGGTATGCTGTGAAGTCGT	210	<b>1.19</b>	de Brun et al. (2015)
<i>IGFBP2</i>	NM_174555.1	F ATGCGCCTTCGGATGA R GTTGTACAGGCCATGCTTGTC	74	<b>1.22</b>	Astessiano et al. (2012)
<i>IGFBP3</i>	AF305199.1	F AGCACAGACACCCAGAATTCT R TTCAGCGTGTCTCCATTTC	86	<b>1.06</b>	Pinotti and Rosi, (2006)
<i>IGFBP4</i>	S77394.1	F ATGTGCCTGATGGAGAAAGG R AAGGCAGAGCCACAGACAGT	98	<b>0.79</b>	de Brun et al. (2015)
<i>IGFBP5</i>	NM_001129733.1	F GGTTTGCCTGAACGAAAAGA R CTGGGTCAGCTTCTTTCTGC	193	<b>1.01</b>	de Brun et al. (2015)
<i>INSR</i>	XM_004008038.1	F TGGCTCTACAGCTGGACAGT R TCAGCACCCAGGATGGTT	86	<b>1.12</b>	de Brun et al. (2015)
<i>LEPR-b</i>	NM_001009763.1	F CAGCGGTTGGGTCTAACATT R GCAGCAGTACACTGCGTCAT	215	<b>1.14</b>	de Brun et al. (2015)
<i>ADIPOR2</i>	NM_001040499.2	F GGCAACATCTGGACACATC R CTGGAGACCCCTTCTGAG	203	<b>1.01</b>	de Brun et al. (2015)
<i>RPL19</i>	NM_001040516.1	F CCCCAATGAGACCAATGAAATC R CAGCCCATCTTGATCAGCTT	119	<b>1.17</b>	Chen et al. (2006)
<i>GAPDH</i>	NM_001190390.1	F GCATCGTGGAGGGACTTATGA R GGGCCATCCACAGTCTTCTG	67	<b>0.99</b>	This paper

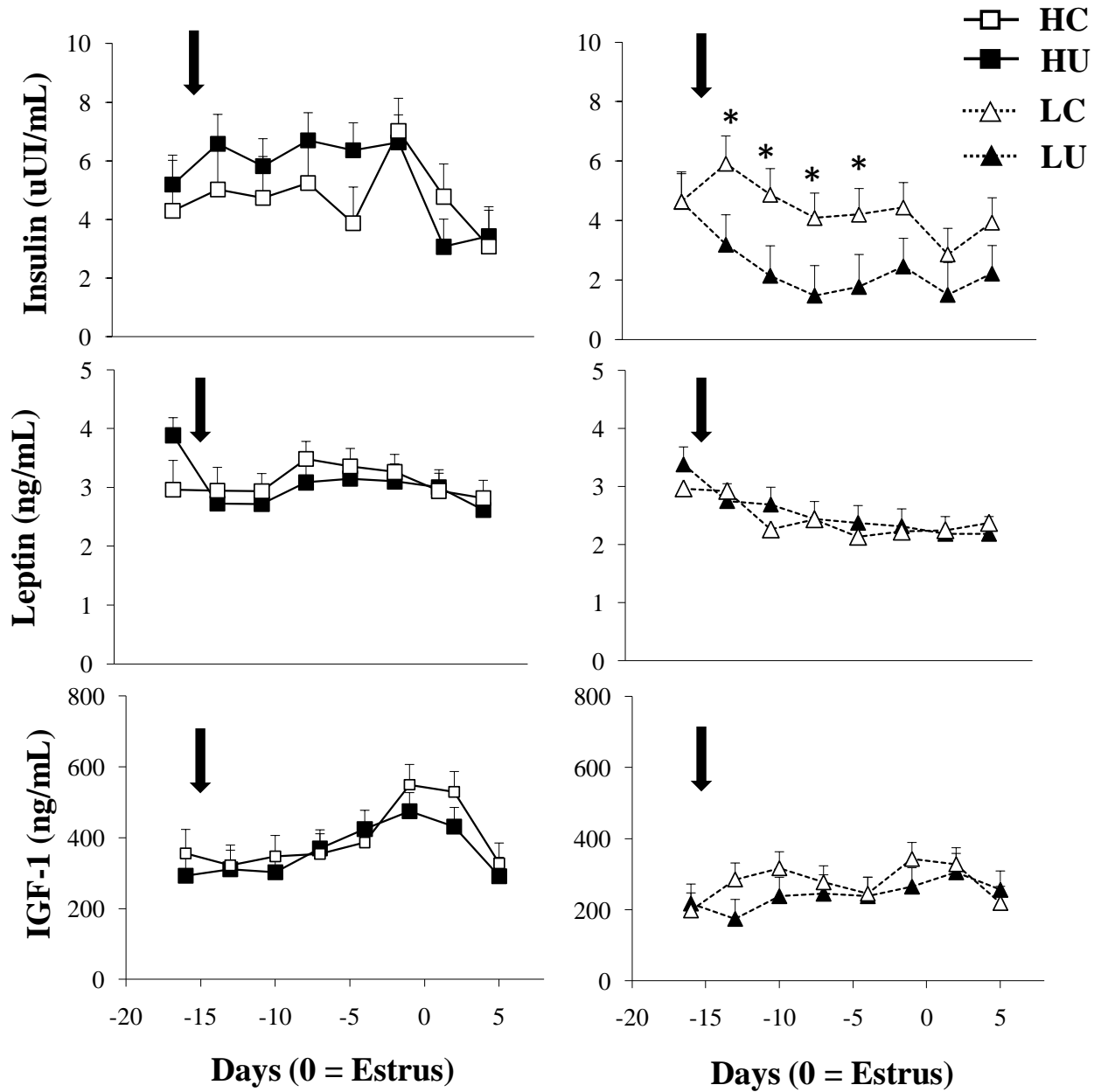
PR, progesterone receptor; ER $\alpha$ , estrogen receptor; GHR, growth hormone receptor; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IGFBP2, IGF-binding protein 2; IGFBP3, IGF-binding protein 3; IGFBP4, IGF-binding protein 4; IGFBP5, IGF-binding protein 5; INSR, insulin receptor; LEPR-b, full-length leptin receptor; ADIPOR2, adiponectin receptor 2; RPL19, ribosomal protein L19 (endogenous control gene); GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (endogenous control gene). \*GenBank ovine sequences.

**Table 2.** Uterine gene expression in ewes with high (H) and low (L) initial body condition score fed 0.5 (undernourished, U) or 1.5 (Control, C) times the daily maintenance requirements, at day 5 of gestation.

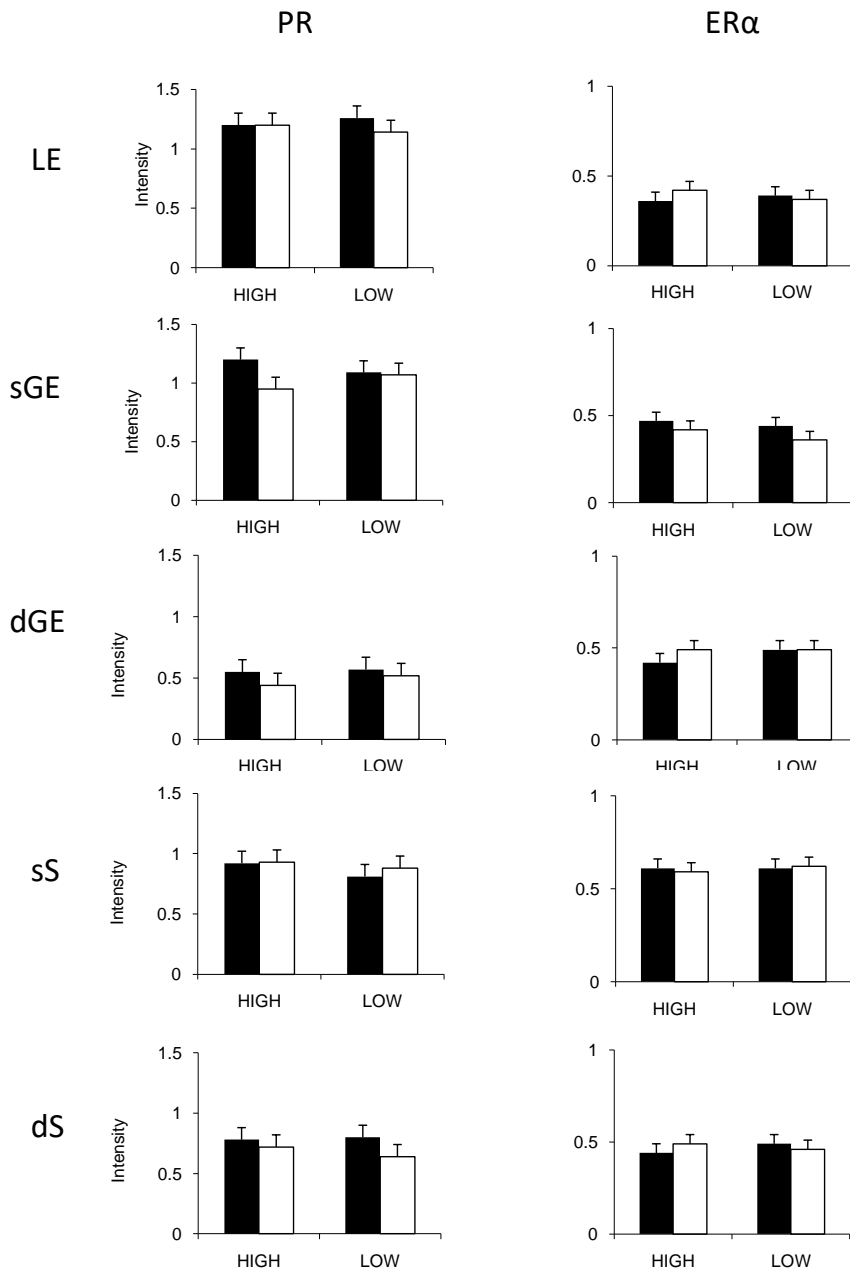
Gene	HC	HU	LC	LU	Mean effect ( <i>p</i> -value)		
					iBCS	T	iBCS *T
PR	0.34 ± 0.29	0.61 ± 0.27	0.91 ± 0.26	0.82 ± 0.29	.	.	.
ER $\alpha$	0.52 ± 0.41	0.80 ± 0.37	1.15 ± 0.33	0.75 ± 0.37	.	.	.
GHR	0.93 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.05 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.17 <sup>a</sup>	.	0.01	0.003
IGF-1	0.83 ± 0.29	0.72 ± 0.29	1.18 ± 0.27	1.00 ± 0.29	.	.	.
IGF-2	0.51 ± 0.27	0.68 ± 0.27	0.50 ± 0.25	0.54 ± 0.27	.	.	.
IGFBP2	0.64 ± 0.44	1.33 ± 0.44	0.45 ± 0.37	1.36 ± 0.44	.	0.08	.
IGFBP3	0.44 ± 0.24	0.58 ± 0.22	0.73 ± 0.22	0.77 ± 0.26	.	.	.
IGFBP4	0.48 ± 0.14	0.59 ± 0.14	0.79 ± 0.11	0.73 ± 0.12	.	.	.
IGFBP5	1.02 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.18	1.25 ± 0.20	.	.	0.09
INSR	0.33 ± 0.30 <sup>x</sup>	0.32 ± 0.29	1.07 ± 0.29 <sup>y</sup>	0.68 ± 0.25	0.07	.	.
LEPR-b	0.46 ± 0.34	0.58 ± 0.34	0.97 ± 0.31	0.88 ± 0.31	.	.	.
ADIPOR2	0.56 ± 0.35	0.81 ± 0.35	0.90 ± 0.32	0.62 ± 0.31	.	.	.

*PR*, progesterone receptor; *ER $\alpha$* , estrogen receptor  $\alpha$ ; *GHR*, growth hormone receptor; *IGF1*, insulin-like growth factor 1; *IGF2*, insulin-like growth factor 2; *IGFBP2-5*, IGF-binding protein 2-5; *INSR*, insulin receptor; *LEPR-b*, full-length leptin receptor; *ADIPOR2*, adiponectin receptor 2.

a vs. b,  $P < 0.05$ . x vs. y,  $P < 0.01$ .



**Figure 1.** Plasma concentrations of insulin, leptin and IGF-1 in ewes with high (H) and low (L) initial body condition score, fed 0.5 (undernourished, U) or 1.5 (control, C) times the requirements for maintenance for 20 days. The black arrows indicate the onset of differential diets. Asterisks denote differences between groups,  $P < 0.05$ .



**Figure 2.** Intensity of staining (arbitrary units) of PR and ER $\alpha$  in the endometrium of ewes with high or low initial body condition score, fed 0.5 (undernourished  $\square$ ) or 1.5 (control  $\blacksquare$ ) times the requirements for maintenance at day 5 of gestation. LE = luminal epithelium, sGE = superficial glandular epithelium, dGE = deep GE, sS = superficial stroma, dS = deep stroma.

