



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

SUBNUTRICION EN OVINOS: EFECTOS SOBRE LA PREÑEZ Y FUNCION UTERINA

por

**Gerardo GARÍN VELÁZQUEZ
Felipe PEÑA MOSCA**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de Doctor en
Medicina Veterinaria
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD
Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2015**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa

Dr. Danilo Fila

Segundo miembro (Tutor):

Lic. Victoria de Brun

Tercer miembro:

Dr. Rafael Aragunde

Cuarto miembro (co-Tutor):

Dra. Ana Meikle

Fecha: 24 de Setiembre de 2015

Autores:

Gerardo Garín Velázquez

Felipe Peña Mosca

TABLA DE CONTENIDO	Páginas
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	4
RESUMEN.....	5
SUMMARY.....	7
INTRODUCCION.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
Ciclo estral en la oveja.....	10
Regulación neuro-endocrina del ciclo estral.....	10
Gestación temprana.....	12
Nutrición y reproducción.....	14
Mediadores entre el estado metabólico y el sistema reproductivo.....	15
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
Objetivos Generales.....	20
Objetivos Específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Diseños experimentales.....	21
Aspectos generales.....	21
Experimento 1.....	22
Experimento 2.....	23
Determinaciones en plasma (Experimentos 1 y 2).....	24
Metabolitos.....	24
Hormonas.....	24
Transcriptos.....	25
Análisis estadísticos.....	26
RESULTADOS.....	27
Experimento 1.....	27
Experimento 2.....	29
DISCUSIÓN.....	32
IMPLICANCIAS DE ESTA TESIS.....	38
CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestras familias por acompañarnos y apoyarnos durante todos estos años y en este momento.

A todos los amigos y compañeros por los momentos compartidos.

Queremos agradecer a nuestras tutoras, Msc. Victoria de Brun y Dra. Ana Meikle por todo el tiempo y apoyo invertido en nosotros.

También al personal del laboratorio de técnicas nucleares por su ayuda y paciencia.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos usados para la cuantificación de ADNc de IGF1 e IGF2 y controles endógenos (PRL19 y HPRT).....Página 26.

Tabla 2. Tasas de fertilidad (% de ovejas preñadas) y de mortalidad embrionaria al día 18 y 40 en ovejas receptoras alimentadas 1,5 M (Grupo Control) y alimentadas 0,5 M (Grupo Subnutrido) con embriones provenientes de ovejas donadoras controles o subnutridas.Página 27.

Tabla 3. Variaciones de peso vivo (PV), condición corporal (CC) y AGNE previo al comienzo de las dietas diferenciales (inicial) y en el momento del sacrificio (final) en ovejas alimentadas 1,5 M (Grupo Control) o 0,5 M (Grupo Subnutrido).....Página 28.

Tabla 4. Variaciones de peso vivo (PV), condición corporal (CC) y concentraciones plasmáticas de AGNE (mM) progesterona al día 7 (ng/ml) factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1,ng/ml) , insulina (μ UI/ml), leptina (ng/ml) y adiponectina (ng/ml) en ovejas preñadas y no preñadas previo al comienzo de las dietas diferenciales (inicio) hasta el día 7 luego del estro en ovejas alimentadas 1,5 M (Grupo Control) o 0,5 M (Grupo Subnutrido).....Páginas 29.

Tabla 5. Variaciones de peso vivo (PV), condición corporal (CC) y AGNE previo al comienzo de las dietas diferenciales (inicial) y en el momento del sacrificio (final) en ovejas alimentadas 1,5 M (Grupo Control) o 0,5 M (Grupo Subnutrido).....Página 29.

Figura 1. Concentraciones plasmáticas de Insulina (μ IU/mL), IGF1 (ng/mL), Leptina (ng/mL) y Adiponectina (ng/mL) en ovejas alimentadas 1.5 (Control, n=9) o 0.5 (subnutridas, n=7) los requerimientos nutricionales de mantenimiento. Los valores se expresan como medias mínimas cuadradas \pm error estándar.....Página 30.

Figura 2. Expresión relativa de transcritos de IGF1 e IGF2 en útero ipsilateral al cuerpo lúteo (n=16) al día 16 del ciclo estral. Los datos son presentados como cuadrados mínimos \pm error estándar.....Página 31.

RESUMEN

La presente tesis consistió en investigar si las reducciones en las tasas de preñez en ovejas subnutridas cuando se transfieren embriones de buena calidad, se asocian con concentraciones diferenciales de las hormonas metabólicas y si la expresión génica endometrial de los factores de crecimiento similares a insulina 1 y 2 son alterados al día 16 del ciclo estral. A su vez aislar los efectos de la subnutrición a nivel embrionario (madre donadora) y a nivel de la madre receptora. Para esto, se realizaron dos experimentos, utilizando el mismo tipo de subnutrición, (la mitad de los requerimientos diarios de mantenimiento, 0,5 M), en ovejas raza Rasa Aragonesa. En el experimento 1, se extrajeron embriones de buena calidad a ovejas donadoras subnutridas y controles los cuales se transfirieron a ovejas receptoras subnutridas y controles. Se estudió el perfil endócrino-metabólico y fertilidad al día 18 y 40 de las receptoras. En el experimento 2, se estudió el perfil endócrino-metabólico y la expresión génica de factores de crecimiento en el endometrio ipsilateral al CL al día 16 del ciclo estral. En ambos experimentos la subnutrición disminuyó el peso vivo y la condición corporal; aumentaron las concentraciones de NEFA y disminuyeron las de insulina. Mientras que en el experimento 1 no se observaron diferencias en las concentraciones de IGF1 y leptina, en el experimento 2 los animales subnutridos presentaron menores niveles plasmáticos de IGF1 y leptina en relación a los controles. En ninguno de los experimentos se encontraron diferencias en las concentraciones de adiponectina. En el experimento 1, el tratamiento nutricional de las donadoras no afectó la preñez de las receptoras cuando embriones de buena calidad fueron transferidos. Independientemente del origen del embrión, en receptoras controles la preñez al día 40 fue de 72% y de las receptoras subnutridas fue de 55% ($p=0.17$); esto se ve con mayor evidencia al analizar la mortalidad embrionaria, las ovejas receptoras subnutridas tendieron a presentar una mayor mortalidad embrionaria tardía que las controles ($p=0.11$). Por otro lado las ovejas subnutridas preñadas tendieron a presentar mayores concentraciones de insulina que las subnutridas no preñadas ($p=0.10$). En el experimento 2, no se observaron diferencias en la expresión relativa de transcritos de IGF1 e IGF2 en útero. En esta tesis se encontró que alteraciones en el estado metabólico-materno debido a la subnutrición están asociadas al éxito reproductivo en ovejas. Además cuando se transfieren embriones de buena calidad, las fallas reproductivas en los animales subnutridos se asocian principalmente a

factores maternos, y no a factores provenientes del embrión. La subnutrición no afectó la expresión de IGF1e IGF2 en el endometrio ipsilateral al CL al día 16 del ciclo estral y esto no estuvo relacionado a los cambios a nivel sistémico de las concentraciones de IGF1.

SUMMARY

This thesis investigated if the reductions in pregnancy rates in undernourished sheep when good quality embryos are transferred, are associated with differential concentrations of metabolic hormones and whether endometrial gene expression of growth factors similar to insulin 1 and 2 are altered at day 16 of the estrous cycle. Two experiments were conducted, using the same type of undernourishment, (half of the daily maintenance requirements, 0.5 M) in Rasa Aragonesa ewes. In experiment 1, two good quality embryos from undernourished ewes and control donor ewes were transferred to low and control recipients ewes and endocrine-metabolic profiles of the recipient ewes were studied. In experiment 2, the endocrine-metabolic profile and gene expression of IGF1 and IGF2 in the ipsilateral uterine horn to the CL at day 16 of the estrous cycle was studied. In both experiments, under-nutrition decreased body weight and body condition, concentrations of NEFA increased and insulin concentrations decreased. While in experiment 1 no differences were observed in IGF1 and leptin concentrations, in experiment 2 under-nourished animals presented lower IGF1 plasmatic and leptin levels related to controls. No differences in adiponectin concentrations were found. In experiment 1, the nutritional treatment of the donor did not affect pregnancy of the recipient ewes when good quality embryos were transferred. Regardless the origin of the embryo in control recipient ewes at day 40 pregnancy rate was 72% and in undernourished recipients was 55% ($p = 0.17$). Undernourished pregnant ewes tended to have higher insulin concentrations than non-pregnant undernourished ewes ($p = 0.10$). In Experiment 2, no differences in the relative expression of IGF1 and IGF2 transcripts in uterus were observed. We found that maternal metabolic-state alterations due to undernutrition are associated with reproductive success in sheep. Furthermore, good quality embryos transfer, reproductive failure in undernourished animals is mainly associated with maternal factors, and not to factors from the embryo. Undernutrition did not affect IGF1 and IGF2 expression in the ipsilateral endometrium to the CL at day 16 of the estrous cycle and this was not related to systemic changes of IGF1 concentrations.

INTRODUCCIÓN

La principal limitante en cualquier sistema productivo animal que se dedique a la cría, es la eficiencia reproductiva. Datos recientes indican que la señalada, en Uruguay se ha ubicado entorno al 73 % (Salgado y col., 2013), la misma depende de la fertilidad, la cantidad relativa de ovejas que presentan partos múltiples (fecundidad) y la sobrevivencia de los corderos.

En nuestro país la tasa de fertilización se encuentra entre 75 y 94% variando según la oferta de forraje, calidad de la pastura y condición corporal (Fernández Abella y col., 2007). La mortalidad embrionaria precoz es quien representa el porcentaje mayor de muertes (entre 15 y 30%), mientras las pérdidas tardías de embriones son de menor magnitud entre el 5 y 7 % (Edey, 1969; Wilkins y Croker, 1990). En ovinos un 40% de las ovulaciones no se corresponden con embriones viables el día 12 de gestación (Ashworth, 1995). Diversas causas pueden desencadenar mortalidad embrionaria. Factores como el estrés, el calor, la nutrición e infecciones uterinas pueden actuar impidiendo un buen diálogo madre-embrión. Se cree que la mortalidad embrionaria en la etapa de pre-implantación se debe a un desarrollo asincrónico, con retraso en el crecimiento del embrión (Goff, 2002).

Durante la gestación temprana, los eventos hormonales asociados con la formación de cuerpo lúteo y la síntesis embrionaria de proteínas, prostaglandinas, y los esteroides resultan en la síntesis y la liberación de productos de secreción del endometrio en el lumen uterino. El embrión en respuesta a los productos de secreción endometriales se desarrolla y crece. Sin embargo una alta mortalidad embrionaria sucede cuando los productos de secreción endometriales se encuentran alterados de tal manera que están asincrónicos con el embrión (Pope, 1988).

Se ha postulado que la mortalidad embrionaria principalmente se debe a fallas en la comunicación entre el embrión y la madre (Goff, 2002). Es importante que exista una adecuada sincronía entre el ambiente materno y el embrión, para asegurar la supervivencia embrionaria. Esta sincronía está dada por las secreciones de hormonas, factores de crecimiento, proteínas y citoquinas, que producen tanto el endometrio como el embrión y liberan a la interfase embrio-maternal, ya sea en forma autócrina o parácrina, y que determinan por tanto dicha sincronía (Martal y col., 1997).

La subnutrición, podría interferir en la relación madre-embrión, afectando dicha sincronía, aumentando de ese modo las pérdidas embrionarias ya que se conoce que tiene efectos negativos en la calidad ovocitaria, lo que provoca una disminución en la tasa de división celular y en la formación del blastocisto (Borowczyk y col., 2006; Ashworth y col., 2008). Los mecanismos fisiológicos que controlan el balance de energía están recíprocamente vinculados a las que controlan la reproducción, y en conjunto, estos mecanismos son los responsables del éxito reproductivo el cual depende de concentraciones hormonales fluctuantes (Schneider y col., 2004).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ciclo estral en la oveja

El ciclo estral en la hembra se da durante la estación reproductiva en períodos sucesivos cortos que se repiten en forma estacional, por ello decimos que la oveja es poliéstrica estacional, con ciclos ovulatorios que se producen cuando el fotoperíodo es decreciente (Karsch, 1980). El ciclo estral tiene una duración promedio de 17 días. La oveja es receptiva al macho únicamente en un período de tiempo de 24 a 36 horas, lo que se denomina celo, y de no quedar preñada repetirá todo el ciclo mientras dure el fotoperíodo (Ungerfeld, 2011).

El factor más importante que regula el período de actividad sexual es la variación estacional de la longitud del día, pero a su vez puede ser manipulado por otros factores como la nutrición, aspectos sociales y las condiciones de explotación (Forcada., 1996). La melatonina es producida por la glándula pineal con un marcado ritmo circadiano, con un máximo de producción en la noche. De esta manera los cambios en el perfil de secreción por variaciones en la duración del día, dan información al organismo de variaciones estacionales del fotoperíodo (McMillen y col., 1995; Arendt, 1998; Malpoux y col., 1999). La duración de secreción de melatonina es procesada por neuronas que regulan la secreción de GnRH estimulando de esta manera la función reproductiva (Arendt, 1998).

Regulación neuro-endócrina del ciclo estral

El control de la reproducción en los mamíferos está regulado por el sistema nervioso y el sistema endócrino, siendo el hipotálamo quien los une (Fernández Abella, 1993; Hafez y Hafez, 2002). En el proceso reproductivo intervienen tres elementos básicos: el hipotálamo, la hipófisis y el tracto reproductivo (Abecia y Forcada, 2010).

El hipotálamo es una estructura del sistema nervioso central que se comporta como un traductor endócrino, transformando la actividad nerviosa en señales hormonales (Abecia y Forcada, 2010). Existen conexiones neurales entre el hipotálamo y la parte posterior de la hipófisis y conexiones vasculares (sistema porta) entre el mismo y la parte anterior de la hipófisis (Hafez y Hafez, 2002).

La secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas GnRH es controlada por dos áreas separadas en el hipotálamo. El centro tónico es el responsable de la secreción basal, y el centro de ondas o centro preovulatorio es el responsable de la liberación preovulatoria de GnRH que estimula el pico preovulatorio de LH (Atuesta y Gonella Diaz, 2011). La GnRH es liberada hacia el sistema porta hipotálamo-hipofisario, para la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) por parte de la adenohipófisis o hipófisis anterior (Fernández Abella, 1993; Hafez y Hafez, 2002; Abecia y Forcada, 2010).

La FSH es secretada en forma de picos, habiendo dos picos principales durante el ciclo estral, uno que coincide con el pico preovulatorio de LH y otro que se encuentra muy próximo a la ovulación, después de 24-30 horas del primer pico (Fernández Abella, 1993). La FSH promueve el crecimiento y la maduración folicular (Hafez y Hafez, 2002). La LH es secretada en pulsos, en la etapa preovulatoria los pulsos aumentan su frecuencia y disminuyen su amplitud, mientras que en presencia de cuerpo lúteo la frecuencia es baja y la amplitud es mayor (Fernández Abella, 1993).

La caída de la progesterona determina que se produzca una retroalimentación positiva entre GnRH y la LH por un lado y con estrógenos por otro. En los ovarios, las células tecales de folículos en crecimiento secretan estrógenos y algo de andrógenos, convirtiéndose las mismas a estrógenos en las células de la granulosa (Ungerfeld, 2011). El estradiol incrementa la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH de forma que se produce una descarga masiva de LH. El pico de LH determina la ruptura y luteinización del folículo de tal manera que caen los niveles de estrógenos (Gibbons y Cueto, 1995; Ungerfeld, 2011).

Los principales factores luteotróficos son hipofisarios, los mismos son la LH y la prolactina, los receptores de los mismos van aumentando en las células luteales hasta la mitad de la fase luteal indicando que el cuerpo lúteo es muy dependiente de ambos a partir de ese momento (Abecia y Forcada, 2010). Luego de la ovulación las células tecales junto a las células de la granulosa, se luteinizan conformando el cuerpo lúteo el cual secreta progesterona (Hafez y Hafez, 2002). La progesterona llega a su máxima concentración 7 a 8 días luego de la ovulación, y la principal fuente de secreción es el cuerpo lúteo. Esta se mantiene hasta el día 12 del ciclo estral y luego baja su concentración alrededor del día 14-15 en caso de no haberse producido una gestación (Fernández Abella, 1993).

En caso de ocurrir una gestación, los niveles de progesterona se mantendrán altos durante toda la gestación y la misma es secretada primero por el cuerpo lúteo y luego por la placenta suprimiendo el estro y la ovulación (Hafez y Hafez, 2002). Esta hormona tiene un papel esencial en la reproducción; altos niveles de progesterona son necesarios no solo para facilitar la implantación sino también para favorecer el desarrollo uterino, disminuir el desarrollo de miometrio y de esa manera mantener el embarazo (Graham y Clarke, 1997).

Durante el ciclo estral se producen diferentes cambios en el aparato reproductor de la hembra. Los cuernos uterinos se vuelven hipertrofiados, al igual que el oviducto y aumentan sus secreciones en el estro por acción de los estrógenos. El cérvix sufre cambios y aumenta la producción de mucus. El mucus vaginal en el proestro es claro y escaso, en el estro pasa a ser más abundante y de color claro, en el metaestro es más cremoso, mientras que en el diestro es caseoso (Fernández Abella, 1993).

El endometrio uterino secreta la prostaglandina F2alfa. Un aumento en las concentraciones plasmáticas de esta prostaglandina induce la luteólisis y por lo tanto el descenso en los niveles de progesterona y la aparición de un nuevo período de estro (Gibbons y Cueto, 1995). En los dos primeros tercios de la fase luteal, la progesterona actúa a nivel endometrial aumentando el almacenamiento de fosfolípidos y la actividad enzimática para la conversión de ácido araquidónico a prostaglandina F2alfa, a su vez la misma inhibe la formación de receptores endometriales para el estradiol y oxcitocina (Abecia y Forcada, 2010). Durante la fase luteal tardía, la progesterona inhibe sus propios receptores en el útero, por lo que pierde la dominancia en la función uterina. Además, el aumento de los niveles de estrógenos proveniente de los folículos en crecimiento induce un incremento en la cantidad de receptores a oxcitocina desencadenándose de esta manera la ruptura del cuerpo lúteo (Ungerfeld, 2011).

Gestación temprana

La gestación puede ser dividida en dos grandes etapas de desarrollo, la embrionaria (fecundación hasta los 35 días) y la fetal (día 36 hasta el parto) (Fernández Abella, 1993). Por otro lado el desarrollo embrionario puede ser dividido en temprano (previo al reconocimiento materno de preñez) y tardío posterior al mismo.

Luego de la fecundación el embrión entra el cuerno uterino alrededor del día 4 post-celo en el estado de mórula. Hacia el día 6 se forma el blastocito joven, las células se compactan y por entrada del líquido extracelular se forma una cavidad rodeada por células trofoblásticas constituyendo el estadio de blastocisto. Posteriormente, se expande y eclosiona entre los días 8 y 9 (Spencer y col., 2004). El día 11 el embrión adopta una forma tubular y luego se elonga, volviéndose filamentoso entre los días 12 y 16. La elongación del blastocisto marca el comienzo de la implantación, aunque la adhesión firme al endometrio no ocurre hasta el día 16 (Wintenberger y Flechon, 1974). Esto no ocurre in-vitro y es dependiente de múltiples factores de secreción endometriales (Goff, 2002).

En los rumiantes domésticos no se produce invasión del endometrio al momento de implantación, por lo tanto, la misma se logra definitivamente mediante la adhesión de las células trofoblásticas mononucleares al epitelio endometrial luminal y la formación de sincitios (Spencer y col., 2004). La diferenciación uterina para apoyar el desarrollo del embrión e implantación es coordinada por estrógenos y progesterona en forma espacio-temporal pudiendo ocurrir la misma en un lapso de tiempo restringido (Huet-Hudson y col., 1989; Carson y col., 2000).

Antes de la implantación los embriones se nutren únicamente de productos de secreción que se acumulan en la luz uterina fenómeno llamado nutrición histotrófica. Dentro de la misma son particularmente importantes las proteínas de unión a retinol y los factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2 (IGF1-IGF2) (Ashworth, 1995). El desarrollo del embrión preimplantatorio requiere de factores que se originan en el tracto reproductivo bajo la influencia de progesterona y estrógenos que actúan de manera parácrina regulando el crecimiento embrionario, estos factores son producidos también por el embrión en sí mismo (Paria y Dey, 1990; Stewart y Cullinan, 1997). Esto es consistente con la expresión de varios factores de crecimiento, citoquinas y sus receptores en el embrión y el útero, así como efectos beneficiosos de estos factores sobre el desarrollo y las funciones embrionarias (Paria y Day, 1990; Carson y col., 2000; Paria y col., 2001).

Como ya mencionamos la mayor mortalidad embrionaria se da en la vida embrionaria temprana (Ashworth, 1995). Los eventos biológicos que transcurren durante estos días, son determinantes para la supervivencia del embrión (Watson y col., 1999). Durante este periodo hay complejas interacciones entre el embrión, ovarios y endometrio que son necesarios para el establecimiento de la preñez (Goff, 2002).

Nutrición y reproducción

El estado metabólico de un animal puede definirse como la cantidad de energía disponible en los tejidos en un momento dado y depende por tanto de la diferencia entre la cantidad de la energía disponible y la cantidad de energía gastada. 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 (Blache y col., 2006).

La cantidad de energía gastada varía de acuerdo a la edad y el estado fisiológico del animal y comprende la energía gastada en funciones que son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis y la energía gastada en necesidades fisiológicas adicionales, tales como el crecimiento y la reproducción (Blache y col., 2006).

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado metabólico pueden depender de la historia metabólica reciente (alimentación, efecto dinámico) o lejano (CC, efecto estático), concepto denominado memoria metabólica (Chilliard y col., 2005; Zhang y col., 2005; Blache y col., 2006; Fernández-Foren., 2011).

La condición corporal es una medida subjetiva del estado nutricional del animal y se basa en la determinación del estado de reservas energética del animal (Russel, 1984). Actualmente la más utilizada es la escala de 5 puntos propuesta por (Russel y col., 1969), donde 1 representa a un animal emaciado y 5 a un animal obeso. La técnica consta en palpar los procesos espinosos y transversos de las vértebras lumbares evaluando la cobertura grasa y muscular (Jefferies y col., 1961).

La determinación de la condición corporal se considera una herramienta útil en el manejo de una majada, el conocer el estado nutricional de los animales le permite al productor tomar las decisiones adecuadas en momentos críticos (Crempien y col., 1993).

El peso vivo no es un buen indicador del grado de reservas debido a las variaciones en el tamaño corporal de los animales. El uso de la condición corporal, permite comparar el estado nutricional del ovino independientemente de las diferencias debidas al efecto de la raza, el tamaño corporal, la categoría, el estado fisiológico (oveja preñada vs. oveja vacía), el llenado del tracto gastrointestinal, la cantidad de lana presente en cada animal, así como del grado de humedad de la misma y del sistema productivo (intensivo vs. extensivo) (Montossi y col., 1998).

En ovinos se ha visto una fuerte correlación negativa entre los niveles plasmáticos de progesterona periférica y el nivel de ingestión (Parr y col., 1987,1993; Rhind y col., 1989). Este hecho parecería contrastar con la menores tasas de preñez asociadas a la subnutrición (Abecia y col., 2006), lo que sugiere que la llegada de la hormona al útero puede no estar reflejada por sus concentraciones circulantes.

Mediadores entre el estado metabólico y el sistema reproductivo

Las mayores demandas energéticas en la oveja ocurren principalmente durante el crecimiento fetal, la lactancia y pubertad. Si bien no se conoce con claridad cuáles son los requerimientos de nutrientes para la foliculogénesis, es poco probable que sean significativos en relación a la utilización de energía de todo el cuerpo (Scaramuzzi y col., 2006). Por esto es más probable que los efectos de los cambios en el estado metabólico sobre la gestación sean ejercidos por una señalización diferencial de las hormonas metabólicas, más que por una insuficiencia de nutrientes “per se” (Sosa y col., 2009a; de Brun, 2014).

Las respuestas endócrinas y metabólicas durante la subnutrición, ante todo buscan mantener el equilibrio del medio interno durante ciertos límites (homeostasis), dándose numerosos cambios en las concentraciones hormonales y en su sensibilidad tisular (Chilliard y col., 1998). Mientras que el mantenimiento de la homeostasis aseguran la perpetuación de los individuos, los cambios en hormonas teleofóricas aseguran la sobrevivencia de las especies actuando sobre la reproducción en sí, pero también en la gestación, lactación y crecimiento (Chilliard y col., 2000).

Se conoce que los factores que median principalmente los cambios nutricionales y el ambiente uterino son la insulina, IGF1, IGF2 y leptina (Blache y col., 2006).

La hormona del crecimiento (GH) juega un papel clave en la subnutrición regulando la utilización de glucosa (Renaville y col., 2002; Flint y col., 2003). El eje somatotrópico

es un sistema multihormonal, que consiste principalmente en la GH, IGFs, sus proteínas carrier asociadas y sus receptores (Breier, 1999; Renaville y col., 2002; Etherton, 2004; Kim, 2014).

En períodos de subnutrición existe un desacoplamiento hepático del eje GH-IGF. Si bien hay aumento en la secreción de GH se reduce la expresión a nivel hepático de GHR de manera que disminuye la secreción de IGF1 (Chilliard y col., 1998; Breier, 1999; Kobayashi y col., 1999; Kim, 2014). Además, también cambian las concentraciones relativas de proteínas de unión a IGF (IGFBPs) en plasma (Jones y Clemmons, 1995; Stevenson y Wathes, 1996; Keller y col., 1998).

Aunque estructuralmente son similares a la insulina, los IGFs difieren en cuanto a su sitio de origen, modo de acción y forma circulante. A diferencia de la insulina que es secretada únicamente por el páncreas, IGF1 e IGF2 son secretados principalmente por el hígado, y también por tejidos periféricos (Kim, 2014) entre los que se encuentran órganos reproductivos como ovario, oviducto, útero y placenta, actuando en los mismos en forma endócrina, parácrina y autócrina (Thissen y col., 1994; Stevenson y col., 1994).

En el útero, tanto IGF1 como IGF2 estimulan la proliferación celular y la diferenciación del embrión y de las células endometriales; estos efectos estimulantes del crecimiento se consideran estar mediada principalmente por el receptor de IGF1 (IGF1R) y las IGFBP, que aumenta aún más la complejidad de este sistema (Kaye, 1997; Wathes y col., 1998; Keller y col., 1998).

El IGF1 cumple un papel importante en la reproducción de los rumiantes, asociándose con un aumento en la fertilidad y mejor desempeño embrionario, además de una menor edad al servicio y en la tasa de concepción al mismo en bovinos (Velázquez y col., 2008). Se ha postulado, que las concentraciones plasmáticas de IGF1 se ven alteradas con la subnutrición, provocando una disminución en los niveles de esta hormona en ovejas sometidas a restricción nutricional (Hua y col., 1995).

En la regulación de la foliculogénesis el IGF1 e IGF2 tienen un papel importante habiendo una compleja interacción entre FSH, esteroides, factores de crecimiento y otras hormonas que controlan el desarrollo folicular (Lenz Souza y col., 2007).

La elevación plasmática de IGF1 está ampliamente relacionada al estradiol y se torna importante no solamente para el desarrollo folicular, sino también para promover de forma directa la supervivencia del espermatozoide y del embrión precoz; o

indirectamente por aumentar las secreciones del útero y oviducto (Lenz Souza y col., 2007).

Es importante destacar que ambos IGFs estimulan el desarrollo de los embriones durante la pre-implantación, actúan en el desarrollo fetal y controlan el desarrollo placentario (Wathes y col., 1998; Keller y col., 1998).

Existe evidencia de que las modificaciones en la dieta cambian la abundancia sérica de las IGFBP en animales y humanos (Thissen y col., 1994). Existen 6 tipos de proteínas de unión a las IGFs que modulan la acción de las mismas (Reynolds y col., 1997; Lenz souza y col., 2007; García-García., 2012). En el tracto reproductivo ovino se ha demostrado la expresión del ARNm de IGF1, IGF2 y sus receptores, y algunas de las IGFBPs (Stevenson y col., 1994; Reynolds y col., 1997). La actividad reguladora de las IGFBP varía según el día del ciclo estral y el estado reproductivo, a su vez la concentración de los diferentes tipos de las mismas varía entre endometrio, líquido uterino y plasma (Keller y col., 1998). A nivel celular las IGFBP se cree que generalmente inhiben las funciones de IGFs pero bajo algunas condiciones pueden potenciar los efectos metabólicos y mitogénicos de las mismas (Reynolds y col., 1997).

Por otro lado, la insulina es secretada por los islotes pancreáticos y tiene múltiples efectos en el metabolismo, entre ellos facilita la entrada de glucosa a las células activando sistemas de transporte y estimula la síntesis de triacilglicéridos y glucógeno (García Sacristan., y col 1995; Kaye, 1997). Esta hormona es uno de los indicadores metabólicos más eficientes en reflejar el estado nutricional de las ovejas, obteniendo variaciones significativas según el grado de alimentación y la condición corporal. (Caldeira y col., 2007).

En períodos de subnutrición la concentración de insulina disminuye, esto lleva a que la estimulación del anabolismo este disminuída (Sosa y col., 2006). Así, el anabolismo es inhibido directamente por la disminución en las concentraciones de insulina, e indirectamente por la falta de efecto estimulador de la insulina sobre la sensibilidad de GH (GHR) que limita la síntesis hepática de IGF1 (de Brun, 2014).

Las concentraciones plasmáticas de insulina e IGF1 aumentan después de una suplementación a corto plazo, lo que aumenta la capacidad de respuesta a las gonadotrofinas y estimula el crecimiento folicular (García-García, 2012).

Otra hormona asociada al estado nutricional es la leptina, la cual es una hormona producida por el tejido adiposo y esta positivamente relacionada con el nivel de grasa

corporal (Chilliard y col., 1998; Delavaud y col., 2000). Es una proteína implicada en la regulación de la homeostasis metabólica, la ingesta y almacenamiento de energía, teniendo también efectos sobre la fertilidad y sistema inmune (Chilliard y col., 2005). Sirve como una señal para el sistema nervioso central (SNC) ya que se ha encontrado receptores para esta en el plexo coroide y en el hipotálamo (Chilliard y col., 1998). La síntesis de leptina es muy sensible a cambios en el estado metabólico, aumenta frente a la sobrealimentación o suplementación y disminuye frente a la subnutrición o ayuno, asociándose su reducción con un aumento del apetito y una disminución de la tasa metabólica (Chilliard y col., 2005; Sosa y col., 2009a; Fernández-Foren y col., 2011). Los receptores de leptina (Ob-R) han sido localizados en el eje hipotálamo, hipófisis anterior, en ovario y en endometrio, testículos (células de Leydig). Esta expresión multifocal de leptina así como la presencia de sus receptores implica la existencia de una regulación nutricional de la leptina en la reproducción (Moschos y col., 2002). En ratas se demostró que la leptina añadida al medio de cultivo promueve el crecimiento del embrión en la etapa de pre-implantación (Kawamura y col., 2002).

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) (Chilliard y col., 1998; Ingvarsen y Andersen, 2000; Burke y Roche, 2007), que generalmente se acompaña con un incremento en la producción de cuerpos cetónicos. La concentración de AGNE puede ser utilizada como un indicador de grados moderados de subnutrición ya que expresa el equilibrio entre lipólisis y lipogénesis (Russel y col., 1967).

Hace varios años Scherer y col., (1995) describían una proteína altamente expresada por los adipocitos la cual creía que podría estar relacionada con la homeostasis y control de status energético, esta proteína es la adiponectina. La adiponectina sensibiliza los tejidos periféricos a la insulina, aumentando el consumo de glucosa y la oxidación de ácidos grasos, teniendo un papel importante en la regulación de la homeostasis energética (Ye y col., 2013; Saremi y col., 2014).

La misma posee además efectos sobre la reproducción, ya que en el ovario estimula la estereidogénesis por las células de la granulosa (Monget y col., 2008). La adiponectina disminuye la secreción de GnRH (Cheng y col., 2011) e inhibe la liberación de GH y LH (Rodríguez-Pacheco y col., 2007). Si bien existe mucha literatura reciente sobre su rol en el metabolismo y la reproducción, hay escasa información respecto al rol de adiponectina en ovinos (Kasimanickam y

Kasimanickam, 2011; de Brun, 2014). Se han identificado dos tipos de receptores de adiponectina, ADIPOR1 y ADIPOR2, con funciones diferentes (Yamauchi y col., 2003). ADIPOR1 está altamente expresado en el músculo esquelético, mientras que ADIPOR2 está altamente expresado en el hígado (Yamauchi y col., 2007).

De lo expuesto anteriormente se evidencia que, si bien están descritos los efectos causados por la subnutrición sobre la fertilidad, la viabilidad embrionaria y en menor medida sobre el ambiente uterino en ovinos, aún se desconocen los mecanismos por los que estos efectos se producen.

HIPÓTESIS

La subnutrición materna provoca pérdidas embrionarias cuando embriones de buena calidad son transferidos, y esto se asocia con concentraciones diferenciales de las hormonas metabólicas.

Los perfiles endócrinos y la expresión génica endometrial de los factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2 son alterados con la subnutrición al momento de la implantación.

OBJETIVOS

Generales

Investigar integralmente las modificaciones del sistema endócrino materno que pueden desencadenar los efectos de la subnutrición sobre el eje reproductivo durante la preñez. Además investigar el efecto de la subnutrición sobre la expresión génica de factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2 en el endometrio ipsilateral al cuerpo lúteo (CL) al día 16 del ciclo estral

Específicos

1. Investigar si las fallas reproductivas asociadas a la subnutrición se asocian con diferencias en la concentración de señales endócrinas (IGF1, insulina, adiponectina, leptina) maternas durante la preñez temprana.
2. Estudiar los efectos de la subnutrición sobre la expresión génica de factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2 en el endometrio ipsilateral al CL al día 16 del ciclo estral.

MATERIALES Y MÉTODOS

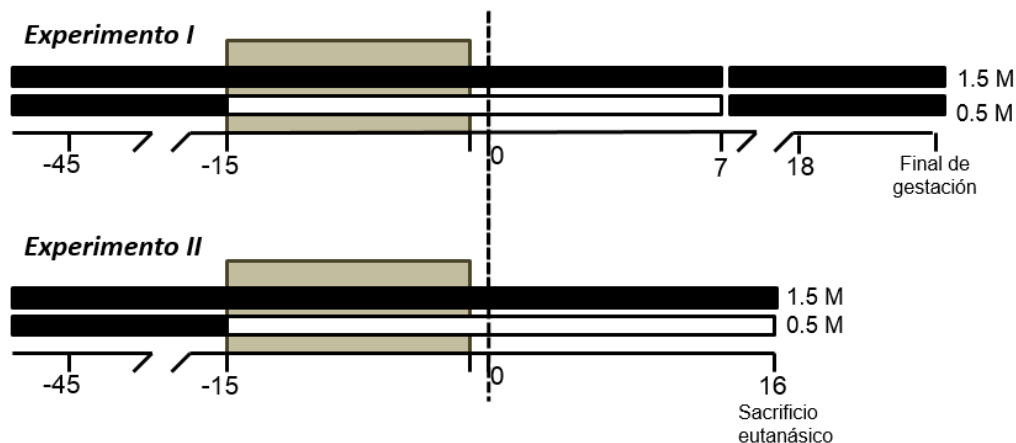
Diseños experimentales

Aspectos generales

Los experimentos de esta tesis se realizaron en el Servicio de Experimentación Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España (Latitud 41°41'N). Se utilizaron ovejas adultas de la raza Rasa Aragonesa durante la estación reproductiva, para esta raza, en esta latitud (Forcada y col., 1992). Los protocolos fueron aprobados por la Comisión Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

Para sincronizar los celos se utilizó un tratamiento intravaginal de 14 días con esponjas impregnadas en progestágenos (Acetato de Fluorogestona, 40mg, Intervet S.A., Salamanca, España), al cabo del cual se administraron entre 285 y 300 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) por vía intramuscular. Los celos (identificados como día 0 del ciclo sexual o de la gestación) se detectaron cada 8 horas y se realizaron con retarjos. Los animales se alimentaron una vez al día (por la mañana) en base a una dieta compuesta por concentrado y heno de cebada, con libre acceso al agua. El concentrado estuvo compuesto por cebada (85%) y harina de soja (15%). En todos los experimentos los animales se alimentaron con dietas para proveer 1,5 o 0,5 veces los requerimientos diarios de mantenimiento (M) (AFRC, 1993). La dieta 1,5 M ofrecida colectivamente asegura un mantenimiento del PV y la CC (grupo control), mientras que la dieta 0,5 M provoca una disminución en el mismo período de tiempo de aproximadamente un 10% tanto en el PV como en la CC (grupo bajo), como ha sido demostrado anteriormente (Abecia y col., 1995, 1997; Lozano y col., 1998). El PV y la CC de los animales se controlaron periódicamente durante los experimentos. La CC fue determinada por un único observador por palpación de las apófisis vertebrales en la región del lomo, en una escala de 0 (emaciada) a 5 (obesa) (Russel y col., 1969). Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos con heparina. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 1000 g y el plasma se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Se realizaron dos experimentos:



Experimento 1:

A mediados de octubre, 97 ovejas maduras Rasa Aragonesa fueron mantenidas en piquetes con áreas descubiertas y ofreciéndoles una dieta formulada para suplir sus necesidades de mantenimiento (AFRC, 1993). Los animales fueron mantenidos durante un mes en estas condiciones antes de comenzar el experimento, permitiendo de esta manera su adaptación. La dieta estaba compuesta por 0.42 kg de ración pelleteada y 0.70 kg de heno de cebada por día, proporcionando 7.8 MJ de energía metabolizable por oveja. De este rebaño, 45 ovejas fueron usadas como donadoras de embriones y 52 como receptoras. De las 45 ovejas donadoras, 20 ovejas fueron asignadas al grupo control (1.5 M) y 25 ovejas al grupo subnutrido (0.5 M). Asimismo, de las 52 receptoras, 25 fueron asignadas al grupo control y 27 al grupo subnutrido. La dieta consistía en 0.8 o 0.5 kg de paja de cebada y 0.55 o 0.1 kg de ración pelleteada, para grupo control y subnutrido respectivamente. Este régimen se mantuvo hasta el día de recolección de embriones (día 7). Se tomaron registros de peso corporal (PV) y condición corporal (CC) (Russel y col., 1969), los cuales fueron determinados al día de inserción de la esponja (día -15), retiro de esponja (día -1) y transferencia embrionaria (día 7).

Las muestras de sangre se recogieron en los días -14, -1, 7 y 18 para determinar las concentraciones en plasma de NEFA, insulina, IGF1, leptina y adiponectina.

La superovulación de ovejas donadoras (grupo control n=20, grupo subnutrido n=25) fue inducida con 210 UI de FSHp (Folltropin; Bioniche Animal Health, Dublin, Ireland) y 500 IU eCG (Folligon, MSD Salud Animal, Madrid, Spain) con una única administración intra-muscular 48h antes del retiro de la esponja intravaginal. Siete días después del comienzo del estro, los embriones fueron colectados mediante laparotomía medio-ventral y clasificados según su etapa de desarrollo y de acuerdo a los postulados por Winterberger-Torres y Sevellec, (1987). Los efectos del nivel de energía en ovejas donadoras en la performance de embriones y los niveles de señales metabólicas y hormonales fueron previamente descritas (Abecia y col., 2013).

Las ovejas receptoras (grupo control n=25, grupo subnutrido n=27) recibieron dos embriones de buena calidad (mórula compacta y blastocisto expandido temprano). Se realizó una incisión de 1 cm en línea media abdominal y el cuerno uterino ipsilateral al ovario con al menos un cuerpo lúteo funcional (CL) fue expuesto usando clamps. Para llevar a cabo la transferencia embrionaria, los embriones fueron aspirados desde el plato con 20 μ L de medio, utilizando un tubo capilar de vidrio conectado a una jeringa de 1mL. La punción fue realizada en el lado dorsal del cuerno uterino, en su tercio superior localizando los embriones en la luz uterina.

La fertilidad temprana fue determinada cuando las concentraciones plasmáticas de progesterona al día 18, se encontraban por encima de 1 ng/mL, mientras que al día 40 la preñez fue confirmada por ultrasonografía.

Experimento 2:

Se utilizaron 30 ovejas Rasa Aragonesa adultas, secas en período de actividad sexual, con una condición corporal en torno a 2,75 estable durante 30 días. Los animales se asignaron al azar en dos grupos con dos dietas distintas para cubrir 1,5 o 0,5 veces las necesidades de mantenimiento. Se determinó peso y condición corporal una vez por semana. Se obtuvieron muestras de sangre con la misma frecuencia que el experimento anterior. Las ovejas mantuvieron las dietas experimentales hasta el sacrificio. El día 16 del ciclo estral se realizó el sacrificio eutanásico de todos los animales y se retiró el tracto reproductivo rápidamente. Se obtuvieron muestras de la zona media de los cuernos ipsilaterales al cuerpo lúteo, que se congelaron en nitrógeno líquido para estudios de expresión génica.

Determinaciones en plasma (Experimentos 1 y 2)

Todas las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de República, Uruguay.

Metabolitos

En el experimento 1, las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (AGNE) fueron determinados por un kit comercial (NEFA-HR (2) Wako Chemicals GmbH, Richmond, Estados Unidos) y determinado por un lector de placa de múltiples pocillos (Multiskan EX; Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). La sensibilidad del ensayo fue de 0.01 mmol/L y el coeficiente de variación intraensayo fue de 1.7 %.

En el experimento 2, los AGNE se determinaron mediante un kit comercial (AGNE-C, Wako Chemicals GmbH, Alemania) según Sosa y col., (2006), en un multi-analizador (Vitalab Spectra 2, Vital Scientific). El coeficiente de variación intraensayo fue de 1.5%.

Hormonas

Las concentraciones de insulina y IGF-I se midieron utilizando ensayos inmunoradiométricos (IRMA) con kits comerciales (INS-IRMA; DIA Source Immuno Assays S.A, Bélgica e IGF-I-RIACT Cis Bio international, GIF-SUR-YVETTE CEDEX, Francia, respectivamente). Todas las muestras se determinaron en un solo ensayo para cada hormona. Para la insulina, el límite de detección fue 1,1 μ UI/mL uUI y el coeficiente variación (CV) intraensayo para el control 1 (22,3 μ UI/mL) y 2 (55,5 μ UI/mL) fueron 5,3 y 8,6%, respectivamente. Para IGF-I, el límite de detección del ensayo fue de 0,29 ng/mL, y el CV intraensayo para el control 1 (41,1 ng/mL) y el control 2 (521,5 ng/mL) fueron 5,54 y 5,34%, respectivamente. Las concentraciones de leptina se determinaron mediante un radioinmunoensayo en fase líquida (RIA) utilizando un kit comercial de múltiples especies leptina (RIA kit, Millipore, EE.UU.) previamente reportado en bovinos (Pinotti y Rosi., 2006). El RIA tuvo una sensibilidad de 1,4 ng/mL. Todas las muestras se determinaron en el mismo ensayo y el CV intraensayo para el control 1 (4,2 ng/mL) y el control 2 (18,8 ng/mL) fueron 7 y 5,16%, respectivamente.

Las concentraciones de adiponectina se midieron con un kit RIA humana (HADP-61 HK, Millipore, EE.UU.), utilizando muestras de plasma sin diluir. La sensibilidad del ensayo fue de 1,54 ng/mL. Todas las muestras se determinaron en el mismo ensayo

y el CV intraensayo para el control 1 (12,2 ng/mL) y el control 2 (95,4 ng/mL) fueron 9,6 y 6,2%, respectivamente.

Las concentraciones de progesterona se determinaron por RIA en fase sólida utilizando kits comerciales (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA) según Sosa y col., (2006). La sensibilidad del ensayo fue de 0.02 ng/L y el coeficiente de variación intraensayo fue de 10.3 %.

Transcriptos

Se extrajo ARN total de útero y utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguidos de precipitación con cloruro de litio y tratamiento con DNasa utilizando un kit DNA-free™ (Ambion, Austin, TX, USA). Para cada muestra, se sintetizó ADN copia (ADNc) mediante transcripción reversa usando una transcriptasa SuperScript III (Invitrogen) con primers oligo-dT y 1ug de ARN total añadido como molde.

Se determinó la expresión génica mediante PCR en tiempo real o cuantitativo (qPCR), utilizando el equipo Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia).

Las secuencias producto del PCR en tiempo real y la longitud de los productos esperados de los primers para amplificar el ADN de los genes IGF1 e IGF2 y de los controles endógenos hypoxanthine- guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) y ribosomal protein L19 (RPL19), se encuentran en la tabla 1. Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas agregando 7.5 µL SYBR®Green master-mix (Quantimix EASY SYG kit, Biotools B&M Labs, Madrid, Spain), cantidades iguales (isomolares) de primers forward y reverse (200 nM, Operon Biotechnologies GmbH, Cologne, Germany), y 2 µL ADN diluido (1:7.5 in RNase/DNase free water) formando un volumen final de 15 µL.

Muestras fueron analizadas y duplicadas en 72-disk Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Se utilizaron condiciones standard de amplificación que se describen a continuación: 3 min a 95°C y 40 ciclos de 15s a 95°C, 40s a 60°C, and 10s a 72°C. Hacia el final de cada corrida de PCR, la eficiencia de las curvas fueron analizadas para asegurarse de que el segmento deseado estaba siendo amplificado y para descartar contaminación del ADN o de los primers.

Se agruparon muestras de ADNc de 6 ovejas (3 de cada tratamiento) para proveer un control exógeno y se realizaron diluciones seriadas de este pool (de 100 a 6.25 ng/tubo) para realizar la curva de regresión de cada gen. La eficiencia (E) de los

ensayos fue calculada de acuerdo a la formula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$ (Tabla 1) (Rutledge y Cote., 2003).

La expresión genética fue medida por la cuantificación relativa (Pflaffl, 2009) para el control exógeno y se normalizó para la expresión media geométrica de los genes de control endógeno (HPRT and RPL19), tomando en cuenta las eficiencias (Pflaffl, 2009). Ambos HPRT y RPL19 han sido usados antes para controles endógenos en útero (Thissen y col., 1994; Sosa y col., 2009a) y su expresión se mantuvo sin cambios entre las muestras en este estudio.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos usados para la cuantificación de ADNc de IGF1 e IGF2 y controles endógenos (RPL19 y HPRT).

Gene	Accession number	Primers sequence	Length (pb)	Efficiency	References
IGF1	NM_001009774.3	F TTGCACTTCAGAAGCAATGG R ACTGGAGAGCATCCACCAAC	209	1.20	de Brun y col., 2014
IGF2	NM_001009311.1	F ACCCTCCAGTTTGTCTGTGG R GGGGTATGCTGTGAAGTCGT	210	1.25	de Brun y col., 2014
RPL19	<u>NM_001040516.1</u>	F CCCCAATGAGACCAATGAAATC R CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	119	1.04	Chen Y, et al., 2006
HPRT	XM_580802	F TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG R CACAGAGGGCCACAATGTGA	105	1.09	Carriquiry et al., 2009

Análisis estadístico

En el Experimento 1, se analizaron las concentraciones hormonales plasmáticas, el PV y la CC por un procedimiento mixto (Statistical Analysis System (SAS), Institute Inc., Cary, NC, USA) de medidas repetidas en el tiempo cuyo modelo estadístico fue la nutrición de la madre donadora y de la madre receptora, el estado fisiológico (gestada, no gestada), el día y las interacciones entre ellos.

En el Experimento 2, las concentraciones hormonales plasmáticas, el PV y la CC, y la determinación de transcritos se analizaron por análisis de varianza utilizando un modelo mixto que incluyó los efecto de tratamiento nutricional (subnutrido vs. control) (Statistical Analysis System (SAS) Institute Inc., Cary, NC, USA).

Para ambos experimentos, las medias de los grupos se compararon por Test de Tukey-Kramer. Se consideró significativo cuando la $p < 0.05$ y tendencia cuando $p > 0.05$ y $p < 0.1$.

RESULTADOS

Experimento 1

Como se puede observar en la tabla 2, el tratamiento nutricional en las donadoras no afecto la fertilidad al día 18 o al 40 o la mortalidad embrionaria.

La fertilidad al día 18 o 40 tampoco fue afectada por el tratamiento nutricional de las receptoras, si bien los porcentajes parecen diferenciarse (receptoras controles 72% y receptoras subnutridas 55%, independientemente del origen del embrión)

Las ovejas receptoras controles tendieron a presentar una menor mortalidad embrionaria tardía con respecto a las ovejas receptoras subnutridas cuando embriones de buena calidad fueron transferidos (14,3% vs 34,8%, $p=0.11$, tabla 2).

Tabla 2. Tasas de fertilidad (% de ovejas preñadas) y de mortalidad embrionaria al día 18 y 40 en ovejas receptoras alimentadas 1,5 M (Grupo Control) y alimentadas 0,5 M (Grupo Subnutrido) con embriones provenientes de ovejas donadoras controles o subnutridas.

	Donadora C Receptor C	Donadora S Receptora C	Donadora C Receptora S	Donadora S Receptora S	P valor
Fertilidad día 18	79% (11/14)	91% (10/11)	80% (12/15)	92% (11/12)	NS
Fertilidad día 40	71% (10/14)	73% (8/11)	53% (8/15)	58% (7/12)	0.17
Mortalidad embrionaria tardía	9.1% (1/11)	20% (2/10)	33.3% (4/12)	36.4% (4/11)	0.11

El tratamiento nutricional al que se sometió a los animales provocó la respuesta esperada en cuanto a cambios en el PV y la CC, y a la modificación de los perfiles de AGNE (Tabla 3). Las ovejas subnutridas del experimento 1 presentaron una disminución del 8% del PV y de un 15% de la CC a lo largo del experimento. Sin embargo, las ovejas del grupo control mantuvieron ambos parámetros.

Las concentraciones plasmáticas de AGNE aumentaron en respuesta a la subnutrición (Tabla 3).

Tabla 3. Variaciones de peso vivo (PV), condición corporal (CC) y AGNE previo al comienzo de las dietas diferenciales (inicial) y en el momento del sacrificio (final) en ovejas alimentadas 1,5 M (Grupo Control) o 0,5 M (Grupo Subnutrido).

	Control	Subnutrido
PV inicial	57,3 ± 1,6 ^a	56,2 ± 1,4 ^a
PV final	57,9 ± 1,7 ^a	51,8 ± 1,7 ^b
CC inicial	2,7 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,1 ^a
CC final	2,8 ± 0,2 ^a	2,2 ± 0,2 ^b
AGNE	0,10 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,02 ^b

El tratamiento nutricional modificó las concentraciones de insulina. Las ovejas subnutridas presentaron menores concentraciones que las ovejas controles (31,1±1.3 µUI/ml vs. 34,5±5.5 µUI/ml, Tabla 4). Cuando se comparan las medias por Test de Tukey-Kramer se encontró que las ovejas subnutridas preñadas tienden a presentar mayores concentraciones de insulina en relación a los subnutridas no preñadas (p=0.10)

Sin embargo, el tratamiento nutricional no afectó las concentraciones de leptina, IGF1 o adiponectina (Tabla 4).

Las concentraciones plasmáticas de progesterona a día 7 no fueron afectadas por el tratamiento nutricional o el estado reproductivo. Sin embargo cuando se comparan las medias por Test de Tukey-Kramer se encontró que las ovejas subnutridas preñadas presentaron concentraciones plasmáticas de progesterona más elevadas que las ovejas controles preñadas (p<0.05) y que las ovejas subnutridas no preñadas (p<0.05).

Tabla 4. Variaciones de peso vivo (PV), condición corporal (CC) y concentraciones plasmáticas de AGNE (mM) progesterona al día 7 (ng/ml) factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1,ng/ml) , insulina (μ UI/ml), leptina (ng/ml) y adiponectina (ng/ml) en ovejas preñadas y no preñadas previo al comienzo de las dietas diferenciales (inicio) hasta el día 7 luego del estro en ovejas alimentadas 1,5 M (Grupo Control) o 0,5 M (Grupo Subnutrido).

	Control		Subnutrido		SEM	T	Preñez
	Preñadas (n=18)	No preñadas (n=7)	Preñadas (n=15)	No preñadas (n=12)			
Peso vivo	57.5 ^a	58.4 ^a	52.3 ^b	50.4 ^b	0,85	<0.0001	NS
CC	2.61 ^a	2.75 ^a	2.32 ^b	2.18 ^b	0,12	0,0006	NS
AGNE	0.11 ^a	0.09 ^a	0.20 ^b	0.17 ^b	0,02	0,0001	NS
P4 día 7	5.73 ^a	6.29 ^{ab}	9.61 ^b	5.23 ^a	1,94	NS	NS
IGF1	295,7	317,1	291,7	301,3	16,2	NS	NS
Insulina	34.0 ^a	34.8 ^a	32.5 ^{abx}	29.7 ^{by}	1,45	0,03	NS
Leptina	0,81	0,71	0,67	0,53	0,17	NS	NS
Adiponectina	18.7	17,4	17.0	17,3	1,03	NS	NS

Experimento 2

En respuesta a la subnutrición los animales presentaron una disminución del PV de un 11% y un 16% de condición corporal. Las ovejas del grupo control mantuvieron ambos parámetros.

Las concentraciones plasmáticas de AGNE aumentaron en las ovejas subnutridas en relación a las controles (Tabla 5).

Tabla 5. Variaciones de peso vivo (PV), condición corporal (CC) y AGNE previo al comienzo de las dietas diferenciales (inicial) y en el momento del sacrificio (final) en ovejas alimentadas 1,5 M (Grupo Control) o 0,5 M (Grupo Subnutrido).

	Control	Subnutrido
PV inicial	71,9 \pm 0,7 ^a	71,9 \pm 0,5 ^a
PV final	70,1 \pm 0,7 ^a	63,8 \pm 0,5 ^b
CC inicial	3,2 \pm 0,2 ^a	3,2 \pm 0,2 ^a
CC final	3,3 \pm 0,2 ^a	2,7 \pm 0,1 ^b
AGNE	0,44 \pm 0,04 ^b	0,61 \pm 0,05 ^a

La subnutrición provocó una disminución en los niveles plasmáticos de insulina ($p < 0.01$), IGF1 ($p < 0.01$) y leptina ($p = 0.02$) en relación a los controles (Figura 1). No se encontraron diferencias de tratamiento para adiponectina (Figura 1).

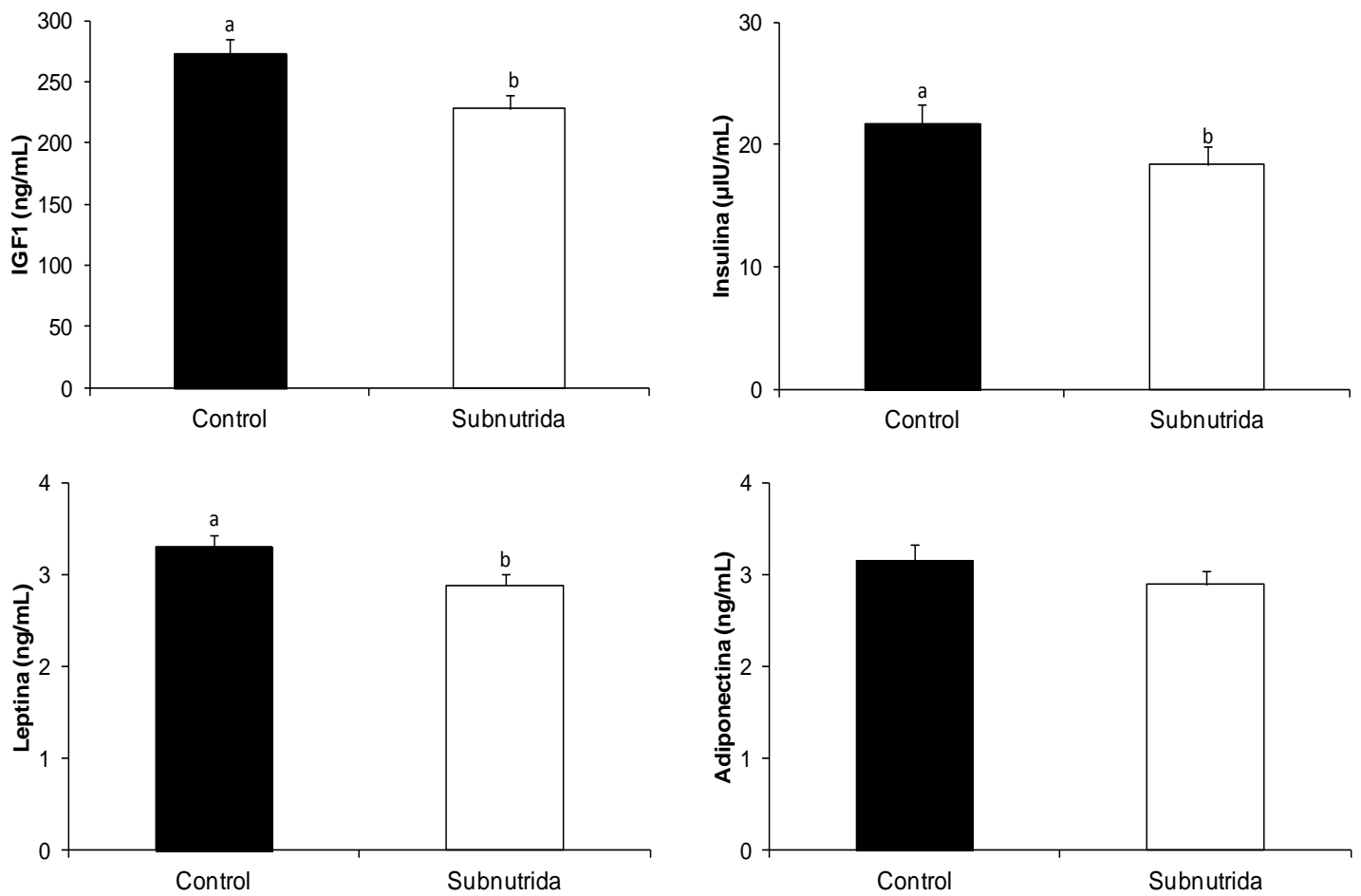


Figura 1. Concentraciones plasmáticas de Insulina (μ IU/mL), IGF1 (ng/mL), Leptina (ng/mL) y Adiponectina (ng/mL) en ovejas alimentadas 1.5 (Control, n=9) o 0.5 (subnutridas, n=7) los requerimientos nutricionales de mantenimiento. Los valores se expresan como medias mínimas cuadradas \pm error estándar.

Efecto de la subnutrición sobre la expresión génica de factores de crecimiento en el endometrio ipsilateral al CL al día 16 del ciclo estral (Experimento 2).

La subnutrición no afectó la expresión relativa de transcritos de IGF1 e IGF2 en cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo (Figura 2).

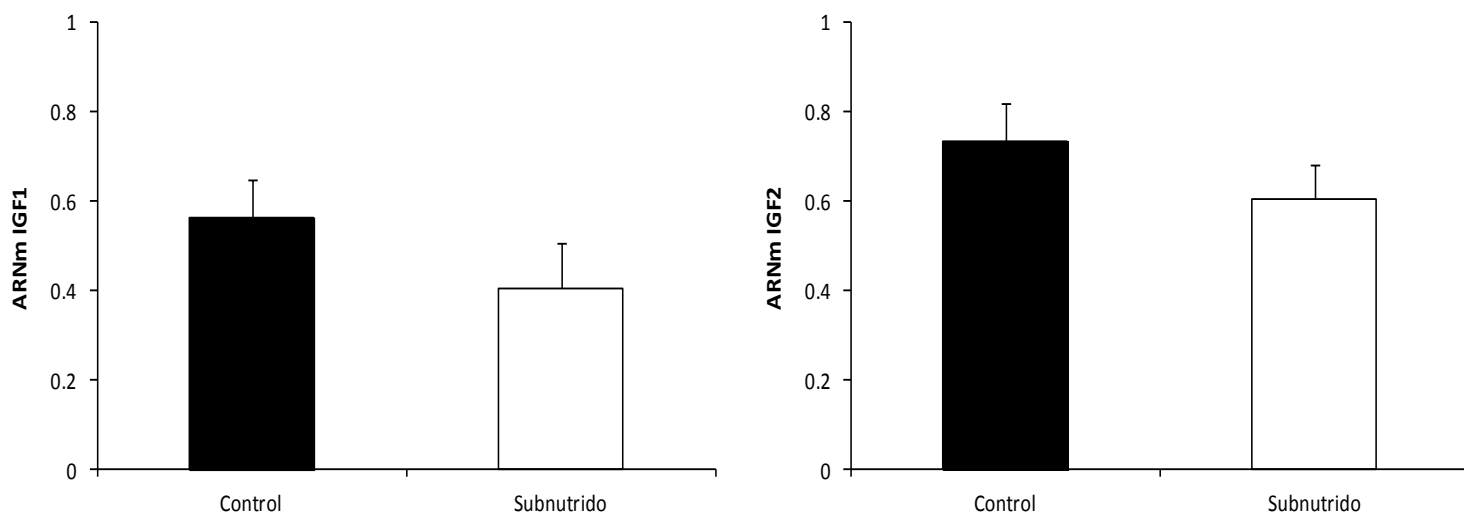


Figura 2. Expresión relativa de transcritos de IGF1 e IGF2 en útero ipsilateral al cuerpo lúteo (n=16) al día 16 del ciclo estral. Los datos son presentados como cuadrados mínimos \pm error estándar.

DISCUSIÓN

En el experimento 1, no se encontraron diferencias de fertilidad entre ovejas controles y subnutridas al día 18. Las ovejas receptoras controles presentaron una fertilidad de 72% al día 40, mientras que las ovejas receptoras subnutridas presentaron una fertilidad de 55%, lo que evidencia una reducción de alrededor del 20% de la fertilidad de los animales subnutridos, sin embargo el número de animales es reducido y esto podría explicar el hecho de que no se encontraran diferencias significativas. Esto concuerda con lo reportado por Abecia y col. en 1995 y 1999 que en animales con una dieta que proporcionaba la mitad de los requerimientos nutricionales diarios de mantenimiento, encontró una disminución significativa de la performance reproductiva de las ovejas. Esto si se hace más marcado en los cálculos de mortalidad embrionaria, las ovejas receptoras subnutridas tendieron a presentar una mayor mortalidad embrionaria tardía con respecto a las ovejas receptoras controles, esto nos permite deducir que cuando embriones de buena calidad son transferidos la supervivencia embrionaria es dependiente principalmente del ambiente materno en el que se desarrolla el embrión, siendo independiente de la historia nutricional del mismo.

Las ovejas subnutridas preñadas presentaron mayores concentraciones de progesterona al día 7 en relación a las ovejas controles preñadas. Mayores niveles de progesterona plasmática en subnutridas en relación a controles ya ha sido reportado previamente (Parr y col., 1987, 1993, Lozano y col., 1998), y se relaciona con un mayor metabolismo de esta hormona a nivel hepático. Sin embargo, es posible que las concentraciones plasmáticas de progesterona no sean un reflejo fiel de las concentraciones locales en el tracto reproductivo, ya que la producción plasmática de progesterona por el cuerpo lúteo no se ha visto afectada por la subnutrición (Abecia y col., 1995, 1997). Asimismo, ha sido reportado previamente por Lozano y col., (1998) que a nivel local, en el tejido endometrial, las concentraciones de progesterona son menores en ovejas subnutridas día 5 de gestación. A su vez, nuestros resultados evidencian que las ovejas subnutridas preñadas presentaron mayores niveles de progesterona plasmática que la subnutridas no preñadas.

La progesterona tiene un papel esencial en la reproducción y para el mantenimiento de la gestación (Graham y Clarke, 1997), por esto suponemos que el grupo que pudo mantener la preñez fue el que tenía mayores concentraciones plasmáticas de progesterona. Esto podría deberse a una alteración en la función lútea normal de los animales que no mantuvieron la preñez, los cuales además tenían una condición corporal y peso vivo similar aunque numéricamente menor al grupo subnutrido que mantuvo la preñez.

El tratamiento nutricional fue eficaz produciendo una disminución en el peso vivo. Cuando las ovejas se sometieron al período de subnutrición de 22 días en el experimento 1 y de 31 días en el experimento 2, se produjo una disminución del PV del 8% y 11% respectivamente. En el experimento 1, el periodo de subnutrición tuvo una duración comparable con los experimentos realizados por de Brun, (2014), en los cuales en 20 y 22 días de períodos de subnutrición, la disminución del peso vivo fue de 9% y 5% respectivamente. Asimismo, en el experimento 2 el período de subnutrición puede ser comparable a lo descrito por Sosa y col., (2009a), donde animales subnutridos durante 27 días, tuvieron una disminución del peso vivo de 9 a 12 %. Es así, que las disminuciones de los PV en los experimentos 1 y 2 concuerdan con los antecedentes de nuestra línea de investigación, en el que el diseño experimental fue similar en ambos grupos y además fueron realizados bajo las mismas condiciones climáticas.

En cuanto a la condición corporal, en el experimento 1, las ovejas subnutridas tuvieron una disminución de la condición corporal del 15% y en un 16% en el experimento 2. Los valores de peso vivo y de la condición corporal de las ovejas del experimento 2, fueron mayores que los de las ovejas del experimento 1. Esto es importante ya que las respuestas endocrino-metabólicas a un episodio de restricción nutricional dependen de las reservas corporales previas al comienzo del experimento, lo que se denomina “memoria metabólica” (Chilliard y col., 1998; Zhang y col., 2005; Blache y col., 2006; Fernandez-Foren y col., 2011).

La subnutrición provocó una movilización de las reservas grasas como se demuestra a través de las concentraciones elevadas de AGNE. Esto es esperable ya que cuando los aportes no satisfacen los requerimientos energéticos, el animal dispone de sus reservas de triglicéridos para su utilización por los diferentes tejidos (Chilliard y col., 1998).

En el experimento 1 los valores de AGNE aumentaron en un 90% en cambio en el experimento 2, aumentaron en un 39%, esto podría deberse, como ya comentamos, a una diferente duración de la subnutrición en ambos experimentos y a su vez también a un diferente estado de reservas al comienzo del mismo, lo cual provocó que las respuestas metabólicas en ambos experimentos fueran diferentes. A su vez es importante destacar también, que si bien se utilizaron kits similares, los aparatos utilizados para la determinación de AGNE difirió en ambos experimentos, lo que también podría explicar en parte las diferencias encontradas en los valores absolutos entre los experimentos 1 y 2.

La subnutrición provocó una disminución de insulina en ambos experimentos. La disminución en las concentraciones de insulina es consistente con lo reportado previamente por Sosa y col., (2006) y Abecia y col., (2013). Se ha propuesto que la disminución en las concentraciones de insulina en animales subnutridos es una estrategia para disminuir los requerimientos de energía cuando la disponibilidad de nutrientes es baja (de Brun, 2014). Esto tiene como consecuencia una disminución del anabolismo, lipogénesis y del transporte de glucosa (Flint y col., 2003). Esto pone a la insulina como uno de los indicadores metabólicos más eficientes en reflejar el estado nutricional de las ovejas (Caldeira y col., 2007). En el experimento 1 de esta tesis, cuando se comparan las medias por test de Tukey-Kramer se encontró que los animales subnutridos preñados tienden a presentar mayores concentraciones de insulina en relación a los subnutridos no preñados. Por lo tanto se sugiere que aquellas ovejas que pudieron enfrentar mejor la restricción nutricional, reflejado en la variación de concentraciones hormonales, fueron las que mantuvieron la preñez. La menor concentración de insulina en las subnutridas no preñadas muestra que esta hormona tiene un efecto importante sobre la preñez, pudiendo actuar a través de receptores de insulina presentes en el endometrio de la oveja y/o regulando la función uterina (Fowden y col., 1989; Gluckman y Pinal, 2003; Dupont y col., 2014).

Como vimos anteriormente, la subnutrición altera el éxito reproductivo, y esto puede estar causado por las señales que se producen entre el embrión y el ambiente uterino, en respuesta a un ambiente hostil. Por lo tanto, alteraciones en este sistema de señales resulta en fallas en la implantación, pérdida embrionaria temprana, desarrollo y crecimiento retardado o acelerado del embrión (Barnes, 2000).

Se ha demostrado previamente, que la insulina estimula la síntesis de progesterona en las células luteales (Wathes y col., 1995), por tanto, no es sorprendente que los animales subnutridos que fueron exitosos en mantener la preñez fueron aquellos animales con mayores concentraciones plasmáticas de estas hormonas. Por tanto estos mecanismos, en conjunto, podrían explicar el éxito de preñez en ovejas subnutridas.

Si bien no se encontraron cambios en las concentraciones plasmáticas de IGF1 y leptina en el experimento 1, los animales subnutridos del experimento 2 presentaron una reducción en las concentraciones de estas hormonas en relación a los animales controles. Estas diferencias encontradas pueden ser explicadas por el fenómeno de memoria metabólica, las respuestas metabólicas a los cambios en el estado metabólico dependen del mismo en un pasado cercano (alimentación, efecto dinámico) o lejano (CC, efecto estático), (Chilliard y col., 2005; Zhang, 2005; Blache y col., 2006; Fernandez-Foren y col., 2011). Por tanto, es probable que los cambios metabólicos del organismo para adaptarse al nuevo estado fisiológico, no hayan sido de la misma índole en los dos experimentos, debido a que el estado de las reservas corporales iniciales de las ovejas fue diferente entre los experimentos, y por esto varía el impacto de la subnutrición (Fernandez-Foren y col., 2011). A su vez de acuerdo a lo propuesto por Soca y col., (2013) las concentraciones de IGF1 integrarían la memoria metabólica (reserva de energía) y la energía disponible, mientras que las concentraciones de insulina y AGNE pueden ser un reflejo del equilibrio entre la ingesta diaria y los requerimientos de energía.

La disminución de IGF1 frente una restricción nutricional es consistente con lo reportado previamente por Sosa y col., (2006). En periodos de subnutrición existe un desacoplamiento del eje somatotrópico provocando una disminución en las concentraciones de IGF1, aún con aumento de GH (Chilliard y col., 1998; Breier, 1999; Kobayashi y col., 1999; Kim, 2014). Este es un mecanismo que asegura la distribución de nutrientes a los diferentes tejidos cuando la energía disponible es limitada (Fernandez-Foren y col., 2011). Por otra parte, la disminución de los niveles plasmáticos de IGF-1 también puede comprometer la eficiencia reproductiva, ya que está comprobado su efecto sobre la fertilidad, desarrollo embrionario y placentario (Wathes y col., 1998; Keller y col., 1998; Uribe-Velázquez y col., 2008).

La leptina es producida principalmente por el tejido adiposo y esta positivamente relacionada con el nivel de grasa corporal (Chilliard y col., 1998; Delavaud., y col 2000; Chilliard y col., 2005). Como ha sido previamente reportado por Fernandez-Foren y col., (2011), animales con alta condición corporal tienen caídas más evidentes en las concentraciones plasmáticas de leptina, lo que concuerda con sucedido en el experimento 2. Por otro lado, los animales con menor condición corporal expuestos a subnutrición, poseen variaciones en las concentraciones de leptina plasmática menos evidentes, lo que puede evidenciarse con los animales del experimento 1. La reducción en las concentraciones de leptina durante la subnutrición, puede actuar como señal para aumentar el apetito, disminuir los gastos de energía y la actividad reproductiva (Chilliard y col., 2000). Además, la leptina parece ser el más importante regulador de la actividad reproductiva en especies de laboratorio (Kawamura y col., 2002; Krug y Ehrhart-Bornstein, 2005), como también lo es en rumiantes (Chilliard y col., 2005). Además de estos cambios, los cuales son de índole sistémico, es importante tener en cuenta su acción a nivel local actuando directamente en tejidos periféricos de forma parácrina o autócrina pudiendo provocar alteraciones a nivel del entorno uterino que comprometan la preñez (Chilliard y col., 2005).

La subnutrición no provocó variaciones en las concentraciones de adiponectina en ninguno de los dos experimentos. La adiponectina es producida por el tejido adiposo y se ha comprobado su efecto sobre el metabolismo y la reproducción en otras especies (Monget y col., 2008; Ye y col., 2013; Reverchon y col., 2014). Esto nos lleva a pensar que las variaciones de la misma puede afectar el éxito de la preñez, pero la falta de estudio sobre estos efectos en ovinos (Kasimanickam y Kasimanickam, 2011) limitan nuestro análisis sobre los resultados de este trabajo.

Expresión génica en el tracto reproductivo

La disminución de los niveles plasmáticos de IGF1 encontrada en los animales subnutridos del experimento 2, contrasta con el efecto en la expresión relativa de transcritos de IGF1 e IGF2 en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, ya que en estos no se observaron diferencias.

Estos resultados son diferentes a lo encontrado por de Brun y col., (2013) en el cual se reportan diferencias de expresión de transcritos de IGF1 en el endometrio al día 5 de la preñez, por otro lado son similares a lo que encontrado por Sosa y col., (2009b) en donde no encontró diferencias en la expresión de transcritos a nivel endometrial en ovejas preñadas al día 14 de preñez. Es probable que estas diferencias se deban a una expresión diferencial de estos transcritos a lo largo del desarrollo embrionario, siendo más importantes durante las primeras etapas de crecimiento, la concentración de los mismos a nivel endometrial varía según el día del ciclo, marcando el estro como el momento de mayor expresión y disminuyendo progresivamente. A su vez las concentraciones de transcritos a nivel de las glándulas endometriales profundas se mantiene en valores altos a lo largo de todo el ciclo, en cambio en glándulas superficiales y miometrio posee un pico en los primeros dos días (Stevenson y col., 1994).

En cuanto a si hay o no cambios a nivel endometrial en la expresión de transcritos entre relación a la preñez, Stevenson y col., (1994) comprobó que la expresión génica a nivel endometrial no varía entre ovejas gestantes y no gestantes en los días 2 y 15 después del estro; esto contradice lo encontrado por Sosa y col., (2009b) que reporto una mayor expresión de transcritos de IGF1 e IGF2 al día 14 en ovejas gestantes con respecto a las no gestantes.

Tanto IGF1 e IGF2 estimulan la proliferación celular y la diferenciación del embrión y de las células endometriales. Estos efectos son mediados por los receptores de IGF1 e IGF2 y las proteínas de unión a IGF (IGFBP) (Kaye y col., 1997; Wathes y col., 1998; Keller y col., 1998). Además, las IGFs son producidas también en tejidos periféricos actuando a nivel local (Stevenson y col., 1994; Thissen y col., 1994).

Consideramos que la modulación de la reproducción por la IGF1 e IGF2 pudo haberse visto comprometida por una diferente producción de las mismas y de las IGBP principalmente a nivel local. Las IGBPs son capaces de modular las funciones de IGFs tanto de manera positiva como negativa (Clemmons, 1998; Rechler y col., 1993), alterando la disponibilidad de la hormona activa y los receptores celulares (Jones y Clemmons, 1995). La actividad reguladora de las IGFBP varía según el día del ciclo estral y el estado reproductivo (Keller y col., 1998). A su vez modificaciones en la dieta cambian la abundancia sérica de las proteínas de unión a IGF (IGFBP) en animales y humanos (Thissen y col., 1994) pudiendo de esta manera comprometer la función reproductiva en estados de subnutrición.

IMPLICANCIAS DE ESTA TESIS

La subnutrición es una situación a la cual las ovejas en Uruguay enfrentan año a año, debido a que no tienen un aporte homogéneo de nutrientes durante todo el año por poseer un sistema de cría ovina pastoril extensivo, con altos porcentajes de pasturas naturales (que oscilan entre 93.1% en basalto superficial, 54.1% en la región litoral oeste, con un promedio general entre 80-85%) (Carambula., 2008). Las pasturas están constituidas por dos grupos fundamentales invernales (c3) y estivales (c4) estando en otoño y primavera la mayoría de las especies activas (Carambula., 2008), lo que lleva a tener periodos de exceso de forraje y periodos de carencia de este. Situación particularmente importante en invierno en el cual existe una baja disponibilidad de forraje que no permite alcanzar consumos adecuados para suplir los requerimientos de las ovejas de cría en gestación avanzada. (Montossi y col., 1998). Por otro lado, la encarnerada se produce en periodos donde la subnutrición no sería habitual ya que existe una buena disponibilidad de forrajes para cubrir los requerimientos nutricionales de las ovejas. Sin embargo, se podría establecer estados de subnutrición causados por los problemas sanitarios. Uno de los principales a nivel nacional son los nematodos gastrointestinales. El nivel de parasitosis según recuento de huevos por gramo de materia fecal (hpg) tiene marcados efectos sobre la reproducción, disminuyendo la tasa ovulatoria y aumentando las pérdidas embrionarias (Fernandez Abella y col., 2006). El pietin (foot rot) es otro grave problema sanitario que puede influenciar el estado nutricional de las majadas. Es una enfermedad común en los ovinos y de difícil erradicación que causa grandes pérdidas económicas. Las ovejas infectadas claudican y no pastorean suficiente y no tienen su máximo comportamiento reproductivo (William y col., 1993). Estudios realizados en borregos Corriedale afectados por Pietín, evidenciaron que se produce una disminución del 4% en la producción de carne y modificaciones en la calidad de la lana, sin considerar las complicaciones más comunes de miasis y abscesos (Mederos y col, 2001). En nuestro país se ha prestado mucha atención a la alimentación en el último tercio de gestación gracias al esfuerzo de los profesionales en resaltar la importancia de este período y a la visibilidad de los resultados de esta buena práctica en un aumento en la supervivencia de los corderos y disminución de patologías metabólicas en ovejas gestantes. Pero por otro lado podría no estar teniéndose en cuenta el verdadero estado en que llegan nuestras ovejas a la encarnerada por la

difícil visualización de sus consecuencias. Consideramos que las pérdidas embrionarias se encuentran subestimadas a nivel productivo en Uruguay porque su efecto directo no sería una disminución importante del procreo ya que muchos de los animales que fallaron, serán fecundados en ciclos estrales posteriores. Por tanto, si bien el principal efecto sería una dispersión de los nacimientos, también se estaría hipotecando el desempeño reproductivo de la majada (prolificidad y fecundidad) (Fernandez Abella y col., 2007).

CONCLUSIONES

La subnutrición modifica el estado metabólico (experimento 1 y 2) y estas alteraciones pueden estar asociadas al éxito reproductivo (experimento 1), principalmente progesterona e insulina.

Cuando se transfieren embriones de buena calidad, las fallas reproductivas en los animales subnutridos se asocian principalmente a factores maternos, y no a factores provenientes del embrión (experimento 1).

La subnutrición no afecta la expresión de factores de crecimiento tipo insulínicos 1 y 2 en el endometrio ipsilateral al CL, al día 16 del ciclo estral. La disminución de IGF1 a nivel sistémico puede no estar relacionada directamente con un cambio en la expresión de transcritos a nivel endometrial (experimento 2).

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abecia J A, Rhind, S M, Bramley, T A, Mcmillen, S R (1995). Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Anim Sci* 61: 57-62.
- 2) Abecia J A, Lozano, J, 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: 209-218.
- 3) Abecia J A, Sosa C, Forcada F, Meikle A (2006). The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 46: 367-78.
- 4) Abecia Martínez A, Forcada Miranda F (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino, Zaragoza, Servet, 195p.
- 5) Abecia J A, Forcada F, Palacín I, Sanchez-Prieto L, Sosa C, Fernández-Foren A, Meikle A, (2013). Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Zygote* 9: 1-9.
- 6) Agricultural and Food Research Council (AFRC) (1993). Energy and protein requirements of ruminants. An advisor manual prepared by the ARFC technical committee on responses to nutrients. Wallingford, CAB International, 347p.
- 7) Arendt J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod* 3(1): 13-22.
- 8) Ashworth CJ. (1995). Maternal and conceptus factors affecting histrotrophic nutrition and survival of embryo. *Livest Prod Sci* 44:99-105.
- 9) Ashworth CJ, Beattie L, Antipatis C, Vallet JL (1999). Effects of pre- and post-mating feed intake on blastocyst size, secretory function and glucose metabolism in meishan gilts. *Reprod Fertil Dev.* 11(6): 323-327.

- 10) Ashworth C J, Ferguson E M, Edwards S A, Hunter M G (2008). Nutritional insights into the origins of embryonic loss in the pig. Proceedings of a Workshop on Embryonic and Fetal Nutrition, 29th May – 1st June 2006. Ravello, Italy, p. 27–29.
- 11) Atuesta J E, Gonella Diaza Á M (2011). Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. *Rev Spei Domus*. 7(14): 15-25.
- 12) Barnes FL. (2000). The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology* 53(2):649-58.
- 13) Bazer FW, Ott TL, Spencer TE (1994). Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses: signals from the trophoblast. *Theriogenology* 20: 79-92
- 14) Bazer, FW (2013). Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *J Anim Sci Biotechnol* 4:23.
- 15) 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: 379–390.
- 16) Borowczyk E, Caton JS, Redmer DA, Bilski JJ, Weigl RM, Vonnahme KA, Borowicz PP, Kirsch JD, Kraft KC, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT (2006). Effects of plane of nutrition on in vitro fertilization and early embryonic development in sheep. *J Anim Sci*. 84(6): 1593-1599.
- 17) Breier BH (1999). Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domest Anim Endocrinol*. 17(2-3): 209-218.
- 18) 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.
- 19) Caldeira R M, Belo A T, Santos C C, Vazques M I, Portugal A V (2007). The effect of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rum. Res.*, 68: 242–255.
- 20) Carambula M (2008). *Pasturas Naturales Mejoradas*. Montevideo Hemisferio Sur, 530p.

- 21) Carson D D, Bagchi I, Dey, S K, Enders A C, Fazleabas A T, Lessey B A and Yoshinaga K (2000). Embryo implantation. *Dev. Biol.* 223: 217-237.
- 22) Cheng X B, Wen J P, Yang J, Yang Y, Ning G, Li X Y (2011). GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine* 39(1): 6–12.
- 23) Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M (1998). Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev.* 38(2):131-52.
- 24) 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: 127-134.
- 25) Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 29: 3–22.
- 26) Clemmons D R (1998). Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 140: 19-24.
- 27) Crempien C, López de PJ, Rodríguez D (1993). Efecto de la condición corporal al parto sobre el peso al nacimiento, mortalidad neonatal, peso al destete en los corderos y peso de vellón en ovejas Merino precoz. *Agric Téc* 53(2): 144-149.
- 28) 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.
- 29) de Brun V (2014). Efecto de la subnutrición materna sobre la gestación temprana en ovinos: énfasis endócrino-metabólico. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, UdelaR, 58 p.
- 30) Dupont J, Scaramuzzi R J, Reverchon M (2014). The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal* 28:1-14.

- 31) Edey T N (1969). Prenatal mortality in sheep. A review. Anim Breed Abstr.37:173-190.
- 32) Etherton TD (2004). Somatotropic function: the somatomedin hypothesis revisited. J Anim Sci. 82 E-Suppl: E239-244.
- 33) Fernández Abella, DH (1993). Principios de Fisiología Reproductiva Ovina. Montevideo. Hemisferio Sur, 247 p.
- 34) Fernández Abella D, Castells D, Piaggio L, Deleón N (2006). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos.I. Efectos de distintas cargas parasitarias y su interacción con la alimentación sobre las pérdidas embrionarias y la fecundidad. Prod Ovina 18: 25 – 31.
- 35) Fernández Abella D, Formoso D, Goicoechea I, Locatelli A, Scarlato S, Ibañez W, Irabuena O (2007). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos. III. Efecto de la asignación de forraje y de un estrés pluviométrico artificial sobre la tasa ovulatoria y pérdidas reproductivas en ovejas corriedale. Prod Ovina 19:15 – 23.
- 36) Fernández–Foren A., Abecia J A, Vázquez M I, Forcada F, Sartore I, Carriquiry M, Meikle A, Sosa C (2011). Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales. ITEA 170(4): 257-271.
- 37) 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.
- 38) Forcada F, Abecia J A, Sierra I (1992). Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. Small Rum Res 8: 313-324.
- 39) Fowden A L, Hughes P, Comline R S (1989). The effects of insulin on the growth rate of the sheep fetus during late gestation. Q. J. Exp. Physiol. 74: 703-714.
- 40) García-García R M (2012). Integrative Control of Energy Balance and Reproduction in Females. ISRN. Veterinary Science. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5402/2012/121389> Fecha de consulta: 13 de agosto del 2015.

- 41) García Sacristan A, Castejon Montijano F, De La Cruz Palomino L F, Gonzalez Gallego J, Murillo Lopez de Silanes M D, Salido Ruiz G (1995). *Fisiologia Veterinaria* Madrid : McGraw-Hill, 1074 p.
- 42) Gibbons A E, Cueto M I (1995). Principios y consideraciones generales sobre la transferencia de embriones. En: Gibbons AE, Cueto MI. *Transferencia de embriones en ovinos y caprinos*. Bariloche, INTA EEA Bariloche, p 5-21.
- 43) Gluckman P D, Pinal C S (2003). Regulation of fetal growth by the somatotrophic axis. *J Nutr.* 133 (5 Suppl 2):1741S-1746S.
- 44) Goff A K (2002). Embryonic signals and survival. *Reprod Domest Anim.* 37:133-139.
- 45) Gong JG, Bramley T, Webb R (1993). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod*, 45:941-949.
- 46) Graham J D, Clarke C L (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocr. Rev.*18: 502- 519.
- 47) Hafez E S E, Hafez, B (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*, 7ª ed, México, McGraw-Hill Interamericana, 519 p.
- 48) Hua K M, Hodgkinson S C S, Bass J J (1995). Differential regulation of plasma levels of insulin-like growth factors-I and II by nutrition, age and growth hormone treatment in sheep. *J. Endocrin.* 147: 507-516.
- 49) Huet-Hudson Y M, Andrews G K, Dey S K (1989). Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology* 125: 1683-1690.
- 50) Ingvarsten KL, Andersen JB, (2000). Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci.* 83(7):1573-1597.
- 51) Jefferies BC (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tasm. J. Agr*, 32: 19-211.

- 52) Jones J, Clemmons D, (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16: 3-34.
- 53) Karsch FJ (1980). Twenty-fifth annual bowditch lecture. Seasonal reproduction: A sage of reversible fertility. *Physiologist*. 23:29–38.
- 54) Kasimanickam R K, Kasimanickam V R (2011). Effect of tocopherol supplementation on serum 8-epi-prostaglandin F2 alpha and adiponectin concentrations, and mRNA expression of PPAR γ and related genes in ovine placenta and uterus. *Theriogenology* 76(3):482-91.
- 55) Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Tanaka T (2002). Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinol*. 143: 1922-1931.
- 56) Kaye P L (1997). Preimplantation growth factor physiology. *Rev Reprod* 2: 121-7.
- 57) Keller M L, Roberts A J, Seidel G E (1998). Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in the uterus and conceptus during early conceptus elongation in cattle. *Biol Reprod* 59(3):632-642.
- 58) Kim J W (2014). Modulation of the Somatotropic Axis in Periparturient Dairy Cows. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27 (1): 147-154.
- 59) 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.
- 60) Krug AW, Ehrhart-Bornstein M (2005). Newly discovered endocrine functions of white adipose tissue: possible relevance in obesity-related diseases. *Cell Mol Life Sci*, 62:1359–1362.
- 61) Lenz Souza M I, Ramírez Benavides G F, Uribe Velásquez L F (2007). Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) en la regulación de la función ovárica. *Biosalud*. 6: 149-159.

- 62) Lozano J M, Abecia J A, Forcada F, Zarazaga L, Alfaro B (1998). Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology* 49: 539-546.
- 63) Malpoux B, Thiéry J C, Chemineau P (1999). Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nut Dev.* 39: 355-366.
- 64) Martal J, Chene N, Camous S, Huynh L, Lantier F, Hermier P, L'haridon R, Charpigny G, Charlier M, Chaouat G (1997). Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev* 9: 355-380.
- 65) McMillen J C, Houghton D C, Young I R (1995). Melatonin and the development of circadian and seasonal rhythmicity. *J Reprod Fertil, Suppl.* 49: 137-146.
- 66) Mederos A, Casaretto A, Ferreira G, Bonino J, Scremini P. INIA, SUL (2001). Evaluación de pérdidas productivas debidas a Footrot en ovinos. En: Estudios sobre Footrot ovino en el Uruguay. Relevamiento de prevalencia, evaluación de las pérdidas productivas y económicas. INIA Serie FPTA 1084,11-17. Disponible en: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219210807155158.pdf>. Fecha de consulta: 13 de agosto del 2015
- 67) Montossi F, San Julián R, de Mattos D, Berretta E J, Zamit W, Levratto J C, Ríos M. (1998). Impacto del manejo de la condición corporal al parto sobre la productividad de ovejas Corriedale y Merino. Seminario sobre actualización de tecnologías para el Basalto. INIA Tacuarembó, Serie Técnica N° 102, pp. 185 - 194.
- 68) Monget P, Chabrolle C, Dupont J (2008). Adipose tissue, nutrition and reproduction: what is the link? *Bull Acad Nat Med*, 192 (4): 637–648.
- 69) Moschos S, Chan J L, Mantzoros C S (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 77: 433-444.
- 70) Paria B C, Dey S K (1990). Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4756-4760.

- 71) Paria B C, Song H, Dey S K (2001). Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue *Int. J. Dev. Biol.* 45: 597-605.
- 72) Parr R A, Davis I F, Fairclough R J, Miles M A (1987). Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J Reprod Fertil* 80: 317-320.
- 73) Parr R A, Davis I F, Miles M A, Squires T J (1993). Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res Vet Sci.* 55(3):306-310.
- 74) Pflaffl M W (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 colostrum and milk. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York 38: 89-93.
- 76) Pope W F (1988). Uterine asynchrony as cause of embryonic loss. *Biol Reprod* 39: 999-1003.
- 77) Raddatz J (2008). Measurements of Adiponectin in lactating dairy cows. Thesis Faculty of North Carolina State University, 69 p.
- 78) Rechler M M (1993). Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm* 47: 1-114.
- 79) Renaville R, Hammadi M, Portetelle D (2002). Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 23(1-2):351-60.
- 80) Reverchon M, Bertoldo M, Ramé C, Dupont J (2014). Adipokines and the Female Reproductive Tract. *Internat J Endocrinol*, 10 p. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ije/2014/232454/> Fecha de consulta. 17 de agosto de 2015.
- 81) Reynolds T S, Stevenson K R, Wathes D C (1997). Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system during earlyplacental development in the ewe. *Endocrinol* 138: 886-97.

- 82) Rhind SM, Martin GB, McMillen S, Tsonis CG, McNeilly AS (1989). Effect of level of food intake of ewes on the secretion of LH and FSH on the pituitary response to gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes. *J Endocrinol* 121:325-330.
- 83) Rodríguez-Pacheco F, Martínez-Fuentes A J, Tovar S (2007). "Regulation of pituitary cell function by adiponectin," *Endocrinology*, 148 (1): 401–410.
- 84) Russel A F J, Doney J M, Reid R L (1967). The use of biochemical parameters in controlling nutrition state in pregnancy ewes and the effect of undernourishment during pregnancy on lamb birth weight. *J. Agric. (Cambridge)* 68:351-358.
- 85) Russel A J F, Doney J M, Gunn R G (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 72: 451-454.
- 86) Russel A J F (1984). Body condition scoring of sheep. *Vet Rec* 6 (Suppl 3): 91- 93.
- 87) Rutledge R G, Cote C (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31: e93.
- 88) Salgado C (2013). Ateneo de la Investigación y Desarrollo de la Producción Ovina. 30 y 31 de Mayo, SUL. Cerro Colorado, Uruguay, 30p.
- 89) 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.
- 90) Scaramuzzi R J, Campbell B K, Downing J A, Kendall N R, Khalid M, Munoz-Gutierrez M, Somchit A (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* 46: 339-354.
- 91) Scherer P E, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish H F (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270 (45):26746-26749.
- 92) Schneider J E (2004). Energy balance and reproduction. *Physiol Behav.* 81: 289-317.

- 93) Soca P, Carriquiry M, Claramun M, Gestido V, Meikle A (2013). Metabolic and endocrine profiles of primiparous beef cows grazing native grassland. 1. Relationships between body condition score at calving and metabolic profiles during the transition period. *Anim Prod Sci* 54 (7):856-861.
- 94) 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: 447-458.
- 95) Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Forcada F, Martin GB, Palacin I, Meikle A (2009a). Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 36: 13-23.
- 96) Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Vázquez MI, Fernández-Foren A, Talmon M, Forcada F, Meikle A (2009b) Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, 2009, 21, 1–13
- 97) Spencer T E, Johnson G A, Bazer F W, Burghardt R C (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128(6):657-68.
- 98) Stevenson K R, Gilmour R S, Wathes D C (1994). Localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and -II messenger ribonucleic acid and type 1 IGF receptors in the ovine uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 134: 1655-1664.
- 99) Stevenson K R, Wathes D C (1996). Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 108: 31-40.
- 100) Stewart C L, Cullinan E B (1997). Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Dev. Genet.* 21: 91-101.
- 101) Thissen J P, Ketelslegers J M, Underwood L E (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev*, 15: 80-101.
- 102) Ungerfeld R (2011). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, V 1.

- 103) Uribe-Velásquez L F, Oba E, Souza M I L (2008). Efeitos da progesterona exógena sobre o desenvolvimento folicular em ovelhas. *Arq Bras Med Vet Zoot*, 60, (1):58-65.
- 104) Velázquez M.A., Spicer L.J., Wathes D.C. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Dom Anim Endocrinol*. 35:325-342.
- 105) Wathes D C, Reynolds T S, Robinson R S, Stevenson K R (1998). Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Dairy Sci* 81: 1778-1789.
- 106) Watson A J, Westhusin M E, Winger Q A (1999). IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil Suppl* 54: 303-315.
- 107) Wilkins J F, Croker KP (1990). Embryonic wastage in ewes. En. *Oldham, G. B. Martin, I. W. Purvis*. Reproductive physiology of Merino sheep: concepts and consequences. Perth, Austr. School Agr. Univ. Western Austr. p. 169-177.
- 108) Kruesi, William K (1993). Control de pietin en ovinos. Montevideo, INIA, 26 p.
- 109) Wintenberger-Torres S, Flechon J E (1974). Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *J Anat* 118: 143-53.
- 110) Winterberger-Torres S, Sevellec C (1987). Atlas of the early development of the sheep embryo. Paris, INRA, 51 p.
- 111) Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno N H (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769.
- 112) 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.

113) 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* 518(2):262-266.

114) Zhang S, Dominique Blache M A, Blackberry, Graeme B M (2005). Body reserves affect the reproductive endocrine responses to an acute change in nutrition mature male sheep. *Anim Reprod Sci* 88: 257-269.