



## SUBNUTRICIÓN: EFECTOS SOBRE LA SECRECIÓN ENDOMETRIAL DE PGF2 $\alpha$ Y DE FACTORES INVOLUCRADOS EN EL RECONOCIMIENTO MATERNO EN OVEJAS CICLICAS Y PREÑADAS

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

<sup>1</sup>Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Uruguay.

<sup>2</sup>Producción Animal, Universidad de Zaragoza, España

### Resumen

Como la subnutrición afecta la supervivencia embrionaria, se investigó el efecto de la misma sobre la secreción de PGF2a y la expresión de los receptores de estrógenos (REa), progesterona (RP) e interferón-tau (IFNAR) y la enzima ciclooxigenasa 2 (COX 2) en el endometrio de ovejas ciclando y preñadas al día 14 post-celo. La subnutrición no alteró la secreción de PGF2a, pero la gestación sí: animales preñados presentan valores menores que los cíclicos en ambos grupos nutricionales. La subnutrición no alteró drásticamente la expresión génica de los factores vinculados al reconocimiento materno el día 14, por lo que se sugiere que los efectos deletéreos de la misma se ejercen más temprano en el desarrollo embrionario.

### Introducción

Trabajos anteriores han demostrado que la subnutrición en la oveja no altera el número de embriones 8-9 días post-celo, pero disminuye la tasa de preñez en los días 14-15 (ver revisión, 1). Esto sugiere que la subnutrición podría afectar la supervivencia embrionaria a través de alteraciones en el reconocimiento materno de la gestación. En ovinos, la señal que el embrión secreta al elongarse, el interferón t (IFNt) que actúa a través de su receptor endometrial (IFNAR), altera la expresión de genes en el endometrio con el fin de evitar la luteólisis. Hacia el fin de la fase luteal, la pérdida de la dominancia uterina a la progesterona -disminución de los receptores de progesterona (RP) - permite la preparación uterina -estrogénica, con aumento de receptores de estrógenos (REa)- que facilita la luteólisis. El mecanismo propuesto más aceptado es que el embrión inhibe la expresión de REa, y por ende, los de oxitocina imposibilitando así el establecimiento del feedback positivo entre oxitocina-PGF2a responsable de la luteólisis (ver revisión, 2). Por otro lado, se podría modificar la secreción de PGF2a a través de la regulación de la expresión de enzimas (Ciclooxigenasa 2) que participan en su síntesis.

En este estudio se investigó si la subnutrición afecta la expresión de REa, RP, IFNAR y COX 2 al día 14 del ciclo (día donde se establece el reconocimiento materno de la gestación) en ovejas cíclicas y preñadas.

### Materiales y Métodos

Ovejas Rasa Aragonesas (n=48) con un peso vivo de 61,8 $\pm$ 7,7Kg y una condición corporal (CC) de 3,32 $\pm$ 0,4 (escala: 0=emaciada, 5=obesa) fueron asignadas a dos grupos: Grupo

C (control, n=21) que se alimentó con una dieta de mantenimiento (12,4 MJ energía metabolizable) y Grupo B (bajo; n=27) al que se le administró la mitad de los requerimientos diarios por 3 semanas, luego de haber sido sincronizadas; y al estro, 20 ovejas del grupo B y 13 del grupo C fueron servidas. Al día 14 del ciclo estral/preñez se sacrificaron todos los animales; se diagnosticó como preñadas los animales que presentaron embrión. Los 4 grupos considerados fueron Grupo B cíclicas (n=6) y preñadas (n=7), y Controles cíclicas (n=5) y preñadas (n=6), descartándose las ovejas servidas no preñadas (33 fueron servidas y quedaron preñadas, de las cuales 21,2% pertenecen al grupo B y 18,18% al grupo C). Se incubó un trozo de endometrio por 24 hrs. y se determinó la concentración de PGF2a en el medio de cultivo mediante ELISA. La determinación de RE, RP, IFNAR y COX 2 se realizó mediante inmunohistoquímica en muestras endometriales de la zona media del cuerno uterino ipsilateral de cuerpo lúteo. Se realizó un análisis de imagen subjetivo en 5 compartimentos endometriales: epitelio luminal, epitelio glandular superficial, epitelio glandular profundo, estroma superficial y estroma profundo; analizándose 10 campos por compartimento por animal. Se analizaron los datos por procedimiento mixto, el modelo incluyó: efectos del observador, grupo (bajo vs. control), condición (cíclicas vs. preñadas), tipo celular, ubicación celular (superficial vs. profundo) y sus interacciones.

### Resultados y Discusión

La presencia del embrión disminuyó el contenido de PGF2a (preñadas: 0.91  $\pm$  0.15 vs. cíclicas: 1.43  $\pm$  0.16 ng/mg tejido, P<0.01) como ha sido descrito previamente (2), pero no hubo efecto de la nutrición.

Las ovejas cíclicas presentaron mayor contenido de REa que las preñadas (en epitelio luminal del grupo B y en estroma profundo del grupo C); esta aumentada expresión de REa facilitaría la luteólisis como se reportó previamente (2). La subnutrición tendió a aumentar REa en el estroma (superficial y profundo) en ovejas preñadas, lo que indicaría una mayor sensibilidad a los estrógenos. Esta acción estrogénica en estroma podría impactar en el epitelio luminal indirectamente y favorecer la luteólisis.

Las células del epitelio luminal fueron casi totalmente negativas a RP - en acuerdo con la regulación en menos de la P4 sobre su receptor que se evidencia hacia el final de la fase luteal - excepto en el Grupo B cíclico donde el 15 % de las células eran positivas. El RP es un marcador de la acción estrogénica. De hecho en este grupo también se encontraron mayores REa. Por otro lado, no se encontraron diferencias provocadas por el tratamiento.

No hubo efectos de la presencia del embrión o del trata-

miento nutricional sobre Cox 2 que se localizó únicamente en el epitelio luminal, por lo que sugerimos que no juega un rol decisivo en el reconocimiento materno de la preñez o en la mortalidad embrionaria provocada por la subnutrición.

En este estudio se demuestra por primera vez que la presencia del embrión altera la sensibilidad endometrial al IFNt: ovejas control preñadas presentaron menores contenidos del receptor a IFNt (IFNAR) en glándulas y estromas superficiales y profundos. Si bien, una mayor expresión de IFNAR indicaría una mayor sensibilidad del endometrio al IFNt que se esperaría en animales preñados; la regulación en menos de una hormona a su propio receptor es muy conocida y es una forma de limitar la acción de la misma (es decir, el propio IFNt inhibe la expresión de su propio receptor). Se destaca que en el grupo subnutrido no solo no se observó este patrón (cíclicas con mayor IFNt que preñadas) sino que se invirtió en epitelio luminal: los animales cíclicos presentaron menores contenidos que los preñados. Esta alteración en este tipo celular que es clave en el mecanismo de reconocimiento materno podría estar en la base de los mecanismos implícitos en la mortalidad embrionaria temprana.

En conclusión, la presencia del embrión provocó una secreción diferencial de PGF2a endometrial y alteró la expresión génica del endometrio al día 14. Por otro lado, la subnutrición no provocó grandes alteraciones en la expresión de los factores vinculados al reconocimiento materno. Estos resultados sugieren que si la preñez se mantiene -embrión viable- al día 14- es debido a que el embrión logró señalizar adecuadamente de su existencia al entorno uterino y por ende no hay mayores alteraciones de la expresión génica aún cuando la subnutrición es importante (0.5 dieta mantenimiento) sufrida en el período abarcado en este ensayo y partiendo de animales en buena CC. La conclusión no incluye otras situaciones de subnutrición más sostenidas en el tiempo. Por esto, sugerimos que los efectos

deletéreos de la subnutrición sobre la supervivencia embrionaria se provocan antes del momento de reconocimiento materno. En este sentido, Sosa et al. (2004) demostraron que en ovejas subnutridas ya al día 5 - llegada del embrión al útero- hay una deficiencia uterina en la sensibilidad a los esteroides (3).

**Agradecimientos**

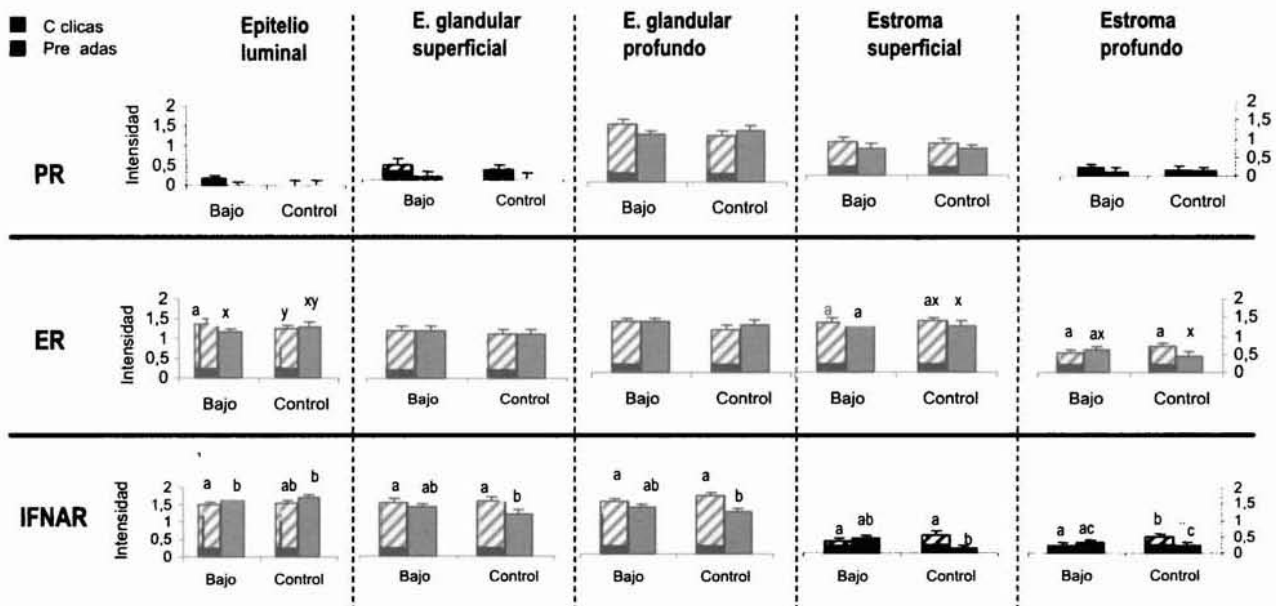
A I.Sartore por su apoyo técnico. Financiación: CICYT (AGL2004-00432/GAN) y DGA (A26), España.

**Summary**

Since embryo survival is affected by undernutrition, we investigated the effect of undernutrition on the endometrial PGF2a secretion and on the expression of estrogen, progesterone and interferon-tau receptors (ERa, PR and IFNAR) and the cyclooxygenase 2 (COX 2) enzyme expression in cyclic and pregnant ewes at day 14 of the cycle. Subnutrition did not affect PGF2a secretion, but the pregnancy affect: pregnant ewes present less values than cyclic for both nutrition groups, and overall did not alter the factors related to maternal recognition of pregnancy suggesting that the detrimental effects of undernutrition are exerted earlier in the embryo development.

**Referencias**

- 1.Abecia et al. *Reprod. Nutr. Dev.* 2006, 46: 367-378.
- 2.Bazer et al. *Anim. Reprod. Sci.* 2004, 82-83: 537-550.
- 3.Sosa et al. *Anim. Rep.Sci* 2004, 84: 337-348.



**Figura 1.** Intensidad de tinción del receptor de progesterona (PR), estrógenos (ERa) e interferón-t (IFNAR) en ovejas control (dieta de mantenimiento) y subnutridas (bajo, 0.5 dieta de mantenimiento), cíclicas (barras rayadas) o preñadas (barras grises) el día 14 del ciclo estral/ preñez, en los diferentes compartimentos celulares. Grupo control: cíclicas, n = 5 y preñadas, n = 6; Grupo bajo: cíclicas, n = 6 y preñadas, n = 7. a,b,c: P < 0.05. a, x, y: P < 0.1.