

EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN Y LA GESTACION SOBRE FACTORES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

A. Fernandez¹, C. Sosa^{1,2}, M. Carriquiry³, M. Talmon¹, F. Forcada², A. Abecia², A. Meikle¹

¹Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, ³Facultad de Agronomía, Uruguay, ²Producción Animal, Universidad de Zaragoza, España

Resumen

En este trabajo se determinó la abundancia de los transcritos de factores de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II), su receptor (IGF-1R) y el receptor de leptina (LEPR) en ovejas subnutridas (0.5X mantenimiento) y controles (1X), ciclando y preñadas, mediante RT-PCR en tiempo real, ya que son factores que estarían implicados en el desarrollo embrionario y/o función uterina. La preñez aumentó el contenido de IGFs mRNA en las ovejas control. La subnutrición afectó la expresión de IGF-II mRNA en ovejas ciclando, pero no en animales gestantes ya que estos no presentaron diferencias con el grupo control. No se encontró efecto de la gestación ni del tratamiento sobre la expresión de mRNA de los receptores de IGF y leptina.

Introducción

Si bien se acepta que los embriones en la etapa de pre-implantación son relativamente autónomos, durante la última década se han acumulado numerosas evidencias sobre la participación de muchas hormonas y factores de crecimiento que determinan la viabilidad futura del embrión (Kaye, 1997). En el tracto reproductivo ovino se ha demostrado la expresión del mRNA de IGF-I, IGF-II y sus receptores (Stevenson y col., 1994; Stevenson y Wathes, 1996; Reynolds y col., 1997). En el útero, ambos IGFs estimulan el desarrollo de los embriones pre-implantación, actúan en el desarrollo fetal y controlan el desarrollo placentario (Wathes y col., 1998). Por otro lado, la leptina y su receptor se ha vinculado con el crecimiento del embrión en la etapa de pre-implantación en ratas (Kawamura y col., 2002). En ovinos, se desconoce si la leptina o su receptor se expresan en endometrio y por lo tanto si tienen un rol en etapas tempranas del embrión. Tanto el IGF-I como la leptina, son mediadores del estatus metabólico que señalizan el eje reproductivo: las concentraciones plasmáticas de ambas disminuyen con la restricción nutricional (Sosa y col., 2005; 2006). Por todo esto, la hipótesis de este trabajo es que la subnutrición severa puede – a través de estas señales- afectar el ambiente uterino favoreciendo la mortalidad embrionaria que se ha observado previamente en ovejas subnutridas (Abecia y col, 2006). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la subnutrición y la preñez sobre la expresión endometrial de los transcritos de IGF-I, IGF-II, IGF-1R y LEPR en ovejas.

Materiales y Métodos

Ovejas Rasa Aragonesas (n=48) con un peso vivo de 61,8±7,7kg y una condición corporal (CC) de 3,32±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 mi-

tad 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. El día 14 del ciclo estral/preñez 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, ciclando (n=5) y preñadas (n=6), descartándose del experimento 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 (IGF-I, IGF-II, IGF-1R y LEPR) y para el gen usado como control interno (proteína ribosomal L19, PRL19). Los datos de expresión de mRNA 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 del 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 vacías).

Resultados y Discusión

El tratamiento (Subnutridas vs. Control) y el estado fisiológico (Ciclando vs. Preñadas) no afectaron la expresión del gen PRL19 usado como control interno. La presencia del embrión aumentó el contenido de IGF-I mRNA, tanto en el grupo bajo como en el grupo control. Lo mismo ocurrió con la expresión de mRNA de IGF-II en el grupo control (Figura 1).

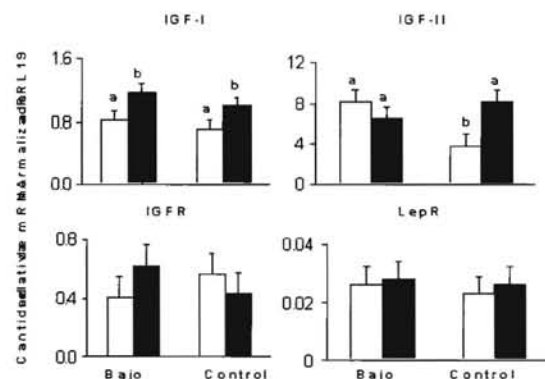


Figura 1. Concentración de mRNA de IGF-I, IGF-II, IGF-R y LepR en ovinos cicloos y preñados alimentados a 1 X mantenimiento (Control) o a 0.5 X (Bajo). a vs b, P < 0.05



El IGF-I y el IGF-II secretados en forma parácrina por el útero, son los principales factores que incrementan el desarrollo embrionario y de la placenta (Wathes y col., 1998; Watson y col., 1999), lo que explicaría el aumento de estos factores en ovejas preñadas. Cann y col. (1997) encontraron que la expresión de IGF-II es mayor en ovinos gestantes como en el presente estudio, por lo que han sugerido que el IGF-II tiene un rol predominante al momento del reconocimiento materno. Esto es consistente con el grado de expresión de cada factor (IGF-I vs. IGF-II), ya que la expresión de IGF-II fue aproximadamente 10 veces mayor que la de IGF-I. El hallazgo más interesante de este estudio es que las ovejas subnutridas preñadas no presentaron mayores niveles de IGF-II mRNA que las ciclando; mas aún, las ovejas ciclando subnutridas presentaron mayores niveles que las ovejas ciclando control, lo que indicaría alguna alteración que podría llevar a explicar las pérdidas embrionarias que provoca la subnutrición. No hubo efectos de la presencia del embrión o del tratamiento nutricional sobre la expresión de mRNA de IGF-1R y de LEPR (Figura 1), por lo que la sensibilidad endometrial a estas hormonas (IGFs y leptina) no parecería ser uno de los mecanismos por los cuales se mantiene la gestación o la subnutrición provoca la pérdida embrionaria.

Conclusión

La presencia del embrión aumentó la abundancia de mRNA de los IGFs en el grupo control, confirmando el rol de estos factores en la manutención de la gestación. La subnutrición afectó la expresión de IGF-II mRNA en ovejas ciclando, pero no en animales gestantes, de forma consistente con hallazgos anteriores (ver poster Talmón y col., 2008). La ausencia de efectos observada en la expresión de mRNA de IGF-1R y LEPR sugiere que no estarían vinculados a la

mortalidad embrionaria provocada por la subnutrición.

Summary

Endometrial transcripts of insulin-like growth factors type-I and II (IGF-I and IGF-II), their receptor (IGF-1R) and leptin receptor (LEPR) were determined by real time RT-PCR in undernourished (0.5X maintenance) and control (1X) pregnant and cyclic ewes as these genes could be involved in embryonic development and/or uterine function. Pregnancy increased mRNA expression of IGFs in control ewes. Under nutrition affected IGF-II mRNA expression in cycling ewes, but not in pregnant animals as IGF-II mRNA expression of undernourished ewes was not different from expression on control group. Nutritional treatment and pregnancy did not affect mRNA expression of IGF-1R and LEPR.

Referencias

- Abecia, J.A., Sosa C., Forcada, F., Meikle, A. *Reprod. Nutr. Dev.* 46 (2006) 367-378.
- Kaye, P.L. *Rev. Reprod.* 2 (1997) 121-7.
- Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A., Tanaka, T. *Endocrinology* 143 (2002) 1922-31.
- Sosa, C., Abecia, J.A., Palacin, I., Forcada, F., Meikle, A. XXXI Jornadas Científicas y X Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Zamora, España (2006) pp. 362-365
- Stevenson, K.R., Gilmour, R.S., Wathes, D.C. *Endocrinology* 134 (1994) 1655-1664.
- Wathes, D.C., Reynolds, T.S., Robinson, R.S., Stevenson, K.R. *J Dairy Sci* 81 (1998) 1778-89.
- Watson, A.J., Westhusin, M.E., Winger, Q.A. *J Reprod Fertil Suppl* 54 (1999) 303-15.