

## LUTEOLISIS VS RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ EN OVINOS SUBNUTRIDOS

M.Talmon<sup>1</sup>, C.Sosa<sup>1,2</sup>, M.Carriquiry<sup>3</sup>, A.Fernandez<sup>1</sup>, F.Forcada<sup>2</sup>, A.Abecia<sup>2</sup>, A.Meikle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, <sup>3</sup>Facultad de Agronomía, Uruguay. <sup>2</sup>Producción Animal, Universidad de Zaragoza, España

### Resumen

En este trabajo se determinó la expresión de los transcritos de receptores de estrógeno a (ER $\alpha$ ), progesterona (PR) y oxitocina (OTR) en ovejas subnutridas (0.5X mantenimiento) y controles (1X) ciclando y preñadas, mediante RT-PCR en tiempo real. Se observó que las ovejas ciclando control presentan mayor abundancia de ARNm de PR y menor contenido de ARNm de ERa que las ciclando subnutridas. No se observó ningún efecto del tratamiento nutricional ni de la condición fisiológica sobre la expresión de ARNm de OTR.

### Introducción

El proceso fisiológico por el cual el embrión señala su presencia al sistema materno y prolonga la vida del CL, se ha denominado reconocimiento materno de la gestación (Short, 1969); en ovinos es el día 14 de gestación. El interferón tau (IFN $\tau$ ) sintetizado por el embrión, actuando a través de su receptor (IFNAR), actúa en forma paracrina para evitar la transcripción del gen del OTR (ya sea directa o indirectamente inhibiendo primero la síntesis de ERa) suprimiendo de esta manera el desarrollo del mecanismo luteolítico en el endometrio (Spencer y Bazer, 1996). Al inhibir el aumento en la expresión de OTR, el embrión evita en última instancia la producción de pulsos luteolíticos de PGF $_{2\alpha}$ , evitando la destrucción del CL, y asegurando un ambiente uterino propicio para su desarrollo (Spencer y col., 2004). Desde que comienza la síntesis de IFN $\alpha$  hasta el día 14, momento en que se desencadena la luteólisis, el embrión debe ser capaz de suprimir el mecanismo luteolítico para asegurar su supervivencia. Cualquier acontecimiento que interfiera con el proceso de reconocimiento materno de la gestación, podría resultar en la muerte embrionaria. La subnutrición provoca mortalidad embrionaria, por lo que la hipótesis de éste trabajo es que la subnutrición afecta factores vinculados al reconocimiento materno de la gestación a nivel uterino. En este estudio se investigó la expresión génica endometrial de ER, PR y OTR en ovejas subnutridas y controles, cíclicas y preñadas.

### Materiales y Métodos

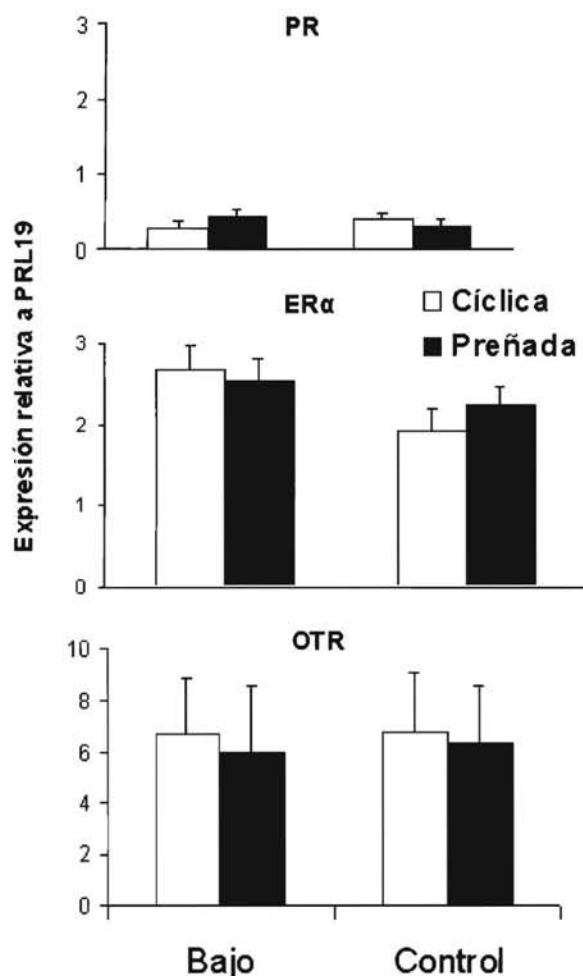
Ovejas Rasa Aragonesa (n=48) con un peso vivo de 61,8 $\pm$ 7,7 kg y una condición corporal (CC) de 3,32 $\pm$ 0,4 (escala: 0=emaciada, 5=obesa) fueron asignadas a dos grupos: Grupo C (control, n=21) que se alimentó con una dieta de mantenimiento (12,4 MJ energía metabolizable) y Grupo B (subnutridas, n=27) al que se le administró la mitad de los requerimientos diarios por 3 semanas. Las ovejas fueron sincronizadas mediante dispositivos intravaginales de progestágenos (Acetato de Fluorogestona 40mg, Intervet S.A., Salamanca, España). El día del estro fue considerado como día 0, momento en que 20 ovejas del grupo B y 13 del grupo C fueron servidas. Al día 14 del ciclo estral/pre-

ñez se sacrificaron todos los animales; considerando como preñados a los animales de los cuales se recuperó uno o más embriones. De esta manera, los 4 grupos considerados fueron: Grupo B, ciclando (n=6) y preñadas (n=7), y Grupo C, cíclicas (n=5) y preñadas (n=6), descartándose las ovejas servidas no preñadas. En el momento del sacrificio se recogieron muestras de endometrio que fueron congeladas hasta su análisis. La cuantificación de los transcritos se realizó mediante RT-PCR en tiempo real usando SYBR-Green y primers diseñados específicamente para los genes de interés (ERa, PR y OTR) y para el gen usado como control interno (proteína ribosomal L19, PRL19). Los datos de expresión de ARNm de los genes de interés se normalizaron respecto al gen de PRL19 y se expresó en relación a la muestra utilizada como control positivo (método de delta-delta Ct, Livak y Schmittgen, 2001). Los datos se analizaron usando el procedimiento mixto (SAS Institute, 2001) y los efectos fijos incluidos en el modelo fueron el tratamiento nutricional (subnutridas vs. control) y estado fisiológico (preñadas vs. cíclicas). Las medias se consideraron diferentes cuando P < 0,05 y con una tendencia a diferir cuando los valores de P estaban comprendidos entre 0,05 y 0,1.

### Resultados

El tratamiento (Subnutridas vs. Control) y el estado fisiológico (Cíclicas vs. Preñada) no afectaron la expresión del gen PRL19 usado como control interno. Se encontró una interacción tratamiento x condición (P=0.07) sobre la abundancia de ARNm de PR (Figura 1): las ovejas controles cíclicas tendieron a presentar mayores contenidos de ARNm de PR que las ovejas subnutridas cíclicas (P<0,13). El tratamiento afectó el contenido de ARNm de ERa: las ovejas subnutridas presentaron mayores valores que las del grupo control (2,6  $\pm$ 0,2 vs. 2,1 $\pm$ 0,2, P=0,08, Figura 1). Las ovejas cíclicas del grupo subnutrido presentaron mayor contenido de ARNm de ERa. No hubo efecto del tratamiento ni de la preñez sobre la expresión de ARNm de OTR (Figura 1).

La progesterona (P4), hormona de la preñez tiene un rol fundamental preparando al útero para una posible gestación, por lo que la mayor sensibilidad a la P4 (mayor contenido de RP) de las ovejas cíclicas del grupo control favorecería el establecimiento de la gestación. Los bajos contenidos de ARNm de PR (en comparación con otros transcritos) es consistente con datos internacionales que reportan bajos contenidos al final de la fase luteal (Wathes y col., 1992). Sosa y col. (2004) demostraron que las ovejas subnutridas con menores concentraciones de P4 endometriales poseían un menor contenido de RP durante la fase luteal temprana (día 5), pero no en la fase luteal tardía (día 10), y esto concuerda con nuestros hallazgos a día 14. En ovejas cíclicas se incrementa el contenido de ERa al día 15 (Wathes y col., 1992). La subnutrición tendió



**Figura 1:** Expresión uterina del receptor de progesterona (PR), estrógenos (ERα) y oxitocina (OTR) en ovejas cíclicas y preñadas alimentadas a 1X mantenimiento (control) o a 0.5 M (Bajo).

a aumentar el contenido endometrial de ARNm de ERα; esto podría facilitar la luteólisis, ya que ERα la favorece, como se reportó previamente por Bazer y col. (2004). Durante el proceso de luteólisis, la oxitocina juega un rol importante estimulando los pulsos de PGF2a (Asselin y col., 1997). En este trabajo es llamativa la alta expresión del receptor de oxitocina al día 14. Sin embargo, no se encontraron diferencias provocadas por la presencia de un embrión, lo que contrasta con Wathes y col (1992) que detectan OTR en los días 14 y 15 del ciclo estral en ovejas cíclicas, pero no en preñadas.

### Conclusión

La subnutrición modifica la expresión de los receptores esteroideos (ER, PR) en ovejas cíclicas a favor de los mecanismos luteolíticos. Sin embargo, no se observan diferencias provocadas por la gestación, aún cuando el animal esta sujeto a una subnutrición severa (0.5X).

### Summary

Endometrial transcripts of the receptors of estrogen a (ERα), progesterone (PR) and oxytocin (OTR) were determined by real time RT-PCR in undernourished (0.5X maintenance) and control (1X) pregnant and cyclic ewes. Cyclic control ewes presented more PR mRNA expression and less ERα mRNA than cyclic undernourished ewes. Neither nutritional treatment nor pregnancy affected OTR mRNA expression.

### Referencias

- Asselin et al. Endocrinology 1997, 138, 4798- 4805
- Bazer et al. Anim. Reprod. Sci. 2004, 82-83: 537-550.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Methods 2001, 25, 402-408.
- Sosa et al. Anim. Rep. Sci 2004, 84: 337-348.
- Spencer, T.E., Bazer, F.W. 1996. Endocrinology 137, 1144-7.
- Spencer, T.E., et al. Anim Reprod Sci, 2004, 82-83 , 537-50.
- Wathers et.al. Institute of Anim Physiology and Genetics Research 1992, 479-490.